

**Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
der Universität Würzburg
Leitung: Professor Dr. Jürgen Groll**

**Aufbau, Charakterisierung und Validierung eines in vitro
Zellkulturmodells des pankreatischen Adenokarzinoms**

**Structure, characterisation and validation of an in vitro cell
culture model of pancreatic adenocarcinoma**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jonas Strulik

aus Würzburg

Würzburg, April 2021



Referent/Referentin: Priv.-Doz. Dr. Marco Metzger

Koreferent/Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll,

i.V. Univ.-Prof. Dr. Torsten Blunk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2021

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des pankreatischen Adenokarzinoms	1
1.2 Stadieneinteilung.....	2
1.3 Gängige Therapieformen	3
1.3.1 Operative Therapie	4
1.3.2 Chemotherapie	5
1.3.2.1 Wirkungsweise von Gemcitabin.....	6
1.3.3 Grenzen der Behandlungsmöglichkeiten	7
1.4 Klassische Tumormodelle.....	8
1.4.1 2D-Modelle	8
1.4.2 Mausmodelle	9
1.5 Tissue Engineering.....	10
1.5.1 Die Rolle der EZM in der Tumorentwicklung.....	11
1.5.2 Entwicklung und Testung neuer pharmakologischer Therapieansätze	12
1.6 Biolumineszenz-Bildgebung in der Krebsforschung.....	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothesen.....	16
2. Material.....	18
2.1 Antikörper	18
2.2 Biologisches Material	18
2.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur	19
2.4 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie	20
2.5 Verbrauchsmaterialien	21
2.7 Geräte.....	21
2.8 Software	22
3. Methoden.....	23
3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	23
3.1.1 Zellkultur.....	23

3.1.2 Auftauen von Zellen.....	23
3.1.3 Passagieren von Zellen.....	23
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	24
3.1.5 Einfrieren von Zellen	24
3.2 Dreidimensionale Zellkultur	25
3.2.1 Fixierung von dezellularisiertem Gewebe in Zellkronen.....	25
3.2.2 Zellkultur auf dezellularisiertem Gewebe.....	25
3.3 Histologie.....	26
3.3.1 Fixierung von Gewebe	26
3.3.2 Einbetten und Schneiden von Gewebe.....	26
3.3.3 Entparaffinieren und Rehydrieren.....	27
3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung	27
3.3.5 Immunfluoreszenzfärbung	28
3.3.6. Bestimmung der Proliferationsrate.....	29
3.3.7. Bestimmung der Differenzierung von Tumorzellen	29
3.4 Bestimmung der Verdopplungszeit.....	30
3.5 Biolumineszenzbasiertes Messverfahren.....	30
3.5.1 Lumineszenz-Intensität in 2D	30
3.5.2 Lumineszenz-Intensität in 3D	31
3.5.3 BLI basiertes 3D-Tumormodell	31
3.5.4 Behandlung im BLI basierten 3D-Tumormodell	31
3.6 Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated-cell-sorting; FACS).....	32
3.7 Mikroskopie	32
3.8 Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse	34
4.1 PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen sind in ihrem Wachstumsverhalten vergleichbar.....	34
4.2 Analyse der Transduktionseffizienz der FLUC PANC-1 Zelllinie.....	35
4.3 Lumineszenz-Intensitäten und Zellzahlen von PANC-1 FLUC zeigen in 2D einen linearen Zusammenhang	36
4.4 Lumineszenz-Signale von PANC-1 in 2D sind auszuschließen.....	38

4.5 Lumineszenz-Intensitäten und Zellzahlen von PANC-1 FLUC zeigen im 3D-Modell einen linearen Zusammenhang.....	39
4.6 Validierung des biolumineszenzbasierten 3D-Tumormodells.....	41
4.6.1 Lumineszenz-Intensitäten von PANC-1 FLUC im 3D Tumormodell visualisieren den Anstieg der Zellzahl	42
4.6.2 Die Proliferationsrate von PANC-1 FLUC ist auf der PanMa und SISser vergleichbar	44
4.6.3 PANC-1 FLUC exprimieren im 3D-Tumormodell charakteristische Marker	47
4.7 Die Behandlung von PANC-1 FLUC mit Gemcitabin lässt sich durch BLI detektieren.....	50
5. Diskussion	52
5.1 Biolumineszenzbasierte Messverfahren	52
5.2 Zelllinien	54
5.3 Matrix des BLI Tumormodells	54
5.4 Detektion der Behandlung von PANC-1 FLUC mittels BLI.....	56
6. Ausblick.....	58
Zusammenfassung	59
Summary	60
Literaturverzeichnis	61
Danksagung.....	69
Lebenslauf	70
Anhang.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Operationsverfahren	4
Abbildung 2 Gemcitabin (dFdC) Muster und Wirkmechanismen	7
Abbildung 3 Prinzip des BLI im Tumormodell.....	15
Abbildung 4 Population Verdopplung von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen.	35
Abbildung 5 GFP ⁻ PANC-1-Zellen und GFP ⁺ PANC-1 FLUC Zellen	36
Abbildung 6 Lumineszenz-Intensität PANC-1 FLUC in 2D	37
Abbildung 7 Vergleich der Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC und PANC-1 in 2D	39
Abbildung 8 Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC in 3D	41
Abbildung 9 Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC im 3D-Tumormodell.....	42
Abbildung 10 Repräsentative Aufnahmen von PANC-1 FLUC im 3D-Tumormodell..	43
Abbildung 11 Proliferation von verschiedenen PANC-1 FLUC Zellzahlen im Tumormodell	45
Abbildung 12 Mikroskopische Aufnahmen der PANC-1 FLUC-Zellen auf der PanMa48	
Abbildung 13 Mikroskopische Untersuchungen der PANC-1 FLUC-Zellen auf der SISser.....	49
Abbildung 14 Behandlungsversuch der PANC-1 FLUC Zellen im validierten Tumormodell mit Gemcitabin	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 UICC TNM-Klassifikation, 8. Auflage, 2018	2
Tabelle 2 UICC Stadium und Überlebensrate (Hartwig & Buchler, 2013).....	3
Tabelle 3 Liste der Antikörper.....	18
Tabelle 4 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	19
Tabelle 5 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie.....	20
Tabelle 6 Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 7 Geräte.....	21
Tabelle 8 Software.....	22
Tabelle 9 Zellzahl und Zelldichte pro Zellkrone	25
Tabelle 10 Paraffineinbettung	26
Tabelle 11 Entparaffinieren und Rehydrieren	27
Tabelle 12 H&E-Färbung	28
Tabelle 13 Immunfluoreszenzfärbung.....	28
Tabelle 14 Zellkerne pro Aufnahme SISser	46
Tabelle 15 Zellkerne pro Aufnahme PanMa	46

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
BLI	Biolumineszenzeimaging; Biolumineszenzbildgebung
Bzw.	Beziehungsweise
CCD	Charge-coupled-device
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FLUC	Firefly luciferase
GFP	Green fluorescence protein
IVIS	In Vivo Imaging System
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
PanMa	Pankreasmatrix
ROI	Region of Interests
SISser	Small-Intestine-Submucosa mit Serosa
SOP	Standard Operating Protocol; Standardverfahren
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
UICC	Union for International Cancer Control
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des pankreatischen Adenokarzinoms

Mit über 450.000 Neuerkrankungen im Jahr 2018 und einer Mortalitätsrate von 4,5% bezogen auf alle Tumortote ist das Pankreaskarzinom in Deutschland an vierter Stelle der krebisbedingten Todesursachen und eine der tödlichsten Tumorerkrankungen weltweit (Bray et al., 2018; Robert-Koch-Institut, 2019). Die beiden häufigsten Tumorarten des Pankreas sind mit 85% das exokrine von den Pankreasgängen ausgehende duktaie Adenokarzinom und mit 5% der Fälle endokrine von den Inseln der Bauchspeicheldrüse ausgehende Tumore (Bray et al., 2018).

Die 5-Jahres-Überlebensrate von nur 9% für Patienten mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom spiegelt eine äußerst ungünstige Prognose wider. Bei 80 - 90% der Patienten ist der Tumor bereits bei Diagnosestellung nicht mehr operabel, aber auch bei erfolgreicher Resektion ist die Prognose schlecht (Bosetti et al., 2012; Lambe et al., 2011; Oberstein & Olive, 2013). Das durchschnittliche Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken liegt in Deutschland bei 1,8% (Robert-Koch-Institut, 2019). Unzureichende Verfahren zur Früherkennung sowie begrenzte Behandlungsmöglichkeiten sind hauptsächlich für die äußerst schlechte Prognose des Karzinoms verantwortlich (Karim-Kos et al., 2008). In Deutschland steigt die Anzahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle laut dem Robert-Koch-Institut kontinuierlich. Als Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Pankreaskarzinom gelten neben einer genetischen Disposition mit positiver Familiengeschichte die beeinflussbaren Faktoren wie Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, Fettleibigkeit, Ernährung, Alkoholkonsum oder körperliche Inaktivität. Wie diese Risikofaktoren die Entstehung von Pankreaskarzinomen im Detail begünstigen, ist noch nicht ausreichend verstanden. Aufgrund der schwierigen Früherkennung ist die primäre Prävention daher von größter Bedeutung (Ilic & Ilic, 2016).

1.2 Stadieneinteilung

Die anatomische Ausbreitung von Krebserkrankungen wird durch die TNM-Klassifizierung anhand der Faktoren Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen bestimmt und entsprechenden klinischen Tumorstadien nach der Union for International Cancer Control (UICC) zugeordnet (Tabelle 1 & 2).

Tabelle 1 UICC TNM-Klassifikation, 8. Auflage, 2018

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor infiltriert in Pankreas oder peripankreatisches Weichgewebe
T4	Tumor infiltriert den Truncus coeliacus und/oder die Arteria mesenterica superior
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in einem einzelnen regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in mehreren regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2 UICC Stadium und Überlebensrate (Hartwig & Buchler, 2013)

Stadium	Resektabilität	Mediane Überlebensrate, Monate	5-Jahres Überlebensrate, Prozent
0 (Tis, N0, M0)	resektabel	Keine Angabe	Keine Angabe
IA (T1, N0, M0)	resektabel	24–42	31–39
IB (T2, N0, M0)	resektabel	20–26	22–27
IIA (T3, N0, M0)	resektabel, im fortgeschrittenen Stadium borderline resektabel	15–30	16–25
IIB (T1–3, N1, M0)	resektabel, im fortgeschrittenen Stadium borderline-resektabel	12–21	8–10
III (T4, jedes N, M0)	Borderline-resektabel oder palliativ	11–14	0–7
IV (jedes T, jedes N, M1)	palliativ	5–12	0–4

Die Klassifikation und Stadieneinteilung sind entscheidend für die Prognose und Therapie des Pankreaskarzinoms. Dabei ist die Chemotherapie in allen Stadien (Stadium I-IV) obligat. Um die äußerst geringen Überlebensraten (Tabelle 2) zu erhöhen, ist die Forschung an neuen Therapeutika und die Entwicklung passender Testsysteme essenziell.

1.3 Gängige Therapieformen

Die radikale chirurgische Resektion des Tumors ist bis heute die einzig kurative Behandlung. Zusätzlich wird bereits in frühen Tumorstadien die Überlebensrate durch adjuvante Chemotherapie oder neo-adjuvante Behandlungsmöglichkeiten erhöht

(McGuigan et al., 2018). Voraussetzung für den Beginn einer Chemotherapie ist immer die exakte histopathologische Klassifikation des Pankreastumors.

1.3.1 Operative Therapie

Ziel der chirurgischen Behandlung ist die Entfernung des Tumors im Gesunden, die sogenannte R0-Resektion. Histopathologisch ist dabei kein Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar. Die chirurgische Resektion dient der Entfernung des Tumors unter Verschonung lebensnotwendiger Organanteile und Gefäße. Das chirurgische OP-Verfahren richtet sich dabei nach der anatomischen Lage des Tumors und der Stadieneinteilung nach UICC-Kriterien (Tabelle 2).

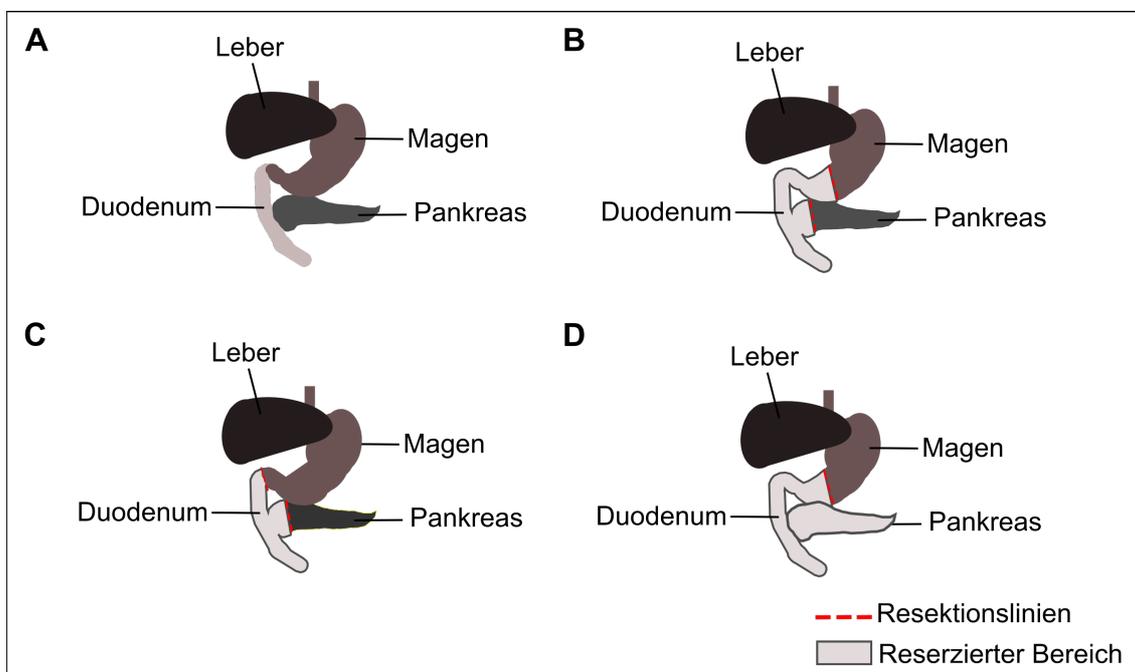


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Operationsverfahren

Die Abbildung A zeigt die physiologische Lagebeziehung der Pankreas und der benachbarten Organe. In B wird die klassische Whipple- und in C die pyloruserhaltende Operation vereinfacht dargestellt. Abbildung D zeigt die schematische Darstellung einer totalen Duodenopankreatektomie. Eigene Darstellung.

Befindet sich das Karzinom im Pankreaskopf ist die klassische Whipple (Abb. 1B) oder die pyloruserhaltende Operation (Abb. 1C) indiziert (Yang et al., 2014). Bei beiden Operationsverfahren werden der Pankreaskopf, das Duodenum, die Gallenblase, Teile des Gallengangs und regionale Lymphknoten entfernt, um somit eine komplette Tumorfreiheit zu erreichen. Bei der pyloruserhaltenden Operation verzichtet man auf eine

zusätzliche Resektion des distalen Magens und verringert damit die postoperativen Komplikationen und Einschränkungen der Patienten.

Bei Lokalisation im Pankreaskorpus wird eine totale Duodenopankreatektomie (Abb. 1D) und bei Karzinomen im Pankreasschwanz eine Pankreaslinksresektion durchgeführt (Christein et al., 2005; Shoup et al., 2003). Der chirurgische Eingriff ist jedoch mit einer hohen Komplikationsrate von 30 - 50% vergesellschaftet. Zu den schwerwiegendsten Komplikationen zählen postoperative Pankreasfisteln, biliäre Komplikationen und Blutungen (Mischinger et al., 2018). Zudem gibt es strenge Indikationsstellungen für eine operative Therapie. Fernmetastasen oder lokal nicht resezierbare Pankreaskarzinome schließen eine R0-Resektion aus. Hier offenbaren sich die Grenzen der chirurgischen Therapie. Darüber hinaus ist bei einer operativen Intervention eine adjuvante Chemotherapie obligat. Dies unterstreicht den klinischen Bedarf an neuen Therapeutika.

1.3.2 Chemotherapie

Chemotherapeutika sind Medikamente zur Tumorthherapie, die möglichst selektiv Tumorzellen abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen. Dadurch verbessern sich die Behandlungsoptionen vor oder nach chirurgischer Resektion oder als alleinige Behandlungsmethode. Es wird zwischen kurativer, adjuvanter und palliativer Chemotherapie unterschieden.

Die Anwendung der adjuvanten Chemotherapie bei Pankreaskarzinomen wurde durch die randomisierte CONKO-001-Studie, die adjuvantes Gemcitabin nach vollständiger chirurgischer Resektion gegen eine alleinige Operation verglich, obligat. Diese Studie zeigte eine Erhöhung der 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate der Patienten von 10,4% auf 20,7% und eine Erhöhung der 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 7,7% auf 12,2% bei adjuvanter Gemcitabin Therapie (Oettle et al., 2007). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse verbesserte sich das Gesamtüberleben jedoch nur von 20 auf 23 Monate (J. P. Neoptolemos et al., 2010). In nachfolgenden Studien (ESPAC-3 / ESPAC-4) wurde Gemcitabin mit 5-Fluoruracil, sowie die duale Therapie von Gemcitabin / Capecitabin mit der Gemcitabin Monotherapie verglichen. 5-Fluoruracil weist vergleichbare Überlebensergebnisse auf wie Gemcitabin, ist jedoch mit stärkeren Nebenwirkungen wie Neutrophilie, Fieber, Müdigkeit und Diarrhö, verbunden (J. P. Neoptolemos et al., 2010). Die duale Therapie hingegen erhöht das mediane Gesamtüberleben von 25,5 auf 28 Monate (John P. Neoptolemos et al., 2017).

In der randomisierten klinischen Studie PRODIGE24/CCTG wurden die Ergebnisse von Gemcitabin und modifiziertem FOLFIRONOX (eine Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan und Leucovorin) bei Patienten mit einer R1- oder R0-Resektion des Pankreaskarzinoms verglichen (Conroy et al., 2018). Die Therapie mit modifiziertem FOLFIRONOX führt im Vergleich zu Gemcitabin zu einer verlängerten Gesamtüberlebensrate, verursacht jedoch stärkere Nebenwirkungen, wie Diarrhö, Parästhesie, Müdigkeit, sensorische periphere Neuropathie, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Mukositis (Conroy et al., 2018). Daher wird FOLFIRONOX ausschließlich bei Patienten mit einem guten Allgemeinzustand verwendet. Als Maßstab für den Allgemeinzustand dient der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) Status. In der aktuellen S3-Leitlinie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms (2013) wird als adjuvante Standardchemotherapie die Anwendung von Gemcitabin oder 5-Fluoruracil empfohlen und als palliative Therapie die Anwendung von FOLFIRONOX oder Gemcitabin. Seit 2014 steht neben den genannten Therapeutika die Kombinationstherapie von Gemcitabin und Paclitaxel zur Verfügung (Von Hoff et al., 2013). In der randomisierten Phase-III Studie MPACT hat sich das mediane Gesamtüberleben im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie erhöht. Das wasserunlösliche Paclitaxel wird an Albumin gebunden und somit gezielter in Tumoren angereichert.

Die Chemotherapie sollte gemäß der CONKO-001-Studie spätestens sechs Wochen nach der Resektion begonnen werden und 6 Monaten lang andauern, um in diesem Zeitraum ein rezidivfreies Gesamtüberleben zu erreichen.

1.3.2.1 Wirkungsweise von Gemcitabin

Da das in dieser Arbeit entwickelte in vitro Modell des Adenokarzinoms mittels des Standardtherapeutikums Gemcitabin auf seine Tauglichkeit als potentiell präklinisches Testsystems untersucht wurde, soll im Folgenden detaillierter auf die Wirkungsweise von Gemcitabin eingegangen werden.

Gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-desoxycytidin; dFdC) ist ein Desoxycytidin-Nukleosid-Analogon und wirkt hemmend auf die DNA-Synthese am Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Huang et al., 1991). Es wird durch verschiedene Nukleosidtransporter (NT) in die Zelle aufgenommen und intrazellulär durch Nukleosidkinasen zum pharmakologisch aktiven Diphosphat-Nukleosid (dFdCDP) und Triphosphat-Nukleosid (dFdCTP) metabolisiert. Der wichtigste zelluläre Metabolit von

Gemcitabin, dFdCTP, wird anstelle von Desoxycytidintriphosphat in die DNA eingebaut. Dadurch kann dFdCTP durch einen maskierten Kettenabbruch während der Replikation die DNA-Synthese hemmen und den Zelltod durch Apoptose herbeiführen (Huang et al., 1991; Mini et al., 2006). Ebenso werden dFdCTP und dFCDP in die RNA eingebaut und hemmen so die RNA-Synthese.

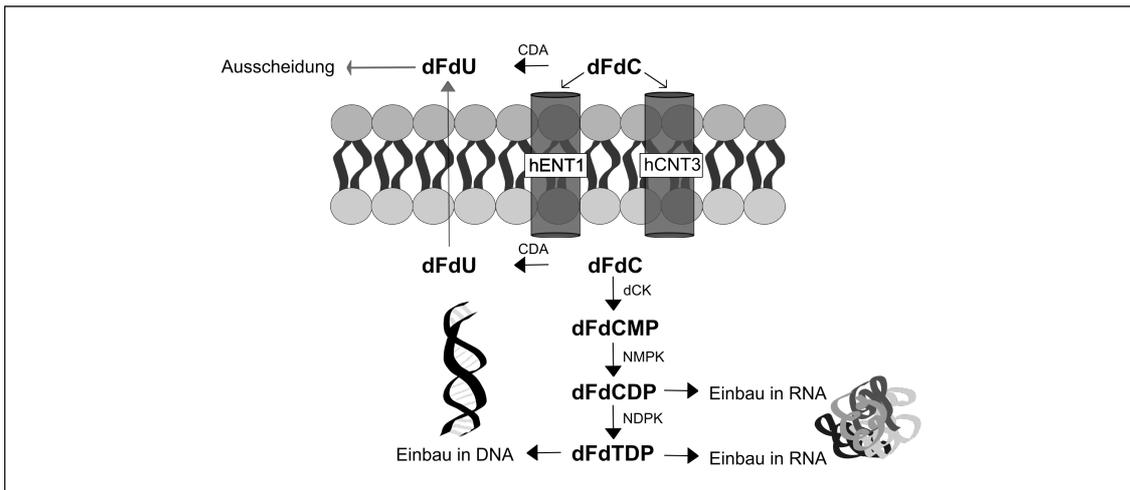


Abbildung 2 Gemcitabin (dFdC) Muster und Wirkmechanismen

CDA: Cytidin-Desaminase, dCK: Desoxycytidinkinase, NMPK: Nucleotidmonophosphatkinase, NDPK: Nucleotiddiphosphatkinase, hENT1: humaner äquilibrativer Nucleosidtransporter-1, hCNT3: humaner konzentrativer Nucleosidtransporter-3, Abbildung modifiziert nach Ciccolini et al. (2016)

Der größte Teil des verabreichten Gemcitabins wird jedoch durch eine schnelle Cytidin induzierte Desaminierung in der Leber und in geringem Anteil im Blut zu Difluordesoxyuridin (dFdU) inaktiviert (Shiple et al., 1992). Mehr als 75% des Gemcitabins wird in den ersten 24 Stunden zu dFdU metabolisiert und im Urin ausgeschieden (Peters et al., 2007). Daher wurde in einer Reihe von Phase-I-Studien die Möglichkeit untersucht, die Dauer der Infusionszeit zu verlängern oder die Dosis zu erhöhen. Jedoch führte weder die verlängerte Infusionszeit noch die Erhöhung der Dosis zu signifikant erhöhten Überlebensraten (Bengala et al., 2005).

