

Sebastian Schuth  
Dr. med.

## **Evaluation des Effekts Krebs-assoziiierter Fibroblasten auf die Chemoresistenz im Pankreaskarzinom**

Fach/Einrichtung: Chirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Oliver Strobel

Das Pankreaskarzinom ist eine aufgrund der geringen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 10% gefürchtete maligne Tumorerkrankung, die wahrscheinlich bis 2030 die zweithäufigste krebssassoziierte Todesursache in der industrialisierten Welt darstellen wird. Ursächlich hierfür ist unter anderem eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Histologisch sind Pankreaskarzinome durch eine komplexe Stromareaktion gekennzeichnet, wobei Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) die am zahlreichsten im Stroma vertretenen Zellen repräsentieren. Neben einer tumorzell-intrinsischen Resistenz wird auch dem Tumor-Stroma und insbesondere CAFs eine supportive Rolle bei der Entstehung von Chemoresistenz und auch beim Krankheitsprogress zugeschrieben. Versuche, das Tumor-Stroma zu eliminieren, waren klinisch jedoch nicht erfolgreich. Daher und aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Tumor-Stromas ist es nötig, den Einfluss einzelner Stroma-Komponenten auf die Entstehung von Chemoresistenz genauer zu untersuchen, um zukünftig möglicherweise gezielt gegen tumorfördernde Eigenschaften des Stromas vorgehen zu können.

Die primäre Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob CAFs das Ansprechen von Pankreaskarzinomzellen auf klinisch etablierte Chemotherapeutika verschlechtern. Weiterführend sollten mögliche Mechanismen identifiziert werden, mit denen CAFs zur Entstehung beziehungsweise Verstärkung einer Resistenz beitragen könnten.

Um dies zu untersuchen, wurden patientenspezifisch-gepaarte Tumor-Organoid- und CAF-Linien aus je denselben chirurgisch-resezierten Tumoren isoliert. Die Verwendung primärer Zelllinien-Paare war mit dem Ziel verbunden, die inter- und intratumorale Heterogenität bei den Tumorzellen und CAFs abzubilden. Um Interaktionen zwischen Tumor-Organoiden und CAFs herzustellen, wurde ein 3D-Co-Kultur-Modell aus jeweils gepaarten Organoiden und CAFs etabliert. Zur Untersuchung des Einflusses von CAFs auf die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika, wurde der DeathPro-Assay verwendet. Um Organoiden und CAFs hierbei zu differenzieren, wurden letztere mithilfe eines Cell Trackers markiert. Verglichen wurde die Wirkung der Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-FU und Paclitaxel jeweils bei Organoiden in Mono- und in Co-Kultur mit CAFs. In einem weiteren Schritt wurde eine Single-cell-RNA-Sequenzierung jeweils bei Organoiden und CAFs in Monokultur sowie in Co-Kultur durchgeführt. Dies hatte zum Ziel, Veränderungen des Transkriptionsprofils zu identifizieren, die in den Tumorzellen und CAFs durch die Co-Kultivierung entstehen und eine Veränderung des Ansprechens der Tumorzellen auf die genannten Chemotherapeutika erklären könnten.

Insgesamt wurden fünf patientenspezifisch-gepaarte Tumor-Organoid- und CAF-Linien mit einer Erfolgsrate von 50 Prozent pro Paar isoliert. Das genannte 3D-Co-Kultur-Modell wurde erfolgreich etabliert, indem verschiedene Kulturbedingungen getestet und letztendlich diejenigen identifiziert wurden, unter denen sowohl Tumor-Organoiden als auch CAFs co-existieren und proliferieren konnten. Im Rahmen der Medikamententestung zeigte sich bei den Kontrollen eine höhere Proliferation der Tumor-Organoiden in Co-Kultur als in Monokultur. Bei Betrachtung der generellen Wirkung der Chemotherapeutika war bei allen getesteten Medikamenten eine geringe Wirkung auf den chemo-induzierten Zelltod der Tumor-Organoiden zu beobachten. Gemcitabin und 5-FU führten aber zu einer Inhibition der Proliferation von Tumorzellen. Bei Organoiden in Co-Kultur war dieser inhibitorische Effekt auf die Proliferation im Falle von Gemcitabin jedoch signifikant geringer ausgeprägt. Obwohl der chemo-induzierte Zelltod bereits in Monokultur gering war, wurde bei Tumor-Organoiden in Co-Kultur zelllinien-übergreifend im Falle aller getesteten Chemotherapeutika ein signifikant niedrigerer chemo-induzierter Zelltod als in Monokultur beobachtet, was insgesamt eine Erhöhung der Chemoresistenz in Co-Kultur bedeutet.

Bei weiterer Untersuchung von Organoiden und CAFs mittels Single-cell-RNA-Sequenzierung konnten sowohl bei den Tumorzellen als auch bei den CAFs verschiedene Subpopulationen auf Basis des Transkriptionsprofils identifiziert werden. In diesem Rahmen wurde auch die Existenz der bereits beschriebenen CAF-Subpopulationen, myCAFs und iCAFs, bestätigt. Auf Seite der CAFs stellten die relevantesten transkriptionellen Veränderungen, die durch die Co-Kultur induziert wurden, eine höhere Expression inflammatorischer Gen Sets dar. Dies war auch bei den Tumorzellen zu beobachten. Die signifikanteste Veränderung stellte bei den Tumorzellen jedoch die höhere Expression eines mit Epithelial-to-Mesenchymal-Transition (EMT) assoziierten Gen Sets dar.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen zum einen, dass das etablierte 3D-Co-Kultur-Modell geeignet ist, um interzelluläre Interaktionen zwischen Tumor-Organoiden und CAFs patientenspezifisch darstellen zu können, die sich auf die Wirkung von Chemotherapeutika und das Transkriptionsprofil einzelner Zellen auswirken können. Mit der Identifikation von Subpopulationen innerhalb der CAF- und Tumorzellpopulationen wurde zudem die transkriptionelle Heterogenität der jeweiligen Zelllinien aufgezeigt. Die höhere Proliferation sowie der niedrigere chemo-induzierte Zelltod von Organoiden in Co-Kultur legen weiterhin nahe, dass CAFs eine supportive Wirkung auf die jeweils korrespondierenden Tumorzellen haben und eine bereits bestehende Resistenz gegenüber klinisch relevanten Chemotherapeutika am ehesten verstärken. Übereinstimmend mit der Literatur könnte eine plausible Erklärung hierfür die festgestellte höhere Expression von mit inflammatorischen Signalwegen und mit Epithelial-to-Mesenchymal-Transition assoziierten Gen Sets bei Organoiden in Co-Kultur sein.