

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms –
Der Entzündungszustand der Lebermikroumgebung determiniert den
Metabolismus und dadurch das Wachstumsverhalten von
Pankreasduktusepithelzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Alexander Maurice Fabian

aus München

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Susanne Sebens
Institut für experimentelle Tumorforschung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Laudes
Klinik für Innere Medizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.04.2019

gez.: _____
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2	Pathologie	1
1.1.3	Hämatogene Metastasierung	4
1.1.4	Klinische Präsentation und Diagnostik	6
1.1.5	Therapie	7
1.2	Die Leber	7
1.2.1	Struktur und Funktion	7
1.2.2	Zellpopulationen	8
1.2.3	Etablierung von Lebermetastasen und die Rolle hepatischer Sternzellen	9
1.3	Zellulärer Metabolismus	11
1.3.1	Definition	11
1.3.2	Kohlenhydratmetabolismus	11
1.3.3	Metabolismus in Tumorzellen	14
1.3.4	Einfluss der Mikroumgebung auf den Metabolismus in Tumorzellen	15
1.4	Ziele der Arbeit	17
2	Materialien	19
2.1	Geräte	19
2.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.4	Rezepturen	23
2.5	Antikörper	25
2.5.1	Primärantikörper	25
2.5.2	Sekundärantikörper	26
2.6	<i>Small interfering RNA</i>	26
2.7	Zelllinien	26
2.8	Medien	27
3	Methoden	29
3.1	Zellkultur	29
3.1.1	Inkulturnahme von Zelllinien	29
3.1.2	Passagieren	29
3.1.3	Zellzahlbestimmung zur Kokultivierung	30
3.1.4	Kokultivierung von Zellen	30

3.1.5	Konservierung von Zelllinien	32
3.2	siRNA-Transfektion	32
3.3	Proteingewinnung aus Ganzzelllysaten	33
3.3.1	Herstellung von Ganzzelllysaten	33
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
3.4	Westernblot	34
3.4.1	SDS-PAGE	34
3.4.2	Proteintransfer	35
3.4.3	Immundetektion	36
3.4.4	Densitometrie	37
3.5	<i>Seahorse-Analyse</i>	37
3.5.1	Funktionsweise und Messablauf	37
3.5.2	Vorbereitung der Well-Platte und des Sensoraufsatzes	39
3.5.3	Vorbereitung der Proben	39
3.5.4	Beladung des Sensoraufsatzes und Beginn der Messung	40
3.6	Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Färbung	40
3.7	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Expressionsanalyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in Pankreasduktusepithelzellen	42
4.1.1	PDEZ zeigen keine Expressionsunterschiede der untersuchten Transportproteine in Abhängigkeit der Kokultur	42
4.1.2	Prämaligne und maligne PDEZ exprimieren verstärkt LDHA nach M1-4HSC-Kokultur	43
4.1.3	G6PD wird unter M-HT-Kokultur stärker exprimiert als unter M1-4HSC-Kokultur	44
4.1.4	Prämaligne und maligne PDEZ exprimieren verstärkt SDHB nach M1-4HSC-Kokultur	45
4.2	siRNA-vermittelte Suppression der SDHB und G6PD in H6c7eR-Kr Zellen	47
4.2.1	Stabile Suppression von SDHB und G6PD über 96 Stunden	47
4.2.2	H6c7eR-Kr Zellen weisen nach G6PD-Suppression und M-HT-Kokultur keine reproduzierbaren Expressionsunterschiede Metabolismus-assoziiierter Proteine auf..	48
4.2.3	H6c7eR-Kr Zellen exprimieren nach SDHB-Suppression und M1-4HSC-Kokultur verstärkt Enzyme des Pentosephosphatweges	49
4.3	Funktionelle Echtzeitanalyse des Metabolismus von H6c7eR-Kr Zellen	50
4.3.1	H6c7eR-Kr Zellen weisen unter M1-4HSC-Kokultur einen aktiveren oxidativen Metabolismus auf als unter M-HT-Kokultur	51
4.3.2	Die Suppression der SDHB hemmt den oxidativen Metabolismus M1-4HSC- kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen	52

4.3.3	Die Suppression der G6PD nimmt keinen wesentlichen Einfluss auf den Metabolismus M-HT-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen	54
4.4	Analyse des Zellwachstums und der Seneszenzrate SDHB- bzw. G6PD-supprimierter H6c7eR-Kr Zellen nach Kokultivierung	55
4.4.1	Die Suppression der SDHB erhöht das Zellwachstum von H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur	56
4.4.2	Die Suppression der SDHB verringert den Anteil SABG-positiver H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur	57
5	Diskussion	58
5.1	Der Stoffwechsel benigner PDEZ ist von oxidativer Phosphorylierung und maligner PDEZ von Glykolyse sowie dem oxidativen Pentosephosphatweg geprägt, während prämaligne PDEZ einen Mischtyp aufweisen	59
5.2	Der Entzündungszustand der Lebermikroumgebung entscheidet in prämaligen PDEZ über die Einnahme des metabolischen Phänotyps benigner oder maligner Zellen	62
5.3	Der Entzündungszustand der Leber determiniert den Stoffwechsel in prämaligen PDEZ und dadurch Seneszenz sowie Zellwachstum	64
5.4	Limitationen.....	67
5.5	Ausblick.....	70
6	Zusammenfassung.....	73
7	Anhang.....	75
7.1	Literaturverzeichnis.....	75
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	89
7.3	Tabellenverzeichnis.....	91
7.4	Abkürzungsverzeichnis.....	91
8	Danksagung.....	95
9	Veröffentlichungen.....	96

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Menschen, die an einem duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) erkranken, leben mit einer infausten Prognose. In Europa liegt ihr medianes Überleben ab Diagnosestellung bei 4,6 Monaten, während es in der altersadaptierten und nicht betroffenen Population 15,1 Jahre beträgt. Trotz der geringen Inzidenzrate von 10:100.000 gilt das PDAC daher als vierthäufigste Krebstodesursache in der westlichen Welt (1). Für die USA wird angenommen, dass das PDAC bis 2030 zur zweithäufigsten Krebstodesursache aufsteigen wird (2). Vorwiegend ältere Menschen sind dabei betroffen. Frauen erkranken im Mittel mit 75 Jahren und Männer mit 71 Jahren (3).

Neben fortgeschrittenem Alter ist eine positive Familienanamnese ein Risikofaktor und erhöht das Erkrankungsrisiko nahezu zweifach (4). 5-10 % der Erkrankten weisen ein am PDAC erkranktes Familienmitglied auf. Abgesehen von bestimmten Keimbahnmutationen von Genen wie *breast cancer 2* (BRCA2) oder Serin/Threonin Kinase 11 (STK11) ist die genetische Grundlage jedoch meist unbekannt (5). Darüber hinaus erhöht Tabakkonsum das Erkrankungsrisiko um 75 % und wird daher als wichtigster Risikofaktor angesehen. Starker Alkoholabusus ist ebenfalls ein Risikofaktor und erhöht das Erkrankungsrisiko um annähernd 20 % (6). Möglicherweise steht dies in Verbindung mit der Induktion einer chronischen Entzündung des Pankreas. Menschen mit chronischer Pankreatitis weisen ein erhöhtes Risiko auf, an einem PDAC zu erkranken (7, 8). Ferner haben Menschen mit Diabetes mellitus ein nahezu zweifach erhöhtes Erkrankungsrisiko (9). Ein weiterer Risikofaktor ist Adipositas, wobei ein erhöhter *Body-Mass-Index* mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert ist (10). Die genannten Risikofaktoren gelten dabei als gesichert, wohingegen weitere Faktoren, wie beispielsweise der Einfluss der Ernährungsweise, weiterhin diskutiert werden (11).

1.1.2 Pathologie

Das Pankreas ist aus exokrinen, endokrinen und nicht-epithelialen Zellpopulationen zusammengesetzt. Der exokrine Teil des Pankreas besteht dabei aus Drüsenendstücken (Azini) und Ausführungsgangsystem. Dieses wird von einschichtigem Epithel ausgekleidet, den pankreatischen duktales Epithelzellen (PDEZ) (12).

Die große Mehrheit der malignen Neoplasien entspringt dem exokrinen Teil und das duktales Adenokarzinom ist mit etwa 85 % die häufigste Neoplasie des Pankreas (13). In Analogie zu anderen Tumoren wird dabei eine Entartungssequenz im Gangsystem von Vorläuferläsionen hin zum invasiven Karzinom angenommen. Ein geringerer Anteil an duktales Adenokarzinomen entsteht aus zystischen Vorläuferläsionen. Hierzu zählen intraduktales papillär-muzinöse Neoplasien und muzinös-zystische Neoplasien (14). Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) sind die am besten charakterisierten Vorläuferläsionen und sind nicht-invasive Gangepithelproliferationen (15). Bisher wurden diese in einem Drei-Stufen-Schema mit zunehmenden Alterationen in Zellmorphologie und Architektur eingeteilt. PanIN-1 weisen hierbei geringe (*low-grade*), PanIN-2 milde (*intermediate-grade*) und PanIN-3 starke (*high-grade*) Alterationen auf (16). PanIN-3 durchbrechen die Basalmembran nicht und entsprechen daher einem *Carcinoma in situ*. Ein aktueller Konsens empfiehlt jedoch die Verwendung eines Zwei-Stufen-Schemas. Dieses unterscheidet lediglich *low-grade* von *high-grade* Dysplasien. Die bisherige Kategorie PanIN-2 soll darin zusammen mit PanIN-1 als *low-grade* Dysplasie bezeichnet werden (17) (vgl. Abbildung 1-1).

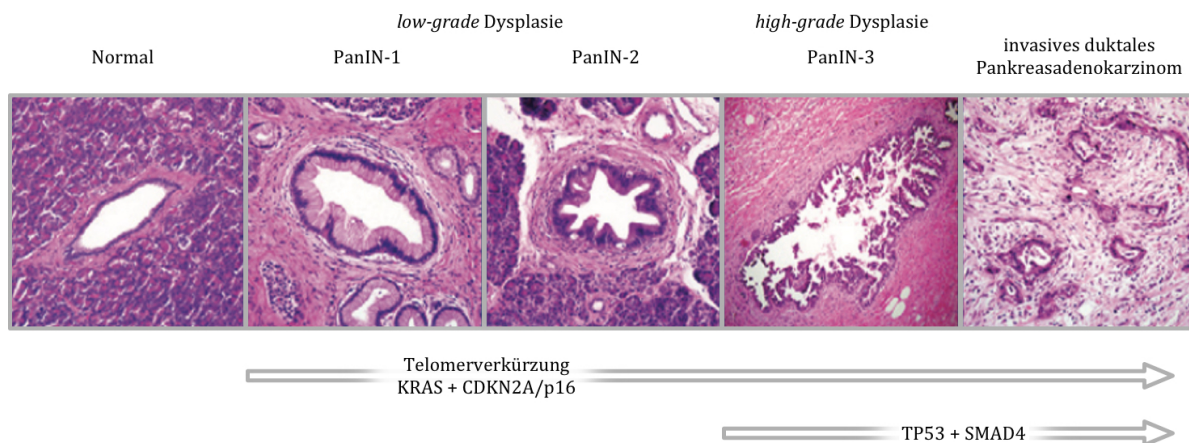


Abbildung 1-1 Entartungssequenz des duktales Pankreasadenokarzinoms am Beispiel von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Gezeigt sind histologische Aufnahmen eines normalen Ausführungsganges, der Vorläuferläsionen PanIN-1 – 3 und eines invasiven Karzinoms. Zusätzlich wurde in der oberen Zeile die neue Terminologie eingefügt (17). Unter den Aufnahmen ist das zeitliche Auftreten genetischer Alterationen dargestellt einschließlich der Gene *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform p16* (CDKN2A/p16), *tumor suppressor p53* (TP53), *mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD4). Abbildung modifiziert nach (18).

Auf genetischer Ebene weisen bereits PanIN-1 intensive Telomerverkürzungen auf, die zu einer Chromosomeninstabilität führen können und somit die Anhäufung weiterer

genetischer Alterationen begünstigen (19). Hierbei wurden vier Treibermutationen beschrieben, die eine Schlüsselrolle einnehmen und in unterschiedlichen Stufen der Entartungssequenz auftreten (15). Dazu gehört das Onkogen *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), das eine Guanosin triphosphatase der Wachstumsfaktor-Signalkaskade kodiert. Dessen Mutation lässt sich in über 90 % der PDAC finden und tritt bereits früh in der Karzinogenese auf (20, 21). Ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt wird das Tumorsuppressorgen *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform p16* (CDKN2A/p16) inaktiviert (21, 22). Im Gegensatz dazu finden sich Funktionsverluste der Tumorsuppressorgene *tumor suppressor p53* (TP53) und *mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD4) erst in einem späteren Stadium der Entartungssequenz (23) (vgl. Abbildung 1-1). Darüber hinaus werden auch epigenetische Alterationen mit der Karzinogenese des PDAC in Verbindung gebracht. Beispielsweise werden bis zu 21 % des Funktionsverlustes von CDKN2A/p16 auf eine Hypermethylierung des Gens zurückgeführt (24). Mit dem Durchbruch der Basalmembran breitet sich das PDAC schließlich invasiv im umliegenden Gewebe aus und weist bestimmte histologische Merkmale auf. Dazu gehören unregelmäßige Drüsen- und Gangbildung, Muzinproduktion, Nekrosen in Ganglumina, Perineuralscheiden- und Lymphgefäßinvasion sowie Wachstum in Gefäßnähe (15). Meist ist das Adenokarzinom mäßig bis kaum differenziert (25).

Charakteristisch ist eine intensive desmoplastische Stromareaktion (26). Zusammengesetzt wird dieses fibrotische Stroma sowohl aus zellulären Komponenten, wie Fibroblasten und Immunzellen, als auch aus den azellulären Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM), wie Kollagenen und Zytokinen (27). Am fibrotischen Umbau sind dabei maßgeblich pankreatische Sternzellen beteiligt, die eine Zellpopulation des Pankreasparenchyms darstellen (28). Diese können beispielsweise im häufig entzündlichen Milieu des PDAC oder durch maligne PDEZ aktiviert werden (29-31). Die Aktivierung führt zu einer Transdifferenzierung zu Myofibroblasten. Myofibroblasten sezernieren im Anschluss verstärkt EZM-Moleküle wie Kollagen und tragen dadurch wesentlich zur Fibrosierung bei (31). Ab einer Zellzahl von etwa 10^9 ist eine Neoplasie palpabel (32). In der Palpation stellt sich ein freipräpariertes PDAC dann als derbe, schlecht definierte Masse dar. Makroskopisch zeigt sich eine sternförmige Struktur und grau-weiße Farbe (25). 60 % der Fälle betreffen den Pankreaskopf, 15 % den Pankreaskörper und 5 % den Pankreasschwanz. 20 % der PDAC nehmen diffus das

gesamte Pankreas ein (25). Bedingt durch die anatomische Lage obstruieren Pankreaskopfkarzinome meist den Gallengang und/oder den distalen Pankreasgang. Dabei resultiert eine Gangdilatation proximal der Stenosierung. Häufig infiltriert das PDAC das dorsale peripankreatische Fettgewebe, Nerven, V. und A. mesentericae superiores und benachbarte Organe (25, 33). Auf lymphatischem Weg erreichen Tumorzellen ferner häufig regionale und distale Lymphknoten und bilden dort Metastasen aus (34). Ein lokal infiltrierendes PDAC, besonders bei Einbruch ins Gefäßsystem, stellt schließlich ein fortgeschrittenes Tumorstadium dar. Dieses liegt ebenfalls vor, sobald der Tumor hämatogen gestreut und Fernmetastasen ausgebildet hat (26).

1.1.3 Hämatogene Metastasierung

Wie Tumoren hämatogen Metastasen ausbilden, beschreibt das Modell der „Invasions-Metastasierungskaskade“ (35). Hierin wird postuliert, dass Zellen sowohl genetische als auch epigenetische und dadurch funktionelle Alterationen akkumulieren. Diese ermöglichen es den Zellen schließlich den Verband des Primärtumors zu verlassen. Die Migration der Tumorzellen und Invasion des benachbarten Gewebes wird dabei mit der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) in Verbindung gebracht, einem Zellprogramm der Embryonalentwicklung und Wundheilung (36). Dadurch verlieren Epithelzellen typische Charakteristika wie Polarität oder Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin) und erlangen einen mesenchymalen Phänotyp. Dieser ist charakterisiert durch Migrations- und Invasionsfähigkeit (36). Die nächsten Schritte der Kaskade sind das Eindringen in das Gefäßsystem, dort als zirkulierende Tumorzelle (ZTZ) zu überleben, an der Kapillarwand des Sekundärorgans zu adhären und aus dem Gefäßbett auszutreten (35). Im Parenchym des Sekundärorgans erlangen Tumorzellen durch eine Mesenchymal-Epitheliale-Transition (MET) erneut einen epithelialen Phänotyp (36). Durch Proliferation können sie zu einer Mikrometastase und schließlich zu einer Makrometastase auswachsen (35).

Auf welche Weise Zellen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen, wird durch zwei verschiedene Modelle postuliert (vgl. Abbildung 1-2). Tumorzellen durchgehen dabei in beiden Modellen Selektionszyklen und erfahren schrittweise sowohl epigenetische als auch genetische Alterationen. Im klassischen Modell der „linearen Progression“ ermöglichen diese es ihnen am Ende der Entartungssequenz zu disseminieren. Hierin

wird die Metastasierung als ein später Prozess in der Karzinogenese verstanden (35). Im Gegensatz dazu postuliert das Modell der „parallelen Progression“ die Metastasierung als frühen Prozess, der sich noch vor der vollständigen Ausbildung eines Primärtumors abspielt. Die maligne Entartung findet hier parallel in Primärtumor und Metastasen statt (37).

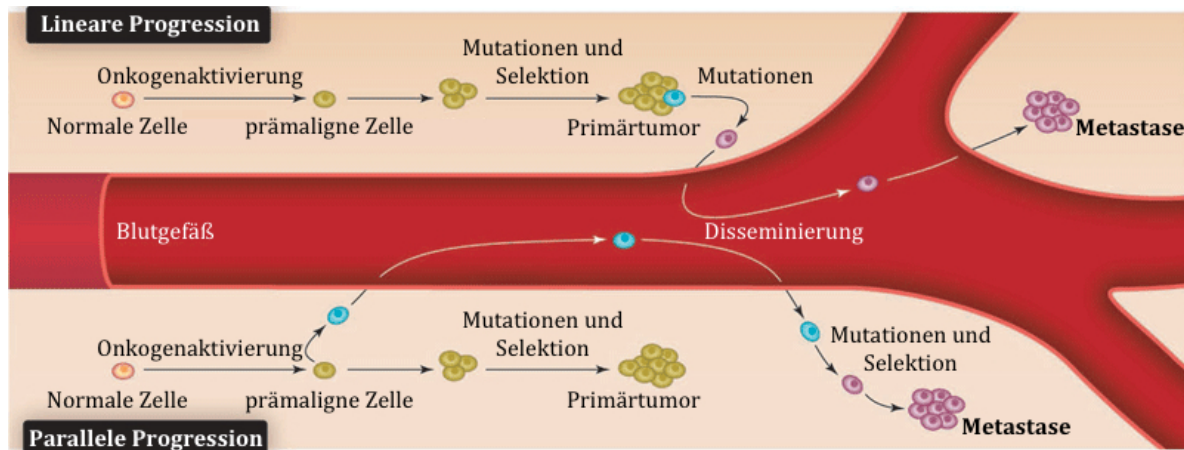


Abbildung 1-2 Lineare Progression vs. parallele Progression. In der oberen Hälfte zeigt die Abbildung schematisch das Modell der „linearen Progression“, in dem Tumorzellen am Ende einer Entartungssequenz und zu einem späten Zeitpunkt disseminieren. Dem gegenüber steht das Modell der „parallelen Progression“, das eine frühe Metastasierung während der Karzinogenese postuliert. Abbildung modifiziert nach (38).