1.3.3 Grenzen der Behandlungsmöglichkeiten

Sowohl die chirurgische als die auch die medikamentöse Therapie sind in ihrer Indikation und Wirkungsweise limitiert. Hier sind neben der strengen Indikationsstellung für eine operative Therapie, bei der lediglich 10-20% der Tumore operabel sind, die moderate

Wirksamkeit der gängigen Therapeutika zu nennen (siehe 1.3.2). Beachtet man zusätzlich die Aggressivität des Pankreaskarzinoms mit medianen Überlebensraten von wenigen Monaten (siehe Tabelle 2) wird der dringende klinische Bedarf neuartiger Behandlungsmöglichkeiten deutlich.

1.4 Klassische Tumormodelle

Die Entwicklung neuer Therapieansätze beruht derzeit auf klassischen Modellsystemen wie der 2D-Zellkultur und Mausmodellen. Die klassischen Tumormodelle sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.4.1 2D-Modelle

Aktuelle Therapiestrategien für Pankreaskarzinome werden bislang überwiegend in 2D-Kultursystemen entwickelt, die die physiologischen Bedingungen *in vivo* allerdings nur unzureichend widerspiegeln. Die Tumorentstehung wird nicht nur durch genetische Veränderungen in der Tumorzelle selbst reguliert, sondern auch durch ihre Umgebung und Wechselwirkungen zwischen Stromazellen und Zellen, die die Tumorentwicklung steuern. Herkömmliche 2D-Tumormodelle, die auf Kunststoff kultivierten Krebszelllinien basieren, weisen im Vergleich zur nativen Mikroumgebung keine histologische Komplexität und Funktionalität auf und können daher die *in vivo* Bedingungen nicht reproduzieren (Hanahan & Weinberg, 2011).

Die fehlenden physiologischen Wechselwirkungen in konventionellen 2D-Modellen könnten ein Grund für die moderate Wirksamkeit der bisherigen Therapeutika in der Pankreaskarzinomtherapie sein. Daher sind neue Testsysteme, die sich den *in vivo* Bedingungen annähern, für die präklinische Forschung zwingend erforderlich. In 2D-Modellen wird grundsätzlich mit Zelllinien gearbeitet, die aus humanen Pankreaskarzinomzellen entstanden. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie PANC-1 sind AsPC-1, BxPC-3 und MIA PaCa-2 die gängigsten Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms (W. H. Chen et al., 1982; Lieber et al., 1975; Tan et al., 1986; Yunis et al., 1977). Die Eigenschaften der Zelllinien sind ausgiebig in einer Übersichtsarbeit beschrieben (Deer et al., 2010).

1.4.2 Mausmodelle

Für die Marktzulassung werden Arzneimittel in konventionellen Mausmodellen bezüglich der Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit validiert. Aufgrund der artspezifischen Unterschiede zwischen Maus und Menschen wie z.B. Stoffwechsel, Körpergewicht und Lebenszeit, lassen sich die Wirkungen *in vivo* jedoch nicht umfassend vorhersagen (Schenke-Layland & Nerem, 2011). Im Folgenden werden gängige Mausmodelle des Pankreaskarzinoms genannt und auf ihre Problemstellungen hingewiesen.

Bei syngenem Mausmodellen werden artgleiche, kompatible Zellen oder Gewebe subkutan oder orthotop in Mäuse implantiert. Als repräsentatives Beispiel eines syngenem Modells sind hier Pan02 Tumore zu nennen, welche durch 3-Methylcholanthren getränkte implantierte Baumwollfäden in einem männlichen Mausmodell entwickelt wurden (Corbett et al., 1984). Die Pan02 Tumorzellen zeigen jedoch hohe Resistenzen gegen Chemotherapeutika und im Gegensatz zu humanen Pankreaskarzinomen eine hohe Mutationsrate. Die am häufigsten im humanen Pankreaskarzinom auftretenden Mutationen des KRAS-Protoonkogens und des TP53-Tumorsuppressorgens konnten nicht nachgewiesen werden (Waddell et al., 2015; Wang et al., 2012). Diese Aspekte schränken die Eignung als präklinisches Modellsystem ein (Pham et al., 2021). Um sich dem zellbiologischen Milieu in humanen Pankreaskarzinomen zu nähern, wurden gentechnisch modifizierte Mausmodelle (GEEM) mit der TP53 und KRAS Mutation etabliert. Eines der am häufigsten untersuchten GEEM ist das LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx1-Cre (KPC) Modell. Die KPC-Mäuse zeigen histopathologische Merkmale humaner Pankreaskarzinome wie Desmoplasien und schlechte Vaskularität (Waddell et al., 2015; Wang et al., 2012). Trotz der vergleichbaren Tumorumgebung konnten einige Therapiekombinationen, die im KPC Modell festgelegt wurden, nicht die erhofften Wirkungen bei Patienten erzielen (Pham et al., 2021). Ebenso wie syngene Modelle und GEMM werden von Patienten abgeleitete Xenotransplantat-Mausmodelle (PDX) in der präklinischen Tumorforschung verwendet. Dabei wird chirurgisch reseziertes Tumorgewebe aus Patienten in immungeschwächte Mäuse implantiert (Hidalgo et al., 2014). Dadurch können zwar Therapiestrategien an Tumorzellen in ihrer annähernd gewohnten Umgebung untersucht werden, die fehlende Immunantwort sorgt jedoch für eine schwierige Übertragbarkeit auf das humane System. Das Versagen der

validierten Therapiekombination in Mausmodellen bei klinischen Studien kann multifaktoriell sein, ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt (Pham et al., 2021). Als ein möglicher Grund werden v.a. die Unterschiede im Immunsystem von Mäusen bzw. Menschen genannt (Li et al., 2018). Weitere Faktoren für die schwer vorhersagbare Wirksamkeit von Medikamenten ist die geringere genetische Vielfalt von Mäusen, sowie das artspezifisch unterschiedliche Stroma (Garrido-Laguna et al., 2011; Jones et al., 2008). Die größte Herausforderung in der Etablierung von Mausmodellen für die Entwicklung neuer Therapiestrategien liegt in dem zeitlichen Faktor und den unterschiedlichen physiologischen Bedingungen (v.a. Immunreaktion) in Mäusen bzw. Menschen (Pham et al., 2021). In KPC-GEMM sind die Tumore erst nach 12-14 Wochen nachweisbar und der Aufbau eines PDX-Modells kann sogar bis zu 6 Monate andauern (Pham et al., 2021). Die lange Zeitdauer zum Aufbau von Mausmodellen ist hinsichtlich der geringen medianen Überlebensraten bei an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten (Tabelle 2) äußerst ungünstig und zeigt den Bedarf an neuartigen Testsystemen für die präklinische Tumorforschung. Untersuchungen zu grundlegenden Aspekten des Tumorverhaltens könnten an neuen aussagekräftigen Modellsystemen des Tissue Engineerings erfolgen, um die Wirksamkeit und Weiter- bzw. Neuentwicklung von Medikamenten zu fördern.

1.5 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches biologische Gewebe und Implantate konstruiert, die die normale Funktion in erkrankten und verletzten Geweben wiederherstellen sollen. Die künstlichen Gewebe dienen darüber hinaus auch als *in vitro* Testsysteme für eine Vielzahl an Fragestellungen und Anwendungen z.B. in der pharmakologischen Forschung zur Ermittlung von Toxizität und Wirkung bekannter, aber auch neuentwickelter Substanzen. Vor allem die Entwicklung von humanen Testsystemen war in den letzten Jahren entscheidend für die Grundlagenforschung und die Weiterentwicklung pharmakologischer Substanzen. Die zu kultivierenden Zellen werden aus Zelllinien oder aus Stammzellen gewonnen. Durch die Entwicklung humaner Testsysteme nähert man sich den *in vivo* Systemen an, erhält aussagekräftigere Daten als aus Tiermodellen und handelt gleichzeitig nach dem ethischen 3R-Prinzip Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern) und Refine

(Verbessern) von Tierversuchen. Die Annäherung an die *in vivo* Situation durch humane Testsysteme dient der Darstellung des komplexen Zusammenspiels von Zellen mit ihrer natürlichen Umgebung. Dadurch lassen sich zelluläre Prozesse in ihrer gesamten Natur darstellen, untersuchen und verstehen. Ein wichtiger Bestandteil der zellulären Umgebung ist dabei die extrazelluläre Matrix (EZM).

1.5.1 Die Rolle der EZM in der Tumorentwicklung

Die EZM umfasst ein Netzwerk aus sezernierten organischen Komponenten. Neben einer strukturgebenden Funktion ist die EZM in eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung, regulierend eingebunden und leistet einen essentiellen Beitrag zur Gewebemöostase (Bonnans et al., 2014; Frantz et al., 2010; Hynes, 2009; Walker et al., 2018). Die Gewebemöostase ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose. Dadurch sind konstante Bedingungen für physiologische Prozesse gegeben. Darüber hinaus ist die EZM für die Eigenschaften jedes Organs wie Elastizität, Druck- und Zugfestigkeit verantwortlich (Walker et al., 2018). Die physiologische Funktion der EZM wird durch die Struktur und Zusammensetzung ihrer Hauptkomponenten Kollagen, Proteoglykane, Fibronectin und Laminin und ihrer Subtypen beeinflusst (Walker et al., 2018). Da jedes Organ eine einzigartige Kombination dieser Bestandteile besitzt, können organspezifische EZM unterschiedliche Funktionen erfüllen, die für eine geregelte Körperfunktion wichtig sind. Die Produktion und Zusammensetzung der Komponenten verändert sich dabei stetig. Ein radikaler Umbau oder die Zerstörung von Matrixgewebe sind jedoch Kennzeichen vieler bösartiger Tumore. Dabei ist die kontinuierliche Interaktion zwischen EZM und Tumorzellen entscheidend für das Tumorwachstum. Bei vermehrten Ablagerungen von Matrixproteinen wird die Zell-Zell-Adhäsion gestört und es kommt zu einem rascheren Tumorwachstum (Paszek et al., 2005). Durch die Tumorzellvermehrung steigt die mechanische Belastung der Basalmembran, die eine natürliche Barriere gegenüber Tumorzellinvasionen in das umliegende Gewebe, die Metastasierung, darstellt. Die stärkeren physikalischen Kräfte ermöglichen den Tumorzellen das Durchdringen der Basalmembran (Kelley et al., 2014). Weiterhin nimmt die Matrixumgebung, insbesondere ihre Festigkeit, Einfluss auf das Verhalten von Tumorzellen (Reid et al., 2017). Reid et. al zeigt, dass eine steifere Matrix zu einer vermehrten Adhäsion von Tumorzellen am Endothel führt und somit eine Metastasierung beschleunigt wird.

Umbaumaßnahmen innerhalb der EZM erfolgen hauptsächlich durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und dienen dem Aufrechterhalten der Gewebekomplexität (Jablonska-Trypuc et al., 2016). Der Verlust dieser führt zu einem erhöhten Krebsrisiko (Cox & Erler, 2011). Die Induktion von Umbaumaßnahmen wird durch mechanische Wechselwirkungen zwischen Zellen und der EZM (Zell-Matrix-Kontakte) sowie Zellen innerhalb der EZM (Zell-Zell-Kontakte) und ihren nachgeschalteten Signaltransduktionen reguliert. Eine besondere Rolle nimmt die EZM in der Progression des Pankreaskarzinoms ein. Pankreaskarzinome weisen hochgradige desmoplastische und fibrotische Merkmale auf. Diese Bedingungen hemmen die Wirksamkeit von Therapeutika und fördern das Tumorwachstum (Cid-Arregui & Juarez, 2015). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von EZM assoziierten Proteinen von Tumorzellen zu einer früheren Metastasierung und geringeren Überlebensraten bei Patienten mit einer Pankreaskarzinomerkankung führt (Tian et al., 2019). Dieses Beispiel verdeutlicht die Bedeutung der EZM in der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren. Die Forschung an Tumormodellen mit EZM Komponenten hat damit besonderen Stellenwert.

1.5.2 Entwicklung und Testung neuer pharmakologischer Therapieansätze

Für die Entwicklung neuer Therapeutika in der Krebstherapie sind *in vitro* Modelle notwendig, welche dem humanen System entsprechen. Einen neuartigen Ansatz bietet das Tissue Engineering mit dem Aufbau von 3D *in vitro* Tumormodellen. Damit können Therapiestrategien, die *in vitro* entwickelt werden, erfolgsversprechender auf den Menschen übertragen und Tierversuche nach dem 3R-Prinzip reduziert werden.

Die 3D *in vitro* Tumormodelle dienen als Zwischenschritt zwischen der 2D-Zellkultur und konventionellen Mausmodellen. In 3D-Modellen werden Zelllinien oder primäre Zellen auf einer Trägerstruktur (engl. Scaffold oder Matrix) kultiviert. Die Matrix besteht aus den natürlichen Komponenten der EZM (siehe 1.5.1). Diese Grundbausteine lassen sich um weitere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten oder Wachstumsfaktoren, die das Verhalten und Wachstum der Tumorzellen entscheidend beeinflussen können, zu einem komplexeren Modell erweitern (Kuen et al., 2017). Durch den Einbau der EZM und weiterer Zelltypen nähert man sich durch die erhöhte Komplexität des Tumormodells der *in vivo* Situation. Dadurch kann die Wirkung von Therapeutika zuverlässiger vorhergesagt werden. Eine bekannte Problematik der 2D-Zellkultur ist eine im Vergleich

zur *in vivo* Situation überhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen. Die entwickelten Therapiestrategien aus 2D-Zellkulturen lassen sich daher nur bedingt *in vivo* übertragen. 3D-Modelle zeigen hingegen eine deutlich geringere Proliferationsrate der Tumorzellen als herkömmliche 2D-Zellkulturen (Stratmann et al., 2014; Yamada & Cukierman, 2007). Die 3D-Komplexität wirkt sich jedoch nicht nur auf das proliferative Verhalten der Tumorzellen aus, sondern auch auf ihre Morphologie sowie die Signaltransduktion. Diese Faktoren nähern sich durch eine 3D-Kultur mit Adhäsion an die EZM den *in vivo* Verhältnissen (Hutmacher et al., 2009; Schliermann et al., 2013; Weaver et al., 1997). Zusammenfassend spiegelt die komplexe Umgebung der EZM in einem 3D *in vitro* Tumormodell und ihre Auswirkung auf Proliferationsverhalten, Therapieverhalten und Signalübertragung der Tumorzellen, die *in vivo* Situation exakter wider als herkömmliche 2D-Modelle (Wallis et al., 2007). Als repräsentative Beispiele für etablierte 3D *in vitro* Modelle mit implementierter EZM, sind die am Lehrstuhl für Tissue Engineering Würzburg entwickelten Tumormodelle für Darm-, Lungen- und Brustkarzinome zu nennen (Gottlich et al., 2018; Gottlich et al., 2016; Stratmann et al., 2014; Wallstabe et al., 2019). Neben der auch hier beschriebenen geringeren Proliferationsrate der Tumorzellen, konnten ebenfalls eine höhere Expression von tumorspezifischen Markern im Vergleich zur 2D-Zellkultur gezeigt werden (Stratmann et al., 2014). Darüber hinaus zeigen Tumorzellen in 3D-Modellen ein anderes Ansprechverhalten auf Chemotherapeutika als in herkömmlichen 2D-Modellen (Gottlich et al., 2016; Stratmann et al., 2014). Die Ergebnisse veranschaulichen das enorme Potential von 3D *in vitro* Modellen für die präklinische Entwicklung neuartiger Therapeutika. Prospektiv könnte die Kultivierung von Primärzellen auf einer Matrix mit Gefäßstrukturen in einem dynamischen Modell darauf aufbauend den nächsten Schritt zur personalisierten Medizin darstellen (Moll et al., 2013).

Zusammenfassend ermöglichen 3D *in vitro* Modelle vor der Validierung von Arzneimitteln in Tierversuchen eine bessere Adaption an das humane System, um so genauere Vorhersagen für die Wirkungen zu ermöglichen. Zusätzlich wird durch die sensitiveren Substanzen die Anzahl der Tierversuche reduziert.

1.6 Biolumineszenz-Bildgebung in der Krebsforschung

Die Biolumineszenz-Bildgebung (engl. Bioluminescence-Imaging, BLI) ist eine hochsensible nicht-invasive Bildgebungsmethode, auf Grundlage des Luciferin-Luciferase-Systems. Die biochemische Erzeugung von Licht durch einen lebenden Organismus, ist ein natürlich vorkommendes Phänomen. Luciferase Enzyme, welche in Glühwürmchen (Firefly Luciferase; FLUC) und anderen biolumineszenten Insekten vorkommen, katalysieren die Oxidation ihres Substrats Luciferin in Oxyluciferin und geben bei Rückkehr des Oxyluciferins in seinen Ausgangszustand Lichtphotonen frei (Sato et al., 2004). Die Detektion des emittierten Lichts wird durch hochsensible Charge-coupled-device (CCD) Kameras als zweidimensionales Bild aufgezeichnet. Das Prinzip der BLI, wie es in dem hier vorgestellten Tumormodell verwendet wurde, wird in Abbildung 3 veranschaulicht.

BLI wird verwendet um Zellen, Genexpression und andere biologische Merkmale in Zellen, Geweben und ganzen Organismen zu verfolgen.

Dadurch ist es möglich das Tumorwachstum und die Wirkung von Therapeutika, auf die Tumorzellen in einem statischen und dynamischen Modell zu visualisieren. Die zunehmende Verwendung von BLI als bildgebende Methode führt damit zu Fortschritten in der Tumorthherapie (O'Neill et al., 2010). Dies unterstreicht die Bedeutung und das Potential von BLI in der zukünftigen Krebsforschung.

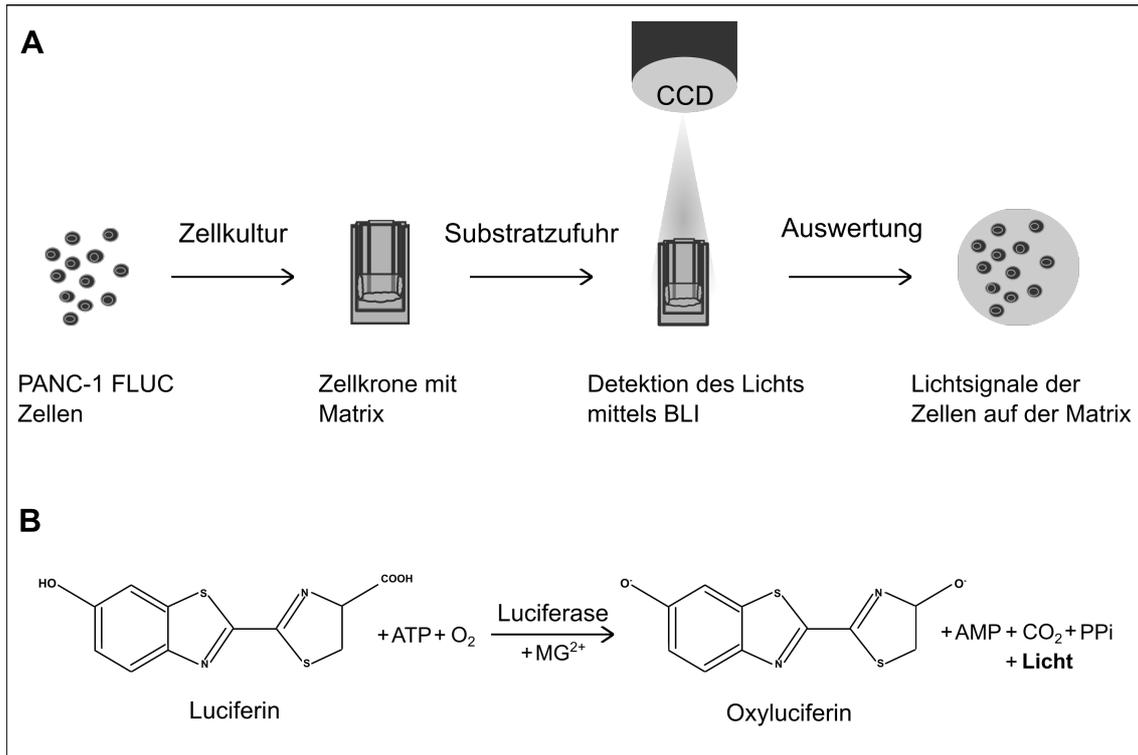


Abbildung 3 Prinzip des BLI im Tumormodell

A zeigt die schematische Darstellung des BLI-Prinzips in dem hier vorgestellten Tumormodell. Luciferase exprimierende Tumorzellen wurden auf einer Matrix kultiviert und nach Inkubation mit 0,15 mg D-Luciferin für 10 Minuten mittels CCD-Kamera detektiert. Die Lichtintensität der Zellen auf der Matrix konnten nach der Auswertung visualisiert werden. In B ist die chemische Reaktion von Luciferin gezeigt. ATP = Adenosintriphosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; PPi = Pyrophosphat; eigene Darstellung.

1.7 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothesen

Da in den letzten Jahrzehnten nur geringfügige Verbesserungen der Überlebensraten bei Pankreaskarzinom Patienten erzielt wurden, besteht ein dringender klinischer Bedarf für die Entwicklung wirksamer therapeutischer Strategien. 3D *in vitro* Modelle sind für das Screening und die Validierung von Therapeutika essenziell. Durch die Entwicklung neuer 3D *in vitro* Modelle, die die EZM implementieren, nähert man sich in der präklinischen Forschung der *in vivo* Situation an und reduziert durch sensitivere Therapeutika nachfolgende Tierversuche.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau, die Charakterisierung und Validierung eines transwell-basierten *in vitro* Modells des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas, um das Verhalten der Tumorzellen auf der EZM zu untersuchen und die Anwendbarkeit als präklinisches Testsystem für Therapeutika zu prüfen.

Um sich den *in vivo* Verhältnissen zu nähern, wurde zum Aufbau des 3D *in vitro* Modells dezellularisierte porzine Pankreasmatrix (PanMa) verwendet. Die Matrix wurde mit Zellen der humanen Zelllinie PANC-1, die aus einem duktaalen Adenokarzinom des Pankreas stammt, kultiviert (Lieber et al., 1975). Das Matrixgerüst für den Aufbau des hier vorgestellten 3D *in vitro* Modells soll durch die implementierte EZM Komponente die *in vivo* Situation exakter widerspiegeln. Um zu untersuchen, ob eine organspezifische Matrix relevant für den Aufbau des Tumormodells ist, wurde neben PanMa auch Dünndarmmatrix (SISser) verwendet. Beide Matrizen des 3D *in vitro* Modells wurden histologisch und immunhistologisch hinsichtlich der Zytomorphologie und des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen untersucht. Zur Bestimmung der Tumorzellmasse, wurde versucht eine nicht-invasive Analyse der Tumorzellen basierend auf BLI zu etablieren. Dazu wurden PANC-1 Zellen verwendet, in die zur Etablierung eines BLI basierendem Zytotoxizitätsverfahren am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg durch Dr. Solonge Le Blanc (Universität Heidelberg, Translationale Pankreasforschung und EPZ-Forschungslabor) Gensequenzen (firefly luciferase (FLUC); green fluorescent protein (GFP)) mittels lentiviralem Gentransfer transduziert wurden. Die Luciferase exprimierenden PANC-1 FLUC Zellen lumineszieren nach Inkubation mit dem Luciferase Substrat Luciferin. Die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen wurde sowohl in einem herkömmlichen

Mikroplatten-Reader (Tecan) sowie in einem BLI-System (IVIS; In Vivo Imaging System, Bruker) untersucht. Während der Mikroplatten-Reader punktuelle Messungen der Lumineszenz-Intensitäten auf der Matrix durchführt und Zahlenwerten zuordnet, misst das IVIS die Lumineszenz-Intensität zuvor ausgewählter Abschnitte (Region of Interests; ROI) und visualisiert diese als Farbwerte. Dadurch soll sowohl eine aussagekräftigere Messung der Lumineszenz-Intensität gewährleistet werden, sowie eine Verteilung der Zellen auf der Matrix erkennbar sein. Um das nicht-invasive Analyseverfahren zu validieren, wurde die PANC-1 FLUC Zellen im 3D *in vitro* Modell mit Gemcitabin, einem Standardtherapeutikum in der Therapie des Pankreaskarzinoms, behandelt.

2. Material

2.1 Antikörper

Tabelle 3 Liste der Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Katalognummer
Anti-Ki67 (Hase)	Abcam	ab16667
Anti-Pan-Zytokeratin (Maus)	Sigma-Aldrich	C2562
Anti-Vimentin (Hase)	Abcam	ab92547
Sekundärantikörper	Hersteller	Katalognummer
Anti-Maus IgG (Esel), Alexa Fluor 555	Life Technologies	A-31570
Anti-Hase IgG (Esel), Alexa Fluor 647	Life Technologies	A-31573

2.2 Biologisches Material

Zelllinie

PANC-1 ist eine humane pankreatische Krebszelllinie. Sie wurde 1956 aus einem duktalem Pankreaskarzinom eines 56-jährigen kaukasischen Mannes entnommen (Lieber et al., 1975). Die Katalognummer der American Type Culture Collection (ATCC) lautet CRL-1496 (siehe Anlage).

Pankreas- und Dünndarmgerüst

Als Gerüst für die dreidimensionale Zellkultur wurde porzine Pankreasmatrix (PanMa) und Dünndarmmatrix (SISser) verwendet. Standardisierte Verfahren zur Entnahme und Dezellularisierung von porzinem Gewebe sind etabliert (Linke et al., 2007). Die Herstellung der PanMa ist beschrieben (Berger et al., 2020). Kurzgefasst wurde der porzine Pankreas *en bloc* zusammen mit der Milz, Teilen des Duodenums und Gefäßen für die Perfusion entfernt. Anschließend wurde das umliegende Bindegewebe vorsichtig vom Pankreas gelöst und die Dezellularisierung durch Spülung über die mitresezierten Gefäße begonnen. Diese Waschvorgänge sind zeitintensiv und erfordern intakte Gefäßsituationen. Die Integrität der Gefäße wurde zwischen den Waschvorgängen

kontrolliert. Nach den abgeschlossenen Waschvorgängen wurden die erzeugten Matrixgerüste bis zur weiteren Verwendung sterilisiert (Berger et al., 2020).

Die Zustimmung durch das lokale Ethikkomitee wurde erteilt (Antragsnummer und Bestätigung: AZ-55.1-2532-2-256). Tierversuche sind laut dem deutschen Tierschutzgesetz für die medizinische Anwendung, die Grundlagenforschung, die Erkennung von Umweltgefährdungen, sowie zur Überprüfung von Arzneimitteln und ihre Prüfung auf Unbedenklichkeit zulässig. Die Tiere wurden entsprechend dem Leitfaden für die Pflege und Verwendung von Labortieren des National Institute of Health (NIH-Veröffentlichung Nr. 85e23, überarbeitet 1996) behandelt. Die Organexplantation entsprach dem deutschen Tierschutzgesetz und der Tierschutzbeauftragte des Instituts informierte die zuständigen Behörden regelmäßig.

2.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium / Lösung	Hersteller	Katalognummer
DMEM, High Glucose, Glutamax™	Thermo-Fischer	61965-026
FCS	Bio & Sell	FCS.ADD.0500
Dulbeccos´ s Phosphat Buffered Saline without MgCl ₂ and CaCl ₂ (PBS ⁻)	Sigma-Aldrich	D1283-500ML
P/S (Penicillin / Streptomycin)	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Natriumpyruvat	Invitrogen	P2256
Enzyme	Hersteller	Katalognummer
Trypsin-EDTA	Thermo-Fischer	15400054
Zellspezifisches Medium	Zusammensetzung	
PANC-1 Zellmedium	DMEM High Glucose Natriumpyruvat 1% P/S 1%	

FCS 10%

2.4 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Tabelle 5 Chemikalien und Lösungen für die Histologie und Immunhistochemie

Chemikalien / Lösungen	Hersteller	Katalognummer
BSA	Biofroxx	1126GR500
Citric acid	Sigma-Aldrich	W230618-10KG-K
Donkey-Serum	Sigma-Aldrich	D9663
Entellan®	Merck	1079600500
Eosin 1% aqueous solution	Morphisto GmbH	10177.01000
Ethanol 99,8%	Carl Roth	K928.4
Fluoromount-G™ DAPI	ThermoFisher	00-4959-52
Haematoylin solution acidic	Morphisto GmbH	10231.01000
Isopropanol	Carl Roth	6752.2
Paraffin	Sigma-Aldrich	6642.8
Roti-Histofix 4%	Carl Roth	P087.3
Triton® X-100	Carl Roth	3051.2
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T8154-20ML
Tween®-20	Sigma-Aldrich	P1379-500ML
Lösungen / Puffer	Zusammensetzung	
Citrat-Puffer	42 g/l Zitronensäure Monohydrate 17.6 g/l Natriumhydroxidpellets in deionisiertem H ₂ O; pH 6.0; bei 4-8°C gelagert	
Blockierlösung	5% Donkey Serum in 5% BSA / PBS ⁻ (steril gefiltert); gelagert bei 4°C	

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Zellkultur 24-Well- und 96-Well-Platten	TPP
Pipetten: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf
Pasteurpipetten	Brand
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt
Zellkronen (wiederverwendbar)	Kuhn GmbH
Zellkulturflaschen: 25cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP

2.7 Geräte

Tabelle 7 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
Zellkultur Inkubator	BBD 6220	ThermoFisher
Zellkultur Arbeitsbank	Safe 2020	ThermoFisher
Zentrifuge (Zellkultur)	Sorvall Legend X1R	ThermoFisher
Digitalkamera	DS126191	Canon
Einbettmaschine	Microm STP 120	ThermoFisher
Mikroskop, brightfield (Zellkultur)	EVOS X1	ThermoFisher
Mikroskop, confocal	TCS SP8	Leica Microsystems CMS GmbH
Mikroskop, fluorescence	BZ-9000	Keyence Corporation
Mikrotom	SM2010 R	Leica Microsystems CMS GmbH
Microplatten Reader	Infinite M200	Tecan Group

Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Bioscience
Bioluminiszenzbildgebung / In Vivo Imaging System	In Vivo Xtreme II	Bruker

2.8 Software

Tabelle 8 Software

Software	Hersteller
BZ-II Analyzer	Keyence Corporation
BZ-II Viewer	Keyence Corporation
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Image J	W. Rasband, National Institute of Health
Inkscape	open source
i-control	Tecan Group
Molecular Imaging (MI)	Bruker
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft

3. Methoden

Alle Experimente wurden nach Standardverfahren (SOPs) durchgeführt, die am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin festgelegt wurden.

3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitsbank durchgeführt. Alle Einwegmaterialien wurden steril und Labormaterialien entweder durch Autoklavierung oder durch Sterilfiltern entkeimt. Zusätzliche Geräte wie Laborflaschen, usw. wurden vor der Verwendung mit 70% Ethanol oder Descosept desinfiziert. Die Zellen wurden in einem Inkubator unter folgenden Bedingungen kultiviert: 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Zellmorphologie und Dichte wurden in regelmäßigen Abständen durch Lichtmikroskopie überwacht.

3.1.1 Zellkultur

PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen wurden in T-75 und T-150 Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose GlutamaxTM mit 10 % FCS, 1% Natriumpyruvat und 1% Penicillin / Streptomycin bis zu einer Dichte von 80 - 90% kultiviert.

3.1.2 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank, wurden diese im 37°C temperierten Wasserbad vorsichtig geschwenkt. Danach wurde die Zellsuspension in das vorbereitete 37 °C warme Medium im Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend konnten 1,5 - 2 x 10⁶ Zellen in eine T75-Zellkulturflasche überführt und mit leichten Schwenkbewegungen gleichmäßig verteilt werden. Am nächsten Tag wurde das Medium in der Flasche gewechselt, um Restdimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Gefriermedium zu entfernen.

3.1.3 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 80 - 90% passagiert. Hierzu wurde nach dem Absaugen des Mediums die Zellkultur gründlich mit PBS⁻ gespült. Die Zellen wurden

daraufhin mit 2 ml Trypsin-EDTA für 2 - 3 min inkubiert und anschließend durch vorsichtiges Klopfen abgelöst. Die vollständige Ablösung der Zellen überprüfte man nun im Lichtmikroskop und stoppte die Enzymreaktion mit 500 µl FCS. Um alle abgelösten Zellen zu Passagieren wurde die Zellkulturflaschen nochmals mit PBS⁻ sorgfältig gespült und die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension zentrifugierte bei 1200 rpm für 5 min bevor der Überstand entfernt, das Zellpellet im Medium resuspendiert und die Zellen in einer bestimmten Anzahl ausgesät werden konnten.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Trypanblau wurde verwendet, um tote Zellen zu identifizieren, die auf Grund einer defekten Zellmembran permeabel für Trypanblau sind und blau angefärbt werden. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Kammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension (20 µl) im Verhältnis 1:5 mit Trypanblau (80 µl) gemischt und 10 µl auf eine Neubauer-Zählplatte gegeben. Die Zellen konnten nun in allen vier Großquadraten unter dem Lichtmikroskop gezählt werden. Für die Errechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Mittelwert IZ} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Quadratfaktor} = \text{lebende Zellen}$$

Mittelwert IZ = Mittelwert lebender Zellen aus den vier Zählkammern

Verdünnungsfaktor = 5

Quadratfaktor = 10⁴

3.1.5 Einfrieren von Zellen

Bei geringer Passagenzahl wurden Zellen für nachfolgende Untersuchungen eingefroren. Die Zelldichte von 1,5 x 10⁶ Zellen / ml wurde in einer geeigneten Zellsuspension, bestehend aus 90% spezifischen Zellmedium, 10% DMSO, gelöst und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Diese lagerten nach 24 Stunden im -80 °C Schrank in einem Stickstofftank bei -180 °C.

3.2 Dreidimensionale Zellkultur

3.2.1 Fixierung von dezellularisiertem Gewebe in Zellkronen

Zuerst wurde jeweils ein Stück dezellularisierte PanMa und SISser in eine Petrischale gegeben und gleichmäßig verteilt. Bei der SISser wurde zuerst die Serosa abgezogen, um die Zellen später auf der darunterliegenden Matrixschicht (Darmaußenseite) zu kultivieren. Als nächstes wurde der Innenring der Zellkrone auf die Matrizen gelegt und mit einem Skalpell zugeschnitten, sodass die Außenwand des Innenrings sowie das Lumen von Matrix bedeckt sind. Anschließend wurde der Innenring mit dem Matrixstück in den Außenring gedrückt, um die Matrix fest in der Zellkrone zu fixieren. Schließlich wurden die Zellkronen in eine 24-well Platte gegeben und mit dem zellspezifischen Medium bedeckt.

3.2.2 Zellkultur auf dezellularisiertem Gewebe

Die oben beschriebene in Zellkronen fixierte Matrizen konnte nun zur Kultivierung von Zellen verwendet werden. Die Matrizen wurden über Nacht in dem PANC-1 spezifischen Zellmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ vor dem Aussäen der Zellen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das jeweilige Medium abgesaugt und 1 ml frisches auf 37 °C vorgewärmtes Medium um die Außenwand des Außenrings der Zellkrone pipettiert. Anschließend wurden 25000 – 250000 Zellen pro Zellkrone in einem Volumen von 50 µl direkt auf die Matrix pipettiert und 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, wodurch die Zellen an die Matrix gebunden werden konnten. Danach wurden zusätzliche 150 µl Medium in den inneren Ring der Zellkrone gegeben. Die besiedelten Zellkronen wurden 21 Tage kultiviert und das Medium nach 2 – 3 Tagen gewechselt.

Tabelle 9 Zellzahl und Zelldichte pro Zellkrone

Zellzahl pro Zellkrone	Zelldichte pro Zellkrone
25000	4,97 x 10 ⁴ Zellen/cm ²
50000	9,94 x 10 ⁴ Zellen/cm ²
100000	1,99 x 10 ⁵ Zellen/cm ²
200000	3,98 x 10 ⁵ Zellen/cm ²
250000	4.97 x 10 ⁵ Zellen/cm ²

3.3 Histologie

3.3.1 Fixierung von Gewebe

Für histologische und immunhistologische Untersuchungen wurden die Zellkronen für 2 Stunden bei Raumtemperatur in Roti®-Histofix-Lösung inkubiert. Nach der Fixierung mit Roti®-Histofix-Lösung wurden die Präparate dreimal mit PBS⁻ gewaschen.

3.3.2 Einbetten und Schneiden von Gewebe

Zunächst mussten die besiedelten Gewebe von den Zellkronen gelöst und nicht besiedelte Abschnitte mit dem Skalpell entfernt werden. Danach konnten die fixierten Gewebe auf Einbettungsfilterpapiere und in Einbettungskassetten gelegt werden. Das Einbetten wurde unter Verwendung einer Einbettungsstation durchgeführt, die eine automatisierte Paraffineinbettung unter Verwendung des folgenden Programms ausführte:

Tabelle 10 Paraffineinbettung

Lösung	Zeit (Stunden)	Prozess
Demineralisiertes H ₂ O	2	Fixiermittel auswaschen
EtOH 50 %	1	
EtOH 70 %	1	
EtOH 80 %	1	
EtOH 96 %	1	Entwässern
Isopropyl 1	1	
Isopropyl 2	1	
Isopropyl /Xylene 1:2	1	
Xylene 1	1	Alkohol entfernen
Xylene 2	1	
Paraffin 1	3	Paraffinieren
Paraffin 2	3	

Nach dem Einbetten wurden die Einbettungskassetten in das erhitzte Paraffinbad der Blockierstation (Leica) gegeben. Das eingebettete Gewebe konnte dann von der Kassette entfernt, in 2-3 kleine Streifen geschnitten und in eine Gießform überführt werden. Die Schnittflächen mussten dabei möglichst nach unten zeigen und die Streifen parallel angeordnet werden. Bevor die Paraffinblöcke geschnitten werden konnten, mussten diese

für 60 Minuten auf einer Kühlplatte abkühlen. Für die H&E-Färbungen, sowie für die Immunfluoreszenzfärbungen, wurden am Schlittenmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in demineralisiertes Wasser gelegt. Diese konnten nun mit dem Objektträger aufgenommen und in 50 °C vorgewärmtes demineralisiertes Wasser überführt werden, um die Schnitte auf dem Objektträger zu strecken und zu fixieren. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger und für H&E-Färbungen wurden unbeschichtete Objektträger verwendet. Die Schnitte trockneten anschließend bei 37 °C über Nacht.

3.3.3 Entparaffinieren und Rehydrieren

Für die histologischen Färbungen mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden die Paraffinschnitte bei 60 °C für 1 Stunde inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen. Danach wurden die Schnitte unmittelbar wie in Tabelle 11 beschrieben weiterbehandelt:

Tabelle 11 Entparaffinieren und Rehydrieren

Lösung	Zeit (min)	Prozess
Xylene 1	10	Entparaffinieren
Xylene 2	10	
EtOH 96 %	Zwei-/ Dreimal eintauchen	
EtOH 96 %	Zwei-/ Dreimal eintauchen	
EtOH 70 %	Zwei-/ Dreimal eintauchen	Rehydrieren
EtOH 50 %	Zwei-/ Dreimal eintauchen	
Demineralisiertes H ₂ O	Schwenken, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind	

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die H&E-Färbung wurde als Übersichtsfärbung verwendet, um die Gewebe- und Zellmorphologie des 3D-Modells zu analysieren. Hämatoxylin färbt dabei anionische Strukturen, wie die Zellkerne blau und Eosin kationische Strukturen, wie das Zytoplasma und die Extrazellulärmatrix rot. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden wie in Tabelle 12 beschrieben gefärbt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt.

Tabelle 12 H&E-Färbung

Lösung	Zeit (min)	Prozess
Hämatoxylin	6	Färben der Zellkerne
Demineralisiertes H ₂ O	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht	Spülen
Leitungswasser	5	Bläuen unter fließendem Wasser
Eosin	6	Färben d. Zytoplasma, EZM
Demineralisiertes H ₂ O	schwach fließen, bis keine Farbe mehr auswäscht	Spülen
EtoH 70%	Zweimal eintauchen	
EtoH 96%	2	Aufsteigende Reihe zum
Isopropanol I	5	Entwässern
Isopropanol II	5	
Xylol I	5	Entfernen des Alkohols
Xylol II	5	

3.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung diente dem Nachweis von tumorspezifischen Proteinen in den PANC-1 Zellen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die histologischen Schnitte, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, entparaffiniert und dehydriert. Anschließend erfolgte eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung in Citratpuffer pH 6,0 für 20 min bei 95 - 100 °C in einem Dampfgerät. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und von demineralisiertem Wasser in Waschpuffer (PBS-T) überführt.

Tabelle 13 zeigt das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.

Tabelle 13 Immunfluoreszenzfärbung

Lösung	Zeit (min)	Prozess
Blockierlösung	20	Blocken
Primärantikörper auf Blockierlösung	Über Nacht bei 4 °C	Primärantikörper
PBS-T	Dreimal 5	Waschen
Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung	60 bei RT	Sekundärantikörper

PBS-T	Dreimal 5	Waschen
DAPI Fluoromount-G™		Eindecken

Der Sekundärantikörper wurde lichtgeschützt aufgetragen und eingedeckelte Schnitte dunkel bei RT gelagert. Für die Doppelfärbung Pancyoterkatin / Vimentin wurden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies verwendet. Darüber hinaus wurden Negativkontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Hierzu wurden die Schnitte statt mit Primärantikörper mit Blockierlösung behandelt.

3.3.6. Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Charakterisierung des Zellverhaltens auf dem porzinem Pankreas- und Dünndarmgewebe wurde die Proliferationsrate der Tumorzelle bestimmt. Dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki67 und DAPI durchgeführt und jeweils 30 Aufnahmen der 3D-Modelle an Tag 3,7,14 und 21 manuell gezählt. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67 konnte die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen bestimmt werden. Ki67 färbt dabei die Zellen in der Matrix, die sich vermehren. Nach Möglichkeit wurden unterschiedliche Stellen der Matrix mikroskopiert und aufgenommen, um möglichst repräsentative Überblicke von der gesamten Matrix bzw. der Zellkrone zu erhalten. Die in Abbildung 11 dargestellte Proliferationsrate in Prozent wurde wie folgt berechnet:

$$Proliferationsrate = \frac{\text{Anzahl Ki67 (positiver) Zellen}}{\text{Anzahl DAPI (positiver) Zellen}} * 100$$

3.3.7. Bestimmung der Differenzierung von Tumorzellen

Zur Charakterisierung des Zellverhaltens auf den unterschiedlichen Matrizen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den epithelialen Marker Pancytokeratin und den mesenchymalen Marker Vimentin durchgeführt. Ein epitheliale Zelle spricht dabei für ein lokal begrenzten Tumor, während eine mesenchymale Tumorzelle einen mobilen Zelltypus mit Potential zur Metastasenbildung charakterisiert.

3.4 Bestimmung der Verdopplungszeit

Die Bestimmung der Verdopplungszeit diente dem Vergleich der PANC-1 und den gentechnisch modifizierten PANC-1 FLUC Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens. Hierzu wurden in einer 24-Well Platte an Tag 0 definierte Zellzahlen von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen (5000, 12500, 25000, 50000, 75000 und 100000) gleichmäßig ausgesät und manuell nach Tag 2, 3, 4, 5, 6 und 7 gezählt (siehe 3.1.4).