Bezüglich der Verteilung von Fernmetastasen führten Autopsiereihen Stephen Paget am Ende des 19. Jahrhunderts zur *Seed-and-Soil*-Theorie. Diese postuliert, dass Tumorzellen (*seed*) eine bestimmte Mikroumgebung (*soil*) bevorzugen und daher mit höherer Wahrscheinlichkeit in einem bestimmten Sekundärorgan Metastasen ausbilden (39). Auf den Boden (*soil*) der Metastase bezieht sich dabei das Konzept der metastatischen Nische. Sie beschreibt die lokale zelluläre und azelluläre Gewebemikroumgebung (40). Ihr Zustand gilt als determinierender Faktor für den Erfolg der Kolonisierung. Zellen des Primarius können dabei humorale Faktoren sezernieren, die die Bildung einer prometastatischen Mikroumgebung und somit einer prämetastatischen Nische im Sekundärorgan induzieren (40, 41). Nach Invasion und Kolonisierung durch Tumorzellen wird diese als metastatische Nische bezeichnet (40).

Gemeinsam mit dem anatomischen Gefäßverlauf erklärt die *Seed-and-Soil*-Theorie folglich die unterschiedlichen Verteilungshäufigkeiten von Fernmetastasen bestimmter Tumorentitäten (42). Zellen des PDAC metastasieren in aufsteigender Reihenfolge in das Peritoneum, die Lunge und die Leber (34). Eine Autopsiereihe zeigte dabei, dass 62 %

der untersuchten PDAC-Fälle Lebermetastasen aufwiesen und die Leber somit der Hauptmetastasierungsort des PDAC ist (43).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat bereits nahezu die Hälfte der am PDAC erkrankten Menschen Fernmetastasen entwickelt (44). Bei eingetretener Metastasierung beträgt die mediane Überlebenszeit nur 2,5 Monate (45). Die frühe und häufige Fernmetastasierung ist somit eine kennzeichnende Eigenschaft des PDAC und wirkt sich unmittelbar auf die Prognose des Patienten aus. Der schlechten Prognose ab Diagnosestellung stehen dabei nur schwach ausgeprägte und unspezifische Symptome im Frühstadium der Erkrankung gegenüber (13).

1.1.4 Klinische Präsentation und Diagnostik

Am PDAC erkrankte Menschen zeigen im Initialstadium ein schwach ausgeprägtes und heterogenes klinisches Bild. Dies wird durch die retroperitoneale Lage des Pankreas, die unterschiedlichen angrenzenden Strukturen und die jeweilige Tumorlokalisation im Organ (siehe Kapitel 1.1.2) erklärt (13). Die häufigsten Frühsymptome sind in absteigender Reihenfolge abdominale Schmerzen, Ikterus, veränderte Stuhlgewohnheiten und Rückenschmerzen (46). Darüber hinaus kommen depressive Symptome und ein neu aufgetretener, insulinpflichtiger Diabetes mellitus im Frühstadium gehäuft vor (47, 48). Diese Frühsymptome werden jedoch selten mit einem PDAC in Verbindung gebracht, wodurch die Diagnosestellung verzögert wird (46). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind schließlich Asthenie, Gewichtsverlust, Inappetenz und abdominale Schmerzen die dominierenden Symptome (49). Zusätzlich sind venöse Thrombembolien wichtige Komplikationen (50). Bei klinischem Verdacht auf ein PDAC werden bildgebende Verfahren, wie Sonographie oder Computertomographie zur Diagnosestellung eingesetzt (51). Die Diagnose muss dabei entweder im Rahmen einer chirurgischen Resektion oder durch eine Biopsie histologisch gesichert werden (51). Zur Verlaufskontrolle wird der Serumentumormarker CA 19-9 bestimmt (51).

Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen schließlich 50-60 % der Patienten eine Metastasierung und 30-40 % eine lokal fortgeschrittene Tumorausbreitung auf. Lediglich 10-20 % der Patienten sind in einem früheren Tumorstadium, welches die operative Resektion erlaubt (52).

1.1.5 Therapie

Durch die spezielle Pathologie und späte Diagnose stellt die Therapie des PDAC eine enorme Herausforderung dar. Die einzige kurative Behandlungsoption ist die chirurgische Resektion (13). Eine R0-Resektion erhöht dabei die mediane Überlebensdauer auf 18 Monate, gegenüber 7 Monaten bei nicht operierten Patienten (53). Eine adjuvante Chemotherapie kann das mediane Überleben zusätzlich auf bis zu 28 Monate erhöhen (54). Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium, das keine vollständige Resektion erlaubt, profitieren nicht von einer Teilresektion (55). Daher können ausschließlich Patienten, die weder Fernmetastasen noch eine arterielle Gefäßinvasion aufweisen, chirurgisch versorgt werden (53). Dementsprechend ist im fortgeschrittenen Tumorstadium die Chemotherapie der Goldstandard (56). Die „S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom 2013“ legt dabei die Monotherapie mit Gemcitabin als Erstlinientherapie fest (51). Diese erhöht das mediane Überleben im Vergleich zu 5-Fluoruracil von 4,4 auf 5,6 Monate (57). Eine im Jahr 2011 vorgestellte Studie verglich die Gemcitabin-Monotherapie mit dem Kombinationsregime FOLFIRINOX (Leucovorin, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin). Patienten, die FOLFIRINOX erhielten wiesen bei stärkeren unerwünschten Arzneimittelwirkungen ein medianes Überleben von 11,1 Monaten gegenüber 6,8 Monaten bei Gemcitabin-Monotherapie auf (58). Daher wird das FOLFIRINOX-Protokoll bei Patienten mit günstigem Risikoprofil empfohlen (51).

Zusammenfassend haben sich die Überlebenschancen Erkrankter trotz intensiver Bemühungen in der Therapie des PDAC in den letzten 20 Jahren kaum gebessert. Zusätzlich ernüchert, dass auch die chirurgisch kurativ behandelten Patienten in der Regel ein Rezidiv erleiden oder postoperativ Lebermetastasen entwickeln (59).

1.2 Die Leber

1.2.1 Struktur und Funktion

Die Leber liegt intraperitoneal im rechten Oberbauch und zeichnet eine besondere Gefäßstruktur aus. Neben arteriellem Blut (*A. hepatica propria*) erreicht das Leberparenchym venöses und nährstoffreiches Blut aus dem Verdauungstrakt (*V. portae hepatis*) im Sinne eines „zweiten Kapillarbettes“ (12). Arteriovenöses Mischblut fließt dabei durch die Lebersinusoide, die erweiterte Kapillaren mit fenestriertem Endothel ohne Basallamina darstellen. Zwischen dem Endothel und dem Leberparenchym befindet sich perikapillär der mit Blutplasma gefüllte Disse-Raum. Nach dem

Durchfließen der Sinusoide mündet das venöse Blut über die *Vv. hepaticae* in die *V. cava inferior*. Die von dem Leberparenchym sezernierte Gallenflüssigkeit fließt entgegen dem Blutstrom. Jeweils ein ableitender Gallenweg verläuft dabei gemeinsam mit einem Ast der *A. hepatica propria* und der *V. portae hepatis*. Dieser gemeinsame Gefäßverlauf (Trias) bildet die Grundlage zur funktionell-klinischen Einteilung der Leber in acht Segmente (12).

Die Leber besitzt ein breites Funktionsspektrum. Sie kommt als erstes Organ mit dem nährstoffreichen Blut des Verdauungstraktes in Kontakt und ist das zentrale Organ im Körperstoffwechsel. Ferner dient sie sowohl der Synthese von Plasmaproteinen als auch der Entgiftung. Die Sekretion von Gallenflüssigkeit ermöglicht darüber hinaus die Ausscheidung von Abbauprodukten und durch die in ihr gelösten Gallensäuren die enterale Lipidresorption (12).

1.2.2 Zellpopulationen

Die Leber verfügt über mehrere organspezifische Zellpopulationen unterschiedlichen Ursprungs, die direkt mit sinusoidalem Blut in Kontakt stehen. Dazu gehören die epithelialen Hepatozyten. Sie stellen Zellen des Leberparenchyms dar (12). Diese sind ein- bis mehrschichtig parallel zu den Lebersinusoiden angeordnet und zeigen eine ausgeprägte Polarität. Der basolaterale Pol findet Kontakt zu benachbarten Hepatozyten und zum perisinusoidalen Disse-Raum, während der apikale Pol den ableitenden Gallenwegen zugewandt ist. Zu den lebereigenen Immunzellen gehören Kupffer-Zellen (Makrophagen) und Pit-Zellen (Natürliche Killerzellen). Beide befinden sich im Endothel der Lebersinusoide (12).

Hepatische Sternzellen (HSC) sind hingegen mesenchymale Perizyten und machen annähernd 10-15 % der lebereigenen Zellen aus (60). HSC befinden sich perisinusoidal im Disse-Raum zwischen Endothelzellen und Hepatozyten (siehe Kapitel 1.2.1). Sie kennzeichnet darin ein spindelförmiges Zellsoma, von dem zahlreiche Zellfortsätze ausgehen und sich im Disse-Raum ausbreiten. Über Zellfortsätze bilden HSC direkte Zellkontakte zu sinusoidalen Endothelzellen und Hepatozyten aus (60). Zusätzlich interagieren HSC mit benachbarten Zellen auf parakrinem Weg, beispielsweise durch die Ausschüttung und Rezeption von Zytokinen (61). Durch die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen und eine ausgeprägte Zellplastizität üben HSC daher unterschiedlichste Funktionen aus. Dazu gehört in einer physiologischen

Lebermikroumgebung die Speicherung von Vitamin A in Form von intrazellulären Lipidtröpfchen (61). Darüber hinaus haben HSC Anteil an der Entwicklung des Parenchyms, der EZM-Homöostase, der Immunantwort und der Regulation des sinusoidalen Blutflusses (61, 62). In Folge einer Leberverletzung durchlaufen HSC ausgeprägte Veränderungen und transdifferenzieren von einem ruhenden zu einem aktivierten Zustand (61). Darin nehmen sie einen hoch proliferativen und Myofibroblast-ähnlichen Phänotyp ein und werden daher hepatische Myofibroblasten (HMF) bezeichnet (63). Diese weisen durch die Expression des Strukturproteins *α-smooth muscle actin* (α -SMA) eine vermehrte Kontraktilität auf (60). Ferner kennzeichnet HMF der Verlust der Vitamin A enthaltenden Lipidtröpfchen (60). Dieser Übergang wird dabei als „Kontinuum“ (61) betrachtet. Somit können Zwischenstadien bestehen, abhängig von der Intensität und Dauer aktivierender Signale. Zu den aktivierenden Signalen zählen parakrin wirkende Entzündungsmediatoren, die von benachbarten Zellen während einer Entzündungsreaktion ausgeschüttet werden. Beispielsweise sezernieren Kupffer-Zellen *transforming growth factor β* (TGF- β), das als wichtigstes Zytokin in Leberverletzungen gilt und über den TGF- β /SMAD-Signalweg zur Aktivierung von HSC führt (61). Als Folge der Aktivierung sezernieren HMF in großem Umfang EZM-Produkte. Dazu gehören stroma-degradierende Matrix-Metalloproteasen (MMP) und stroma-aufbauendes Kollagen I und Fibronectin (61). Dadurch gestalten HMF den strukturellen Umbau der Leber. Die Aktivierung von HSC zu HMF gilt somit als „Schlüsselereignis“ (60) der Leberfibrosierung. Darüber hinaus können auch Tumorzellen HSC aktivieren und infolgedessen HMF tumorsupportive Eigenschaften ausüben (64-66). Diese konnten sowohl an lebereigenen Neoplasien wie dem Leberzellkarzinom als auch an disseminierten Tumorzellen (DTZ) und Lebermetastasen nachgewiesen werden (41, 67, 68).

1.2.3 Etablierung von Lebermetastasen und die Rolle hepatischer Sternzellen

Aufgrund der besonderen Gefäßstruktur und der speziellen Mikroumgebung ist die Leber eines der häufigsten Ziele metastasierender Tumoren, einschließlich des PDAC (34, 69). Bis zur Etablierung durchläuft eine Lebermetastase mehrere Stadien (1-4), die durch Interaktion der Tumorzellen mit der Lebermikroumgebung geprägt sind (70). Zunächst kommen in der *mikrovaskulären Phase* (1) ZTZ in Lebersinusoiden zum Stillstand (70). Dort stirbt der Großteil ab, bedingt durch mechanische Traumata oder

eine adäquate Immunantwort. Wenigen Tumorzellen gelingt es, intravasal als DTZ zu überleben. Die meisten überlebenden Tumorzellen verharren dabei in einem ruhenden Zustand (70). Nur wenige proliferieren und wachsen zu einer *avaskulären Mikrometastase* (2) im Sinusoid oder Disse-Raum aus (70). Durch die Rekrutierung und Aktivierung von Stromazellen bildet sich eine tumorfördernde Lebermikroumgebung aus, welche durch Interaktion über Zytokine geprägt ist. Wachstum und weitere Größenzunahme (>300 µm) induzieren Hypoxie, wodurch Tumor- und Stromazellen angiogene Faktoren sezernieren (70). Dies führt zur Endothelzell-Rekrutierung und Angiogenese. Nach dieser Phase der *angiogenen Mikrometastase* (3) kann sich schließlich eine *etablierte Makrometastase* (4) mit klinischer Manifestation ausbilden (70). Zusammenfassend kann eine physiologische Lebermikroumgebung DTZ durch eine adäquate Immunantwort abtöten und eine Kolonisierung verhindern (71). Dahingegen können DTZ die Leber leichter kolonisieren, falls die Lebermikroumgebung durch eine Entzündungsreaktion geprägt ist und bereits im Vorfeld aktivierte Stromazellen aufweist (41, 71).

In dieser prometastatischen Lebermikroumgebung nehmen HMF eine entscheidende Rolle ein. Dies verdeutlichen *in vitro*-Versuche, die eine gesteigerte Proliferationsrate von Tumorzellen im Beisein von HMF nachwiesen (64, 65, 72). Zusätzlich wiesen in einem Mausmodell Tumorzellen, die gemeinsam mit HMF injiziert worden sind eine höhere Lebermetastasierungsrate auf, als bei alleiniger Injektion von Tumorzellen (68). HMF entfalten ihre prometastatische Wirkung dabei über mehrere Wege und in allen Stadien der Lebermetastasierung. Beispielsweise sezernieren PDEZ des Primarius Exosomen, die von Kupffer-Zellen aufgenommen werden (41). Diese schütten im Anschluss TGF-β aus. Hierdurch aktivierte HMF sezernieren wiederum EZM-Moleküle wie Fibronectin und tragen darüber entscheidend zur Bildung einer prämetastatischen Nische bei (siehe Kapitel 1.1.3) (41). Darüber hinaus sezernieren HMF MMP und Chemoattraktanten wie *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), wodurch die Invasion von ZTZ erleichtert werden kann (65, 73, 74). Ferner unterdrücken HMF die T-Zell-Antwort und begünstigen dadurch die Leberkolonisierung zusätzlich (75). Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factor* (PDGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF) führt zu einer gesteigerten Proliferation (64). Schließlich fördern HMF die Angiogenese und können somit auch zur Etablierung einer Metastase beitragen (76).

1.3 Zellulärer Metabolismus

1.3.1 Definition

Der zelluläre Metabolismus oder Stoffwechsel ermöglicht den Abbau von Stoffen (Katabolismus) sowie den Aufbau großer Moleküle (Anabolismus) (77). Er stellt ein streng reguliertes Netzwerk dar, das aus Zwischenprodukten (Intermediärmetaboliten) und meist enzymatischen Reaktionen (Stoffwechselwegen) geflochten wird (77). Ein Grundprinzip des Metabolismus ist der Einsatz der „universellen Energiewährung“ Adenosintriphosphat (ATP). ATP wird dabei durch den exergonen Abbau kohlenstoffhaltiger Brennstoffe generiert und für den Ablauf endergoner Reaktionen wie Biosynthesen eingesetzt (77). Umfassender wird Metabolismus ferner als „Daseinsweise des Lebens“ beschrieben (78). Er stellt die Funktion, das Wachstum und die Selbsterneuerung des Organismus sicher und ist somit nicht lediglich auf „den Umsatz freier Energie“ zu reduzieren (78).

1.3.2 Kohlenhydratmetabolismus

Kohlenhydrate (KH) sind Verbindungen aus Kohlenstoffatomen und Hydroxylgruppen (77). Sie nehmen zahlreiche Funktionen in der zellulären Homöostase ein. Beispielsweise sind sie an der Zellkommunikation, am Aufbau der EZM und als wichtige Brennstoffe am Energiehaushalt beteiligt (77). Aufgrund dieses breiten Einsatzspektrums und enger Verflechtungen mit dem Stoffwechsel anderer Stoffgruppen, beinhaltet der KH-Stoffwechsel daher zentrale Wege des zellulären Metabolismus. Glukose ist dabei das Schlüsselmolekül des KH-Stoffwechsels und ihre Wege variieren abhängig von Zelltyp, Sauerstoffangebot, Energiebedarf und Proliferationsstatus (79, 80).

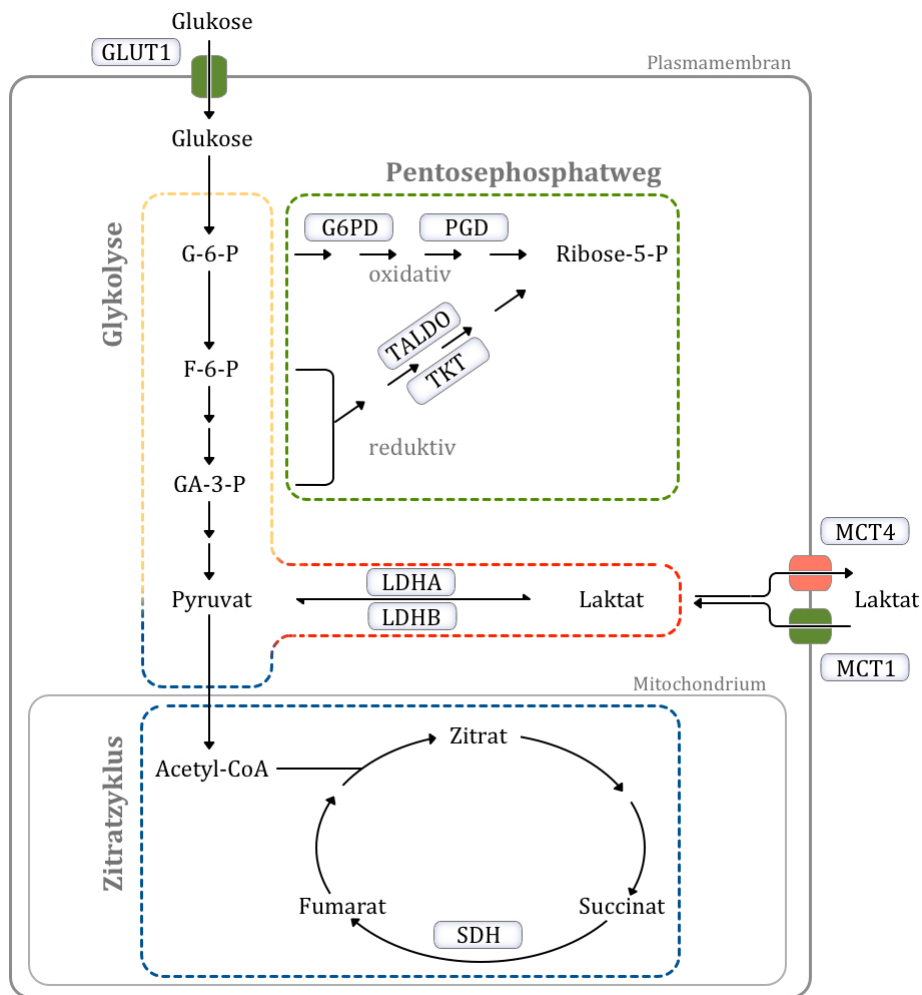


Abbildung 1-3 Vereinfachte Darstellung des zellulären Kohlenhydratstoffwechsels. Schematisch gezeigt sind die zelluläre Aufnahme von Glukose über ein Transportprotein sowie ihre Stoffwechselwege mit Glykolyse, Pentosephosphatweg und Zitratzyklus im Mitochondrium. Ferner ist die Abgabe und Aufnahme von Laktat über Transportproteine gezeigt. Dargestellt sind die Proteine Glukosetransporter 1 (GLUT1), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (PGD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT), Laktatdehydrogenase A (LDHA), Laktatdehydrogenase B (LDHB), Monokarboxylat Transporter 1 (MCT1), Monokarboxylat Transporter 4 (MCT4) und Succinatdehydrogenase (SDH). Abbildung modifiziert nach (81).