3.5 Biolumineszenzbasiertes Messverfahren

Für das biolumineszenzbasierte Messverfahren der Luciferase modifizierten PANC-1-FLUC Zellen, wurden zunächst Versuche am Mikroplatten Reader durchgeführt. Für die Auswertung der Lumineszenz im Mikroplatten Reader wurde die Software i-control verwendet. Der Mikroplatten Reader misst Lichtphotonen und ordnet ihnen Zahlenwerte zu, die im Folgenden als Lumineszenz-Intensität bzw. Intensität bezeichnet werden. Anschließend wurden die Zellen für die biolumineszenzbasierte Bildgebung (BLI) in einem In Vivo Imaging System (IVIS; In Vivo Xtreme II) untersucht. Zur Auswertung der BLI diente die Software Molecular Imaging (MI). Das IVIS misst Lichtphotonen in einem zuvor festgelegten Kameraabschnitt. Die CCD-Kamera musste dazu auf ca. -90 °C gekühlt und der zu messende Bereich fokussiert werden. Anschließend wurden zweidimensionale Bilder erzeugt. Zur Auswertung der Bilder wurden für jeden Versuch kreisförmige Regions Of Interests (ROI) mit demselben Innenbereich (Pixel; ppi) gebildet. Die Software ermittelt anschließend die durchschnittliche Lichtphotonenintensität für jedes einzelne ROI in P/s/mm².

3.5.1 Lumineszenz-Intensität in 2D

Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in 2D wurde eine definierte Zellzahl von PANC-1 FLUC-Zellen (2500, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000) in einer 96-Well Platte ausgesät und für 3 Stunden inkubiert, um ein Anheften der Zellen zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,15 mg/ml D-Luciferin und zellspezifischem Medium inkubiert. Hierbei wurden 50 µl in jedes Well pipettiert.

Anschließend folgten die Messungen im Mikroplatten Reader und im IVIS. Ebenso wurden die ursprünglichen PANC-1 Zellen untersucht.

3.5.2 Lumineszenz-Intensität in 3D

Für die Bestimmung der Lumineszenz-Intensität in 3D wurden definierte Zellzahlen (25000, 50000, 100000, 150000, 200000) auf der PanMa und der SISser kultiviert und für 5 Stunden im zellspezifischen Medium inkubiert, um ein Anheften an die Matrix zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,15 mg/ml D-Luciferin und zellspezifischem Medium inkubiert. Hierbei wurden 600 µl um die Außenwand des Außenrings der Zellkrone pipettiert und 100 µl direkt auf die Matrix. Anschließend folgten die Messungen im Mikroplatten Reader und im IVIS.

3.5.3 BLI basiertes 3D-Tumormodell

Für den Aufbau des BLI basierten 3D-Tumormodells wurden die Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, auf der PanMa und SISser kultiviert. Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Luciferase Messungen erfolgten an Tag 3, 7, 14 und 21. Hierzu wurde das zellspezifische Medium abgesaugt und die Zellen für 10 Minuten mit 0,15 mg/ml D-Luciferin inkubiert. Hierbei wurden 600 µl um die Außenwand des Außenrings der Zellkrone pipettiert und 100 µl direkt auf die Matrix. Anschließend folgten die Messungen im Mikroplatten Reader und im IVIS. Nach den Messungen wurde das mit D-Luciferin versetzte Medium abgesaugt, um weitere Inkubation mit D-Luciferin zu vermeiden. An Tag 7, 14 und 21 wurden sowohl vor als auch nach Inkubation mit D-Luciferin Messungen im Mikroplatten Reader und im IVIS durchgeführt, um mögliche Hintergrundsignale zu detektieren. Die Hintergrundsignale wurden zur Vergleichbarkeit der Daten von den Messungen nach der Inkubation abgezogen. Zusätzlich wurden sowohl Leerkontrollen, als auch Kontrollen der ursprünglichen PANC-1 Zellen angefertigt.

3.5.4 Behandlung im BLI basierten 3D-Tumormodell

Für die Behandlung der PANC-1 FLUC Zellen wurden das BLI basierte 3D-Tumormodell wie in 3.2.2 beschrieben für 14 Tage kultiviert. An Tag 14 wurde die Behandlung mit Gemcitabin begonnen. Der IC₅₀-Wert für PANC-1 bei Therapie mit Gemcitabin in 2D nach 72 Stunden wurde bereits beschrieben (Awasthi et al., 2013). Das zellspezifische Medium wurde ab Tag 14 mit 1,8 mM Gemcitabin versetzt. Zuvor wurde eine Messung nach Inkubation mit für 10 Minuten mit 0,15 mg/ml D-Luciferin im

zellspezifischen Medium im IVIS durchgeführt, um einen Ausgangswert für die Behandlung zu definieren. Hierbei wurden 600 µl um die Außenwand des Außenrings der Zellkrone pipettiert und 100 µl direkt auf die Matrix. Das Medium wurde anschließend mit dem Gemcitabin versetzten zellspezifischen Medium ausgetauscht. Weitere Messungen im IVIS erfolgten nach 48, 72 und 168 Stunden nach Inkubation für 10 Minuten mit 0,15 mg/ml D-Luciferin. Das mit D-Luciferin versetzte Medium wurde nach jeder Messung mit frisch versetztem Gemcitabin im zellspezifischen Medium ausgetauscht. Im Behandlungsmodell erfolgten keine Hintergrundmessungen vor der Inkubation mit D-Luciferin. Zur grafischen Darstellung wurden die Intensitäten auf Tag 0 der Behandlung normalisiert.

3.6 Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated-cell-sorting; FACS)

In dieser Arbeit wurden PANC-1 FLUC Zellen anhand GFP mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) aufgereinigt. Es wurde mit dem BD FACSCalibur gearbeitet. Das Prinzip beruht auf Emission von optischen Signalen von Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Das BD FACSCalibur ermöglicht die Detektion von 3500 Ereignissen pro Sekunde. Die Menge des gestreuten Lichtes hängt von Größe und Komplexität der Zellen ab. Im Scatterplot (Forward Scatter; FCS, Side Scatter; SSC) werden die Zellen gated, um Zelldupletten und Zellreste auszuschließen. Anschließend wurde die Autofluoreszenz der Zellen im FITC Kanal (Wellenlänge 530 nm) als GFP⁺ bzw. GFP⁻ definiert. Im *Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg* wurden die GFP⁺ Zellen letztlich gesortet, um 98 % GFP⁺ Zellen zu erhalten.

3.7 Mikroskopie

Die H.E. und Ki67 / DAPI Färbungen wurden mittels Keyence Mikroskop BZ-9000 untersucht. Für Ki67 wurden Cy5- und TRIT-C-Filter zum Nachweis von konjugierten Alexa Fluor 647- bzw. 555-Fluorophoren verwendet, während ein DAPI-Filter für die nukleare DAPI-Färbung angewendet wurde. Für jeden Schnitt wurden mindestens 8 Bilder aufgenommen, um möglichst repräsentative Überblicke von der gesamten Matrix bzw. der Zellkrone zu erhalten. Anschließend konnten die mikroskopierten Aufnahmen mittels ImageJ weiter untersucht und überlagert werden. Die Immunfluoreszenzfärbung

von Vimentin und Pancytokeratin wurde am Confocal Mikroskop TCS SP8 aufgenommen. Es wurden die Anregungswellenlängen 543 nm und 667 nm verwendet.

3.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen auf Pankreas- und Dünndarmgewebe wurde ein Holm-Sidak's multipel T-Test mit Graphpad Prism durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

Vor dem Aufbau des hier vorgestellten 3D-Tumormodells wurden die PANC-1 FLUC Zellen anhand GFP mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) aufgereinigt und mit der ursprüngliche Zelllinie PANC-1 in der 2D-Zellkultur verglichen. Danach wurde das biolumineszenzbasierte Messverfahren des Tumormodells sowohl in der 2D-Zellkultur, sowie in der statischen 3D-Zellkultur validiert und anschließend die Zellen des statischen 3D-Modells histologisch charakterisiert. Anschließend konnte das funktionell validierte Modell zum Behandlungsversuch mit dem Zytostatika Gemcitabin verwendet werden.

4.1 PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen sind in ihrem Wachstumsverhalten vergleichbar

Zunächst wurde untersucht, ob sich die genomische Modifikation mittels lentiviraler Transduktion auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirkt. Dadurch sollte die Eignung der PANC-1 FLUC Zellen für den Aufbau eines Tumormodells bestätigt werden. Hierzu wurde die Verdopplungszeit der PANC-1 FLUC Zellen bestimmt und mit der Zellteilungsrate der nicht-modifizierten Ursprungszelllinie PANC-1 verglichen.

In Vorversuchen mit unterschiedlicher Zelldichte an Tag 0 (5000, 12500, 25000, 50000, 75000 und 100000) zeigte sich, dass Zellen über 25000/1,86 cm²/Well zu dicht ausgesät sind und sich so womöglich in ihrem Wachstum limitieren. Daher wurde dieser Versuch mit einer Zelldichte von 10000/1,86 cm² an Tag 0 durchgeführt und die Zellen für 7 Tage kultiviert. Das Wachstumsverhalten der PANC-1 Zellen und der PANC-1 FLUC Zellen unterscheiden sich nach Auswertung des Versuchs nur geringfügig (Abb. 4A). Trotz der gentechnischen Modifikation der PANC-1 FLUC Zellen sind hier keine Veränderungen im Wachstumsverhalten zu erkennen. Demnach hat die lentivirale Transduktion des FLUC-Gens in die PANC-1 Zellen keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Die Aufnahmen unter dem Lichtmikroskop in Abbildung 4B weisen weiterhin keine ersichtlichen morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den PANC-1 Zellen auf. Beide Zelllinien können in gleichem Maße zu einem Aufbau von pankreatischen Tumormodellen verwendet werden.

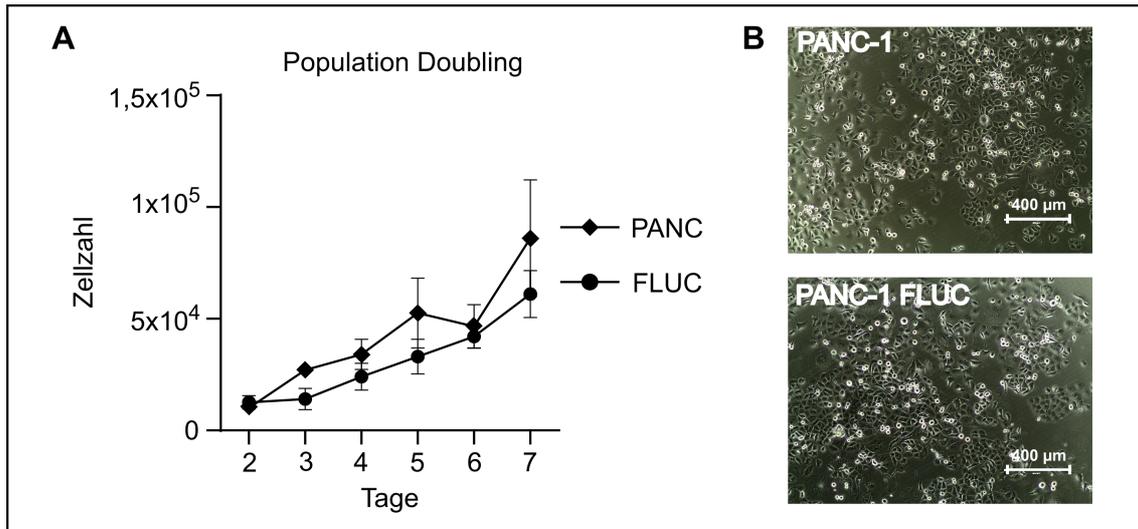


Abbildung 4 Population Verdopplung von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen.

A Der Graph zeigt das Wachstumsverhalten von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen. Es wurden 10000 Zellen in 24-well Platten kultiviert. Die graphische Darstellung zeigt die Mittelwerte der Zellzahl über 7 Tage. Die Anzahl biologischer Replikate lag bei n=3.

B Die Bilder zeigen repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen an Tag 5 in 10facher Vergrößerung.

4.2 Analyse der Transduktionseffizienz der FLUC PANC-1 Zelllinie

Vor Aufbau des Tumormodells musste überprüft werden, ob die lentiviral veränderten PANC-1 FLUC Zellen die gewünschte Gensequenz für das Enzym Luciferase tragen. Da die Luciferase Gensequenz zusammen mit einer GFP-Markierung transduziert wurde, konnten die Luciferase⁺ Zellen im Durchflusszytometer mittels GFP Signal detektiert und sortiert werden. Dadurch konnten GFP⁻ Zellen aus der PANC-1 FLUC Zelllinie entfernt werden, um eine möglichst reine Zellkultur von GFP⁺ Zellen zu verwenden. In der PANC-1 Population lag die Anzahl vitaler Einzelzellen im FACS bei 61,2% (Abb. 5A). Bei den PANC-1 FLUC Zellen wurden 62,3% vitale Zellen gated (Abb.5D). Damit konnten Zelldupletten und Zellreste für die nachfolgenden Versuche ausgeschlossen werden. Der FITC-A Fluoreszenzkanal erkennt das vom GFP emittierte Licht in der Wellenlänge von 519 nm. Im GFP⁺- Bereich lagen 0,3% der PANC-1 Zellen (Abb. 2B, C) und 91,1% der PANC-1 FLUC Zellen (Abb. 5E, F). Anschließend wurden die GFP⁺ PANC-1 FLUC Zellen durch Mitarbeiter der FACS Unit des Instituts für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg von den GFP⁻ PANC-1 FLUC Zellen gesortet. Danach konnte eine Zellpopulation mit 98% GFP⁺ PANC-1 FLUC Zellen für die nachfolgenden Versuche verwendet werden (siehe Anlage 2). Durch die Durchflusszytometrie und das Zellsorting wurde gewährleistet, dass eine homogene

PANC-1 FLUC Zelllinie mit dem nötigen GFP Konstrukt und Luciferase Enzym für das BLI basierte Tumormodell verwendet wurde.

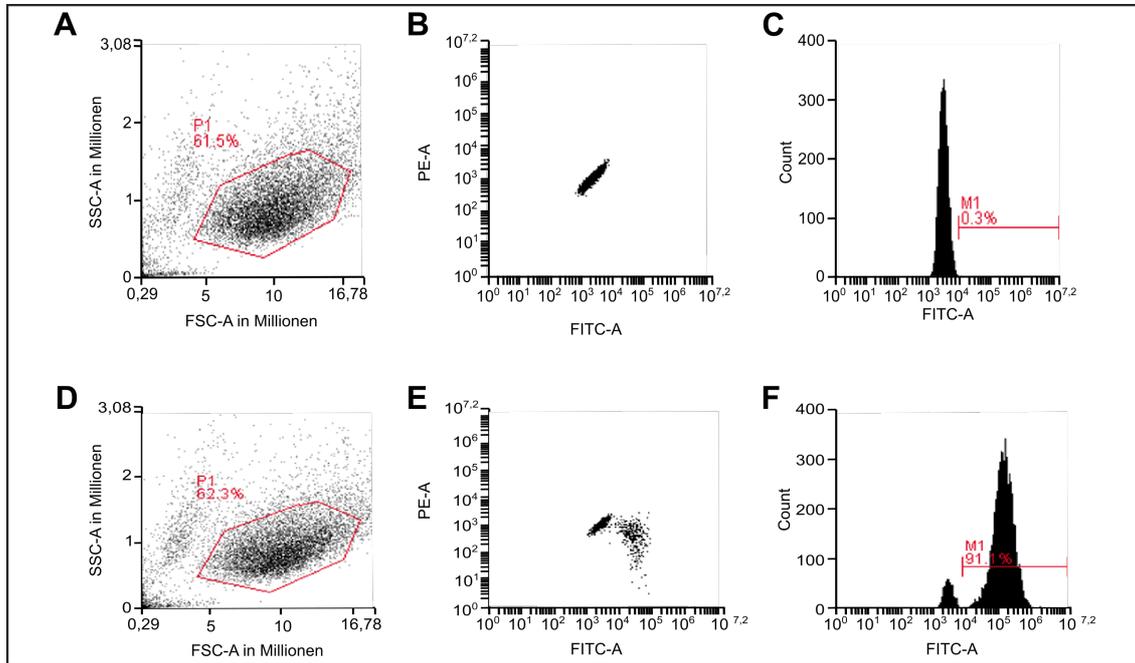


Abbildung 5 GFP⁻ PANC-1-Zellen und GFP⁺ PANC-1 FLUC Zellen

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Analyse der PANC-1 (A, B, C) und der PANC-1 FLUC (D, E, F) Zellen. In A und D wird die Anzahl vitaler Zellen in der Population dargestellt. Diese wurden durch den FSC / SSC gegatet. B und C bzw. D und F zeigt die Anzahl der autofluoreszierenden Zellen (GFP⁺) im FITC Kanal. Die Anzahl biologischer Replikate lag bei n=2.

4.3 Lumineszenz-Intensitäten und Zellzahlen von PANC-1 FLUC zeigen in 2D einen linearen Zusammenhang

Zum Aufbau eines biolumineszenzbasierten dreidimensionalen Tumormodells wurde die Luciferase-Aktivität der PANC-1 FLUC-Zellen zunächst unter 2D-Zellkulturbedingungen untersucht. Dazu wurde eine definierte Zellzahl von PANC-1 FLUC-Zellen (2500, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000) in einer 96-Well Platte ausgesät, für 3 Stunden inkubiert, um ein Anheften der Zellen an die Wells zu gewährleisten und anschließend für 10 Minuten mit 0.15 mg/ml D-Luciferin inkubiert. Anschließend folgten die Messungen im Mikroplatten Reader und im IVIS.

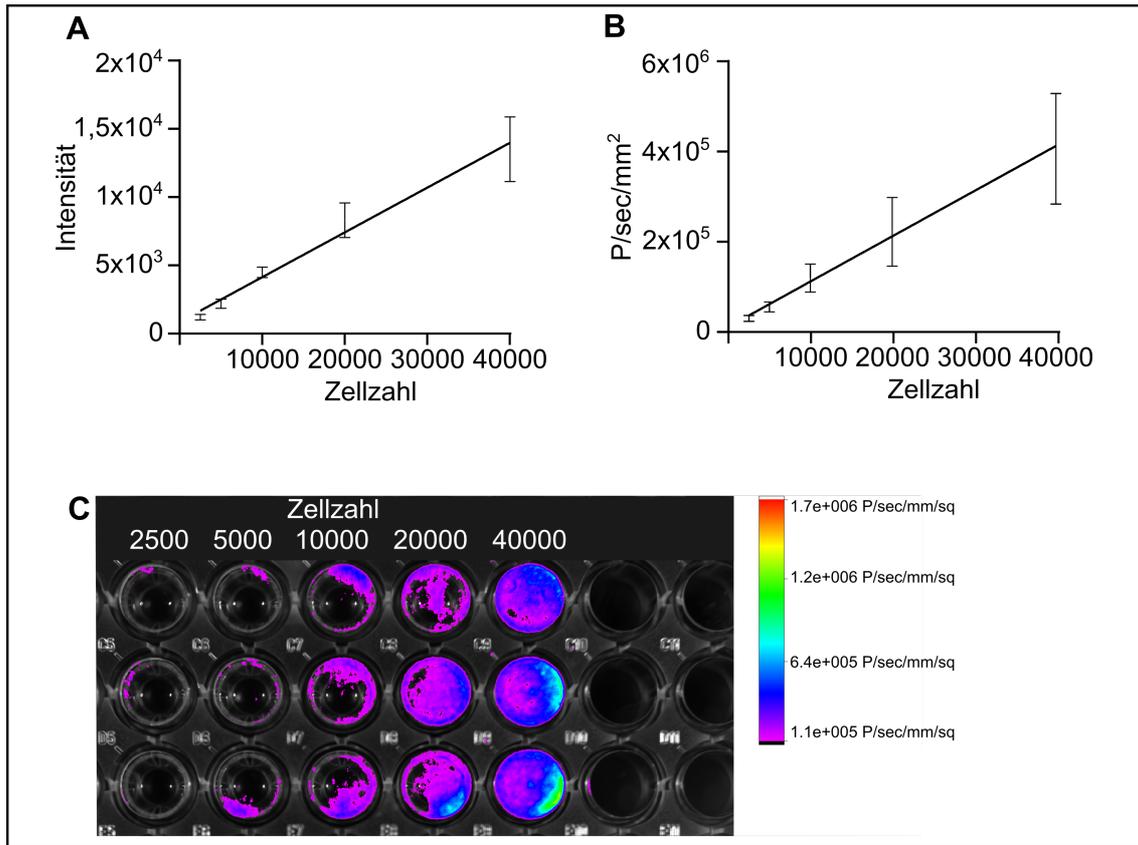


Abbildung 6 Lumineszenz-Intensität PANC-1 FLUC in 2D

A Der Graph zeigt die Lumineszenz-Intensität definierter PANC-1 FLUC Zellzahlen (10000, 20000, 30000, 40000) in 2D im Mikroplatten-Reader nach Inkubation für 10 Minuten mit 0.15 mg/ml D-Luciferin. Es wurden in einer 96-Well Platte jeweils drei Wells mit den gleichen Zellzahlen ausgesät. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei $n=3$. Die Werte der Lumineszenz-Intensität sind die Mittelwerte der drei biologischen Replikate. Zur graphischen Veranschaulichung wurde eine Ausgleichsgerade der Lumineszenz-Intensitäten mittels GrahPad Prism errechnet. **B** zeigt analog dazu die Ausgleichsgerade der Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellzahlen (10000, 20000, 30000, 40000) in 2D im IVIS. Die Lumineszenz-Intensität wird im IVIS in P/sec/mm² angegeben. Der ROI-Innenbereich für die Auswertung der Lumineszenz-Intensität im MI betrug 25737 ppi. In **C** wird eine repräsentative BLI-Aufnahme aus dem IVIS abgebildet. Hier ist der Aufbau eines biologischen Replikats (n_2) gezeigt.

Die Ausgleichsgerade der Lumineszenz-Intensitäten im Mikroplatten Reader weist eine Korrelation zur Zellzahl auf (Abb. 6A). Gleiches gilt für die Messungen im IVIS (Abb. 6B). Die Lumineszenz-Intensitäten, hier in P/sec/mm² angegeben, steigen linear zur Zellzahl. Im Gegensatz zum Mikroplatten Reader, der punktuelle Messungen durchführt, kann durch die im IVIS verbaute Kamera und den im MI gesetzten ROI die gesamte Fläche des Wells gemessen werden. Das IVIS ermöglicht neben der Messung der Werte für die Lumineszenz-Intensität ebenso die BLI (Abb. 6C). Hier ist die Verteilung der Zellen im jeweiligen Well zu beobachten. Dazu wird den Lumineszenz-Intensitäten Farben zugeordnet, um sie zu visualisieren. Somit gibt es direkten Aufschluss darüber, wie sich die Zellen in einem Well verteilen. In Abbildung 6C ist zu sehen, dass

die Zellen nicht gleichmäßig in einem Well verteilt sind, sondern vermehrt an den Rändern des Zellkulturwells wachsen. Dieses ist bereits bei geringen Zellzahlen zu beobachten und verdeutlicht sich bei größeren Zellzahlen. Die 40000 ausgesäten Zellen bedecken zwar das gesamte Well verdichten sich jedoch eindeutig zum Rand. Es ist zu vermuten, dass sich die Zellen an den Bereichen aufhalten, an denen Sie die größte Oberfläche zum Anheften an das Well vorfinden. Die lineare Proportionalität von Lumineszenz-Intensität und Zellzahl ist das vordergründliche Ergebnis dieses Versuchs. Es konnte gezeigt werden, dass Rückschlüsse von der Lumineszenz-Intensität auf die Zellzahl gezogen werden können. Damit eignet sich das Verfahren, um die Zellzahl nicht-invasiv zu bestimmen.

4.4 Lumineszenz-Signale von PANC-1 in 2D sind auszuschließen

Zum Ausschluss von Lumineszenz-Signalen durch Autofluoreszenzen der nicht transduzierten PANC-1 Zellen wurde der oben beschriebene Versuch im Mikroplatten Reader ebenso mit den PANC-1 Zellen durchgeführt. Abbildung 7 vergleicht die Lumineszenz-Intensität von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen. Zur optischen Vereinfachung wurden die Zelllinien graphisch getrennt voneinander dargestellt.

Abbildung 7A stellt für den direkten Vergleich von PANC-1 und PANC-1 FLUC Zellen, die in 4.3 für PANC-1 FLUC Zellen beschriebene lineare Proportionalität von Lumineszenz-Intensität und Zellzahl erneut dar. PANC-1 Zellen weisen eine im Vergleich zu den PANC-1 FLUC Zellen sehr geringes Lumineszenz-Signal auf (Abb. 7B). Ein möglicher Grund für die Messung eines Lumineszenz-Signals der PANC-1 Zellen ist das Hintergrundsignal. Dieses kann von den Zellen selbst, vom Medium oder von dem im Medium versetzten Luciferin, welches eventuell auch ohne Luciferase in geringen Mengen reagiert, stammen. Der Vergleich der Lumineszenz-Intensitäten von PANC-1 FLUC und der Lumineszenz-Signale von PANC-1 Zellen lässt schlussfolgern, dass die Lumineszenz der Zellen alleine durch das Enzym Luciferase hervorgerufen wird. Daraus folgt, dass die Zellen selbst keinen Einfluss auf die Lumineszenz-Intensität haben und sich Verfälschungen des Messergebnisses durch eventuelle Autofluoreszenzen der Zellen ausgeschlossen werden können.

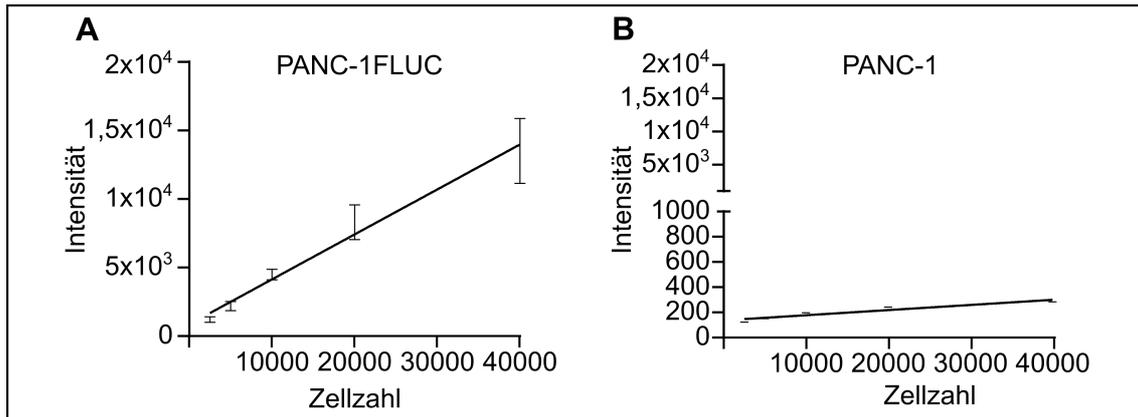


Abbildung 7 Vergleich der Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC und PANC-1 in 2D

A Der Graph zeigt die Lumineszenz-Intensität definierter PANC-1 FLUC Zellzahlen (10000, 20000, 30000, 40000) in 2D im Mikroplatten-Reader nach Inkubation für 10 Minuten mit 0.15 mg/ml D-Luciferin. Es wurden in einer 96-Well Platte jeweils drei Wells mit den gleichen Zellzahlen ausgesät. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei $n=3$. Die Werte der Lumineszenz-Intensität sind die Mittelwerte der drei biologischen Replikate. Zur graphischen Veranschaulichung wurde eine Ausgleichsgerade der Lumineszenz-Intensitäten mittels GrahPad Prism errechnet. **B** zeigt analog dazu die Lumineszenz-Signale definierter PANC-1 Zellzahlen (10000, 20000, 30000, 40000) in 2D im Mikroplatten-Reader nach Inkubation für 10 Minuten mit 0.15 mg/ml D-Luciferin. Es wurden in einer 96-Well Platte jeweils drei Wells mit den gleichen Zellzahlen ausgesät. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei $n=1$. Die Werte der Lumineszenz-Signale sind die Mittelwerte der drei Wells. Zur graphischen Veranschaulichung wurde eine Ausgleichsgerade der Lumineszenz-Signale mittels GrahPad Prism errechnet.

4.5 Lumineszenz-Intensitäten und Zellzahlen von PANC-1 FLUC zeigen im 3D-Modell einen linearen Zusammenhang

Um zu untersuchen ob der lineare Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenz-Intensität auch bei Aussaat der Zellen auf einer gewebespezifischen Matrix besteht, wurden zunächst analog zum Versuch in 2D (siehe 4.3) definierte Zellzahlen (25000, 50000, 100000, 150000, 200000) auf den Matrizen PanMa und SISser ausgesät, für 5 Stunden inkubiert, um ein Anheften der Zellen an die Wells zu gewährleisten und anschließend für 10 Minuten mit 0.15 mg/ml D-Luciferin inkubiert. Danach erfolgten die Messungen der Lumineszenz-Intensität im Mikroplatten Reader und im IVIS. In den Abbildungen 8A und B ist ähnlich den Ergebnissen im Zweidimensionalen (siehe 4.3), eine Korrelation zwischen Zellzahl und Lumineszenz-Intensität zu erkennen. Die Lumineszenz-Intensität im Mikroplatten Reader steigt linear mit der Zellzahl (Abb.8B). Im IVIS ist eine geringere Intensitätssteigerung ab 100000 Zellen zu beobachten (Abb.8A). Von 25000 - 100000 besteht auch im IVIS ein linearer Zusammenhang. Erst über 100000 Zellen scheint ein Plateau erreicht zu werden (Abb.8A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Messung im IVIS bei zu hohen Zellzahlen unzuverlässig ist. Möglicherweise ist hier die Detektionsgrenze des IVIS erreicht. Die Messung der

Lumineszenz-Intensität konnte auf PanMa und SISser in gleichem Maße durchgeführt werden. Es konnten nur geringe Unterschiede in den Lumineszenz-Intensitäten auf den beiden Matrizen beobachtet werden (Abb. 8A-C). Im Mikroplatten Reader liegt eine leicht höhere Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen auf der PanMa vor (Abb. 8B). Abbildung 8C zeigt die BLI-Aufnahme der besiedelten PanMa und SISser im IVIS. Hiervon lässt sich die räumliche Verteilung der PANC-1 FLUC Zellen auf den beiden Matrizes ablesen. Bei geringeren Zellzahlen verteilen sich die Zellen an den Rand der Zellkrone, während bei höheren Zellzahlen größere Lumineszenz-Intensitäten in der Mitte der Zellkrone vorhanden sind. Ab einer Zellzahl von 100000 ist die Matrix innerhalb der Zellkrone vollständig besiedelt. Dies gilt sowohl für PanMa, als auch für SISser (Abb.8C). Dies könnte im Zusammenhang mit dem Plateau in Abbildung 8A stehen. Die vollständig besiedelte Zellkrone weist womöglich auf ein baldiges Erreichen der Detektionsgrenze im IVIS hin. Besonders auffällig in der Auswertung von Abbildung 8C sind die Intensitäten der Zellkronen der unteren Reihe PanMa und der oberen Reihe SISser. Hier wird bei der Zellzahl 25000, 100000 und 250000 deutlich, dass die Zellkronen, die im Zentrum der CCD-Kamera liegen, eine höhere Intensität aufweisen als die außenstehenden Reihen. Dies weist darauf hin, dass die Signaldetektion des IVIS nicht gleichmäßig, sondern abhängig von der Detektorposition ist. Dieses Phänomen wird auch im weiteren Tumormodell beobachtet.

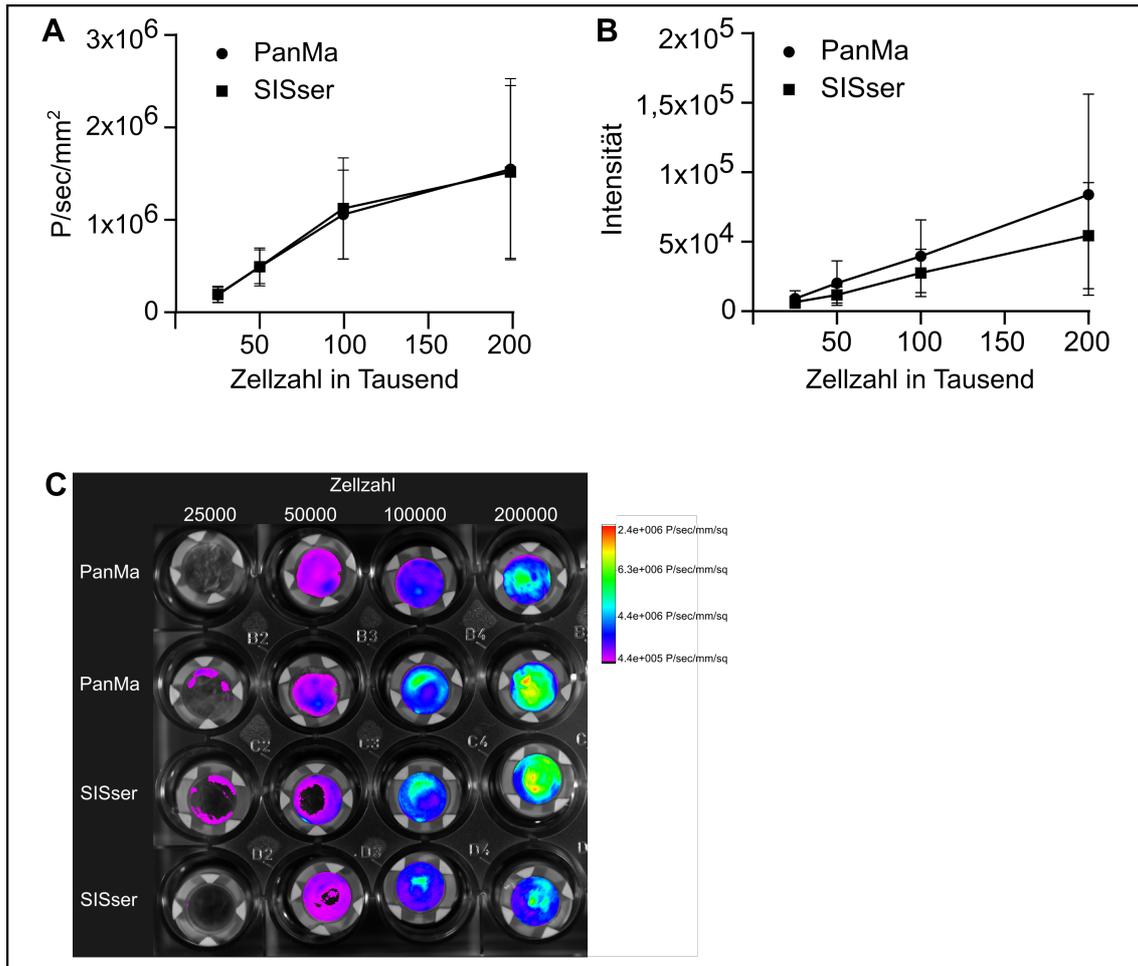


Abbildung 8 Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC in 3D

A Der Graph zeigt die Lumineszenz-Intensität in P/sec/mm² definierter Zellzahlen (50000, 100000, 150000, 200000) auf der PanMa und der SISser im IVIS. Dazu wurden auf den Matrizen jeweils 2 Zellkronen mit den gleichen Zellzahlen besiedelt, 5 Stunden im Inkubator anwachsen lassen und für 10 Minuten mit 0,15 mg D-Luciferin inkubiert. Die Anzahl der biologischen Replikate beträgt n=3. Die Werte der Lumineszenz-Intensität sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Der ROI-Innenbereich für die Auswertung der Lumineszenz-Intensität im MI betrug 44121 ppi. **B** zeigt analog dazu die Lumineszenz-Intensität definierter Zellzahlen (50000, 100000, 150000, 200000) auf den Matrizen im Mikroplatten Reader. **C** zeigt eine repräsentative Aufnahme BLI-Aufnahme aus dem IVIS. Hier ist der Aufbau eines biologischen Replikats (n1) gezeigt.

4.6 Validierung des biolumineszenzbasierten 3D-Tumormodells

Zum Aufbau eines 3D *in vitro* BLI basierendem Testsystems des Pankreaskarzinoms wurden die PANC-1 FLUC Anfangszellzahlen 25000, 50000 und 100000 auf der PanMa und SISser ausgesät und über 21 Tage kultiviert. Im weiteren Verlauf werden diese zur sprachlichen Vereinfachung als Zellaussaat 25000, 50000 und 100000 beschrieben. Damit wurde überprüft welche Zellzahlen passend für die Kultur über 21 Tage sind. Neben der Zellkultur und den Messungen im IVIS wurden die PANC-1 FLUC Zellen

histologisch und immunhistologisch hinsichtlich ihrer Morphologie und Expression charakteristischer Tumormarker untersucht.

4.6.1 Lumineszenz-Intensitäten von PANC-1 FLUC im 3D Tumormodell visualisieren den Anstieg der Zellzahl

Abbildung 9A und B zeigen die Lumineszenz-Intensitäten der PANC-1 FLUC Zellen während der Kultur auf der PanMa und SISser. Die PanMa-Modelle weisen in den ersten 14 Tagen der Kultur eine ansteigende Intensität auf, wohingegen die Zunahme des Signals bei weiterer Kultur bis Tag 21 etwas geringer ausfällt (Abb. 9A). Selbiges ist in geringerem Ausmaß auf der SISser zu beobachten (Abb. 9B). Die Zellaussaat 50000 übersteigt auf der PanMa mit ihrer Lumineszenz-Intensität ab Tag 14 die der Zellaussaat 100000 (Abb. 9A). Die Zellaussaaten 25000 und 100000 nähern sich auf der PanMa in ihrer Lumineszenz-Intensität bis Tag 21 an (Abb. 9A). Auf der SISser besitzt die Zellaussaat 100000 über 21 Tage eine höhere Lumineszenz-Intensität als die Zellaussaaten 50000 und 25000 (Abb. 9B). Insgesamt zeigen die Zellaussaaten auf der PanMa und SISser tendenziell eine vergleichbare Lumineszenz-Intensität (Abb. 9A, B).

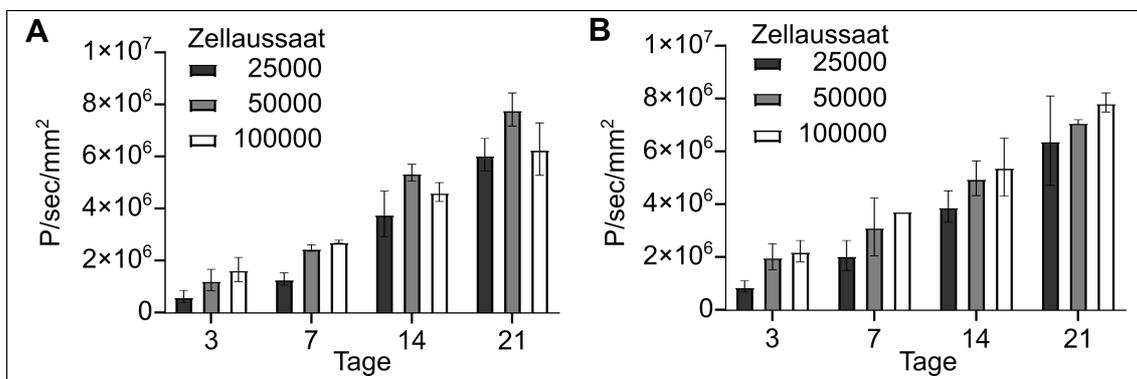


Abbildung 9 Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC im 3D-Tumormodell

A Der Graph zeigt die Lumineszenz-Intensität in P/sec/mm² von definierter PANC-1 FLUC Zellaussaat (25000, 50000, 100000) über 21 Tage auf der PanMa im IVIS. An Tag 7, 14 und 21 wurden sowohl vor als auch nach Inkubation mit 0,15 mg/ml D-Luciferin Messungen im IVIS durchgeführt, um mögliche Hintergrundsignale zu detektieren. Die Hintergrundsignale wurden zur Vergleichbarkeit der Daten von den Messungen nach der Inkubation abgezogen. Es wurden auf den Matrizen jeweils zwei Zellkronen mit derselben Zellaussaat kultiviert. Die Anzahl der biologischen Replikate beträgt n=3. Die Werte der Lumineszenz-Intensität sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Der ROI-Innenbereich für die Auswertung der Lumineszenz-Intensität im MI betrug 44121 ppi. In **B** wird analog dazu die Lumineszenz-Intensität in P/sec/mm² von definierter PANC-1 FLUC Zellaussaat (25000, 50000, 100000) über 21 Tage auf der SISser dargestellt. Auch hier wurden die Hintergrundsignale vor den Messungen an Tag 7, 14 und 21 detektiert und von den Messungen nach der Inkubation mit 0,15 mg/ml D-Luciferin abgezogen.

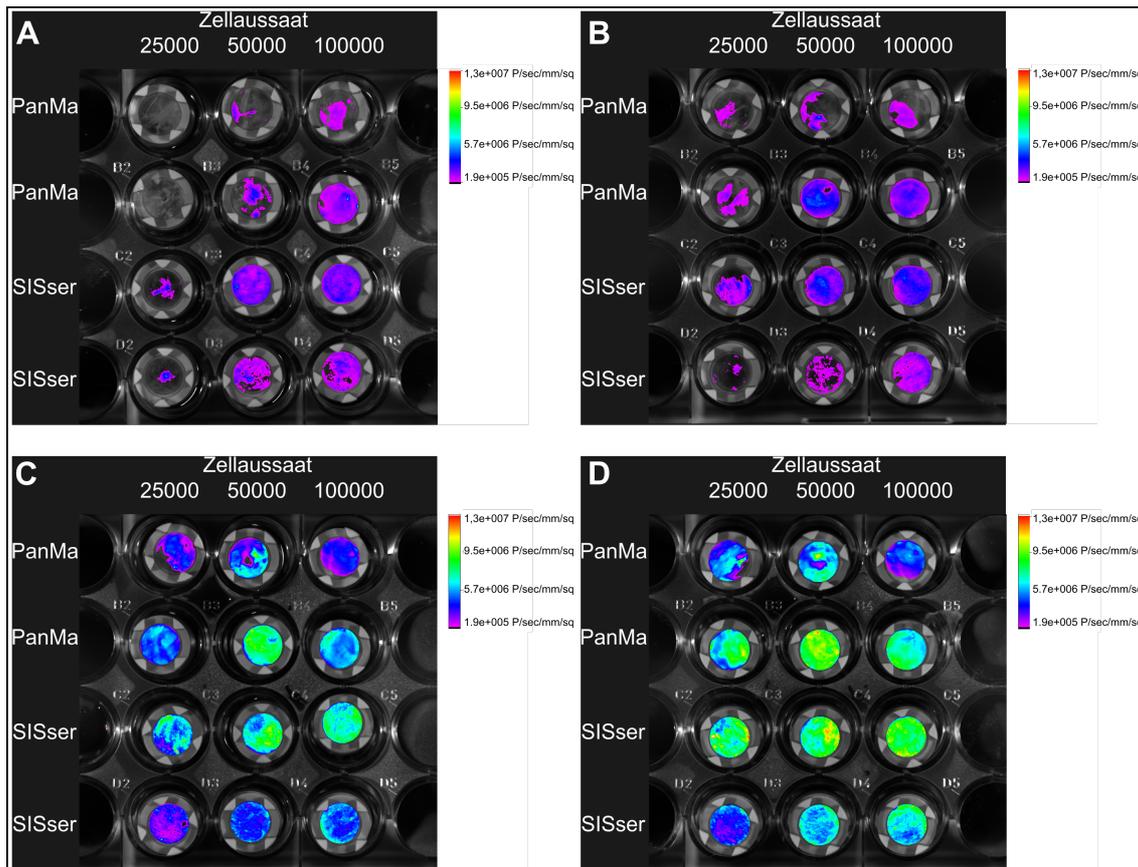


Abbildung 10 Repräsentative Aufnahmen von PANC-1 FLUC im 3D-Tumormodell

Die Abbildung zeigt repräsentative BLI-Aufnahmen des 3D-Tumormodells aus dem IVIS. Hier ist der Aufbau eines biologischen Replikats (n3) gezeigt. Es sind jeweils zwei Zellkronen mit Zellaussaat 25000, 50000 und 100000 für die PanMa und SISser dargestellt. A – D zeigen die BLI-Aufnahmen von Tag 3 bis Tag 21.

In Abbildung 10 sind die repräsentativen BLI-Aufnahmen aus dem IVIS dargestellt. An Tag 3 liegt die Zellaussaat 25000 auf der PanMa womöglich unterhalb der Detektionsgrenze (Abb. 10A). Die Zellaussaat 100000 bedeckt am Tag 3 in der unteren PanMa Reihe, sowie der oberen SISser Reihe die Matrizen vollständig (Abb. 10A). Die höheren Lumineszenz-Intensitäten der im Zentrum der CCD-Kamera liegenden Zellkronen wird ebenfalls über die Messungen an Tag 7, 14 und 21 im Tumormodell deutlich (Abb. 10A-D). Dies unterstreicht die in 4.5 aufgestellte Hypothese, dass die Signaldetektion des IVIS nicht gleichmäßig, sondern abhängig von der Detektorposition ist. Dennoch ist in der BLI-Aufnahme eine kontinuierliche Zunahme der Lumineszenz-Intensität visualisiert. Damit wird bestätigt, dass die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen in einem Tumormodell über 21 Tage Rückschlüsse auf die Zellzahl

zulässt. Es ist davon auszugehen, dass der Anstieg der Lumineszenz-Intensität auf eine Vermehrung der Zellen zurückzuführen ist.