Vereinfacht dargestellt nimmt die Zelle Glukose zunächst durch Transportproteine über erleichterte Diffusion auf (vgl. Abbildung 1- 3). Um die Diffusion aus der Zelle heraus zu verhindern, erfolgt im Zytoplasma die Phosphorylierung zu Glukose-6-phosphat (G-6-P) (79). Ausgehend von G-6-P eröffnen sich unterschiedliche Wege, in Abhängigkeit des zellulären Bedarfs und Sauerstoffangebotes (79). Der Abbau im Rahmen der Glykolyse dient der Generierung von ATP und der Bereitstellung von Bausteinen für Biosynthesen (79). Die Glykolyse baut im Zytosol G-6-P unter Einsatz von oxidiertem Nicotinamadenindinukleotid (NAD^+) über mehrere Zwischenschritte zu Pyruvat ab. Durch exergone Substratkettenphosphorylierung werden in diesem Prozess 2 Moleküle ATP generiert (77). Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat im Anschluss zu Laktat

konvertiert. Hierbei entsteht NAD^+ , das somit wiederum den Abbau weiterer Glukosemoleküle ermöglicht (77). Um einer intrazellulären Ansäuerung entgegenzuwirken, erleichtern Transportproteine schließlich den Austritt des produzierten Laktats. Einige Zellen sind dabei in der Lage zirkulierendes Laktat aufzunehmen und wiederum zu Pyruvat umzuwandeln (79). Unter aeroben Bedingungen kann Pyruvat zur Generierung von ATP weiter verstoffwechselt werden. Dazu wird Pyruvat im Mitochondrium zu Acetyl-CoA umgesetzt und im Zitratzyklus vollständig zu CO_2 oxidiert (77). Die dabei freiwerdenden energiereichen Elektronen werden auf die mitochondriale Atmungskette übertragen und dienen schließlich der oxidativen Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP (77). Bei diesem Vorgang ist molekularer Sauerstoff der letzte Elektronenakzeptor (77). Ein wichtiges Enzym ist dabei die Succinatdehydrogenase (SDH) (vgl. Abbildung 1-3), da sie sowohl eine Reaktion des Zitratzyklus als auch der mitochondrialen Atmungskette katalysiert (77). Zusammenfassend ist bezüglich der ATP-Generierung die oxidative Phosphorylierung mit etwa 30 Molekülen ATP je Molekül Glukose gegenüber dem anaeroben Weg mit 2 Molekülen ATP je Molekül Glukose überlegen (77). Neben der Glykolyse kann G-6-P alternativ den Pentosephosphatweg (PPW) einschlagen (77). Der oxidative Teil des PPW oxidiert dabei G-6-P unter Herstellung von reduziertem Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Pentosen wie Ribose-5-phosphat. NADPH ist ein Reduktionsmittel, das sowohl für Biosynthesen als auch zur Reduktion von Antioxidantien wie Gluthation benötigt wird. Dahingegen ist Ribose-5-phosphat ein Bestandteil von Nukleotiden und ist somit für deren Synthese erforderlich (77). Das Schrittmacherenzym dieses oxidativen Teils des PPW ist die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) (vgl. Abbildung 1-3) (77). Über den reduktiven Teil ist der PPW ferner mit weiteren Intermediaten der Glykolyse verknüpft (77). Hierin werden unterschiedlich lange Kohlenhydrate reversibel ineinander umgewandelt, beispielsweise 2 C_6 und 1 C_3 zu 3 C_5 . Je nach Stoffwechsellage werden somit Intermediate der Glykolyse zu Pentosen konvertiert oder Pentosen dem weiteren Abbau in der Glykolyse zugeführt (77).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Glukose zu unterschiedlichen Produkten verstoffwechselt werden kann. Diese dienen den jeweiligen zellulären Bedürfnissen (79). Im Beisein von Sauerstoff nutzen differenzierte Zellen dabei vorwiegend die oxidative Phosphorylierung (82). Sie dient der effizienten Synthese von ATP

zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen (82). Falls Zellen durch Wachstumsfaktoren jedoch zur Proliferation angeregt werden, nutzen sie Glukosederivate verstärkt als Ausgangsstoffe zur Synthese von Zellbausteinen (82). Tumorzellen passen dabei ihren Stoffwechsel auf ähnliche Weise an, ohne auf die externe Stimulation durch Wachstumsfaktoren angewiesen zu sein (82).

1.3.3 Metabolismus in Tumorzellen

Die neoplastische Entartung somatischer Zellen wird als genetische Erkrankung betrachtet, die sich auf Grundlage von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen manifestiert (83, 84). Sowohl Onkogene wie KRAS als auch Tumorsuppressorgene wie TP53 beeinflussen unmittelbar den Metabolismus von Tumorzellen (85-87). Darüber hinaus sind Metabolismus-assoziierte Proteine selbst als Onkogene beziehungsweise Tumorsuppressorgene und ihre Substrate als sogenannte tumorfördernde „Onkometabolite“ beschrieben worden (88-90). Daher wird das Konzept von Tumoren als einer genetischen Erkrankung zunehmend durch das Konzept einer metabolischen Erkrankung ergänzt (91). Dementsprechend gelten metabolische Veränderungen als eines der neuen Kennzeichen (*emerging hallmarks*) von Tumorzellen (92).

Zu den metabolischen Veränderungen gehört eine erhöhte Glykolyserate (80, 93). Sie wurde erstmals von Otto Warburg in den 1920er Jahren beobachtet und wird daher Warburgeffekt genannt (80). Er beschreibt den erhöhten Umsatz von Glukose, die trotz ausreichender Sauerstoffversorgung vorwiegend glykolytisch zu Laktat abgebaut wird (80). Das entstandene Laktat wird im Anschluss von der Tumorzelle abgegeben (80). Auch in Zellen des PDAC konnte dabei der Warburgeffekt beobachtet werden (94). Dies steht im Einklang mit der Feststellung, dass die häufig und früh eintretende Mutation des Onkogens KRAS den glykolytischen Stoffwechsel in Zellen des PDAC fördert (85). Die intensivierete Glykolyse unterstützt die Proliferation und Tumorigenität von Zellen, trotz der etwa 18-fach geringeren ATP-Ausbeute im Vergleich zum oxidativen Abbau von Glukose (92). Auch wenn nicht abschließend geklärt ist, auf welchem Weg Tumorzellen von einer gesteigerten Glykolyserate profitieren, bestehen unterschiedliche Erklärungsansätze (95). Dazu gehört, dass proliferierende Zellen in größerem Maß von Reduktionsmitteln und Zellbausteinen abhängig sind als von ATP (80). Intermediärmetabolite der Glykolyse stellen dabei Ausgangsstoffe sowohl für die Synthese von Zellbausteinen als auch von Reduktionsmitteln dar (siehe Kapitel 1.3.2).

Daher weist der PPW in proliferierenden Tumorzellen eine erhöhte Aktivität auf, weshalb Zellen des PDAC beispielsweise das Enzym G6PD verstärkt exprimieren (94, 96). Auf diesem Weg wird NADPH als Reduktionsmittel und Ribose-5-phosphat zur Nukleotidsynthese bereitgestellt.

1956 postulierte Warburg eine mitochondriale Dysfunktion in Tumorzellen. Diese würde in der Folge eine gesteigerte Glykolyserate zur Deckung des Energiebedarfs erfordern (97). Heute geht man im Gegensatz dazu davon aus, dass Alterationen in mitochondrialen Enzymen selbst aktiv zur Tumorigenität beitragen (98). Beispielsweise sind Zellen des PDAC in verstärktem Maß von Glutamin abhängig, das aufgenommen und anaplerotisch in den Zitratzyklus eingebracht wird (99). Die dabei entstehenden Intermediärmetabolite dienen als Ausgangsstoffe für Biosynthesen, zum Beispiel von Aminosäuren oder Fettsäuren (99). Zusätzlich verstoffwechseln Zellen des PDAC Glutamin über Aspartat und Malat zu Pyruvat und generieren auf diesem Weg NADPH (100). Neben der Funktion als Ausgangsstoffe für Biosynthesen spielen Intermediärmetabolite des Zitratzyklus ferner eine Rolle als „Onkometabolite“. Bestimmte Tumorentitäten weisen beispielsweise Funktionsverluste des Tumorsuppressorgens SDH auf und PDAC Zellen regulieren SDH herunter (88, 94). Dadurch steigt die intrazelluläre Konzentration des Substrates der SDH, dem „Onkometabolit“ Succinat (vgl. Abbildung 1-3) (101). Succinat ist wiederum an der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor 1- α* (HIF1- α) beteiligt (90). Dieser passt die Zelle physiologischerweise an hypoxische Bedingungen an und erhöht die Glykolyserate (102). In Zellen des PDAC kann HIF 1- α zusätzlich die Proliferation, Migration und schließlich die Metastasierung unterstützen (103). Zusammenfassend charakterisiert den Stoffwechsel von Tumorzellen daher sowohl ein erhöhter glykolytischer Umsatz (Warbureffekt) als auch eine tumorfördernde Anpassung mitochondrialer Funktionen. Dabei steht der metabolische Phänotyp von Tumorzellen in gegenseitiger Wechselwirkung mit der Mikroumgebung des Tumors.

1.3.4 Einfluss der Mikroumgebung auf den Metabolismus in Tumorzellen

Klassischerweise wurden Tumorzellen hinsichtlich ihres Metabolismus getrennt von ihrer Mikroumgebung untersucht (104). Da allerdings gezeigt werden konnte, dass ihr Metabolismus vom Kontext der Tumormikroumgebung abhängt, kommt den jeweiligen Interaktionen eine wachsende Bedeutung zu (105).

In Abhängigkeit der räumlichen Nähe zu einem Blutgefäß, sind Tumorzellen beispielsweise unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Diesbezüglich wurde im PDAC eine Zusammenarbeit normoxischer und hypoxischer Tumorzellen beobachtet. Hypoxische Zellen sezernieren dabei glykolytisch entstandenes Laktat, das von normoxischen Zellen aufgenommen und oxidativ verwertet wird (106). Diese Zusammenarbeit zwischen Tumorzellen soll zu einem insgesamt aggressiveren Gesamttumor beitragen (106). Darüber hinaus bestehen metabolische Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen, die sich möglicherweise je nach Tumorentität unterscheiden. Am Beispiel des Mammakarzinoms wurde beobachtet, dass neoplastische Zellen die Glykolyse und Laktatproduktion in umliegenden Myofibroblasten induzieren (107, 108). Das entstandene Laktat wird über Transportproteine von den Myofibroblasten abgegeben, um von Tumorzellen wiederum aufgenommen zu werden (107, 108). Als „metabolische Parasiten“ nutzen sie es anschließend zum oxidativen Abbau im Mitochondrium und somit zur oxidativen Phosphorylierung (107). Diese Beobachtung wird reverser Warburgeffekt bezeichnet, da die erhöhte Glykolyserate in Stromazellen beobachtet wurde, während Tumorzellen eine verstärkte oxidative Phosphorylierung zeigten (107). Myofibroblasten beeinflussen ebenfalls im Fall des PDAC den Metabolismus von Tumorzellen. Eine Studie zeigte beispielsweise, dass Myofibroblasten Exosomen abgeben, die von Tumorzellen aufgenommen werden (109). Diese Exosomen enthalten dabei energiereiche Metabolite wie Glutamin, die von Tumorzellen zur Biosynthese oder Energiegewinnung umgesetzt werden können (109). Im Gegensatz zum Mammakarzinom wurde ferner beobachtet, dass Myofibroblasten einen glykolytischen Phänotyp in Tumorzellen des PDAC fördern (109). Diesen Effekt erzielen Myofibroblasten möglicherweise durch miRNA-Moleküle, die mit Exosomen transportiert werden. Dadurch erfolgt sowohl eine Steigerung der Glykolyserate als auch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in neoplastischen Zellen des PDAC (109).

In der Zusammenschau wird deutlich, dass der Stoffwechsel eine kennzeichnende und definierende Stellung in lebenden Organismen einnimmt (78). Dementsprechend weisen auch Tumorzellen bestimmte metabolische Eigenschaften auf, die wesentlich zu ihrem entarteten Verhalten beitragen (110). Obwohl die Mikroumgebung im Primarius Tumorzellen richtungsweisend beeinflusst, ist ihre Einflussnahme auf den Metabolismus von Tumorzellen jedoch nur lückenhaft verstanden (111).

Unverstanden ist insbesondere der Einfluss den die Mikroumgebung des Sekundärorgans auf den Metabolismus disseminierter Tumorzellen im Fall von Fernmetastasen ausübt.

1.4 Ziele der Arbeit

Menschen, die an einem PDAC erkranken, sehen sich mit einer medianen Überlebenszeit von weniger als fünf Monaten einer schicksalhaften Diagnose gegenübergestellt (1). Entscheidend trägt zu dieser bei, dass der Großteil der Erkrankten zum Diagnosezeitpunkt ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufweist, häufig mit Lebermetastasen (45, 52). Um aussichtsreichere Behandlungskonzepte zu entwickeln, kommt dem umfassenden Verständnis der Mechanismen der Lebermetastasierung somit eine grundlegende Bedeutung zu.

Metastasierende PDEZ setzen sich in der Leber einer fremden Umwelt aus. In wechselnden Umweltbedingungen begünstigen metabolische Alterationen die Anpassung und das Überleben von Tumorzellen dabei maßgeblich (92, 112, 113). Gleichzeitig kann die Lebermikroumgebung im physiologischen Zustand eine Kolonisierung hemmen, während sie im entzündlichen Zustand eine „prometastatische Nische“ darstellt (70, 114). Inwiefern die jeweilige Lebermikroumgebung Einfluss auf den Metabolismus metastasierender PDEZ nimmt und dadurch eine Rolle in der Etablierung von Metastasen spielt ist jedoch gänzlich unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit sollte dies an Tumorzellen in unterschiedlichen Stufen der Entartungssequenz untersucht werden, da zunehmend eine frühzeitige Metastasierung während der Karzinogenese angenommen wird (37, 115). Daher wurden *in vitro* Versuche mit benignen (H6c7eR-pBp), prämaligen (H6c7eR-Kr) oder malignen (PANC-1) PDEZ durchgeführt, die als Modell für metastasierende Zellen des PDAC dienen. Diese wurden dabei jeweils entweder monokultiviert oder mit hepatischen Sternzellen (M1-4HSC) beziehungsweise hepatischen Myofibroblasten (M-HT) indirekt kokultiviert. M1-4HSC wurden als Modellzelllinie für eine physiologische und M-HT für eine entzündliche Lebermikroumgebung eingesetzt.

Zunächst sollte eine Charakterisierung des Stoffwechsels der drei PDEZ-Zelllinien in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen erfolgen. Insbesondere sollte dabei der Einfluss der jeweiligen Kokultivierung überprüft werden. Hierfür wurde in PDEZ mittels Westernblot-Verfahren die Expression Metabolismus-assoziierter Proteine untersucht.

Nach dieser Charakterisierung sollten in Abhängigkeit der Kokultur auffällig regulierte Proteine mittels siRNA-Transfektion in PDEZ supprimiert und ihr Einfluss dadurch näher untersucht werden. Dazu sollte der Stoffwechsel siRNA-transfizierter, kokultivierter PDEZ erneut mittels Westernblot-Verfahren und zusätzlich funktionell mittels *Seahorse-Analyse* charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Seneszenzrate durch Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung ermittelt werden. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die in Kokultur ermittelten Proteine über den Stoffwechsel hinaus das Wachstumsverhalten von PDEZ beeinflussen und dadurch zur Etablierung einer Lebermetastase beitragen können.

Zusammengefasst wurden folgende Fragen untersucht: Unterscheiden sich PDEZ unterschiedlicher Entartungsstufen in ihrem Stoffwechsel? Worin unterscheidet sich der Einfluss einer physiologischen von einer entzündlichen Lebermikroumgebung auf den metabolischen Phänotyp von PDEZ? Besteht in PDEZ, die unter Einfluss der jeweiligen Lebermikroumgebung stehen, ein Zusammenhang zwischen dem metabolischen Phänotyp und Zellwachstum?

2 Materialien

2.1 Geräte

Biologische Sicherheitswerkbänke

HERA Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HERA Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Inkubationsgeräte

BBD 6220 CO ₂ – Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gyrotwister Laborschüttler	Labnet international, Woodbridge, USA
HERA Cell 240 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MR Hei-Mix S Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, D
QBA1 Blockthermostat	Grant, Cambridge, UK
Roller mixer SRT9 stuart	Bibby Scientific, Stone, UK
W12 Wasserbad	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, D
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
WTC ED-53 Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, D

Laborwaagen

Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB 120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

Messgeräte

Fusion SL Lumineszenzdetektor	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Infinite M200 Pro	Tecan Group, Männedorf, CH
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, D
Seahorse XFp Analyzer	Agilent, Santa Clara, USA

Mikroskope

AE2000	Motic, Wetzlar, D
Evos _{XL} Core	AMG, Bothell, USA
Axioskop 40	Zeiss, Jena, D
Axiovert 25	Zeiss, Jena, D

Pipetten

Finnipipette

0.2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pipetboy

Integra Biosciences, Zizers, CH

Ripette

Ritter, Schwabmünchen, D

Software

EndNote X7

Thomson Reuters, New York City, USA

FusionCapt Advance Software

Vilber Lourmat, Eberhardzell, D

i-control

Tecan Group, Männedorf, CH

ImageJ

NIH, Bethesda, USA

Microsoft Office 2011

Microsoft Corporation, Redmond, USA

Pixelmator 3.4.2

Pixelmator Team, Vilnius, LT

SigmaPlot 12.5

Systat Software, Chicago, USA

Wave Desktop 2.2

Agilent, Santa Clara, USA

Ultraschallhomogenisator

Seriennummer PG.1029

MSE, London, UK

Vakuumpumpe

Laboport

KNF Neuberger, Freiburg, D

Vortexmischer

Genius 3

IKA, Staufen, D

VF2

IKA, Staufen, D

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, Bohemia, USA

Westernblot

OmniPAC MIDI CS-300V Netzteil

Cleaver Scientific, West Sussex, GB

OmniPAGE VS10D Gelkammer

Cleaver Scientific, West Sussex, GB

SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer

Cleaver Scientific, West Sussex, GB

Zentrifugen

Galaxy Mini

VWR, Radnor, USA

Heraeus Biofuge pico

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Heraeus Fresco 17

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Heraeus Pico 17

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Heraeus Multifuge 3 S-R
Heraeus Multifuge X1
Rotina 420 R
Sprout mini centrifuge

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hettich, Tuttlingen, D
Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

CryoPure Gefäß 1,0 ml
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml
Mikrotiterplatte 96-Well
Nitril-Untersuchungshandschuhe
Parafilm M
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl
Ritips 25 µl, 50 µl, 100 µl
PVDF Membran 0,45 µm
Röhrchen 15 ml, 50 ml
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml
Transwelleinsätze 6-Well,
Porengröße 0,4 µm
Wellplatten 6-Well
Whatman-3MM Filterpapier
XFp Carrier Tray
XFp FluxPak
Zellschaber 25 cm
Zellkulturflaschen 75 cm²

Sarstedt, Nürnberg, D
Eppendorf, Hamburg, D
Sarstedt, Nürnberg, D
Ansell, München, D
Brand, Wertheim, D
Sarstedt, Nürnberg, D
Ritter, Schwabmünchen, D
GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Sarstedt, Nürnberg, D
Sarstedt, Nürnberg, D
Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT

Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Agilent, Santa Clara, USA
Agilent, Santa Clara, USA
Sarstedt, Nürnberg, D
Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT

2.3 Chemikalien und Reagenzien

6-Aminocapronat
Ammoniumperoxodisulfat
Bromphenolblau Indikator ACS
Clarity Western ECL Substrat
Dinatriumhydrogenphosphat
DMEM High Glucose Medium
Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Merck Millipore, Darmstadt, D
Merck Millipore, Darmstadt, D
BioRad Laboratories, Hercules, USA
Carl Roth, Karlsruhe, D
PAA, Pasching, A
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Epidermal growth factor (EGF)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Venlo, NL
Kaliumchlorid	Th. Geyer, Renningen, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Keratinozytenmedium SFM	Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
β -Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom, Berlin, D
Opti-MEM Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA
PageRuler	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, A
Penicillin-Streptomycin	
10.000 U/ml - 10 mg/ml	PAA, Pasching, A
Poly-D-Lysin 0,01 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin 20 μ g/ μ l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Carlsbad, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, D
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
SuperSignal West Dura	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TGF- β 1 10 mg/ml (rekombinant-human)	BioLegend, San Diego, USA
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, A

Tween	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
XF Calibrant	Agilent, Santa Clara, USA
<u>Kits</u>	
DC Protein Assay Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
XFp Cell Mito Stress Test Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

2.4 Rezepturen

Lösung	Rezeptur
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %	1 g APS in 10 ml aqua destillata
Blot-Puffer A	300 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 11
Blot-Puffer B	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 10,6
Blot-Puffer C	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 40 mM 6-Aminocapronat pH 10,6
<i>Bovine lacto transfer technique optimizer</i> (BLOTTO)	5 g Milchpulver 100 ml TBS-T
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (10x)	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumdihydrogenphosphat 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat 1000 ml aqua destillata pH 7,4

Laemmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (v/v) Glycerol pH 7,6
TBS (10x)	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	100 ml TBS (10x) 1000 µl Tween 20 ad 1000 ml aqua destillata
Westernblot Farbpuffer	2,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,005 % (w/v) Bromphenolblau in Laemmli-Puffer (2x)
Westernblot Laufpuffer	15,5 g Tris-Base 72,1 g Glycin 5 g SDS ad 5000 ml aqua destillata
Westernblot Sammelgel	0,75 ml aqua destillata 312,5 µl Tris Puffer (pH 6,8) 162,5 µl Acrylamid 30 % (w/v) 6,75 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 1,25 µl TEMED
Westernblot Trenngel 10 %	0,75 ml Aqua destillata 1,5 ml Tris-Puffer (pH 8,8) 1,5 ml Acrylamid 30 % (w/v) 22 µl APS-Lösung 10 % 4,4 µl TEMED

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Antigen (Klon)	Donor/ Isotyp	Stock- konzentration	Verdünnung in 5 ml BLOTTO	Katalognummer
G6PD (H- 160)	Kaninchen/ polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-67165*
GLUT1 (SPM498)	Maus/ IgG _{2a}	0,2 mg/ml	1:500	ab-40084**
HSP90 (H- 114)	Kaninchen/ polyklonal	0,2 mg/ml	1:2000	sc-7947*
LDH-A (E-9)	Maus/ IgG ₁	0,2 mg/ml	1:2000	sc-137243*
LDH-B (431.1)	Maus/ IgG ₁	0,2 mg/ml	1:2000	sc-100775*
MCT1 (H-1)	Maus/ IgG ₁	0,2 mg/ml	1:2000	sc-365501*
MCT4 (F-10)	Maus/ polyklonal	0,2 mg/ml	1:2000	sc-376101*
PGD (D-17)	Kaninchen/ polyklonal	0,1 mg/ml	1:1000	sc-138520*
SDHB (FL-280)	Kaninchen/ polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-25851*
TALDO (C-5)	Maus/ IgG ₁	0,2 mg/ml	1:1000	sc-365449*
TKT (H-50)	Kaninchen/ polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-67120*

* bezogen von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

** bezogen von Abcam, Cambridge, UK

2.5.2 Sekundärantikörper

Spezifität	Konjugat	Donor	Stockkonzentration	Verdünnung in 5 ml BLOTTO	Katalognummer
Kaninchen-IgG	Meerrettich-peroxidase	Ziege	83 µg/ml	1:2000	#7074*
Maus-IgG	Meerrettich-peroxidase	Pferd	170 µg/ml	1:2000	#7076*

* bezogen von Cell Signaling, Danvers, USA

2.6 Small interfering RNA

siRNA	Stockkonzentration	Katalognummer	Hersteller
Kontroll-siRNA-A	10 µM	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
G6PD siRNA	10 µM	sc-60667	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
SDHB siRNA	10 µM	sc-44088	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

2.7 Zelllinien

Pankreasduktusepithelzelllinie	Beschreibung	Quelle
H6c7eR-pBp	nicht tumorigene humane pankreatische Epithelzelllinie transduzierter retroviraler pBabepuro-Vektor transduziertes HPV-Onkoprotein E6/E7 PDAC-assoziierte Mutationen: keine Modell für benignes Pankreasduktusepithel	M.S. Tsao, Toronto, Kanada (116)
H6c7eR-Kr	prämaligene humane pankreatische Epithelzelllinie transduzierter retroviraler pBabepuro-K-ras4B ^{G12V} -Vektor transduziertes HPV-Onkoprotein E6/E7 PDAC-assoziierte Mutationen: KRAS Modell für prämaliges Pankreasduktusepithel	M.S. Tsao, Toronto, Kanada (116)

PANC-1	humane Pankreasadenokarzinomzelllinie PDAC-assoziierte Mutationen: KRAS, TP53, CDKN2A/p16 Modell für malignes Pankreasduktusepithel	ATCC, Manassas, USA (117, 118)
--------	---	---

Hepatische Stromazelllinie	Beschreibung	Quelle
M1-4HSC	murine immortalisierte hepatische Sternzelllinie (HSC) aus p19 ^{ARF} defizienten Mäusen Modell für annähernd physiologische Lebermikroumgebung	W. Mikulits, Wien, Österreich (119)
M-HT	murine immortalisierte hepatische Myofibroblastzelllinie (HMF) entstanden aus M1-4HSC Zellen durch TGF-β1 vermittelte Aktivierung und Transdifferenzierung Modell für entzündliche Lebermikroumgebung	W. Mikulits, Wien, Österreich (119)

2.8 Medien

Kulturmedium	Zusammensetzung
H6c7eR-pBp sowie H6c7eR-Kr	500 ml Keratinozytenmedium SFM 500 ml RPMI 1640 2,5 ng/ml EGF 5 % (v/v) FKS 0,5 % (v/v) L-Glutamin 25 µg/ml Rinderhypophysenextrakt
PANC-1	500 ml RPMI 1640 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Natriumpyruvat

M1-4HSC	500 ml DMEM High Glucose 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin
M-HT	500 ml DMEM High Glucose 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin 1 ng/ml TGF- β 1

Kokulturmedium	Zusammensetzung
H6c7eR-pBp oder H6c7eR-Kr kokultiviert mit M1-4HSC oder M-HT	500 ml RPMI 1640 10 % (v/v) L-Glutamin 10 % (v/v) FKS
PANC-1 kokultiviert mit M1-4HSC oder M-HT	500 ml DMEM High Glucose 500 ml RPMI 1640 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Natriumpyruvat

Seahorse Versuchsmedium	Zusammensetzung
<i>Mito-Medium</i>	XF Basis Medium minimal DMEM 10 mM (= 1,8 g/l) Glukose 1 mM (= 0,15 g/l) L-Glutamin 1 mM (= 0,11 g/l) Natriumpyruvat

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer biologischen Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung und vorgewärmten Medien.

3.1.1 Inkulturnahme von Zelllinien

Es wurden immortalisierte Zelllinien verwendet, deren Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgt. Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryo-Röhrchen, in welchem sich die Zellen in 10 % DMSO in FKS befanden, dem Stickstofftank entnommen. Die Zellen wurden anschließend in einem 50 ml Röhrchen mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Um das zytotoxische Frostschutzmittel DMSO aus der Suspension zu entfernen, wurden die Zellen 5 Minuten à 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Dies wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Suspension im Anschluss in eine beschriftete 75 cm² Polystyrol-Kulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte daraufhin in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxidbegasung und 86 % Humidität. Diese Bedingungen treffen, falls nicht anders angegeben, für alle Zellkulturinkubationen zu.

3.1.2 Passagieren

Kultivierte Zellen verbrauchen Nährstoffe, scheiden Stoffwechselprodukte aus und proliferieren, was zu einer zunehmenden Konfluenz in der Zellkulturflasche führt. Daher wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert und dadurch in neuem Kulturmedium auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierzu wurde die Zellkulturflasche dem Inkubator entnommen und das sich darin befindende Medium vorsichtig abgesaugt. Um die Zellen von dem Flaschenboden zu lösen, wurde den PDEZ 5 ml Trypsin und den hepatischen Stromazellen 5 ml Accutase hinzugegeben. Die Zellkulturflasche wurde daraufhin im Brutschrank für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Loslösen der Zellen lichtmikroskopisch überprüft und bei unzureichender Loslösung die Inkubation verlängert. Schließlich wurde die Zellsuspension entnommen und in einem 50 ml Röhrchen in 5 ml Medium aufgenommen. Das sich in der Suspension befindende Trypsin beziehungsweise die Accutase wurde durch einen Zentrifugationsschritt von

5 Minuten à 1200 U/min entfernt und das Zellpellet mit 20 ml Kulturmedium resuspendiert. Zusätzlich erhielten M-HT-Zellen 2 µl TGF-β1 und sowohl die H6c7eR-pBp als auch die H6c7eR-Kr Zellen 0,5 µl Puromycin je 10 ml Kulturmedium. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit je 10 ml auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt und inkubiert. Da sich Zelllinien mit wachsender Passagenzahl verändern, wurden diese nach maximal 15 Passagen verworfen und neue in Kultur genommen.

3.1.3 Zellzahlbestimmung zur Kokultivierung

Um für Versuche eine bestimmte Zellzahl auszusäen, wurde diese im Voraus mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung ermittelt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der über die perforierte Zellmembran in tote Zellen eindringt und dort an intrazelluläre Proteine bindet. Abgestorbene Zellen werden blau gefärbt, wohingegen vitale Zellen ungefärbt bleiben. Zunächst wurde dazu die Kammer vorbereitet, indem mit Druck das angefeuchtete Deckglas auf die Trägerstege der Glasplatte gelegt wurde. Der korrekte Sitz wurde mit Hilfe der auftretenden Newtonschen Ringe überprüft. Um die Zellen für das Zählen vorzubereiten, wurden diese aus der Zellkulturflasche gelöst (siehe Kapitel 3.1.2) und die Zellsuspension für eine homogene Zellverteilung resuspendiert. 18 µl der Zellsuspension wurden entnommen und mit 2 µl Trypanblau (10:1 Färbung) in einer 96-Well-Platte vermischt. Hieraus wurden 10 µl in die Zählkammer zwischen Deckglas und Glasplatte pipettiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden im Anschluss die vitalen Zellen in den vier Großquadranten gezählt. Der durch vier geteilte und somit gemittelte Wert wird mit 10^4 (Kammerfaktor) und 10^1 (Verdünnungsfaktor) multipliziert, wodurch die Zellzahl pro Milliliter Suspension resultiert. Eine anschließende Multiplikation mit dem Volumen der Zellsuspension entspricht der Gesamtzellzahl.

3.1.4 Kokultivierung von Zellen

Die gemeinsame Kultivierung (Kokultivierung) von Zelllinien erlaubt die Untersuchung gegenseitiger Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde zur Kokultivierung ein indirektes Transwellsystem im 6-Well-Format angewandt. In diesem System stehen kokultivierte Zellen über lösliche Faktoren im Austausch, die gezielt analysiert werden können. Im Well (= unteres Kompartiment) befanden sich dabei H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr oder PANC-1 Zellen mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^4$ in 2 ml Medium. Im Transwell (= oberes Kompartiment) befanden sich hingegen entweder keine Zellen (Monokultur)

oder die hepatischen Stromazellen M1-4HSC beziehungsweise M-HT mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ in 1,5 ml Medium (vgl. Abbildung 3-1).

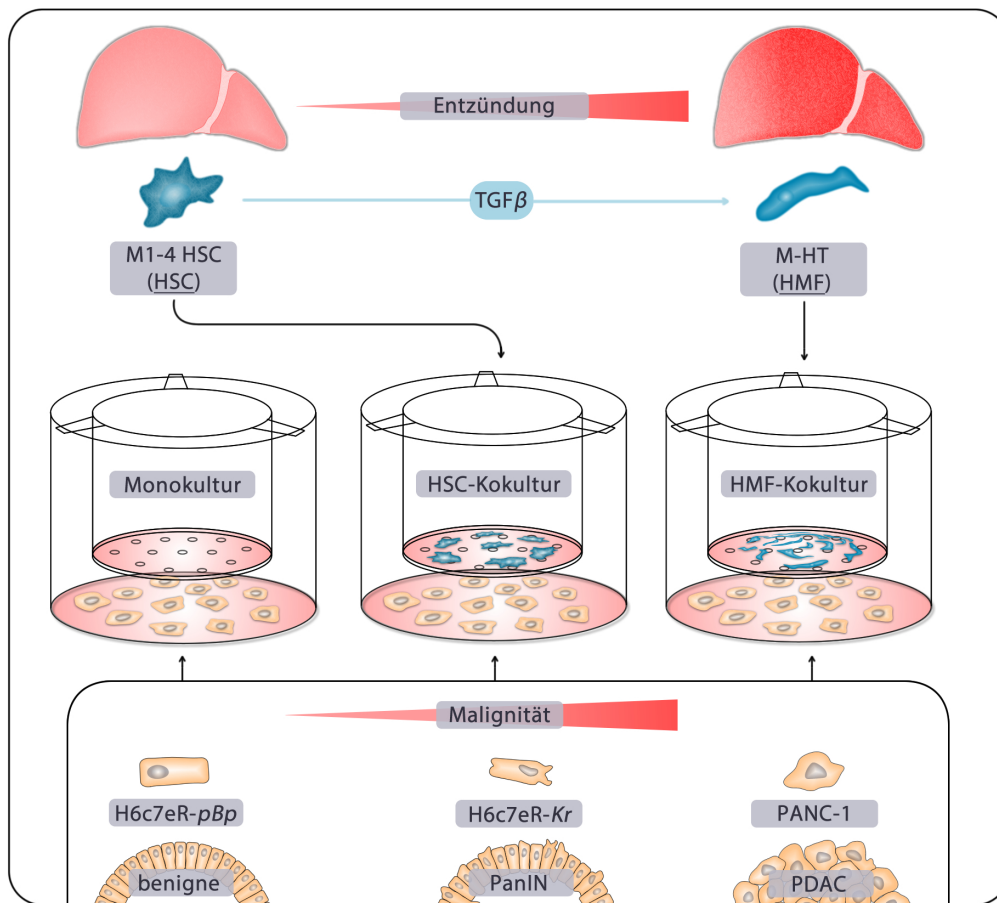


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Kokultivierung von PDEZ mit hepatischen Stromazellen. Im unteren Abbildungsdrittel sind die jeweils verwendeten pankreatischen dukталen Epithelzell(PDEZ)-Linien H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 in von links nach rechts aufsteigender Malignität mit pankreatischer intraepithelialer Neoplasie (PanIN) und pankreatischem duktälem Adenokarzinom (PDAC) dargestellt. Das obere Abbildungsdrittel zeigt die hepatischen Stromazelllinien M1-4HSC und M-HT. M1-4HSC repräsentieren eine physiologische Lebermikroumgebung als hepatische Sternzellen (HSC), wohingegen die durch *transforming growth factor* β (TGF- β) aktivierten M-HT eine entzündliche Lebermikroumgebung als hepatische Myofibroblasten (HMF) repräsentieren. In der Abbildungsmitte ist die Monokultivierung der jeweiligen PDEZ im Well und die Kokultivierung der jeweiligen PDEZ im Well mit den jeweiligen hepatischen Stromazellen im Transwell abgebildet. Abbildung modifiziert nach (120).

Zur Durchführung der Kokultivierung wurde nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 3.1.3) ein Mastermix in einem 50 ml Röhrchen angelegt. Dieser bestand aus dem der Zellzahl entsprechendem Volumen und Kulturmedium. Die jeweiligen hepatischen Stromazellen wurden aus dem Mastermix in die Transwells pipettiert. Diese wurden dann mit einer Pinzette in die Wells einer 6-Well-Platte gelegt, in welche zuvor 2 ml Kulturmedium pipettiert worden sind. Die PDEZ wurden aus dem Mastermix direkt

in die Wells einer anderen 6-Well-Platte pipettiert. Im Anschluss an eine 24-stündige getrennte Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel auf Kokulturmedium durchgeführt und die Kokultivierung begonnen. Dazu wurde zunächst das Anwachsen der Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Im Anschluss wurde das Kulturmedium aus den Transwells und Wells abgesaugt und diese mit frischem Kokulturmedium aufgefüllt. Daraufhin wurden die mit hepatischen Stromazellen beladenen Transwells mit einer Pinzette in die mit PDEZ beladenen Wells überführt. Sofern nicht anders angegeben, folgte eine Inkubation im Brutschrank für 6 Tage.

Um PDEZ nach deren Kokultivierung zu zählen, wurde das Transwell verworfen und das Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmte Accutase in das Well pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und deren Loslösung lichtmikroskopisch kontrolliert. Gegebenenfalls wurde die Inkubation verlängert, um ein vollständiges Ablösen zu erzielen. Die Zellsuspension wurde dann in 2 ml Eppendorfgläser überführt, in welche 1 ml vorgewärmtes Kokulturmedium vorgelegt wurde. Nach der Resuspension erfolgte die Zellzählung (siehe Kapitel 3.1.3).

3.1.5 Konservierung von Zelllinien

Zelllinien können eingefroren und in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden. Dazu wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst (siehe Kapitel 3.1.2) und in 5 ml vorgewärmtem PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten à 1200 U/min. Um die Zellen von Mediumrückständen zu reinigen, wurde das Pellet in 10 ml vorgewärmtem PBS resuspendiert und daraufhin erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in einer Lösung aus 900 µl FKS und 100 µl DMSO gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Kryo-Röhrchen pipettiert. Dieses wurde wiederum in ein vorgekühltes Kryokarussell überführt, welches bei -80 °C gelagert wurde. Nach zwei Tagen wurde das Kryo-Röhrchen dem Kryokarussell entnommen und für die dauerhafte Lagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2 siRNA-Transfektion

Die Technik der siRNA-Transfektion führt zu einer transienten Gensuppression. Vereinfacht dargestellt wird dabei doppelsträngige *small interfering RNA* (siRNA) über Vesikelfusion von der Zelle zunächst aufgenommen. Im Anschluss bindet die siRNA an den Nukleasekomplex „*RNA-induced silencing complex*“, der zur siRNA homologe mRNA

spaltet. Dadurch nimmt schließlich die Konzentration der jeweiligen mRNA ab, wodurch ein bestimmtes Gen posttranskriptionell supprimiert wird (121). Im Anschluss lässt sich der Einfluss der Gensuppression auf die Zelle untersuchen. Zunächst erfolgte dafür eine Zellaussaat wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, jedoch mit $2 \cdot 10^4$ PDEZ. Nach der 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen 2 ml frisches Kulturmedium ausgetauscht. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz in 2 ml Eppendorfgefäßen auf Eis hergestellt. Pro Well bestand dieser aus 100 µl FCS-freiem Opti-MEM-Medium und 12 µl HiPerFect, einem Transfektionsreagenz, welches die Lipidvesikelbildung zum Transport der siRNA ermöglicht. Zusätzlich enthielt ein Transfektionsansatz 1 µl G6PD-siRNA beziehungsweise 2 µl SDHB-siRNA. Für die Kontrollen wurden entsprechend 1 µl beziehungsweise 2 µl Kontroll-siRNA eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der jeweilige Transfektionsansatz tröpfchenweise und unter stetigem Schwänken in das jeweilige Well pipettiert und die 6-Well-Platte im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurde das Medium ausgetauscht und gegebenenfalls eine Kokultivierung mit $7,5 \cdot 10^4$ hepatischen Stromazellen begonnen (siehe Kapitel 3.1.4). Sofern nicht anders angegeben, folgte eine Inkubation im Brutschrank für 96 Stunden.