4.6.2 Die Proliferationsrate von PANC-1 FLUC ist auf der PanMa und SISser vergleichbar

Um zu verifizieren, dass der Anstieg der Lumineszenz-Intensität auf eine Vermehrung der Zellen zurückzuführen ist, wurde die Proliferationsrate der PANC-1 FLUC Zellen auf der PanMA und SISser bestimmt. Abbildung 11 zeigt die Proliferationsrate in % der Zellaussaat 25000, 50000 und 100000 auf der PanMa und SISser über 21 Tage. Die Zellaussaat 25000 zeigt an Tag 3 und 7 eine höhere Proliferationsrate auf der SISser als auf der PanMa (Abb. 10A). An Tag 14 und 21 ist die Rate auf der PanMa leicht erhöht im Vergleich zur SISser. Insgesamt sinkt die Proliferationsrate auf beiden Matrizen kontinuierlich, jedoch von Tag 3 bis 14 deutlich stärker als von Tag 14 bis Tag 21 (Abb. 11A). Die Zellaussaat 50000 verhält sich ähnlich. Ebenso sind hier die Proliferationsraten auf der SISser bis Tag 7 höher und überwiegen auf der PanMa an Tag 14 und 21 (Abb. 11B). An Tag 21 ist auf der PanMa ein leichter Anstieg der Proliferationsrate, im Vergleich zu Tag 14 zu beobachten (Abb. 11B). Diese leicht erhöhte Proliferationsrate an Tag 21 ist für die Zellaussaat 100000 sowohl auf der PanMa, als auch auf der SISser zu beobachten (Abb. 11C). Zusammenfassend zeigt sich, dass die Proliferationsraten der PANC-1 FLUC Zellaussaat auf den Matrizen bis Tag 14 sinken (Abb. 11A-C). Im Kontext mit der steigenden Lumineszenz-Intensität im Tumormodell (Abb. 9) und dem linearen Zusammenhang zwischen Lumineszenz-Intensität und Zellzahl (Abb.8) könnte die sinkende Proliferationsrate ein Hinweis auf einen kontaktinduzierten Proliferationsstopp auf beiden Matrizen sein. In der statistischen Auswertung zeigen sich zudem keine Unterschiede zwischen dem Proliferationsverhalten der PANC-1 FLUC Zellen auf der PanMa und SISser. Dies lässt den Schluss zu, dass die Matrizen die Zellen in ihrem proliferativen Verhalten nicht unterschiedlich beeinflussen.

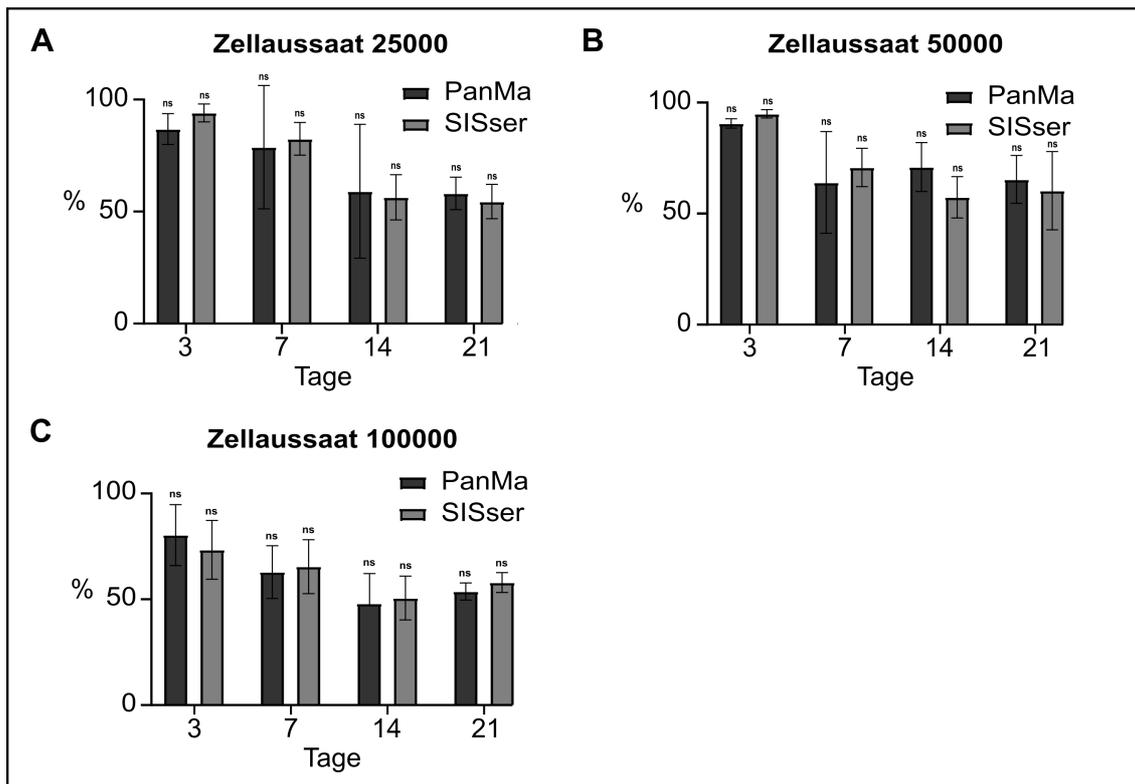


Abbildung 11 Proliferation von verschiedenen PANC-1 FLUC Zellzahlen im Tumormodell

Die Proliferationsrate konnte durch die Färbung der Matrizen gegen Ki67 / DAPI bestimmt werden. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei $n=3$. Dabei wurden an den Messtagen für jedes biologische Replikat mindestens 8 histologische Bilder pro Zellaussaat aufgenommen, alle Zellen auf den Matrizen (DAPI) sowie die proliferativen Zellen (Ki67⁺) gezählt und der Mittelwert der Proliferationsraten für die Zellaussaaten aller drei biologischen Replikate in % errechnet. **A** zeigt die Proliferationsrate der Zellaussaat 25000 in % auf der PanMa und SIS über 21 Tage. **B** stellt die Proliferationsrate der Zellaussaat 50000 in % auf der PanMa und SIS über 21 Tage dar. In **C** wird die Proliferationsrate der Zellaussaat 100000 in % auf der PanMa und SIS über 21 Tage gezeigt. Um Abweichungen der Proliferationsrate auf den unterschiedlichen Matrizen zu analysieren, diente die statistische Auswertung mit einem Holm-Sidak's multiplen T-Test bei dem die Signifikanz bei $p < 0,05$ liegt.

Tabelle 14 und 15 zeigen neben den proliferativen Zellen (Ki67⁺) alle gezählten Zellen (DAPI) für beide Gewebe über 21 Tage für die Zellaussaaten 25000, 50000 und 100000. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei $n=3$. Es sind die Mittelwerte der biologischen Replikate, ihre Standardabweichung, sowie die Proliferationsrate der Zellaussaaten in % als Zahlenwerte aufgeführt. Bei der Zellaussaat 50000 auf der SISser steigt die Zellzahl bis Tag 14 und nimmt bis Tag 21 wieder ab (Tabelle 14). Bei den anderen Zellaussaaten, ist dieses Phänomen nicht zu beobachten. Insgesamt wird deutlich, dass eine Vermehrung von proliferativen Zellen auf der PanMa und SISser für 25000 Zellen am besten möglich ist. Die Zellzahl steigt auf beiden Matrizen kontinuierlich bis Tag 21 (Tabelle 14 und 15).

Tabelle 14 Zellkerne pro Aufnahme SISser

Tage		Tag 3			Tag 7		
Zellaussaat		25000	50000	100000	25000	50000	100000
DAPI	MW	25,44	32,04	46,37	43,44	53,8	64,87
	STBW	0,83	8,37	6,33	2,46	3,18	9,26
Ki67	MW	23,92	30,43	34,39	35,93	38,15	41,33
	STBW	1,46	8,36	8,96	4,62	5,06	1,29
	MW in %	93,98	94,88	73,12	82,4	70,74	65,19
Tage		Tag 14			Tag 21		
Zellaussaat		25000	50000	100000	25000	50000	100000
DAPI	MW	74,3	94,97	78,3	90,61	84,67	114,3
	STBW	4,14	8,38	7,71	8,48	10,55	13,6
Ki67	MW	42,067	54,13	38,87	49,78	49,51	65,5
	STBW	7,99	6,89	3,88	9,52	5,77	4,09
	MW in %	56,34	57,3	50,39	54,44	60,27	57,7

Tabelle 15 Zellkerne pro Aufnahme PanMa

Tage		Tag 3			Tag 7		
Zellaussaat		25000	50000	100000	25000	50000	100000
DAPI	MW	15,38	25,05	29,53	30,56	55,5	77,23
	STBW	5,73	3,08	3,63	8,16	1,8	21,09
Ki67	MW	13,65	22,72	23,34	28,88	31,55	47,21
	STBW	5,62	3,13	2,59	7,64	11,31	11,59
	MW in %	86,76	90,54	80,03	78,69	63,98	62,61
Tage		Tag 14			Tag 21		
Zellaussaat		25000	50000	100000	25000	50000	100000
DAPI	MW	83,6	75,7	94,13	102,7	93,03	62,63
	STBW	15,39	11,7	12,19	11,28	17,89	9,50
Ki67	MW	45,57	57,73	44,79	60,29	61,38	33,28
	STBW	13,85	6,08	6,43	12,62	15,75	4,26
	MW in %	54,51	76,26	47,59	59,11	65,98	53,14

4.6.3 PANC-1 FLUC exprimieren im 3D-Tumormodell charakteristische Marker

Weiterhin wurden die PANC-1 FLUC Zellen der PanMa und SISser basierten Tumormodelle auf Morphologie und die Expression charakteristischer Tumormarker untersucht.

Die histologischen Aufnahmen der PanMa zeigen ein mehrschichtiges Wachstum der Zellen auf der PanMa (Abb. 12A-C). Vereinzelt sind Zellen in die Matrix eingewandert (Abb. 12A-C). Einzelne Zellen zeigen proliferative Aktivität (Ki67⁺), wobei die Anzahl Ki67⁺ Zellen mit zunehmender Zellzahl abnimmt (Abb. 12D-F). Dies deckt sich mit der ermittelten Proliferationsrate (Abb. 11). Die Zellaussaaten 25000 und 50000 zeigen auf der PanMa an Tag 21 mehr proliferative Zellen als die Zellaussaat 100000. Aus Tabelle 15 ist zu entnehmen, dass die Proliferationsrate der Zellaussaaten 25000 und 50000 bei 59,11% bzw. 65,98% liegt, währenddessen die Proliferationsrate der Zellaussaat 100000 bei 53,14% liegt. Deutlicher wird der Unterschied zwischen den Zellaussaaten, wenn man die Mittelwerte der durchschnittlich gezählten Ki67⁺ Zellen pro Matrix hinzuzieht. Hier stehen bei den Zellaussaaten 25000 und 50000 60,29 bzw. 61,38 Ki67⁺ Zellen pro mikroskopierter Aufnahme 33,28 Ki67⁺ Zellen bei der Zellaussaat 100000 gegenüber (Tabelle 15). Vergleicht man die Expression der tumorspezifischen Marker Vimentin (rot) und Pancytokeratin (grün) erkennt man, dass Vimentin in der Zellaussaat 25000 häufiger als in den Zellaussaaten 50000 und 100000 exprimiert wird (Abb. 12 G-I). Pancytokeratin wird hingegen verstärkt in den Zellaussaaten 50000 und 100000 exprimiert (Abb. 12 H-I).

SISser basierte Modelle der Zellaussaat 25000 weisen einen mehrschichtigen Zellverband auf der Matrixoberfläche auf (Abb. 13A), wohingegen auf Modellen mit der Zellaussaaten 50000 und 100000 Zellen vermehrt innerhalb der Matrix vorzufinden waren (Abb. 13B, C). Die Anzahl der Ki67⁺ Zellen auf der SISser scheint nicht wie auf der PanMa, mit höherer Zellaussaat zu sinken (Abb. 13D-F). Dies wird durch die Auswertung der Tabelle 14 verdeutlicht. Die Proliferationsrate der Zellaussaaten 25000, 50000 und 100000 liegt bei 54,44%, 60,27% und 57,7% (Tabelle 14). Ebenfalls ist die durchschnittliche Anzahl der gezählten Ki67⁺ Zellen pro untersuchte Aufnahme auf der SISser ähnlich (Tabelle 14). Die Unterschiede zwischen den Zellaussaaten an Tag 21 hinsichtlich der Zellzahl und ihrer Proliferationsrate sind auf der SISser geringer als auf

der PanMa. Bei der Auswertung mikroskopischen Aufnahmen der tumorspezifischen Marker Vimentin (rot) und Pancytokeratin (grün) wird deutlich, dass die Zellaussaat 25000 deutlich weniger Vimentin⁺ Zellen aufweist als die Zellaussaaten 50000 und 100000 (Abb. 13G-I). Auffällig dabei ist die Lokalisation der Vimentin⁺ Zellen. Die Vimentin⁺ Zellen befinden sich in den Zellaussaaten 50000 und 100000 vor allem innerhalb der Matrix. Die Beobachtungen implizieren, dass Zellen, die in die Matrix migriert sind, um dort zu residieren, einen mesenchymalen Charakter aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass für eine erfolgreiche Migration der Zellen in die Matrix ein mesenchymaler Zelltypus vorausgesetzt ist.

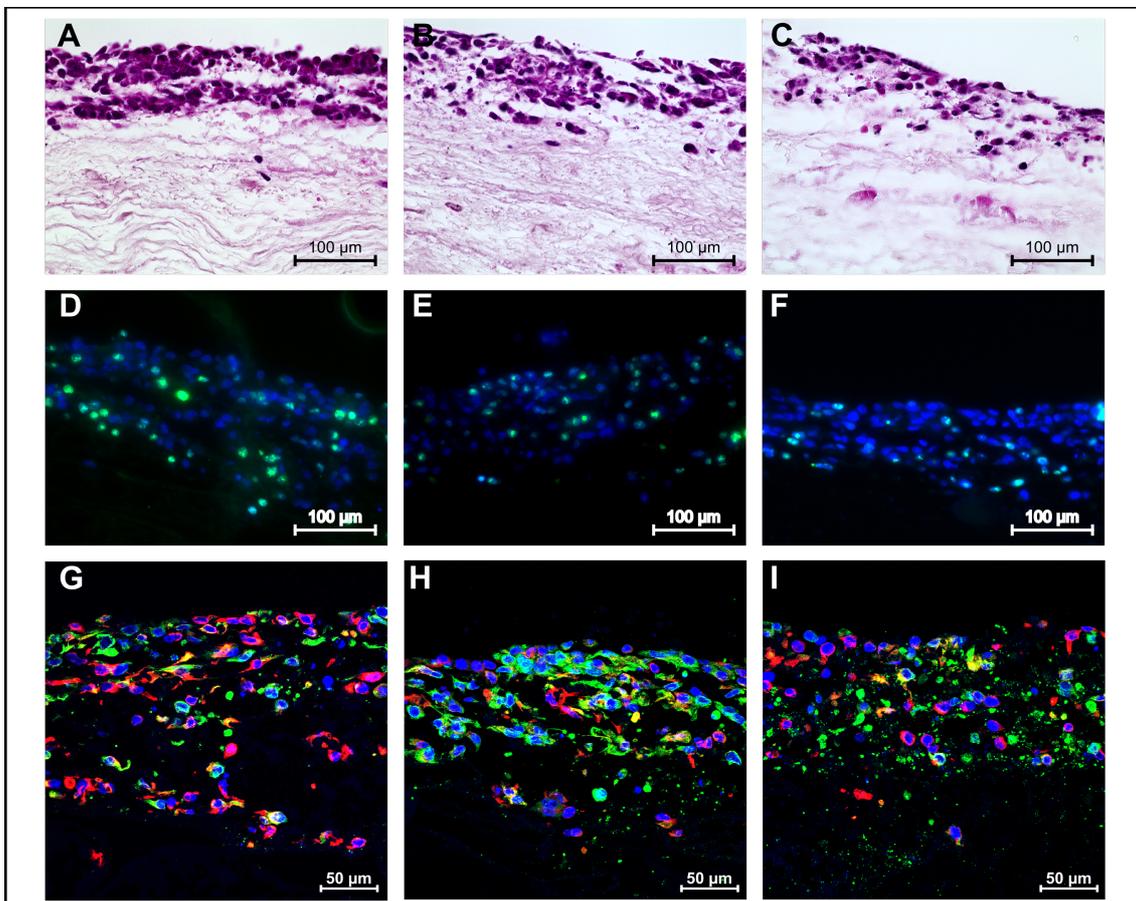


Abbildung 12 Mikroskopische Aufnahmen der PANC-1 FLUC-Zellen auf der PanMa

Die Abbildung zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Zellaussaaten 25000, 50000 und 100000 an Tag 21. In A-C sind H.E. Färbungen der Zellaussaaten 25000 (A), 50000 (B) und 100000 (C) an Tag 21 dargestellt. D-F zeigen die Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki67 (grün) und DAPI (blau) der Zellaussaaten 25000 (D), 50000 (E) und 100000 (F) an Tag 21. In G-I sind die Immunfluoreszenzfärbungen gegen die tumorspezifischen Marker Vimentin (rot) und Pancytokeratin (grün) der Zellaussaaten 25000 (G), 50000 (H) und 100000 (I) an Tag 21 dargestellt.

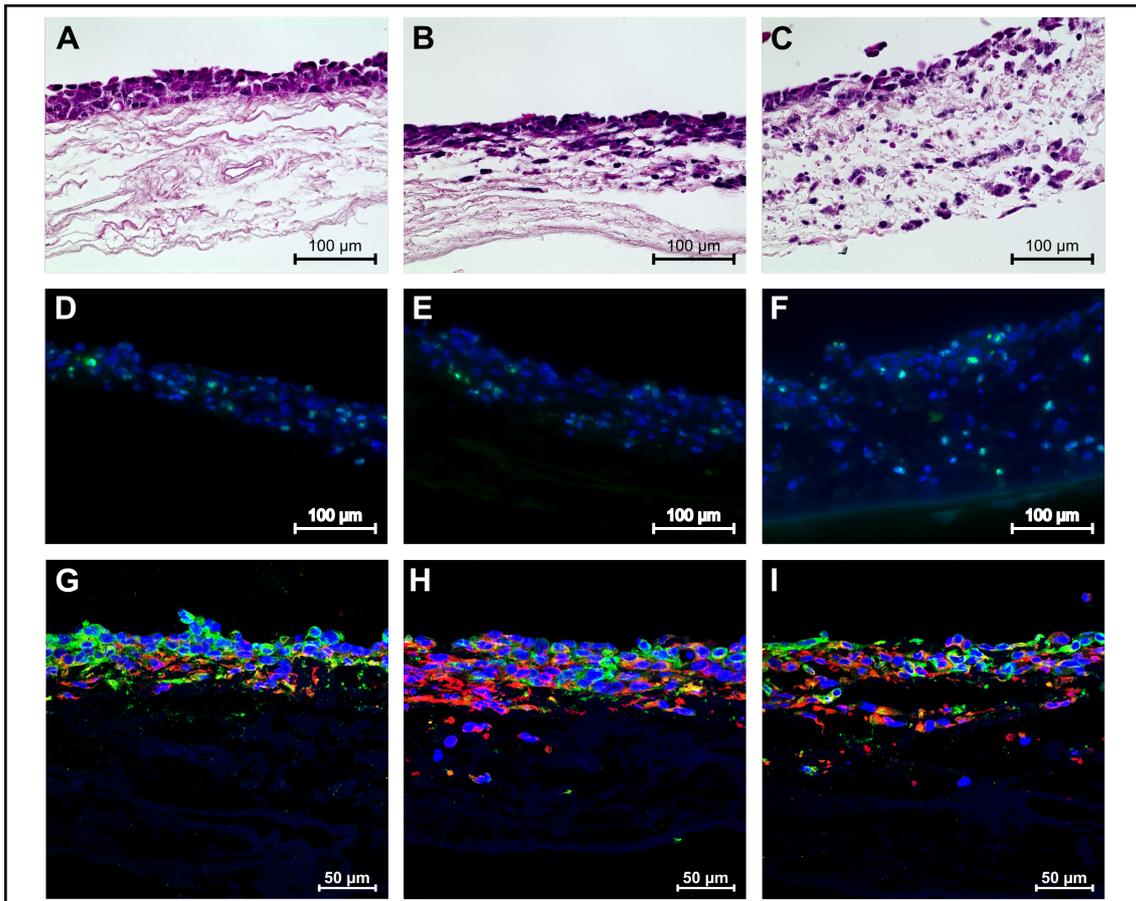


Abbildung 13 Mikroskopische Untersuchungen der PANC-1 FLUC-Zellen auf der SISser

Die Abbildung zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Zellaussaaten 25000, 50000 und 100000 an Tag 21. In **A-C** sind H.E. Färbungen der Zellaussaaten 25000 (A), 50000 (B) und 100000 (C) an Tag 21 dargestellt. **D-F** zeigen die Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki67 (grün) und DAPI (blau) der Zellaussaaten 25000 (D), 50000 (E) und 100000 (F) an Tag 21. In **G-I** sind die Immunfluoreszenzfärbungen gegen die tumorspezifischen Marker Vimentin (rot) und Pancytokeratin (grün) der Zellaussaaten 25000 (G), 50000 (H) und 100000 (I) an Tag 21 dargestellt.

Durch die dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich die PANC-1 FLUC Zellen in einem 3D-Tumormodell über 21 Tage kultivieren lassen und ihre Vermehrung auf den Matrizen mittels BLI untersucht werden kann. Darüber hinaus werden tumorspezifische Marker im Tumormodell exprimiert, die ein Merkmal für ein funktionsfähiges Modell darstellen.

Um zu untersuchen ob sich Therapeutika auf die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen auswirken, wurde aufgrund ihres proliferativen Verhaltens die Zellaussaat 25000 für die Anwendung im Behandlungsmodell ausgewählt.

4.7 Die Behandlung von PANC-1 FLUC mit Gemcitabin lässt sich durch BLI detektieren

Um die Eignung der EZM-basierten Tumormodelle, sowie des lumineszenzbasierten Analyseverfahrens zur Testung von Tumorthapeutika zu verifizieren, sowie mögliche EZM-vermittelte Unterschiede im Ansprechverhalten der Tumorzellen auf entsprechende Substanzen zu untersuchen, wurden PANC-1 FLUC Zellen bis Tag 14 auf der PanMa und SISser kultiviert und anschließend mit Gemcitabin behandelt. Dafür wurden zu Beginn aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse in 4.6 25000 Zellen ausgesät. Es wurden behandelte, sowie unbehandelte PANC-1 FLUC Zellen untersucht.