3.3 Proteingewinnung aus Ganzzelllysaten

3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Um von mono- beziehungsweise kokultivierten PDEZ eine Proteinuntersuchung durchzuführen, wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt. Zunächst wurde hierfür das Medium aus dem Well abgesaugt und zweimal ein Waschschriff mit 1 ml PBS durchgeführt. Im Anschluss wurden 100 µl Laemmli-Puffer (2x) in das Well pipettiert und somit die Zellen lysiert. Um das GZL zu sammeln, wurde der Wellboden mit einem Zellschaber bearbeitet und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Falls die Zellen zuvor zur Zählung gelöst worden waren (siehe Kapitel 3.1.5), erfolgte eine Zentrifugation von 5 Minuten à 4.000 U/min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl Laemmli-Puffer (2x) hinzu pipettiert. Die gewonnen GZL wurden fünfmal à 1 Sekunde mit $1,87 \text{ N/m}^2$ mittels eines Ultraschallhomogenisators behandelt und anschließend auf Eis gelegt. Die Lagerung der GZL erfolgte bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Ganzzelllysate wurde das *DC Protein Assay Kit* verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Ähnlich zur Lowry-Methode basiert der Assay auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Zunächst reagieren Proteine des GZL mit Kupfertartrat in basischem Milieu. Im Anschluss reduzieren vorwiegend die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan des Protein-Kupfer-Komplexes ein Folin-Reagenz. Die blauen Reaktionsprodukte werden kolorimetrisch gemessen und besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 750 nm. Zur Messung wurden 96-Well-Platten verwendet und die bei 4 °C gelagerten Reagenzien auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. In doppelten Ansätzen wurden pro Well 5 µl GZL, 25 µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S in 1 ml Reagenz A) und 200 µl Reagenz B pipettiert. Zusätzlich wurde in doppelten Ansätzen eine Standardreihe aus BSA hergestellt. BSA wurde dazu in Laemmli-Puffer (2x) von 0,2 mg/ml bis 1,55 mg/ml verdünnt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Dunkelheit und RT. Danach wurde mit Hilfe des Photometers *Infinite M200 Pro* die Absorption jedes Wells bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Die jeweilige Proteinkonzentration wurde schließlich anhand der BSA-Standardreihe errechnet.

3.4 Westernblot

Das Westernblotverfahren dient zum Nachweis und zur Charakterisierung bestimmter Proteine. Das Verfahren basiert auf drei Schritten: Größenauftrennung, Transfer und Immundetektion der Proteine.

3.4.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die größenabhängige Auftrennung eines Proteingemisches. Aus Ganzzelllysaten wurden hierzu Proben mit 10 µg Proteingehalt hergestellt. Zu jeder Probe wurde in Laemmli-Puffer (2x) gelöstes Natriumdodecylsulfat (SDS), β -Mercaptoethanol und der Farbstoffmarker Bromphenolblau hinzu pipettiert. Ein anschließendes Aufkochen der Proben für 5 Minuten bei 95 °C löst gemeinsam mit β -Mercaptoethanol die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine auf. Dies ermöglicht die Bindung des negativ geladenen SDS an hydrophobe Seitenketten, wodurch eine negative Proteingesamtladung resultiert. Nach dem Aufkochen wurden die Proben für wenige Sekunden zentrifugiert und auf Eis gelegt. Anschließend wurden 10 %-ige Polyacrylamidgele angefertigt, wobei

das Sammel- und Trenngel sequentiell gegossen wurden. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses in der mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer *OmniPAGE VS10D* fixiert. Um die Laufhöhen der Proteine vergleichen zu können, wurde in die Randtaschen des ausgehärteten Gels ein Proteinstandard (*PageRuler*) mit vorgefärbten Proteinen definierter Größe pipettiert. Nachdem die Proben in die jeweilige Geltasche pipettiert worden waren, wurde Spannung von 90 V im Sammelgelbereich und 130 V im Trenngelbereich angelegt. Durch den in den Proben enthaltenen Farbstoffmarker Bromphenolblau konnte deren Laufgeschwindigkeit in Richtung der Kathode verfolgt werden, welche umgekehrt proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist. Kurz bevor die Proben das untere Ende des Gels erreichten, wurde die Spannung abgenommen und die Gele der Kammer entnommen. Die Proteine des jeweiligen Ganzzellsates befanden sich nach ihrer Größe aufgetrennt in je einer Spalte des Gels.

3.4.2 Proteintransfer

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine im semi-dry blotting-Verfahren mittels *Sandwich*-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und fixiert. Dazu wurde zunächst die hydrophobe PVDF-Membran durch einminütige Inkubation in Methanol hydriert und in destilliertes Wasser gelegt. Anschließend wurde das *Sandwich* angefertigt. Dieses besteht von Kathode zu Anode aus sechs in Blot-Puffer C getränkten Whatmanpapieren, dem Gel, der PVDF-Membran, drei in Blot-Puffer B und schließlich sechs in Blot-Puffer C getränkten Whatmanpapieren (vgl. Abbildung 3-2). Das *Sandwich* wurde in der Transferkammer fixiert und eine Stromstärke von 70 mA pro *Sandwich* senkrecht zum Gel für eine Stunde angelegt. In dieser Zeit bewegten sich die Proteine in Richtung der positiven Elektrode und somit auf die PVDF-Membran. Die anzulegende Stromstärke ergibt sich dabei aus folgender Formel:
$$\text{mA} = (\text{Länge}(\text{cm}) * \text{Breite}(\text{cm}) * 1,25 \text{ mA}) / \text{cm}^2.$$

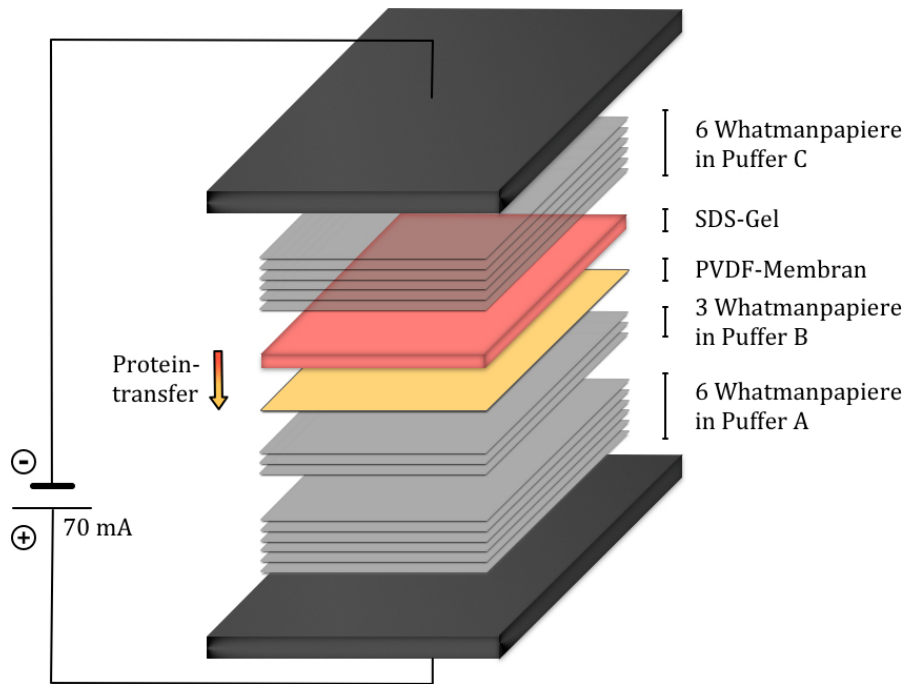


Abbildung 3-2 Proteintransfer mittels *semi-dry-blotting*-Verfahren. Aufbau eines *Sandwich* aus sechs Whatmanpapieren in Puffer C getränkt, einem Natriumdodecylsulfat(SDS)-Gel, einer Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran, drei Whatmanpapieren in Puffer B getränkt und sechs Whatmanpapieren in Puffer A getränkt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 70 mA angelegt.

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran entnommen und für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern, wurde die Membran über Nacht und bei 4 °C auf einem Laborschüttler in BLOTTO inkubiert.

3.4.3 Immundetektion

Um die zu untersuchenden Proteine zu visualisieren, wurde eine Immundetektion durchgeführt und die Methode der verstärkten Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) angewandt. Dafür wurde die PVDF-Membran, nach dem Blockieren in BLOTTO, in 50 ml Röhrchen mit einem spezifischem Primärantikörper für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Primärantikörper sind Kapitel 2.5.1 zu entnehmen. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die PVDF-Membran danach dreimal à 10 Minuten in TBS-T gewaschen. In Abhängigkeit des Donors des Primärantikörpers, wurde die PVDF-Membran anschließend mit einem Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert, welcher an die Primärantikörper bindet. Die Inkubation erfolgte in 50 ml Röhrchen für eine Stunde bei RT auf einem Rollmischer und zu Verdünnungen wie in Kapitel 2.5.2 angeben. Es folgten drei zehnmütige Waschschrte in TBS-T. Der Sekundärantikörper ist dabei ein Fusionsprotein. Es besteht aus

einem Fab-Fragment, das an den Primärantikörper bindet, und dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). Durch die Visualisierung von Reaktionsprodukten der HRP kann das untersuchte Protein quantifiziert werden. Dazu wurde die PVDF-Membran für fünf Minuten in der Substratlösung *Clarity* nach Herstellerangaben inkubiert. *Clarity* besteht aus einem Zweikomponentensystem (Peroxid-Lösung und Luminol-Lösung) und agiert als Substrat der HRP. Die Produkte der resultierenden Reaktion erzeugen Chemilumineszenz. Dieses Licht wurde mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektors Fusion SL detektiert, wodurch eine Proteinbande auf der PVDF-Membran sichtbar wurde. Die Leuchtintensität der Proteinbande spiegelt die Menge des untersuchten Proteins wider.

Da eine unregelmäßige Beladung der Gele oder fehlerhafte Proteinauftrennung zu Artefakten in der Leuchtintensität des untersuchten Proteins führen kann, wird eine Ladekontrolle eingesetzt. Hierzu wurde das Haushaltsprotein Hitzeschockprotein 90 (HSP90) auf jeder Membran detektiert. Das zu untersuchende Protein wurde im Vergleich zur Leuchtintensität des HSP90 der gleichen Probe ausgewertet.

3.4.4 Densitometrie

Zur Objektivierung von Proteinexpressionsunterschieden wurde eine vergleichende Dichtemessung beziehungsweise Densitometrie von Westernblotbanden durchgeführt. Durch das Programm *ImageJ* wurde hierzu die prozentuale Bandendichte im Vergleich bestimmt und anschließend an die jeweilige Ladekontrolle angepasst.

3.5 Seahorse-Analyse

3.5.1 Funktionsweise und Messablauf

Um den metabolischen Zellphänotyp funktionell zu charakterisieren, wurden Echtzeitanalysen mit Hilfe des Gerätes *Seahorse XFp Analyzer* durchgeführt. Der *XFp Analyzer* basiert auf dem Prinzip der Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate (*extracellular acidification rate*, ECAR) und der Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR). Da die Ansäuerung mit der Glykolyserate und der Sauerstoffverbrauch mit der mitochondrialen Atmung korrelieren, wird somit der Zellmetabolismus durch wiederholte Messungen charakterisiert. Die Messungen finden dabei in einer transienten Mikrokammer statt, die zwischen einer einschichtigen Zellrasen und einem Feststoffsensoren erzeugt wird (vgl. Abbildung 3-3). Zwischen den Messungen wird der Sensor durch das Gerät angehoben und das Medium durchmischt.

Zur Charakterisierung der mitochondrialen Atmung wurde das *XF Cell Mito Stress Test Kit* eingesetzt und nach Herstellerangaben vorgegangen. Dieses Kit enthält Substanzen, die sequentiell über Injektionskanäle (vgl. Abbildung 3-3) hinzugegeben werden und die mitochondriale Atmung beeinflussen. Dadurch werden bestimmte Änderungen der OCR induziert, die eine Charakterisierung des oxidativen Metabolismus ermöglichen.

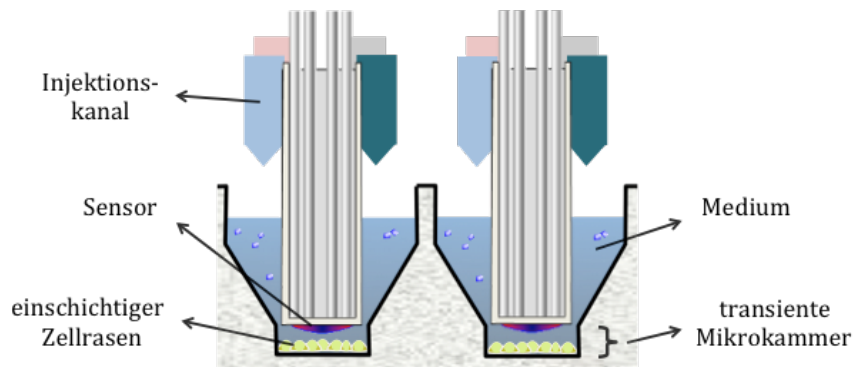


Abbildung 3-3 Seahorse-Analyse. Graphische Darstellung der transienten Mikroammer. Graphik modifiziert nach freundlicher Genehmigung durch Dr. W. Kammerloher, ehemals *Seahorse Bioscience*.

Zunächst wird die Basalrate der OCR bestimmt (vgl. Abbildung 3-4). Im nächsten Schritt wird Oligomycin injiziert, das die ATP-Synthase durch Bindung an den Protonenkanal (Fo-Untereinheit) inhibiert. Folglich stagniert die Protonenkonzentration im Intermembranraum des Mitochondriums. Die Atmungskette wird dadurch in ihrer Aktivität gehemmt und verbraucht weniger Sauerstoff. Daher sinkt die OCR auf ein Niveau, welches durch das natürliche Protonenleck durch die innere Mitochondrienmembran und die nicht-mitochondriale Atmung bestimmt wird. Im Anschluss wird Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) hinzugegeben. FCCP transportiert Protonen durch die innere Mitochondrienmembran und wirkt somit als chemischer Entkoppler der Atmungskette. In der Folge nimmt der Protonengradient stark ab. Dies induziert die maximale Aktivität der Atmungskette und steigert somit den Sauerstoffverbrauch. Die OCR steigt auf das Niveau der maximalen mitochondrialen Atmung an. Im letzten Schritt werden Rotenon und Antimycin A injiziert. Rotenon inhibiert Komplex I und Antimycin A Komplex III der Atmungskette. Da der sauerstoffverbrauchende Komplex IV von der Funktion dieser Enzyme abhängt, erliegt die mitochondriale Atmung der Zellen. Die resultierende niedrige OCR stellt die nicht-mitochondriale Zellatmung durch andere sauerstoffverbrauchende Enzyme wie Zytochrome dar. Die basale mitochondriale Atmung ergibt sich schließlich aus der Differenz der Basalrate der OCR und der nicht-mitochondrialen Atmung. Die

respiratorische Reservekapazität errechnet sich wiederum aus der Differenz der maximalen und der basalen Atmung.

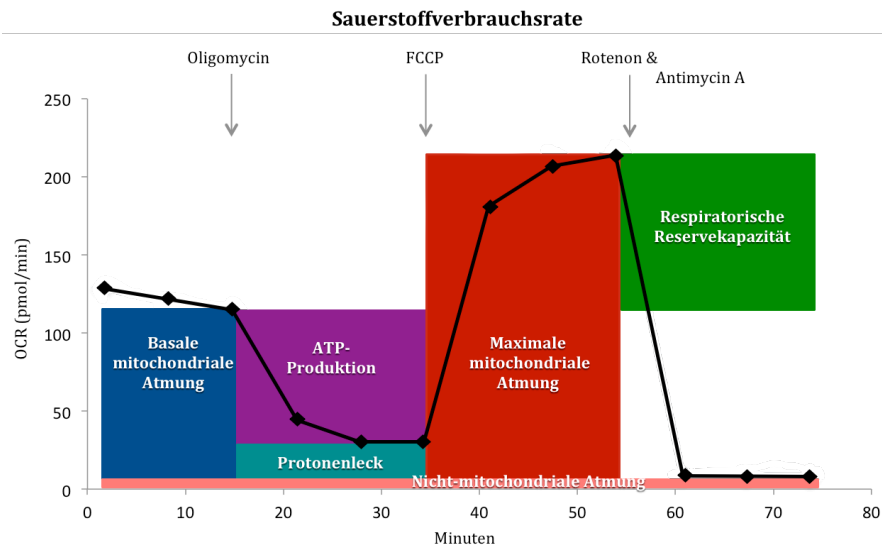


Abbildung 3-4 Seahorse-Analyse. Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im Mito Stress Test. Diagramm modifiziert nach freundlicher Genehmigung durch Dr. W. Kammerloher, ehemals *Seahorse Bioscience*.

3.5.2 Vorbereitung der Well-Platte und des Sensoraufsatzes

Damit die Zellen am Wellboden haften und einen einschichtigen Zellrasen bilden, wurde die 6-Well-Platte *XFp Miniplate* am Vorabend des Versuchs beschichtet. Hierzu wurden 50 µl Poly-D-Lysin in jedes Well pipettiert und die Platte danach vorsichtig gevortext. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden die Wells dekantiert und dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Wasser abgesaugt und die Platte über Nacht trocken in der Zellkulturbank aufbewahrt. Der Sensoraufsatz besteht aus einem Festkörpersensor und vier Injektionskanälen für unterschiedliche Substanzen. Um die Funktion des Sensors zu gewährleisten, wurde dieser mit 200 µl *XF Calibrant* am Vorabend des Versuches hydriert. Der Sensoraufsatz wurde anschließend in einem Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht aufbewahrt.

3.5.3 Vorbereitung der Proben

Für die Messung wurden die zuvor kokultivierten PDEZ aus der Kokultur-Platte in die *XFp Miniplate* übertragen. Dies wurde am Morgen der Messung durchgeführt, um den kokultivierten Phänotyp der Zellen zu bewahren. Pro Well wurde eine Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ bis $4 \cdot 10^4$ Zellen eingesetzt. Nach der Zählung der Zellen (siehe Kapitel 3.1.4), wurden diese dreimal mit *Mito-Medium* gewaschen und in 50 µl *Mito-Medium* je Well

pipettiert. Um die Bildung eines einschichtigen Zellrasens zu erleichtern, wurde im Anschluss die *XFp Miniplate* für drei Minuten à 300 x g zentrifugiert.

Schließlich wurde jedes Well mit 125 µl *Mito-Medium* aufgefüllt und die *XFp Miniplate* in einem Wärmeschrank bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

3.5.4 Beladung des Sensoraufsatzes und Beginn der Messung

Während der Inkubation der *XFp Miniplate* wurde der Sensoraufsatz mit den Substanzen des *XF Cell Mito Stress Test Kit* beladen (siehe Kapitel 3.5.1). Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Die jeweiligen Konzentrationen sind Tabelle 3-1 zu entnehmen.

Tabelle 3-1 Konzentrationen der Substanzen des *XF Cell Mito Stress Test Kit*.

Substanz	Konzentration (µM)	Injektionskanal
Oligomycin	1	A
FCCP	0,5	B
Rotenon/Antimycin A	0,5	C

Nach der Verdünnung wurden 25 µl jeder Substanz in den entsprechenden Injektionskanal des Sensoraufsatzes pipettiert. Im Anschluss wurde der Sensoraufsatz zur Kalibration in den *XFp Analyzer* eingefahren. Nach erfolgter Kalibration des Sensoraufsatzes wurde die *XFp Microplate* dem Inkubator entnommen, in das Gerät eingefahren und die Messung begonnen. Die Auswertung erfolgte mittels *Wave Desktop* und *Microsoft Excel*.

3.6 Seneszenz-assoziierte-β-Galaktosidase-Färbung

Die zelluläre Seneszenz ist ein Zustand eines Zellzyklusarrestes und aufgehobenen Zellwachstums. In (prä-)neoplastischen Zellen wird sie überwiegend als Schutzmechanismus vor weiterer Entartung und Proliferation aufgefasst (122). Die Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SABG) ist ein lysosomales Enzym, das ein Funktionsoptimum bei einem pH von 6 aufweist und von seneszenten Zellen vermehrt exprimiert wird (123). Zur Färbung der SABG wurde das *Senescence β-Galactosidase Staining Kit* verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Dieses Kit basiert auf der Umsetzung des Glykosids X-Gal durch die SABG bei pH 6, wobei sich die Reaktionsprodukte lokal als blaue Präzipitate ablagern. Zunächst wurde das Medium kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen abgesaugt und ein Waschschrift mit PBS durchgeführt.

Nachdem 1 ml formaldehydhaltige Fixierungslösung pro Well pipettiert wurde, erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei RT. Im Anschluss wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen, um überschüssige Fixierungslösung zu entfernen. Danach wurde die X-Gal-enthaltende β -Galaktosidase-Färbelösung auf einen pH von 6 eingestellt und davon 1 ml pro Well pipettiert. Um ein Austrocknen der Wells zu verhindern, wurde die 6-Well-Platte mit Parafilm überzogen und anschließend in einem Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Wells mit PBS gewaschen und die Reaktion abgestoppt. Die Lagerung erfolgte in PBS und bei 4 °C.

Zur Auswertung wurden mit Hilfe eines digitalen Lichtmikroskops, bei 280-facher Vergrößerung, fünf Fotoaufnahmen aus zufällig gewählten Bereichen eines Wells gemacht. Im Anschluss wurden diese Aufnahmen nebeneinander angereiht und eine Linie durch deren Mitte gezogen. Die sich auf der Linie befindenden Zellen wurden manuell ausgezählt. Als negativ wurden dabei ungefärbte, als positiv blau gefärbte Zellen gewertet. Hieraus wurde die Prozentzahl an SABG-positiven Zellen bestimmt.

3.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 12.5 genutzt. Die Normalverteilung von Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test verifiziert. Zur Ermittlung von Mittelwertsunterschieden wurde der gepaarte und ungepaarte zweiseitige t-Test eingesetzt. Sofern keine Normalverteilung vorlag wurde ein Mann-Whitney Rangsummentest durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen und ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant (= *) betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in Pankreasduktusepithelzellen

Den Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen in der Lebermikroumgebung und dem Verhalten disseminierter PDEZ beschrieben bereits frühere Arbeiten (124, 125). Mit M1-4HSC Zellen kokultivierte PDEZ wiesen darin eine geringere Wachstums- und höhere Seneszenzrate auf als nach Kokultivierung mit M-HT Zellen. M1-4HSC Zellen wurden dabei als ein Modell für eine physiologische und M-HT Zellen für eine entzündliche Lebermikroumgebung eingesetzt. Um der Frage nachzugehen, welche Rolle in diesem Zusammenhang metabolische Alterationen der PDEZ spielen, wurde ein Screening von Metabolismus-assoziierten Proteinen in PDEZ nach Mono- und Kokultur durchgeführt. Hierzu wurden benigne (H6c7eR-pBp), prämaligne (H6c7eR-Kr) oder maligne (PANC-1) PDEZ für 6 Tage je in An- oder Abwesenheit von M1-4HSC oder M-HT Zellen kultiviert (siehe Kapitel 3.1.4 und vgl. Abbildung 3-1). Anschließend erfolgte die Expressionsanalyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in den jeweiligen PDEZ mittels Westernblot-Verfahren (siehe Kapitel 3.4).

4.1.1 PDEZ zeigen keine Expressionsunterschiede der untersuchten Transportproteine in Abhängigkeit der Kokultur

Um intrazellulär Metabolite zu verstoffwechseln, müssen diese von der Zelle aufgenommen und abgegeben werden. Dies wird durch membranständige Transportproteine ermöglicht, deren Expression in Tumorzellen häufig alteriert ist (126, 127). Ob grundsätzlich Unterschiede in PDEZ bestehen und ob eine Alteration in Abhängigkeit der Lebermikroumgebung erfolgt, wurde an drei Transportproteinen untersucht (vgl. Abbildung 4-1). Der Glukosetransporter GLUT1 zeigte eine höhere Expression mit aufsteigender Malignität. H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen exprimierten GLUT1 am stärksten. Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Kokultur zeigten sich, bei allgemein schwieriger Darstellung des Proteins, nicht. Der Monokarboxylat Transporter 1 (MCT1), welcher unter physiologischen Stoffwechsellagen und in einigen Tumorzellen als Laktatimporter fungiert (126), wurde in H6c7eR-pBp Zellen stärker exprimiert als in maligneren PDEZ. Die Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Kokultur wiesen keine Regelmäßigkeit auf. Im Gegensatz zum MCT1 ist der Monokarboxylat Transporter 4 (MCT4) ein Laktatexporter und wird vorwiegend von glykolytischen Zellen exprimiert (126). Die Expression von MCT4 stieg tendenziell mit

der Malignität der PDEZ. Es zeigten sich keine konstanten Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Kokultur.

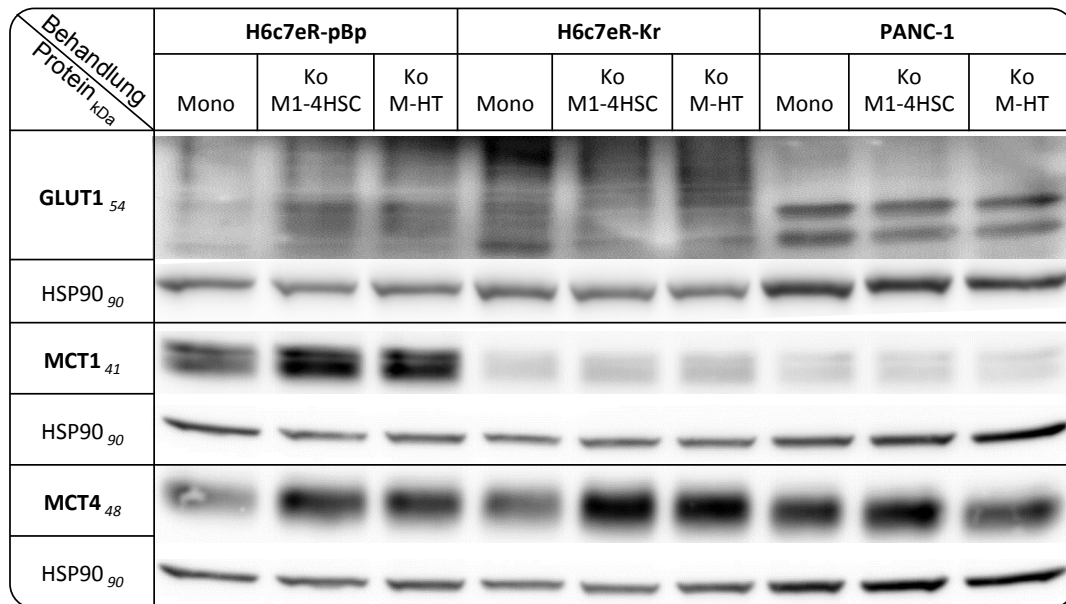


Abbildung 4-1 Westernblot-Analyse von Membrantransportproteinen in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen. Glukosetransporter 1 (GLUT1), Monokarboxylat Transporter 1 (MCT1), Monokarboxylat Transporter 4 (MCT4) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus mindestens drei Versuchen.

4.1.2 Prämaligne und maligne PDEZ exprimieren verstärkt LDHA nach M1-4HSC-Kokultur

Das über MCTs transportierte Laktat wird intrazellulär durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) interkonvertiert (siehe Kapitel 1.3.2 und vgl. Abbildung 1-3). Der Frage nachgehend, ob Zusammenhänge zwischen den Expressionsmustern dieser Proteine bestehen, wurde im Anschluss die Expression der LDH analysiert (vgl. Abbildung 4-2). Die tetramere LDH besteht aus den Untereinheiten LDHA, LDHB und LDHC. LDHA interkonvertiert bevorzugt Pyruvat zu Laktat und LDHB Laktat zu Pyruvat (128). Die LDHB wurde unter Monokultur am stärksten in den benignen H6c7eR-pBp Zellen exprimiert. Die Kokulturbedingungen nahmen keinen spezifischen Einfluß auf die Expression der LDHB. Ebenfalls wurde die LDHA mit steigender Malignität in PDEZ schwächer exprimiert. Jedoch wurde die LDHA unter M1-4HSC-Kokultur stärker exprimiert als unter M-HT-Kokultur. Dieser Effekt lag signifikant in H6c7eR-Kr ($p = 0,002$) und PANC-1 ($p = 0,005$) Zellen vor.

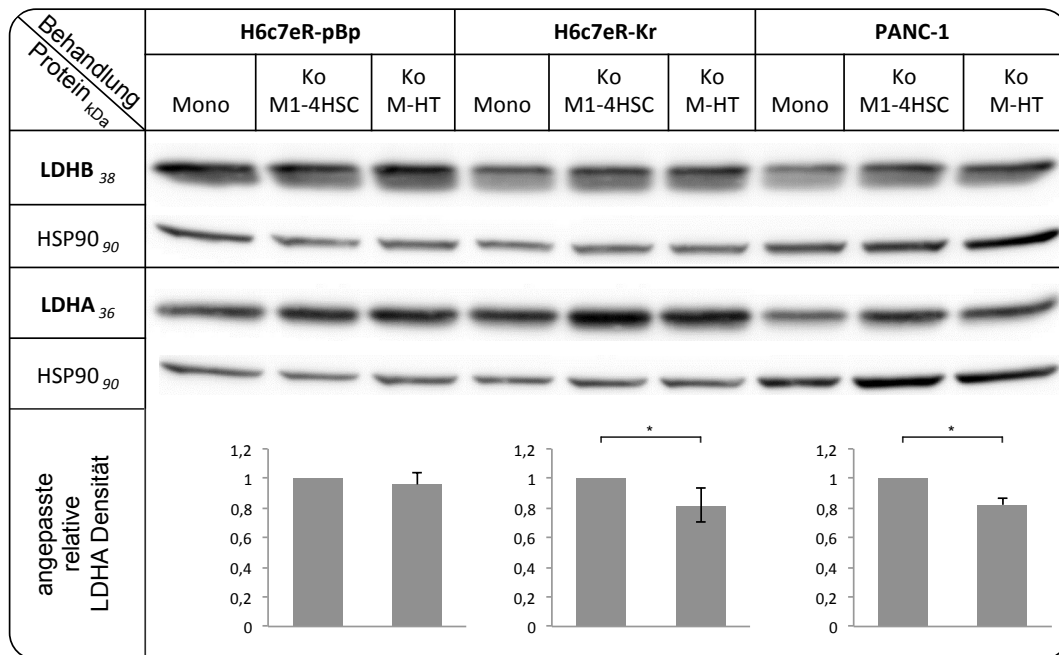


Abbildung 4-2 Westernblot-Analyse der Laktatdehydrogenase-Untereinheiten LDHB und LDHA in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen. Laktatdehydrogenase B (LDHB), Laktatdehydrogenase A (LDHA) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus mindestens vier Versuchen. Die Histogramme stellen Mittelwerte beziehungsweise den Median der Densität von LDHA der jeweiligen Behandlung dar. Hierfür wurden sechs Versuche zusammengefasst, auf M1-4HSC Kokultur normalisiert sowie die Densität dem jeweiligen HSP90 angepasst. Einfache Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Positive und negative Fehlerbalken stellen das dritte beziehungsweise erste Quartil um den Median dar. Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney Rangsummentest beziehungsweise ein zweiseitiger ungepaarter t-Test angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p-Wert < 0,05) angenommen.

4.1.3 G6PD wird unter M-HT-Kokultur stärker exprimiert als unter M1-4HSC-Kokultur

Der Pentosephosphatweg dient der Herstellung von Bausteinen für Biosynthesen und des Reduktionsäquivalentes NADPH. Die Enzyme des PPW werden in Tumorzellen häufig vermehrt exprimiert (129). Folglich wurden vier Enzyme des PPW hinsichtlich ihrer Expression untersucht (vgl. Abbildung 4-3). Die Transketolase (TKT) und Transaldolase (TALDO) sind Enzyme des reduktiven Teils des PPW. Während die TALDO keine Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Malignität aufwies, zeigte die TKT eine mit der Malignität abnehmende Expression in monokultivierten PDEZ. Weder die TKT noch die TALDO wies dabei gerichtete Expressionsunterschiede nach M1-4HSC- oder M-HT-Kokultur auf. Die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (PGD) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) gehören dem oxidativen Teil des PPW an. Die PGD zeigte keine gerichteten Expressionsunterschiede in den drei PDEZ-Zelllinien. Die G6PD wurde hingegen von malignen Zellen stärker exprimiert als von prämaligen

oder benignen. Ferner wurde die G6PD in allen Zelllinien nach M-HT Kokultur stärker exprimiert als nach M1-4HSC-Kokultur. In H6c7eR-Kr Zellen war dieser Unterschied signifikant ($p = 0,038$).

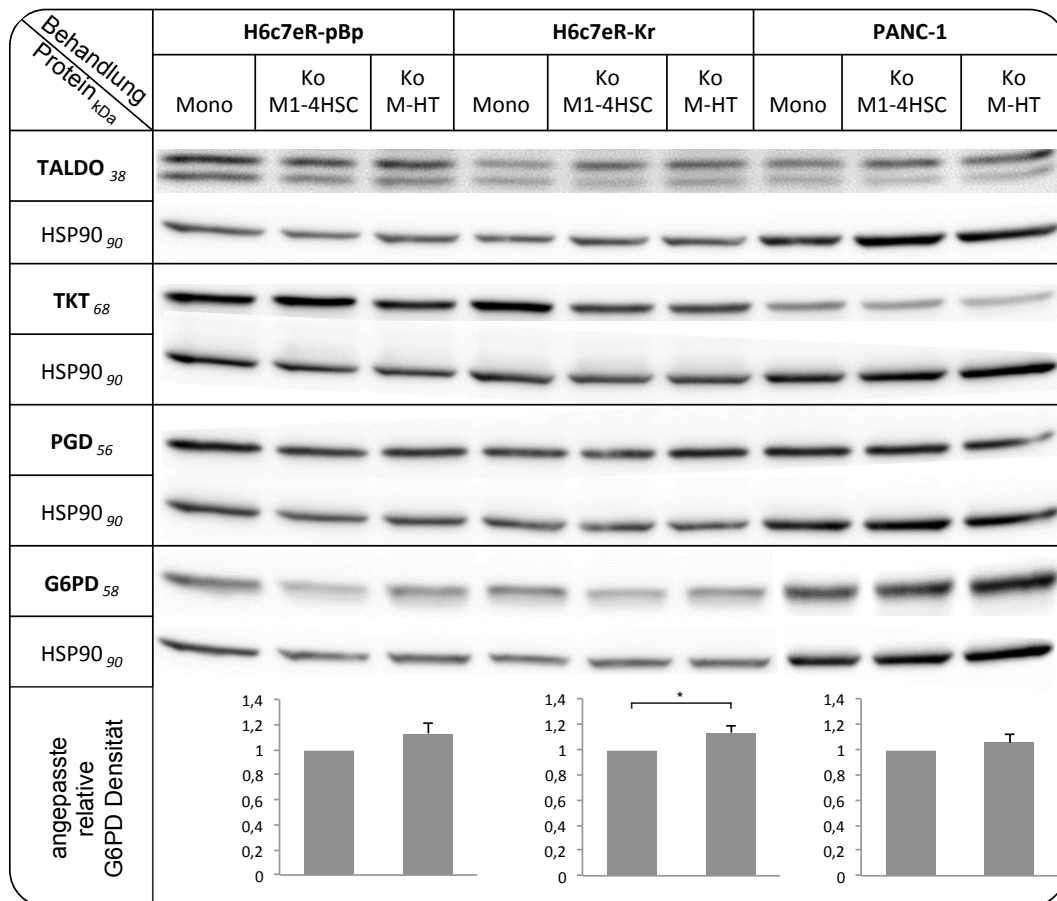


Abbildung 4-3 Westernblot-Analyse von Enzymen des Pentosephosphatweges in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen. Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (PGD) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus mindestens vier Versuchen. Die Histogramme stellen Mittelwerte der Densität von G6PD der jeweiligen Behandlung dar. Hierfür wurden sieben Versuche zusammengefasst, auf M1-4HSC Kokultur normalisiert sowie die Densität dem jeweiligen HSP90 angepasst. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p -Wert $< 0,05$) angenommen.

4.1.4 Prä-maligne und maligne PDEZ exprimieren verstärkt SDHB nach M1-4HSC-Kokultur

Die tetramere Succinatdehydrogenase (SDH) katalysiert sowohl eine Reaktion des Zitratzyklus als auch eine Reaktion der Atmungskette. Die Untereinheiten der SDH sind Tumorsuppressorgene, wobei besonders *loss of function*-Mutationen der SDHB zu hoch aggressiven Tumorentitäten beitragen (88). Die Westernblot-Analyse der mono- und

kokultivierten PDEZ zeigte hierbei eine Abnahme der Expression in Monokultur mit steigender Malignität (vgl. Abbildung 4-4). PANC-1 Zellen wiesen die geringste Expression auf. Darüber hinaus zeigte die SDHB in H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen eine deutlich stärkere Expression unter M1-4HSC-Kokultur als unter M-HT-Kokultur. In H6c7eR-Kr Zellen lag diesbezüglich ein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,01$).

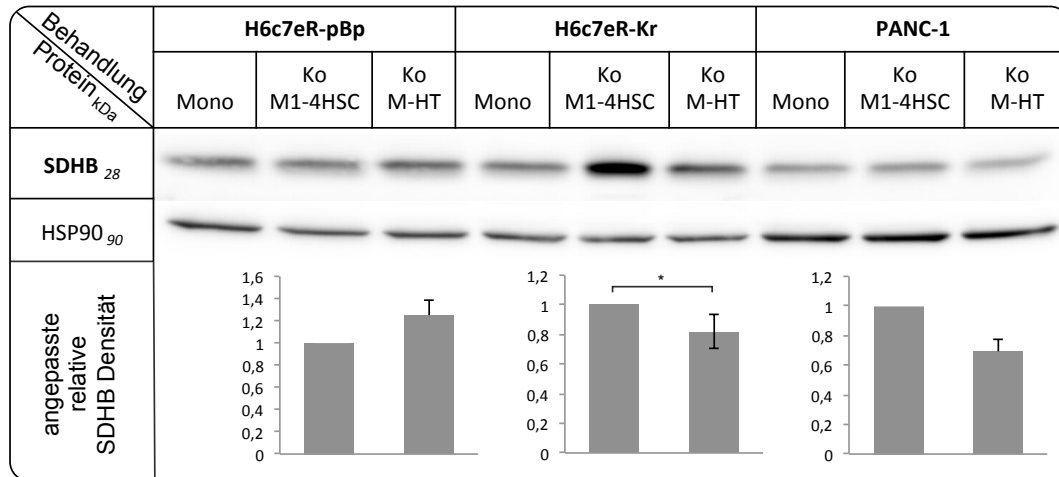


Abbildung 4-4 Analyse der Succinatdehydrogenase-Untereinheit SDHB in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen. Succinatdehydrogenase B (SDHB) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus sechs Versuchen. Die Histogramme stellen Mittelwerte oder den Median der Densität von SDHB der jeweiligen Behandlung dar. Hierfür wurden sechs Versuche zusammengefasst, auf M1-4HSC Kokultur normalisiert sowie die Densität dem jeweiligen HSP90 angepasst. Einfache Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Positive und negative Fehlerbalken stellen das dritte beziehungsweise erste Quartil um den Median dar. Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney Rangsummentest angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p -Wert $< 0,05$) angenommen.