In Abbildung 14 A und B wird die Lumineszenz-Intensität der behandelten und unbehandelten PANC-1 FLUC Zellen sowohl auf der PanMa als auch auf der SISser dargestellt. Auf der PanMa ist die Lumineszenz-Intensität der behandelten Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht erhöht (Abb. 14A). Nach 72 Stunden ist eine deutlich verringerte Lumineszenz-Intensität für die behandelten Zellen zu beobachten (Abb. 14A). Die Lumineszenz-Intensität ist nicht nur geringer als die unbehandelten Zellen nach 72 Stunden, sondern auch geringer als die Intensität nach 24 Stunden (Abb. 14A). Nach 168 Stunden hat die Lumineszenz-Intensität nahezu den Ausgangswert vor Behandlungsbeginn erreicht (Abb. 14A). Selbiges ist für die SISser zu beobachten. Die Lumineszenz-Intensität der behandelten Zellen steigt zum Ausgangswert vor der Behandlung nach 24 Stunden an und sinkt danach deutlich ab (Abb. 14B). Nach 168 Stunden nähert sich die Lumineszenz-Intensität dem Ausgangswert (Abb. 14B). Die Lumineszenz-Intensitäten der unbehandelten Zellen steigen auf der PanMa kontinuierlich an (Abb. 14A). Auf der SISser steigt die Lumineszenz-Intensität der unbehandelten Zellen bis zur Messung nach 72 Stunden und sinkt nach 168 Stunden leicht ab (Abb. 14B). Wird wie in 4.6.1 davon ausgegangen, dass die Lumineszenz-Intensität linear mit der Zellzahl steigt, kann die Abnahme der Lumineszenz-Intensität auf eine reduzierte Zellzahl hindeuten. Damit könnte die Wirkung des Gemcitabins auf die PANC-1 FLUC Zellen im pankreatischen Tumormodell bestätigt werden. In Abbildung 14C und D wird die Abnahme der Lumineszenz-Intensität mittels BLI-Aufnahmen visualisiert. Die Lumineszenz-Intensitäten der SISser-Modelle überwiegen denen der PanMa-Modelle. Die Abnahme der Lumineszenz-Intensitäten sind auf den SISser-Modellen erst ab 168 Stunden deutlicher zu erkennen, während die Auswirkungen der Behandlung mit

Gemcitabin auf der PanMa nach 72 Stunden ersichtlich sind. Möglicherweise ist dies ein Hinweis für eine höhere Wirksamkeit des Gemcitabins auf der PanMa.

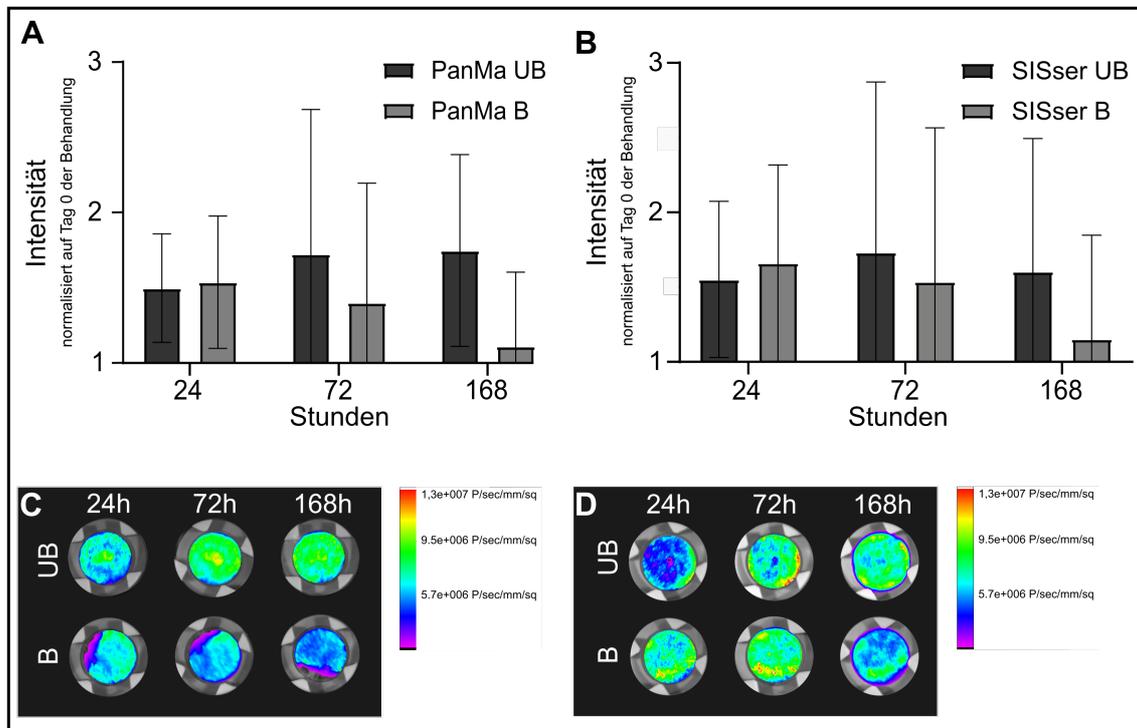


Abbildung 14 Behandlungsversuch der PANC-1 FLUC Zellen im validierten Tumormodell mit Gemcitabin

A Der Graph zeigt die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen auf der PanMa nach Behandlung mit Gemcitabin. Die Behandlung mit Gemcitabin wurde ab Tag 14 im Tumormodell begonnen und Messungen nach 24, 72, und 168 Stunden im IVIS durchgeführt. Es wurden jeweils drei behandelte (PanMa B / SISser B) und drei unbehandelte (PanMa UB / SISser UB) Zellkronen auf der PanMa und SISser untersucht. Die biologischen Replikate beträgt $n=3$. Die Werte der Lumineszenz-Intensität sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Der ROI-Innenbereich für die Auswertung der Lumineszenz-Intensität im MI betrug 44121 ppi. In **B** wird analog dazu die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen auf der SISser nach Behandlung mit Gemcitabin gezeigt. **C** und **D** zeigen repräsentative BLI-Aufnahmen eines biologischen Replikats ($n=2$) der unbehandelten (UB) und behandelten (B) Zellkronen nach 24, 72 und 168 Stunden auf der PanMa (**C**) und SISser (**D**).

Durch den Versuch der Behandlung von PANC-1 FLUC Zellen mit Gemcitabin im BLI-basierten Testsystem des pankreatischen Karzinoms konnte gezeigt werden, dass ein Standardtherapeutika aus der Pankreaskarzinomtherapie die Lumineszenz-Intensitäten der Zellen herabsetzt. Damit wird das Potential dieses BLI basierendem Tumormodell unterstrichen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde an der Etablierung und Validierung eines BLI basierten *in vitro* Testsystems für die Pankreaskrebsforschung gearbeitet. Im Gegensatz zu herkömmlichen 2D-Tumortestsystemen wurde hier die gentechnisch veränderte Tumorzelllinie PANC-1 FLUC auf einer pankreatischen porzinen Matrix kultiviert und in einem BLI basierten Testsystem für 21 Tage untersucht. Durch die Verwendung von PanMa wurde eine gewebespezifische EZM Komponente implementiert, um ein Tumormodell zu erhalten, welches die *in vivo* Situation besser widerspiegelt als eine 2D-Zellkultur. Um zu untersuchen ob unterschiedliche Matrizen bzw. unterschiedliche EZM Komponenten, das Verhalten der Tumorzellen und die Wirkung von Therapeutika beeinflussen, wurden die PANC-1 FLUC Zellen ebenfalls auf dem porzinem Dünndarmgewebe SISser untersucht. Der Einfluss des Matrixgerüsts auf die Therapie von Tumorzellen bei Darm-, Lungen- und Brustkrebs konnten in Studien am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg bereits gezeigt werden (Gottlich et al., 2018; Gottlich et al., 2016; Kühnemundt et al., 2020; Stratmann et al., 2014; Wallstabe et al., 2019). Die SISser diente in dieser Arbeit demnach als fundierter Vergleich für die neuartig etablierte PanMa. Der lineare Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenz-Intensität konnte das Potential eines BLI basierten Tumormodells für die Krebsforschung bestätigen. Weiterhin konnten im Tumormodell charakteristische Tumormarker nachgewiesen werden. Die unterschiedlich starke Expression dieser Marker auf PanMa und SISser zeigen Tendenzen für einen Einfluss unterschiedlicher EZM Komponenten auf das Verhalten der Tumorzellen. Dies zeigt sich auch in der Wirkung des Standardtherapeutikums Gemcitabin, welches auf PanMa tendenziell eine raschere Verminderung der Lumineszenz-Intensität hervorruft.

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnten jedoch Problemstellungen in der BLI identifiziert werden, die es in weiterführenden Untersuchungen zu überwinden gilt, um dieses 3D *in vitro* Tumormodell für die Testung von Therapeutika freizugeben.

5.1 Biolumineszenzbasierte Messverfahren

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Messung des Luciferase Signals der PANC-1 FLUC Zellen im PanMa-basierten 3D-Tumormodell und somit ein nicht-invasives Untersuchungsverfahren der Tumorzellen generell möglich ist. Es konnte

nachgewiesen werden, dass die Tumorzellzahl in einem linearen Zusammenhang zur Lumineszenz-Intensität steht. Allerdings konnte die exakte Tumorzellzahl nicht bestimmt werden, da auch Autofluoreszenzen oder Hintergrundsignale die Lumineszenz-Intensität verfälschen können. Trotz der höheren Empfindlichkeit der BLI gegenüber anderen nicht-invasiven Bildgebungsmethoden, wurden in dieser Arbeit Hintergrundsignale vor erneuter Inkubation mit dem Substrat D-Luciferin detektiert (Keyaerts et al., 2012). Diese mussten daher von den Messungen nach der Inkubation abgezogen werden, um verifizierte Aussagen über die Lumineszenz-Intensitäten der Zellzahlen in einem Tumormodell über mehrere Tage treffen zu können. Die notwendige Detektion der Hintergrundsignale verlängert die Messungen und die Auswertung in der MI-Software erheblich. Darüber hinaus wurde die Positionierung der CCD-Kamera bei den Messungen der Lumineszenz-Intensitäten als Fehlerquelle identifiziert. Anders als in BLI-basierten Mausmodellen, in denen die Mäuse in einer definierten Position untersucht werden, ist die simultane Detektion mehrerer Zellkronen stark von der Autofokussierung und Positionierung der Kamera abhängig. Bei mehreren Messungen derselben Zellkrone an unterschiedlichen Positionen innerhalb des IVIS konnte festgestellt werden, dass die Lumineszenz-Intensität im Zentrum der Kamera höhere Werte besitzt als am Rand der Kamera. Daher muss in weiteren Untersuchungen die Möglichkeit einer Positionierungshilfe getestet werden oder pro Messung nur noch eine Zellkrone simultan aufgenommen werden. Dieser Umstand würde zusätzlich zu der Detektion der Hintergrundsignale die BLI-Messungen verlängern. Entscheidend für eine vergleichbare Auswertung der Lumineszenz-Intensitäten war die kreisförmige Setzung von gleichflächigen ROIs. Diese mussten passgenau für die Matrix der Zellkronen und die Größe der einzelnen Wells erstellt werden. Bei unterschiedlich großen ROIs wäre die Auswertung der Lumineszenz-Intensität nicht quantifizierbar. In der Setzung von gleichflächigen ROIs liegt jedoch auch der Vorteil des BLI. Anders als im Mikroplatten Reader, der nur punktuelle Messungen auf der Zellkrone vornimmt, kann durch das BLI nach Auswertung in der MI-Software die Lumineszenz-Intensität der gesamten Zellkrone beurteilt werden. Darüber hinaus ist die Visualisierung der Lumineszenz-Intensität durch die BLI-Aufnahmen zur Verteilung der Zellen auf der Matrix ein entscheidender Vorteil gegenüber dem Mikroplatten Reader. Diese Punkte unterstreichen das Potential der BLI für 3D *in vitro* Testsysteme, auch wenn eine Standardisierbarkeit durch die

Hintergrundsignale, die mögliche fehlerhafte Positionierung der Kamera und den hohen zeitlichen Aufwand zum jetzigen Zeitpunkt erschwert ist. Zusammenfassend ist eine Verwendung der BLI für eine Visualisierung der Zellen auf der Matrix sinnvoll, für die Bestimmung der Tumorzellen auf der Matrix ist jedoch der Mikroplatten Reader aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse ausreichend.

5.2 Zelllinien

Als zelluläre Komponente des BLI basierten 3D *in vitro* Testsystems des Pankreaskarzinoms Zelllinien verwendet. Studien zeigen, dass Primärzellen die natürlichen Gegebenheiten von *in vivo* Zellen besser repräsentieren. Dennoch besitzen Zelllinien einige Vorteile gegenüber den Primärzellen. Während sich Zelllinien im Vergleich zu Primärzellen einfacher kultivieren lassen, sind Primärzellen in ihrer Isolation und Kultur komplexer (Cree et al., 2010). Insbesondere zum Aufbau eines BLI basierten Tumormodells wäre die Verwendung von Primärzellen mit einem erheblichen Aufwand verbunden, da die Primärzellen nach jeder Isolation transduziert werden müssten. Zelllinien sind hingegen in großen Mengen verfügbar und können nach einmaliger Transduktion mit FLUC eingefroren werden. Zudem sind ihre Eigenschaften bereits beschrieben. Diese Merkmale sprechen für eine Validierung eines neuartigen Testsystems mit Zelllinien bevor das Modell auf Primärzellen adaptiert wird.

5.3 Matrix des BLI Tumormodells

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche EZM Komponenten das Wachstumsverhalten der PANC-1 FLUC Zellen im BLI basierten Tumormodell beeinflussen, wurden die Zellen auf PanMa und SISser kultiviert. Die PanMa ist eine aus Kollagenfibrillen bestehende Matrix, die im Vergleich zur SISser aufgrund eines höheren Anteils visköser Komponenten eine geringere Steifigkeit aufweist und somit ein etwas weiches ECM-Gerüst darstellt als die SISser (Berger et al., 2020). Der Einfluss der unterschiedlichen ECM Komponenten auf die auf der Matrix kultivierten Zellen, konnten durch Berger et. al bestätigt werden, indem das Genexpressionprofil pluripotenter Stammzellen auf organspezifischen Matrizen untersucht wurde. In den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die PANC-1 FLUC Zellen generell auf der PanMa und der SISser ein ähnliches proliferatives Wachstum zeigen. Bei höheren Zellaussaaten

wurden jedoch auf der PanMa weniger proliferative Zellen detektiert als auf der SISser. Dies deutet darauf hin, dass die SISser länger zur Proliferation der Tumorzellen geeignet ist als die PanMa. Mögliche Gründe dafür liegen in der Zusammensetzung der SISser, welche mit ihrer dichteren Struktur den Zellen ein steiferes Grundgerüst als die weiche viskoelastische PanMa für die Proliferation vorgibt. In histologischen Untersuchungen konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Zellen auf der SISser ein invasiveres Wachstum in die Matrix aufweisen als in die PanMa. Die Ergebnisse bestätigen demnach einen Einfluss der EZM Komponenten auf das Wachstum der Zellen und die Expression tumorspezifischer Marker. Es wurde bereits bestätigt, dass eine steife EZM das Tumorwachstum fördert (Reid et al., 2017). Möglicherweise ist das invasivere Verhalten der Zellen ebenso auf vermehrten Zell-Matrix-Kontakte in der SISser begründet. Es ist bekannt, dass Zell-Matrix-Kontakte das Verhalten der Zellen beeinflussen. Durch die dichtere Kollagenfaserstruktur der SISser, v.a. gerichtete dicke fibrilläre Kollagene, könnten so mehr Zell-Matrix-Kontakte zu einem invasiveren Wachstum der Zellen in die Matrix führen. In der Proteomanalyse der EZM von PanMa und SISser bestätigen Berger et. al einen matrixabhängigen Einfluss auf die Zelldifferenzierung. Dabei wurden mehr Laminin- und Kollagenproteine in der SISser im Vergleich zur PanMa nachgewiesen. Der Adhäsionsmechanismus von Tumorzellen des pankreatischen Adenokarzinoms *in vivo* beruht u.a. auf einer Anheftung an Laminin. Eine Überexpression von Laminin ist dabei mit einem schlechteren Überlebensprognose verbunden (J. Chen et al., 2018). Der geringe Kollagen- und Lamininanteil in der PanMa wäre daher eine mögliche Erklärung für das invasivere Verhalten der Tumorzellen auf der SISser. Der Nachweis von weiteren Adhäsionsmolekülen würde diese Theorie stützen. Hier ist das Zelladhäsionsmolekül EpCAM zu nennen, welches als mögliches therapeutisches Ziel bei Pankreaskarzinom gilt und die Zell-Zell-Interaktion bestimmt (Lin et al., 2018). Darüber hinaus setzt eine Metastasierung von Tumorzellen die epitheliale mesenchymale Transmission (EMT) voraus. Daher ist der Nachweis von E-Cadherin, welches eine entscheidende Rolle bei der EMT spielt, diagnostisch wertvoll (Polireddy et al., 2016). Weiter zeichnet sich das *in vivo* Tumorgewebe über fibrotische Zustände aus, welche die medikamentöse Therapie erschweren (Chu et al., 2007). Daher ist es denkbar die PanMa zu einem fibrotischen Gerüst mit einer dichteren Kollagenfaserstruktur auszubauen, um sich der *in vivo* Situation weiter zu nähern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die

differente Zusammensetzung und Struktur der EZM-Komponenten von gewebe-spezifischen Matrizen auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen auswirkt.

5.4 Detektion der Behandlung von PANC-1 FLUC mittels BLI

Um das BLI basierte Messverfahren für ein 3D-Testsystem des Pankreaskarzinoms zu überprüfen, wurden die PANC-1 FLUC Zellen mit Gemcitabin behandelt und die Anti-Tumor Wirkung durch die verringerte Lumineszenz-Intensität im Behandlungsmodell bestätigt. Die Lumineszenz-Intensität der PANC-1 FLUC Zellen sinkt nach Behandlung mit Gemcitabin auf der PanMa etwas stärker als auf der SISser. Dies könnte ein Hinweis für eine bessere Wirksamkeit des Gemcitabins auf der PanMa sein. Um die Wirkungsweise von Gemcitabin auf die PANC-1 FLUC Zellen in dem BLI basierten 3D-Testsystem weiter zu untersuchen, sind histologische und immunhistologische Untersuchungen notwendig. Zusätzlich ist für ein anwendbares Testsystem zuvor die Behandlung mit anderen Therapeutika und die Analyse ihrer Wirkungen auf die PANC-1 FLUC Zellen sinnvoll. In 3D-Sphäroidmodellen des Pankreaskarzinoms wurde PANC-1 Zellen neben Gemcitabin mit Paclitaxel, einem Zytostatikum, das seit 2014 in Kombination mit Gemcitabin zugelassen ist, behandelt (Hwang et al., 2019). Dabei wurde eine bessere Anti-Tumor Wirkung für Paclitaxel bestätigt. Die größte Problematik in der Entwicklung neuartiger Therapiestrategien ist die signifikant höhere Proliferationsrate von Tumorzellen in 2D im Vergleich zur *in vivo* Situation. Dies führt zu einer Fehleinschätzung der Konzentration von Therapeutika, insbesondere Zytostatika, die eine Wirkung gegen die Proliferation der Tumorzellen erzielen sollen (Cree et al., 2010). Durch die EZM Komponenten und den Ausbau der Matrix zu einem komplexeren Tumormodell, könnte die Aussagekraft der Therapiestrategien valider werden. Der Hauptnachteil von Gemcitabin ist z.B. die schnelle Desaminierung zu seinem inaktiven Metaboliten 2', 2'-Difluordesoxyuridin durch die Cytidineaminase. Dies führt zu einer geringen *in vivo* Halbwertszeit. Daher sind erfolgsversprechende *in vitro* Daten nur zu einem Teil auf die *in vivo* Situation übertragbar. Darüber hinaus ist in fortgeschrittenen Stadien des Pankreaskarzinoms die Aufnahme von Gemcitabin in das Tumorgewebe durch eine ausgeprägte Fibrose erschwert (Chu et al., 2007). Der Ausbau der Matrix zu einer dichteren Struktur, die einem fibrotischem Zustand ähnelt, könnte auch hier die *in vivo* Situation besser widerspiegeln und die simulierte Therapiestrategie aussagekräftiger

werden lassen. Aktuelle Forschungen beziehen sich jedoch weniger auf die Implementierung und Ausbau von EZM Komponenten, sondern eher auf die Modifikation von Standardtherapeutika (Prodrugs), um ihre Effektivität zu erhöhen. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Wirkung einer lipophilen Prodrug des Gemcitabins (18CGEM) auf PANC-1 Zellen untersucht (Forciniti et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass 18CGEM eine deutlich höhere Wirksamkeit auf PANC-1 Zellen als Gemcitabin aufweist, da dieses nicht nur durch die Nukleosidtransporter in die Zellen aufgenommen wird, sondern auch durch Fettsäuretranslokasen. Neben Paclitaxel ist 18CGEM ein möglicher Kandidat für die Testung in dem hier vorgestellten 3D *in vitro* Testsystem. Die Untersuchungen von unterschiedlichen Therapeutika könnten die Aussagekraft der BLI basierte Messmethode untermauern und die präklinische Forschung weiter vorantreiben.

6. Ausblick

Ein BLI basiertes Tumormodell könnte ein geeignetes *in vitro* 3D-Testsystem darstellen, anhand dessen Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte und die Wirkung verschiedener Therapeutika auf Tumorzellen untersucht werden kann. Im Vergleich zu 2D-Testsystemen werden die *in vivo* Verhältnisse besser wiedergespiegelt. Neben der nicht-invasiven Untersuchungsmethode durch BLI basiertes Messverfahren, kann die Invasion der Zellen auf unterschiedlichen Matrizen untersucht werden. Um das 3D *in vitro* Testsystem für die präklinische Krebsforschung valide zu gestalten, bedarf es noch weitgehender Entwicklung hinsichtlich einfacherer Auswertungsmethoden, sowie einem komplexeren Aufbau der EZM. In einem etablierten statischen 3D-Tumormodell konnte kürzlich die Behandlung von Tumorzellen des dreifach negativen Brustkrebs (TNBC) mittels BLI bereits erfolgreich visualisiert werden (Stuber et al., 2020). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das Tumormodell zu einem vaskularisierten dynamischen Modell in einem Bioreaktor auszubauen. In Bioreaktorsystemen können physiologische Prozesse exakter dargestellt werden (Moll et al., 2013). Idealerweise könnte ein Tumormodell mit isolierten Primärzellen eines erkrankten Patienten aufgebaut werden und die Reaktion unterschiedlicher Therapeutika auf den Tumor getestet werden. Dies würde eine gezieltere Therapie *in vivo* ermöglichen und Nebenwirkungen reduzieren. Nach erfolgreicher Etablierung des BLI basierten Tumormodells bietet es der Wissenschaft eine gute Möglichkeit für die Weiterentwicklung und Testung chemotherapeutischer Medikamente, die einen Mehrwert für an einem Pankreaskarzinom erkrankte Patienten generieren können.