In der Zusammenschau des Screenings Metabolismus-assoziiertes Proteine zeigte sich, dass sich benigne, prämaligne und maligne PDEZ deutlich in ihrer Proteinexpression unterscheiden. Während der Glukose-Importer GLUT1 und der Laktatexporter MCT4 vor allem in maligneren PDEZ exprimiert wurde, exprimierten benignere PDEZ stärker den Laktatimporter MCT1, die Laktat zu Pyruvat konvertierende Enzymuntereinheit LDHB und die Enzymuntereinheit des Zitratzyklus und der Atmungskette SDHB. Dies lässt auf einen vorwiegend glykolytischen Metabolismus in maligneren PDEZ und demgegenüber einen eher oxidativen Metabolismus in benigneren PDEZ schließen. Bezüglich des PPW zeigte sich tendenziell, dass Enzyme des oxidativen Teils wie G6PD vorwiegend von maligneren PDEZ exprimiert wurden, während benignere PDEZ verstärkt Enzyme des reduktiven Teils exprimierten.

Darüber hinaus ließen die Westernblot-Ergebnisse einen gerichteten Einfluss der M1-4HSC- beziehungsweise M-HT-Kokultivierung auf die Expression bestimmter Proteine erkennen. Dabei fiel insbesondere die reziproke Expressionsänderung der SDHB und G6PD auf: die SDHB wurde unter M1-4HSC- und die G6PD unter M-HT-Kokultur signifikant stärker exprimiert. Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dieser reziproken Expressionsänderung und den Änderungen im Verhalten der PDEZ nach Kokultur (siehe Kapitel 4.1) besteht, wurde eine siRNA-vermittelte Suppression der SDHB beziehungsweise G6PD in PDEZ durchgeführt.

4.2 siRNA-vermittelte Suppression der SDHB und G6PD in H6c7eR-Kr Zellen

4.2.1 Stabile Suppression von SDHB und G6PD über 96 Stunden

Da H6c7eR-Kr Zellen die stärksten Expressionsunterschiede der SDHB und G6PD unter den beiden Kokulturbedingungen aufwiesen, wurde diese Zelllinie für die weiteren Versuche ausgewählt. Eine siRNA-vermittelte Suppression der Genexpression hält dabei nur vorübergehend an. Daher wurde zunächst ermittelt, wie lang darüber eine Suppression der SDHB und G6PD erzielt werden kann. Dafür wurden H6c7eR-Kr Zellen mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen transfiziert und für 48 Stunden beziehungsweise 96 Stunden monokultiviert (siehe Kapitel 3.2). Anschließend wurde mittels Westernblot-Verfahren (siehe Kapitel 3.4) die Dauer und Intensität der Suppression der jeweiligen Behandlung ermittelt. Die siRNA-Transfektion supprimierte hierbei in allen eingesetzten Konzentrationen die Expression der SDHB und G6PD. Ein Effekt, der auch nach 96 Stunden Kultivierung zu verzeichnen war (vgl. Abbildung 4-5).



Abbildung 4-5 Analyse der G6PD und SDHB in H6c7eR-Kr Zellen nach siRNA-Transfektion. H6c7eR-Kr Zellen wurden mit unterschiedlichen Stoffmengen von SDHB-siRNA (siSDHB) bzw. G6PD-siRNA (siG6PD) oder Kontroll-siRNA (Ktrl) behandelt und für je 48 oder 96 Stunden monokultiviert. Succinatdehydrogenase B (SDHB), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert.

Für alle folgenden Suppressions-Versuche wurde daher eine 96-stündige Kokultivierung nach der jeweiligen siRNA-Transfektion von H6c7eR-Kr Zellen angeschlossen. Den Kokultur-bedingten Expressionsunterschieden entsprechend, wurden mit 20 pmol siSDHB transfizierte H6c7eR-Kr Zellen dabei mit M1-4HSC Zellen kokultiviert, wohingegen mit 10 pmol siG6PD transfizierte H6c7eR-Kr Zellen mit M-HT Zellen kokultiviert wurden.

4.2.2 H6c7eR-Kr Zellen weisen nach G6PD-Suppression und M-HT-Kokultur keine reproduzierbaren Expressionsunterschiede Metabolismus-assoziierter Proteine auf

Um den Einfluss der transienten Suppression der G6PD auf den Metabolismus von H6c7eR-Kr Zellen nach M-HT-Kokultur zu untersuchen, wurde eine Expressionsanalyse Metabolismus-assoziierter Proteine mittels Westernblot durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Hierfür wurden die Westernblot-Banden der Kontrollbehandlung mit den Banden der siRNA-vermittelten Suppression von G6PD in H6c7eR-Kr Zellen verglichen (vgl. Abbildung 4-6). Die Suppression der G6PD in H6c7eR-Kr Zellen wurde dabei auch nach 96-stündiger M-HT-Kokultur bestätigt. Weder die Enzyme PGD, TKT, noch die Enzymuntereinheiten LDHA, LDHB und SDHB wiesen gerichtete Expressionsunterschiede in H6c7eR-Kr Zellen auf.

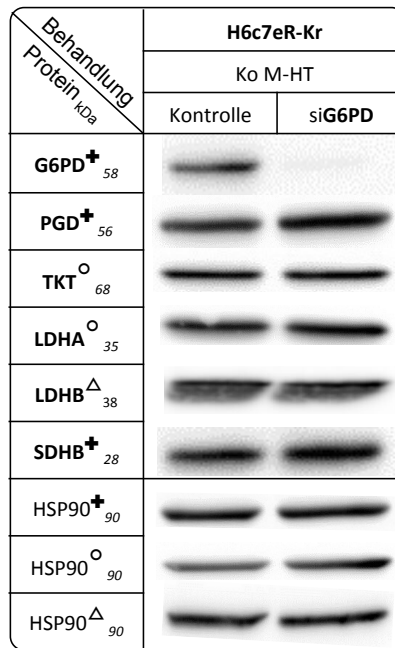


Abbildung 4-6 Westernblot-Analyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in H6c7eR-Kr Zellen nach G6PD-Suppression und 96-stündiger Kokultivierung mit M-HT Zellen. H6c7eR-Kr Zellen wurden mit 10 pmol Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder 10 pmol G6PD-siRNA (siG6PD) behandelt und 96 Stunden mit M-HT Zellen kokultiviert. Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (PGD), Transketolase (TKT), Laktatdehydrogenase A (LDHA), Laktatdehydrogenase B (LDHB), Succinatdehydrogenase B (SDHB), und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Das jeweilige Symbol kennzeichnet das zugehörige HSP90. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus mindestens vier Versuchen.

4.2.3 H6c7eR-Kr Zellen exprimieren nach SDHB-Suppression und M1-4HSC-Kokultur verstärkt Enzyme des Pentosephosphatweges

Um zu untersuchen, ob die Suppression der SDHB einen Einfluss auf den Metabolismus von H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur nimmt (siehe Kapitel 3.2), wurde analog zu Kapitel 4.2.2 vorgegangen. Dabei zeigte sich, dass die Suppression der SDHB in H6c7eR-Kr Zellen nach 96-stündiger Kokultur mit M1-4HSC Zellen stabil war (vgl. Abbildung 4-7). Die Enzymuntereinheit LDHA wies unter SDHB-Suppression eine tendenziell verringerte Expression auf, wohingegen LDHB keine Expressionsunterschiede in H6c7eR-Kr Zellen aufwies. Ebenso wies die PGD keine Expressionsunterschiede auf. Dahingegen zeigten die G6PD und TKT, Enzyme des PPW, eine tendenziell verstärkte Expression in SDHB-supprimierten H6c7eR-Kr Zellen bei gleichzeitiger Kokultur mit M1-4HSC Zellen.

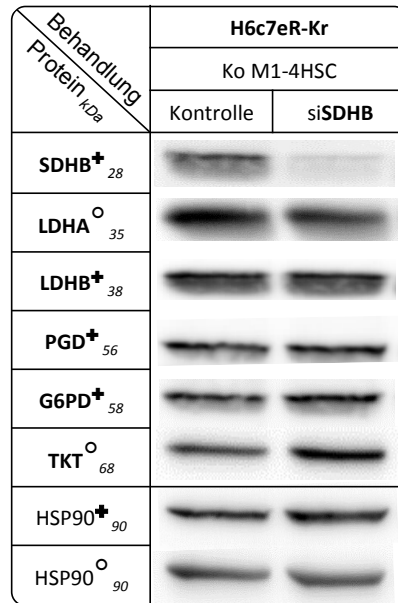


Abbildung 4-7 Westernblot-Analyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in H6c7eR-Kr Zellen nach SDHB-Suppression und 96-stündiger Kokultivierung mit M1-4HSC Zellen. H6c7eR-Kr Zellen wurden mit 20 pmol Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder 20 pmol SDHB-siRNA (siSDHB) behandelt und 96 Stunden mit M1-4HSC Zellen kokultiviert. Succinatdehydrogenase B (SDHB), Laktatdehydrogenase A (LDHA), Laktatdehydrogenase B (LDHB), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (PGD), Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transketolase (TKT), und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wurden in GZL mittels Westernblot detektiert. Das jeweilige Symbol kennzeichnet das zugehörige HSP90. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus mindestens vier Versuchen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Suppression der SDHB und ebenfalls der G6PD in H6c7eR-Kr Zellen trotz der jeweiligen Expressions-induzierenden Kokulturbedingung anhielt. Die SDHB-Suppression M1-4HSC-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen führte dabei zu stärkeren Expressionsunterschieden von Metabolismus-assoziierten Proteinen im Vergleich zur G6PD-Suppression nach M-HT-Kokultur. Insbesondere erhöhte die SDHB-Suppression bei gleichzeitiger M1-4HSC-Kokultur tendenziell die Expression der Enzyme des Pentosephosphatweges G6PD und TKT.

4.3 Funktionelle Echtzeitanalyse des Metabolismus von H6c7eR-Kr Zellen

Die Expressionsmuster Metabolismus-assoziiierter Proteine in H6c7eR-Kr Zellen wiesen auf einen veränderten glykolytischen beziehungsweise oxidativen Metabolismus in Abhängigkeit der Kokultur hin (siehe Kapitel 4.1). Um den metabolischen Phänotyp kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen auch funktionell zu charakterisieren, wurden Echtzeitanalysen mit Hilfe des *XFp Analyzers* durchgeführt. Zur genaueren Untersuchung des oxidativen Metabolismus wurde dabei das *XFp Cell Mito Stress Test Kit* eingesetzt. Durch die extrazelluläre Messung des Sauerstoffverbrauchs (OCR) und

der Ansäuerungsrate (ECAR) vitaler Zellen im Verlauf des Tests ermöglicht die *Seahorse-Analyse* die funktionelle Charakterisierung des zellulären Stoffwechsels (siehe Kapitel 3.5).

4.3.1 H6c7eR-Kr Zellen weisen unter M1-4HSC-Kokultur einen aktiveren oxidativen Metabolismus auf als unter M-HT-Kokultur

Um zunächst den Einfluss der jeweiligen Kokultur auf den Metabolismus von H6c7eR-Kr Zellen zu analysieren, wurden diese mit M1-4HSC beziehungsweise M-HT Zellen für sechs Tage kokultiviert (siehe Kapitel 3.1.4) und anschließend mittels *XFp Analyzer* untersucht (siehe Kapitel 3.5 und vgl. Abbildung 4-8). Hierbei zeigten H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur einen höheren basalen Sauerstoffverbrauch als unter M-HT-Kokultur. Die basale Atmung betrug 106,8 pmol/min in M1-4HSC kokultivierten H6c7eR-Kr Zellen im Vergleich zu 77,6 pmol/min in M-HT kokultivierten Zellen. Nach Injektion von Oligomycin sank der Sauerstoffverbrauch auf ein ähnliches Niveau in beiden Behandlungen ab. Dagegen steigerte FCCP den Sauerstoffverbrauch auf einen deutlich höheren Maximalwert mit 206,7 pmol/min nach M1-4HSC-Kokultur als nach M-HT-Kokultur mit 126,1 pmol/min. Folglich wiesen M1-4HSC kokultivierte H6c7eR-Kr Zellen im Vergleich zur M-HT-Kokultur eine doppelt so hohe respiratorische Reservekapazität auf. In der zusammengefassten, auf M1-4HSC-Kokultur normalisierten Auswertung (n=3) spiegelte sich dies in einer signifikant höheren basalen Atmung ($p = 0,00073$) und respiratorischen Reservekapazität ($p = 0,00024$) nach M1-4HSC-Kokultur von H6c7eR-Kr Zellen im Vergleich zur M-HT-Kokultur wider. Durch die Zugabe von Rotenon und Antimycin A fiel der Sauerstoffverbrauch wiederum auf ein ähnliches Niveau in Zellen beider Behandlungen ab (vgl. Abbildung 4-8, A und B). Die Ansäuerungsrate betreffend, wiesen M-HT kokultivierte H6c7eR-Kr Zellen höhere Werte auf als nach M1-4HSC-Kokultur (vgl. Abbildung 4-8, C). Der Mittelwert der basalen Ansäuerungsrate betrug dabei 77,3 mpH/min nach M-HT-Kokultur gegenüber 67 mpH/min nach M1-4HSC-Kokultur. Im Einklang dazu zeigten H6c7eR-Kr Zellen nach M-HT-Kokultur einen überwiegend glykolytischen Phänotyp, wohingegen diese nach M1-4HSC-Kokultur einen oxidativeren Phänotyp aufwiesen (vgl. Abbildung 4-8, D).

Zusammenfassend förderte die M1-4HSC-Kokultur im Vergleich zur M-HT-Kokultur einen oxidativeren Phänotyp in H6c7eR-Kr Zellen. Dies steht in Einklang mit der erhöhten Expression der SDHB in M1-4HSC-kokultivierten H6c7eR-Kr Zellen.

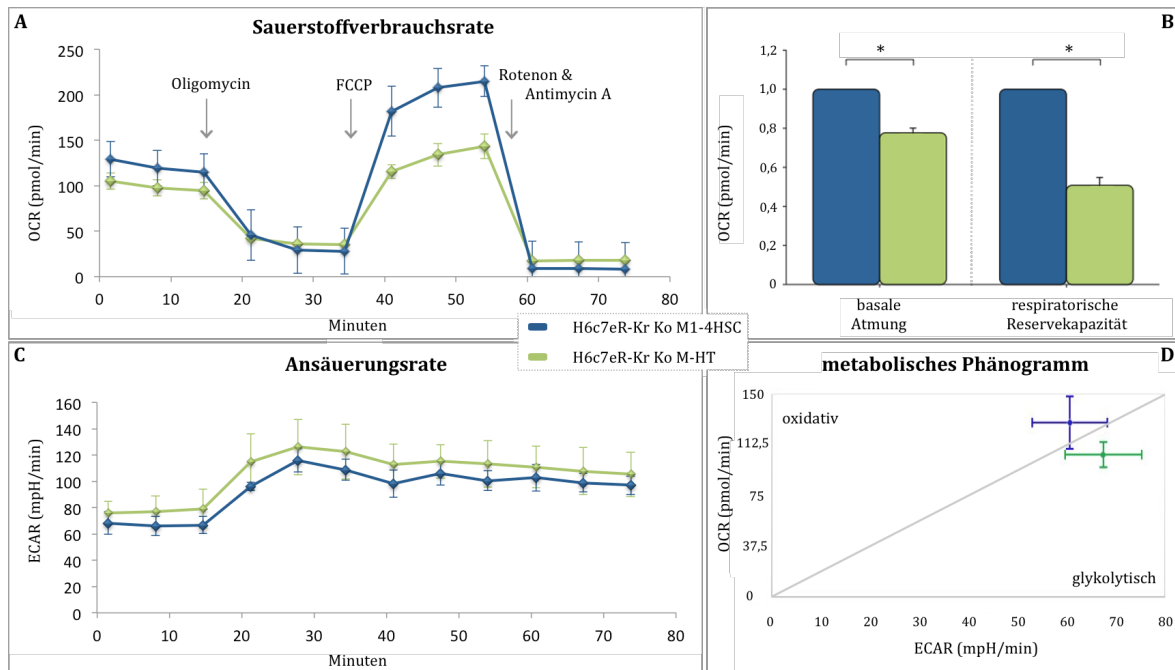


Abbildung 4-8 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an H6c7eR-Kr Zellen nach sechs Tagen Kokultur mit M1-4HSC bzw. M-HT Zellen mittels Seahorse-Analyse. Die Analyse wurde mittels *XFp Analyzer* und unter Verwendung des *XFp Mito Stress Test Kits* durchgeführt. Dargestellt sind (A) der Verlauf des extrazellulären Sauerstoffverbrauchs (OCR), (C) der Verlauf der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) und (D) das metabolische Phänogramm „OCR vs. ECAR“. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus drei Versuchen. (B) zeigt die zusammengefasst analysierten Mittelwerte der basalen Atmung und der respiratorischen Reservekapazität aus drei Versuchen nach Normalisierung auf M1-4HSC Kokultur. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p-Wert < 0,05) angenommen.

4.3.2 Die Suppression der SDHB hemmt den oxidativen Metabolismus M1-4HSC-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen

Um den Einfluss der SDHB-Suppression auf den Metabolismus M1-4HSC-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen eingehender zu überprüfen, wurde ebenfalls mit diesen Zellen eine *Seahorse-Analyse* durchgeführt (siehe Kapitel 3.5 und vgl. Abbildung 4-9). Die Aussaat, siRNA-Transfektion und Kokultivierung mit M1-4HSC Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Messung der basalen Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) ergab hierbei deutlich niedrigere Werte in SDHB-supprimierten Zellen im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die basale Atmung lag bei 62,5 pmol/min in der Suppressionspopulation gegenüber 102,9 pmol/min in der Kontrollpopulation. Oligomycin senkte im Anschluss den Sauerstoffverbrauch in Zellen beider Behandlungen in vergleichbarem Maß. Dahingegen führte die Injektion von FCCP zu einem deutlich niedrigeren Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in SDHB-supprimierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Suppression der SDHB verringerte folglich

die respiratorische Reservekapazität annähernd auf die Hälfte des Wertes der Kontrollbehandlung: 68,0 pmol/min in SDHB-supprimierten Zellen gegenüber 126,3 pmol/min in den Kontrollzellen. Nach der Zugabe von Rotenon und Antimycin A sank die Sauerstoffverbrauchsrate in beiden Behandlungen auf vergleichbare Werte ab (vgl. Abbildung 4-9, A und B).