Zusammenfassung

Da in den letzten Jahrzehnten nur geringfügige Verbesserungen der Überlebensraten bei an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten erzielt wurden, besteht ein dringender klinischer Bedarf für die Entwicklung wirksamer therapeutischer Strategien. Dreidimensionale *in vitro* Modelle sind für das Screening und die Validierung von Therapeutika essenziell.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels der Methoden des Tissue Engineerings ein biolumineszenzbasiertes dreidimensionales *in vitro* Testsystem des pankreatischen Karzinoms aufgebaut und charakterisiert werden. Für die Detektion von Lumineszenz-Intensitäten wurde die pankreatische Krebszelllinie PANC-1 zuvor mit firefly luciferase (FLUC) transduziert. PANC-1 FLUC Zellen wurden auf porziner Pankreasmatrix (PanMa) und Dünndarmmatrix (SISser) kultiviert, um den Einfluss unterschiedlicher Matrizen auf das Verhalten der Zellen im Tumormodell zu untersuchen. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit die PANC-1 FLUC mit einem Standardtherapeutikum der Pankreaskarzinomtherapie, Gemcitabin, behandelt und die Wirkung mittels biolumineszenzbasierter Bildgebung detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Lumineszenz-Intensität von PANC-1 FLUC Zellen einer bestimmten Zellzahl durch biolumineszenzbasierte Messverfahren zugeordnet werden kann. Weiter wurde nachgewiesen, dass die Extrazellulärmatrix einen Einfluss auf die Expression tumorspezifischer Marker hat und PANC-1 FLUC Zellen ein unterschiedlich invasives Wachstum auf organspezifischen Matrizen aufweisen. Die Wirkung von Gemcitabin auf die Tumorzellen kann durch das hier vorgestellte biolumineszenzbasierte Messverfahren detektiert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind die Grundlage für die weitere Validierung eines biolumineszenzbasierten dreidimensionalen *in vitro* Testsystems des pankreatischen Karzinoms für die präklinische Erforschung neuartiger Therapiestrategien.

Summary

With only modest improvements in survival rates in pancreatic cancer patients over the past decades, there is an urgent clinical need for the development of effective therapeutic strategies. Three-dimensional in vitro models are essential for screening and validation of therapeutics.

In the present work, a bioluminescence-based three-dimensional in vitro test system of pancreatic carcinoma was constructed and characterised using tissue engineering methods. For the detection of luminescence intensities, the pancreatic cancer cell line PANC-1 was previously transduced with firefly luciferase (FLUC). PANC-1 FLUC cells were cultured on porcine pancreatic matrix (PanMa) and small intestine matrix (SISser) to investigate the influence of different matrices on the behaviour of the cells in the tumour model. Furthermore, in this work, the PANC-1 FLUC were treated with a standard therapeutic agent of pancreatic cancer therapy, gemcitabine, and the effect was detected using bioluminescence-based imaging.

It was shown that the luminescence intensity of PANC-1 FLUC cells can be assigned to a specific cell number by bioluminescence-based measurement techniques. Furthermore, it was demonstrated that the extracellular matrix has an influence on the expression of tumour-specific markers and that PANC-1 FLUC cells show different invasive growth on organ-specific matrices. The effect of gemcitabine on tumour cells can be detected by the bioluminescence-based measurement method presented here. The results presented in this work are the basis for further validation of a bioluminescence-based three-dimensional in vitro test system of pancreatic carcinoma for preclinical research into novel therapeutic strategies.

Literaturverzeichnis

- Awasthi, N., Zhang, C., Schwarz, A. M., Hinz, S., Wang, C., Williams, N. S., . . . Schwarz, R. E. (2013). Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, *34*(10), 2361-2369. doi:10.1093/carcin/bgt227
- Bengala, C., Guarneri, V., Giovannetti, E., Lencioni, M., Fontana, E., Mey, V., . . . Conte, P. F. (2005). Prolonged fixed dose rate infusion of gemcitabine with autologous haemopoietic support in advanced pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, *93*(1), 35-40. doi:10.1038/sj.bjc.6602673
- Berger, C., Bjorlykke, Y., Hahn, L., Muhlemann, M., Kress, S., Walles, H., . . . Zdzieblo, D. (2020). Matrix decoded - A pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human iPSC differentiation. *Biomaterials*, *244*, 119766. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119766
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, *15*(12), 786-801. doi:10.1038/nrm3904
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Negri, E., La Vecchia, C., Zeegers, M. P., & Boffetta, P. (2012). Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(1), 3-13. doi:10.1002/mc.20785
- 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: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Chen, J., Zhang, H., Luo, J., Wu, X., Li, X., Zhao, X., . . . Yu, S. (2018). Overexpression of alpha3, beta3 and gamma2 chains of laminin-332 is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology Letters*, *16*(1), 199-210. doi:10.3892/ol.2018.8678
- Chen, W. H., Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Shimano, T., Penetrante, R., Sanders, W. H., . . . Chu, T. M. (1982). Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro*, *18*(1), 24-34. doi:10.1007/BF02796382
- Christein, J. D., Kendrick, M. L., Iqbal, C. W., Nagorney, D. M., & Farnell, M. B. (2005). Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, *9*(7), 922-927. doi:10.1016/j.gassur.2005.04.008

- Chu, G. C., Kimmelman, A. C., Hezel, A. F., & DePinho, R. A. (2007). Stromal biology of pancreatic cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(4), 887-907. doi:10.1002/jcb.21209
- 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 Chemotherapy and Pharmacology*, 78(1), 1-12. doi:10.1007/s00280-016-3003-0
- Cid-Arregui, A., & Juarez, V. (2015). Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 21(31), 9297-9316. doi:10.3748/wjg.v21.i31.9297
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C.-c., Raoul, J.-L., . . . Bachet, J.-B. (2018). Unicancer GI PRODIGE 24/CCTG PA.6 trial: A multicenter international randomized phase III trial of adjuvant mFOLFIRINOX versus gemcitabine (gem) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 36(18_suppl), LBA4001-LBA4001. doi:10.1200/JCO.2018.36.18_suppl.LBA4001
- Corbett, T. H., Roberts, B. J., Leopold, W. R., Peckham, J. C., Wilkoff, L. J., Griswold, D. P., Jr., & Schabel, F. M., Jr. (1984). Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Research*, 44(2), 717-726.
- Cox, T. R., & Erler, J. T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 4(2), 165-178. doi:10.1242/dmm.004077
- Cree, I. A., Glaysher, S., & Harvey, A. L. (2010). Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 375-379. doi:10.1016/j.coph.2010.05.001
- Deer, E. L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., . . . Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425-435. doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963
- Forciniti, S., Dalla Pozza, E., Greco, M. R., Amaral Carvalho, T. M., Rolando, B., Ambrosini, G., . . . Cardone, R. A. (2020). Extracellular Matrix Composition Modulates the Responsiveness of Differentiated and Stem Pancreatic Cancer Cells to Lipophilic Derivate of Gemcitabine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1). doi:10.3390/ijms22010029

- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 24), 4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Garrido-Laguna, I., Uson, M., Rajeshkumar, N. V., Tan, A. C., de Oliveira, E., Karikari, C., . . . Hidalgo, M. (2011). Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(17), 5793-5800. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0341
- Gottlich, C., Kunz, M., Zapp, C., Nietzer, S. L., Walles, H., Dandekar, T., & Dandekar, G. (2018). A combined tissue-engineered/in silico signature tool patient stratification in lung cancer. *Molecular Oncology*, 12(8), 1264-1285. doi:10.1002/1878-0261.12323
- Gottlich, C., Muller, L. C., Kunz, M., Schmitt, F., Walles, H., Walles, T., . . . Nietzer, S. L. (2016). A Combined 3D Tissue Engineered In Vitro/In Silico Lung Tumor Model for Predicting Drug Effectiveness in Specific Mutational Backgrounds. *J Vis Exp*(110), e53885. doi:10.3791/53885
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hartwig, W., & Buchler, M. W. (2013). Pancreatic Cancer: Current Options for Diagnosis, Staging and Therapeutic Management. *Gastrointest Tumors*, 1(1), 41-52. doi:10.1159/000354992
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinska, E., Byrne, A. T., Caldas, C., . . . Villanueva, A. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*, 4(9), 998-1013. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B., & Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Research*, 51(22), 6110-6117. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718594>
- Hwang, H. J., Oh, M. S., Lee, D. W., & Kuh, H. J. (2019). Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 258. doi:10.1186/s13046-019-1225-9
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216-1219. doi:10.1126/science.1176009

- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9694-9705. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
- Jablonska-Trypuc, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), 177-183. doi:10.3109/14756366.2016.1161620
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., . . . Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321(5897), 1801-1806. doi:10.1126/science.1164368
- Karim-Kos, H. E., de Vries, E., Soerjomataram, I., Lemmens, V., Siesling, S., & Coebergh, J. W. (2008). Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European Journal of Cancer*, 44(10), 1345-1389. doi:10.1016/j.ejca.2007.12.015
- Kelley, L. C., Lohmer, L. L., Hagedorn, E. J., & Sherwood, D. R. (2014). Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. *Journal of Cell Biology*, 204(3), 291-302. doi:10.1083/jcb.201311112
- Keyaerts, M., Caveliers, V., & Lahoutte, T. (2012). Bioluminescence imaging: looking beyond the light. *Trends in Molecular Medicine*, 18(3), 164-172. doi:10.1016/j.molmed.2012.01.005
- Kuen, J., Darowski, D., Kluge, T., & Majety, M. (2017). Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. *PloS One*, 12(7), e0182039. doi:10.1371/journal.pone.0182039
- Kühnemundt, J., Leifeld, H., Scherg, F., Schmitt, M., Nelke, L., Schmitt, T., . . . Nietzer, S. L. (2020). Modular micro-physiological human tumor/tissue models based on decellularized tissue for improved preclinical testing. *Altex*. doi:10.14573/altex.2008141
- Lambe, M., Eloranta, S., Wigertz, A., & Blomqvist, P. (2011). Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden. *Acta Oncologica*, 50(8), 1220-1227. doi:10.3109/0284186X.2011.599338
- Li, J., Byrne, K. T., Yan, F., Yamazoe, T., Chen, Z., Baslan, T., . . . Stanger, B. Z. (2018). Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. *Immunity*, 49(1), 178-193 e177. doi:10.1016/j.immuni.2018.06.006

- Lieber, M., Mazzetta, 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. *International Journal of Cancer*, *15*(5), 741-747. doi:10.1002/ijc.2910150505
- Lin, R., Wang, Y., Chen, Q., Liu, Z., Xiao, S., Wang, B., & Shi, B. (2018). TRPM2 promotes the proliferation and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Med Rep*, *17*(6), 7537-7544. doi:10.3892/mmr.2018.8816
- Linke, K., Schanz, J., Hansmann, J., Walles, T., Brunner, H., & Mertsching, H. (2007). Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Engineering*, *13*(11), 2699-2707. doi:10.1089/ten.2006.0388
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(43), 4846-4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, *17 Suppl 5*, v7-12. doi:10.1093/annonc/mdj941
- Mischinger, H.-J., Werkgartner, G., Kornprat, P., Marsoner, K., Wagner, D., Cerwenka, H., & Bacher, H. (2018). Komplikationen in der Pankreaschirurgie. *Wiener klinisches Magazin*, *21*(3), 98-107. doi:10.1007/s00740-018-0226-1
- Moll, C., Reboredo, J., Schwarz, T., Appelt, A., Schurlein, S., Walles, H., & Nietzer, S. (2013). Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system. *J Vis Exp*(78). doi:10.3791/50460
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., . . . Büchler, M. W. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, *389*(10073), 1011-1024. doi:10.1016/s0140-6736(16)32409-6
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., . . . European Study Group for Pancreatic, C. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*, *304*(10), 1073-1081. doi:10.1001/jama.2010.1275

- O'Neill, K., Lyons, S. K., Gallagher, W. M., Curran, K. M., & Byrne, A. T. (2010). Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *Journal of Pathology*, *220*(3), 317-327. doi:10.1002/path.2656
- Oberstein, P. E., & Olive, K. P. (2013). Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *6*(4), 321-337. doi:10.1177/1756283X13478680
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., . . . Riess, H. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, *297*(3), 267-277. doi:10.1001/jama.297.3.267
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., . . . Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, *8*(3), 241-254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010
- Peters, G. J., Clavel, M., Noordhuis, P., Geysen, G. J., Laan, A. C., Guastalla, J., . . . Vermorken, J. B. (2007). Clinical phase I and pharmacology study of gemcitabine (2', 2'-difluorodeoxycytidine) administered in a two-weekly schedule. *Journal of Chemotherapy*, *19*(2), 212-221. doi:10.1179/joc.2007.19.2.212
- Pham, T. N. D., Shields, M. A., Spaulding, C., Principe, D. R., Li, B., Underwood, P. W., . . . Munshi, H. G. (2021). Preclinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Utility in Immunotherapy Studies. *Cancers*, *13*(3). doi:10.3390/cancers13030440
- Polireddy, K., Dong, R., McDonald, P. R., Wang, T., Luke, B., Chen, P., . . . Chen, Q. (2016). Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition for Identification of Inhibitors for Pancreatic Cancer Cell Invasion and Tumor Spheres Formation. *PloS One*, *11*(10), e0164811. doi:10.1371/journal.pone.0164811
- Reid, S. E., Kay, E. J., Neilson, L. J., Henze, A. T., Serneels, J., McGhee, E. J., . . . Zanivan, S. (2017). Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO Journal*, *36*(16), 2373-2389. doi:10.15252/embj.201694912
- Robert-Koch-Institut. (2019). Krebs in Deutschland 2015/2016.
- Sato, A., Klauberg, B., & Tolwani, R. (2004). In vivo bioluminescence imaging. *Comparative Medicine*, *54*(6), 631-634.
- Schenke-Layland, K., & Nerem, R. M. (2011). In vitro human tissue models--moving towards personalized regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, *63*(4-5), 195-196. doi:10.1016/j.addr.2011.05.001

- Shipley, L. A., Brown, T. J., Cornpropst, J. D., Hamilton, M., Daniels, W. D., & Culp, H. W. (1992). Metabolism and disposition of gemcitabine, and oncolytic deoxycytidine analog, in mice, rats, and dogs. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 20(6), 849-855. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1362937>
<https://dmd.aspetjournals.org/content/20/6/849.long>
- Shoup, M., Conlon, K. C., Klimstra, D., & Brennan, M. F. (2003). Is extended resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas justified? *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 7(8), 946-952; discussion 952. doi:10.1016/j.gassur.2003.08.004
- Stratmann, A. T., Fecher, D., Wangorsch, G., Gottlich, C., Walles, T., Walles, H., . . . Nietzer, S. L. (2014). Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model. *Molecular Oncology*, 8(2), 351-365. doi:10.1016/j.molonc.2013.11.009
- Stuber, T., Monjezi, R., Wallstabe, L., Kuhnemundt, J., Nietzer, S. L., Dandekar, G., . . . Hudecek, M. (2020). Inhibition of TGF-beta-receptor signaling augments the antitumor function of ROR1-specific CAR T-cells against triple-negative breast cancer. *J Immunother Cancer*, 8(1). doi:10.1136/jitc-2020-000676
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., . . . Chu, T. M. (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Investigation*, 4(1), 15-23. doi:10.3109/07357908609039823
- Tian, C., Clauser, K. R., Ohlund, D., Rickelt, S., Huang, Y., Gupta, M., . . . Hynes, R. O. (2019). Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(39), 19609-19618. doi:10.1073/pnas.1908626116
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., . . . Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A. M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., . . . Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), 495-501. doi:10.1038/nature14169

- Walker, C., Mojares, E., & Del Rio Hernandez, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). doi:10.3390/ijms19103028
- Walles, T., Weimer, M., Linke, K., Michaelis, J., & Mertsching, H. (2007). The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment. *Onkologie*, 30(7), 388-394. doi:10.1159/000102544
- Wallstabe, L., Gottlich, C., Nelke, L. C., Kuhnemundt, J., Schwarz, T., Nerreter, T., . . . Hudecek, M. (2019). ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight*, 4(18). doi:10.1172/jci.insight.126345
- Wang, Y., Zhang, Y., Yang, J., Ni, X., Liu, S., Li, Z., . . . Li, M. (2012). Genomic sequencing of key genes in mouse pancreatic cancer cells. *Current Molecular Medicine*, 12(3), 331-341. doi:10.2174/156652412799218868
- Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601-610. doi:10.1016/j.cell.2007.08.006
- Yang, C., Wu, H. S., Chen, X. L., Wang, C. Y., Gou, S. M., Xiao, J., . . . Li, Y. F. (2014). Pylorus-preserving versus pylorus-resecting pancreaticoduodenectomy for periampullary and pancreatic carcinoma: a meta-analysis. *PloS One*, 9(3), e90316. doi:10.1371/journal.pone.0090316
- Yunis, A. A., Arimura, G. K., & Russin, D. J. (1977). Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *International Journal of Cancer*, 19(1), 128-135. doi:10.1002/ijc.2910190118

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Groll und PD Dr. Marco Metzger für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Gutachter bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Daniela Zdzieblo für die Möglichkeit meiner Promotion am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg bedanken. Vielen Dank für Ihr Vertrauen und die viele Unterstützung die ich jederzeit von Ihnen erhalten habe.

Ein besonderer Dank gilt Constantin Berger, der mich in fachlichen Fragen aufgeklärt und im Umgang mit den komplexen Versuchsmethoden geschult hat. Eine bessere Betreuung bei einer Promotion ist nicht vorstellbar.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg für den kollegialen Umgang bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in meinem Studium stets unterstützt und angespornt haben.

Lebenslauf

Schulischer Werdegang

Hölty-Gymnasium Wunstorf

08/2006 – 07/2014

Studium

Studium der Zahnmedizin

04/2015 – 06/2020

Universität Würzburg

Doktorand

02/2019 – 08/2020

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Universität Würzburg

Beruflicher Werdegang

Zahnarzt

Seit 07/2020

Jonas Strulik

Anhang

Anhang 1 Produktblatt Zelllinie PANC-1



Product Sheet

PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: pancreas/duct

Disease: epithelioid carcinoma

Age: 56 years

Gender: male

Morphology: epithelial

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

G6PD, B

DNA Profile:

D5S818: 11,13

D13S317: 11

D7S820: 8,10

D16S539: 11

vWA: 15

TH01: 7,8

Amelogenin: X

TPOX: 8,11

CSF1PO: 10,12

Cytogenetic Analysis: Chromosome studies indicate a modal number of 63 with 3 distinct marker chromosomes and a small ring chromosome. This is a hypertriploid human cell line. The modal chromosome number was 61, occurring in 32% of cells. However, cells with 63 chromosomes also occurred at a high frequency (22%). The rate of cells with higher ploidies was 8.5%.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submerged in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C , preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C . Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 ml complete culture medium and spin at approximately $125 \times g$ for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete growth medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio) and dispense into a 25 cm^2 or a 75 cm^2 culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO_2 in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Product Sheet

PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 3



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Remove medium, and rinse with 0.25% trypsin, 0.53mM EDTA solution. Remove the solution and add an additional 1 to 2 mL of trypsin-EDTA solution. Allow the flask to sit at room temperature (or at 37°C) until the cells detach. Add fresh culture medium, aspirate and dispense into new culture flasks. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:4 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week



Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

Growth is inhibited by 1 unit/mL L-asparaginase.
The cells will grow in soft agar.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.



Product Sheet

PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: PANC-1 (ATCC® CRL-1469™)

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials. Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2021. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [01/01]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

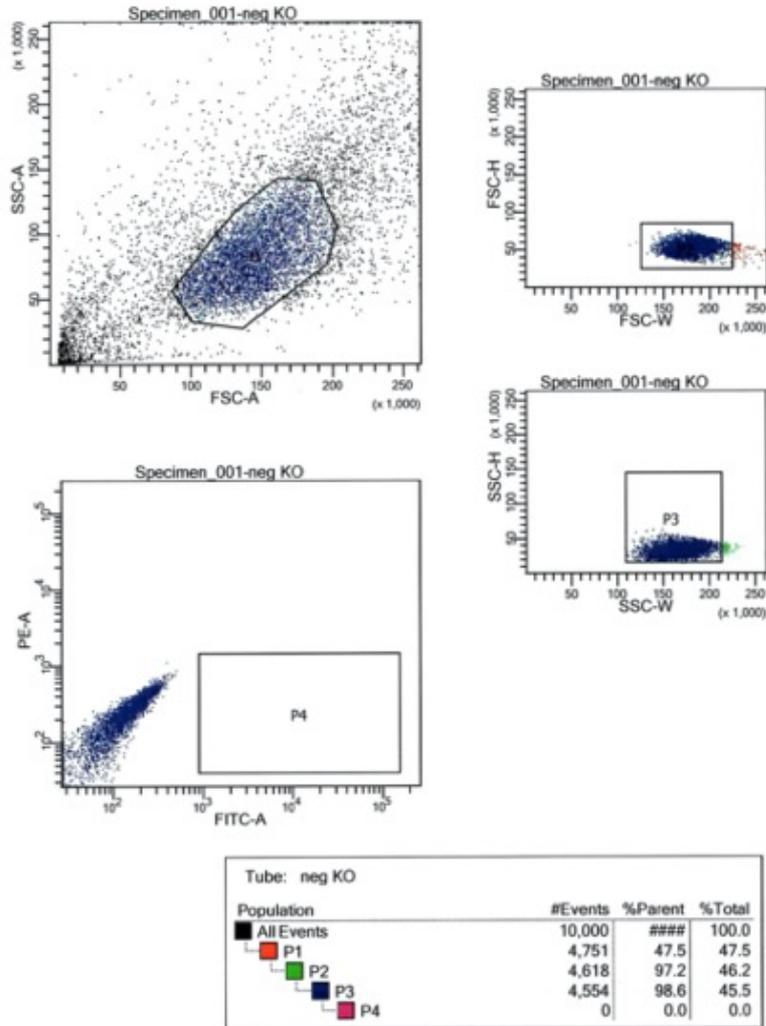
800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 3 of 3

Anhang 2 FACS Institut für Virologie und Immunologie Universität Würzburg

BD FACSDiva 8.0.1



Sheet1

Printed on: Wed Mar 13, 2019 03:32:54 CET