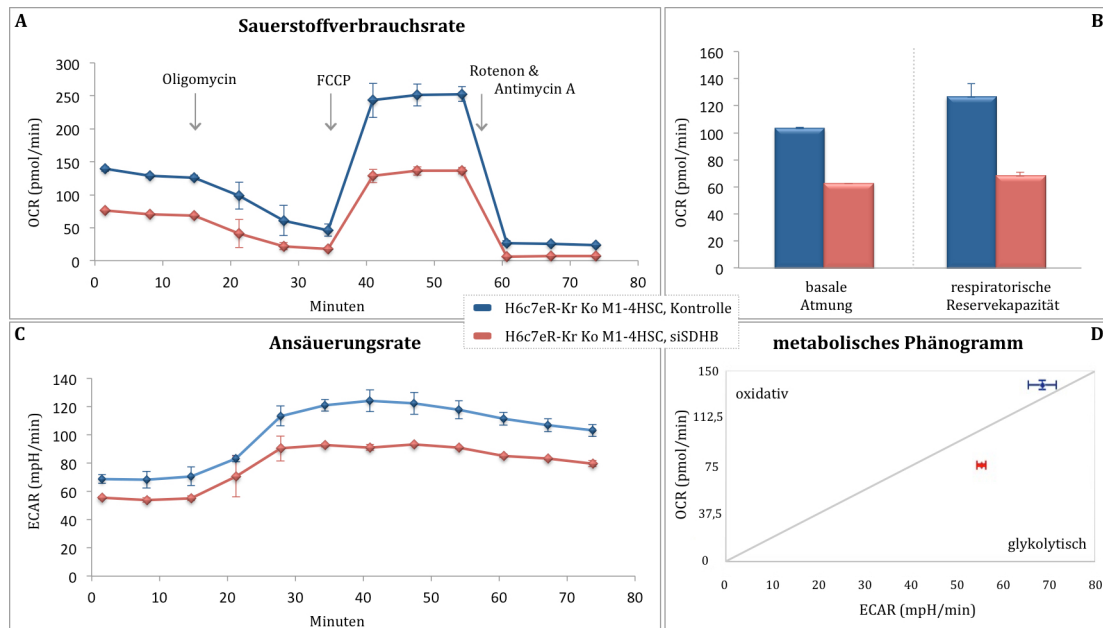


Abbildung 4-9 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an SDHB-supprimierten bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten H6c7eR-Kr Zellen nach 96 Stunden M1-4HSC-Kokultur mittels Seahorse-Analyse. Für die Transfektion wurden 20 pmol SDHB-siRNA bzw. 20 pmol Kontroll-siRNA eingesetzt, SDHB steht für Succinatdehydrogenase B. Die Analyse wurde mittels *XFp Analyzer* und unter Verwendung *XFp Mito Stress Test Kits* durchgeführt. Dargestellt sind (A) der Verlauf des extrazellulären Sauerstoffverbrauchs (OCR), (B) die Mittelwerte der basalen Atmung und respiratorischen Reservekapazität, (C) der Verlauf der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) und (D) das Phänogramm „OCR vs. ECAR“. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus zwei Versuchen.

Die extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) wies in H6c7eR-Kr Zellen nach Kontrollbehandlung höhere Werte auf als nach SDHB-Suppression. Der Mittelwert der basalen Ansäuerungsrate betrug hierbei 69,2 mpH/min in Kontrollzellen und 54,8 mpH/min in SDHB-supprimierten Zellen (vgl. Abbildung 4-9, C). In der Zusammenschau zeigt das Phänogramm, dass die SDHB-Suppression im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu einer insgesamt geringeren metabolischen Aktivität führt. Während die Kontrollpopulation im vermehrt oxidativen Bereich lag, wies die SDHB-supprimierte Population einen vermehrt glykolytischen Phänotyp auf. (vgl. Abbildung 4-9, D).

4.3.3 Die Suppression der G6PD nimmt keinen wesentlichen Einfluss auf den Metabolismus M-HT-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob auch die Suppression der G6PD den Metabolismus M-HT-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen beeinflusst, wurde ebenfalls die *Seahorse-Analyse* (siehe Kapitel 3.5 und vgl. Abbildung 4-10) eingesetzt. Die Aussaat, siRNA-Transfektion und Kokultivierung mit M-HT-Zellen erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Sauerstoffverbrauchsrate der H6c7eR-Kr Zellen verlief dabei annähernd deckungsgleich nach G6PD-Suppression, im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Dementsprechend wies die basale Atmung nur einen geringen Unterschied in Abhängigkeit der Behandlung auf: 65 pmol/min in G6PD-supprimierten Zellen und 69,8 pmol/min in Kontrollzellen. Auch die respiratorische Reservekapazität zeigte mit 35 pmol/min nach G6PD-Suppression und 35 pmol/min nach Kontrolltransfektion keinen Unterschied (vgl. Abbildung 4-10, A und B). Der Mittelwert der basalen extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) betrug in Zellen mit G6PD-Suppression 75,6 mpH/min und 63,9 mpH/min in den Kontrollzellen (vgl. Abbildung 4-10, C). Das metabolische Phänogramm zeigt dabei entsprechend die leicht höhere glykolytische Aktivität G6PD-supprimierter H6c7eR-Kr Zellen bei ähnlicher Aktivität des oxidativen Metabolismus (vgl. Abbildung 4-10, D).

Zusammenfassend und im Einklang mit der Westernblot-Analyse (siehe Kapitel 4.2.2) nahm die Suppression der G6PD in M-HT-kokultivierten H6c7eR-Kr Zellen keinen weiteren Einfluss auf deren Metabolismus. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Zusammenschau der Westernblot- und *Seahorse-Analyse*, dass die SDHB-Suppression den oxidativen Metabolismus in M1-4HSC-kokultivierten H6c7eR-Kr Zellen hemmt und gleichzeitig zu einem glykolytischen Phänotyp sowie zu einer vermehrten Expression von Enzymen des Pentosephosphatweges führt (siehe Kapitel 4.2.3).

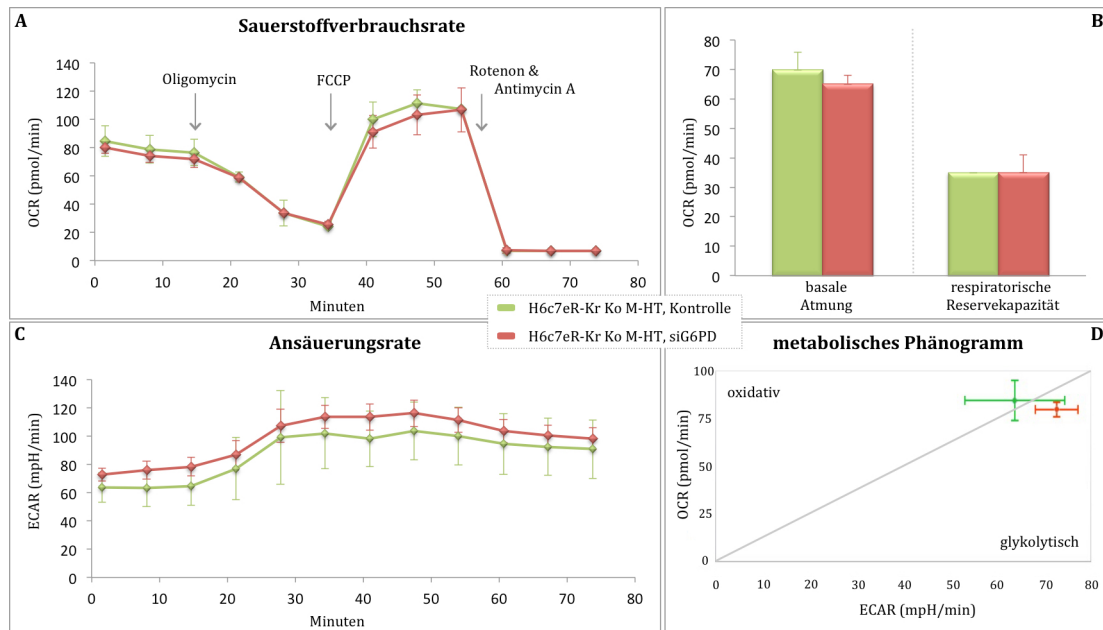


Abbildung 4-10 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an G6PD-supprimierten bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten H6c7eR-Kr Zellen nach 96 Stunden M-HT-Kokultur mittels Seahorse-Analyse. Für die Transfektion wurden 10 pmol G6PD-siRNA bzw. 10 pmol Kontroll-siRNA eingesetzt, G6PD steht für Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die Analyse wurde mittels *XFp Analyzer* und unter Verwendung des *XFp Mito Stress Test Kits* durchgeführt. Dargestellt sind (A) der Verlauf des extrazellulären Sauerstoffverbrauchs (OCR), (B) die Mittelwerte der basalen Atmung und respiratorischen Reservekapazität, (C) der Verlauf der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) und (D) das Phänogramm „OCR vs. ECAR“. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Gezeigt ist ein Ergebnis von einem repräsentativen Versuch aus zwei Versuchen.

4.4 Analyse des Zellwachstums und der Seneszenzrate SDHB- bzw. G6PD-supprimierter H6c7eR-Kr Zellen nach Kokultivierung

Wie bereits gezeigt werden konnte, weisen H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur im Vergleich zur M-HT-Kokultur ein verringertes Zellwachstum bei gleichzeitig erhöhter Anzahl ruhender, seneszenten Zellen auf (125). Daher wurde im Anschluss der Frage nachgegangen, ob die jeweilige Kokulturbedingung durch eine Erhöhung der SDHB-beziehungsweise G6PD-Expression neben dem Metabolismus zusätzlich das Wachstums- und Seneszenzverhalten von H6c7eR-Kr Zellen beeinflusst. Hierfür wurden H6c7eR-Kr Zellen mit der jeweiligen siRNA-Transfektion und Kokultivierung behandelt. Anschließend wurde ihre Zellzahl beziehungsweise der Anteil SABG-positiver Zellen mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen (siehe Kapitel 3.1.4 und Kapitel 3.7).

4.4.1 Die Suppression der SDHB erhöht das Zellwachstum von H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur

Bezüglich der Zellzahl nahm die G6PD-Suppression M-HT-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen keinen Einfluss (vgl. Abbildung 4-11, A). Der Mittelwert aus drei Versuchen mit Kontrollzellen betrug $20 \cdot 10^4$ und $18,9 \cdot 10^4$ in G6PD-supprimierten Zellen. Im Gegensatz dazu wiesen SDHB-supprimierte und M1-4HSC-kokultivierte H6c7eR-Kr Zellen eine signifikante Zunahme ($p = 0,041$) der Zellzahl auf (vgl. Abbildung 4-11, A). Dabei lag der Mittelwert aus drei Versuchen der M1-4HSC-kokultivierten Kontrollbehandlung bei $10,3 \cdot 10^4$ Zellen (vgl. Abbildung 4-11, B), wohingegen die SDHB-Suppression M1-4HSC-kokultivierter H6c7eR-Kr Zellen die Zellzahl auf $19 \cdot 10^4$ Zellen erhöhte (vgl. Abbildung 4-11, C).

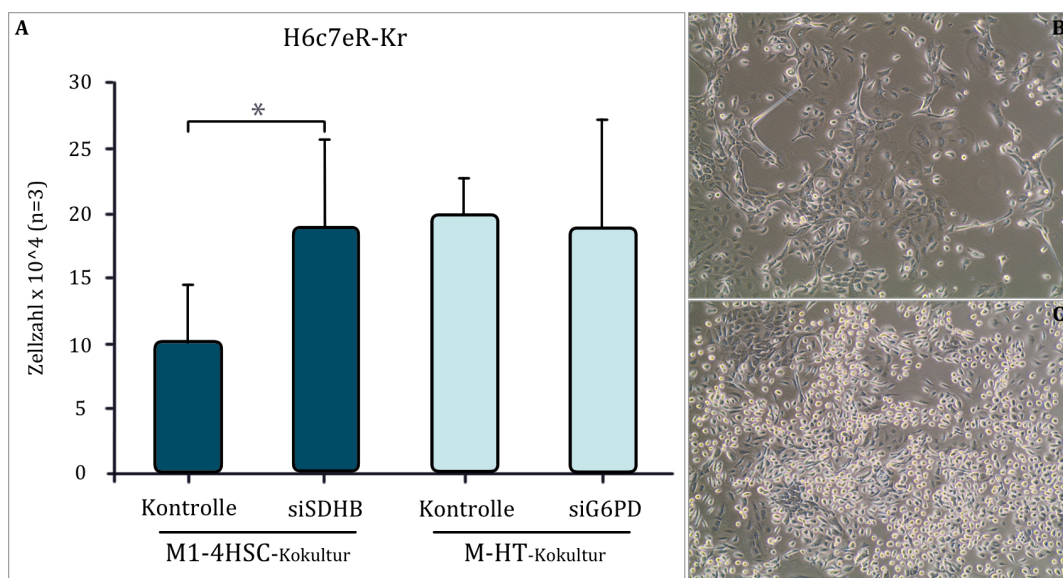


Abbildung 4-11 Auswertung der Zellzahlbestimmung von SDHB- bzw. G6PD-supprimierten H6c7eR-Kr Zellen nach 96-stündiger M1-4HSC- bzw. M-HT-Kokultur. H6c7eR-Kr Zellen wurden mit 20 pmol bzw. 10 pmol Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder 20 pmol SDHB- bzw. 10 pmol G6PD-siRNA (siSDHB, siG6PD) behandelt und 96 Stunden mit M1-4HSC bzw. M-HT Zellen kokultiviert. SDHB steht für Succinatdehydrogenase B und G6PD für Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. Das Histogramm (A) zeigt den Mittelwert der Zellzahl + Standardabweichung nach der jeweiligen Behandlung ($n = 3$). Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p -Wert $< 0,05$) angenommen. Gezeigt sind repräsentative Fotoaufnahmen (280x) unmittelbar vor der Zellzählung einer Kontrollbehandlung (B) und einer SDHB-Suppression (C) in H6c7eR-Kr Zellen nach M1-4HSC-Kokultur.

4.4.2 Die Suppression der SDHB verringert den Anteil SABG-positiver H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur

Bezüglich des Anteils SABG-positiver Zellen wiesen G6PD-supprimierte H6c7eR-Kr Zellen unter M-HT-Kokultur einen moderaten Anstieg auf (vgl. Abbildung 4-12, A). Aus drei Versuchen waren dabei nach Kontrollbehandlung 25,9 % und nach G6PD-Suppression 42,6 % der Zellen SABG positiv. Nach der SDHB-Suppression in H6c7eR-Kr Zellen unter M1-4HSC-Kokultur kam es hingegen zu einer signifikanten Abnahme ($p = 0,028$) SABG-positiver Zellen (vgl. Abbildung 4-12, A). Aus drei Versuchen waren nach der Kontrollbehandlung 62,9 % der Zellen SABG-positiv, wohingegen nach SDHB-Suppression nur noch 41 % positive Zellen detektiert werden konnten. Morphologisch zeigten darüber hinaus Kontrollzellen flächig ausgebreitete Zellsomata (vgl. Abbildung 4-12, B), die mit dem Zustand der zellulären Seneszenz assoziiert werden (130). Demgegenüber wiesen SDHB-supprimierte H6c7eR-Kr Zellen tendenziell kleinere und kompaktere Zellsomata auf (vgl. Abbildung 4-12, C).

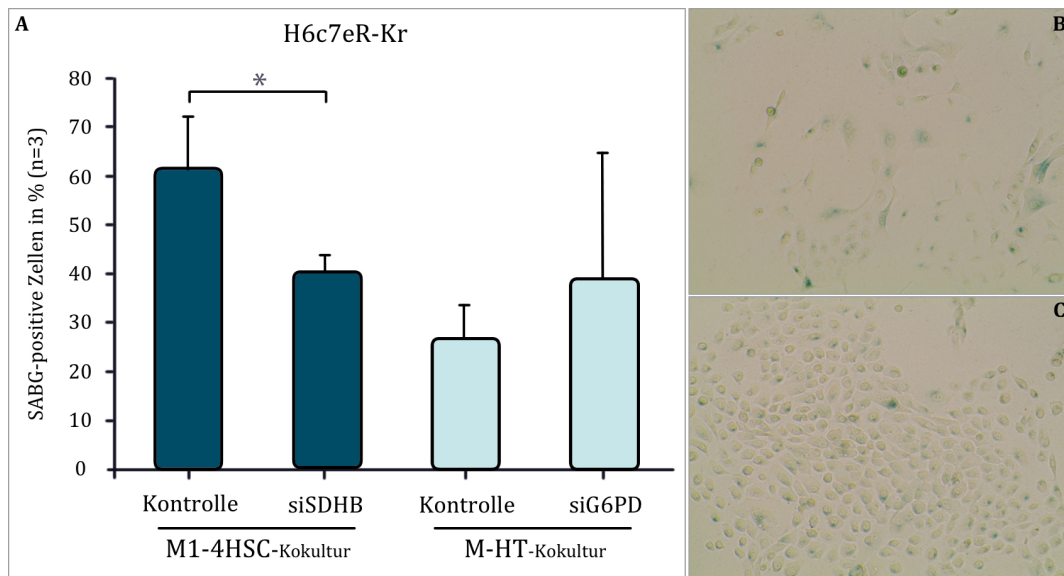


Abbildung 4-12 Auswertung der SABG-Färbung von SDHB- bzw. G6PD-supprimierten H6c7eR-Kr Zellen nach 96-stündiger M1-4HSC- bzw. M-HT-Kokultur. H6c7eR-Kr Zellen wurden mit 20 pmol bzw. 10 pmol Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder 20 pmol SDHB- bzw. 10 pmol G6PD-siRNA (siSDHB, siG6PD) behandelt und 96 Stunden mit M1-4HSC bzw. M-HT Zellen kokultiviert. SDHB steht für Succinatdehydrogenase B und G6PD für Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. Das Histogramm (A) zeigt den Mittelwert der Prozentzahl der SABG-positiven Zellen + Standardabweichung nach der jeweiligen Behandlung ($n = 3$). Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test angewandt und ein Signifikanzniveau von 5 % (p -Wert $< 0,05$) angenommen. Repräsentative Fotoaufnahmen (280x) der SABG-Färbung einer Kontrollbehandlung (B) und einer SDHB-Suppression (C) in H6c7eR-Kr Zellen nach M1-4HSC-Kokultur.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Lebermikroumgebung in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes distinkte Veränderungen im Metabolismus von PDEZ hervorruft. Sowohl die Expressionsanalyse Metabolismus-assoziiierter Proteine als auch die funktionelle *Seahorse-Analyse* zeigten, dass M-HT Zellen einen glykolytischen Phänotyp und dahingegen M1-4HSC Zellen einen oxidativen Phänotyp in H6c7eR-Kr Zellen fördern. Insbesondere die durch M1-4HSC-Kokultur in PDEZ verstärkt exprimierte SDHB wies dabei einen Zusammenhang zum veränderten Wachstums- und Seneszenzverhalten von PDEZ nach Kokultur auf: die Suppression der SDHB in H6c7eR-Kr Zellen verstärkte, trotz gleichzeitiger Kokultivierung mit M1-4HSC Zellen, das Zellwachstum und verringerte den Anteil SABG-positiver Zellen. Dies steht im Einklang mit einer metabolischen Anpassung durch eine vermehrte Expression von Enzymen des PPW in SDHB-supprimierten und M1-4HSC kokultivierten H6c7eR-Kr Zellen.

5 Diskussion

Das verbesserte Verständnis der Pathogenese im Primarius des PDAC konnte bisher nicht in ein wesentlich verbessertes Überleben der Erkrankten übersetzt werden (siehe Kapitel 1.1). Dieses liegt weiterhin bei 4,6 Monaten im Median ab Diagnosestellung (1). Der Therapieerfolg wird durch das dabei regelhaft fortgeschrittene Tumorstadium limitiert, welches häufig durch Fernmetastasen charakterisiert ist (52). Die Leber ist der Hauptmetastasierungsort des PDAC (43). Lebermetastasen sind ein negativer Prognosefaktor und zusätzlich mit einem schlechteren Überleben assoziiert als extrahepatische Metastasen (131-133). Im Kontrast zu ihrer Bedeutung sind die Mechanismen der Lebermetastasierung des PDAC nur ansatzweise verstanden. Ihr Verständnis ist jedoch die Voraussetzung zur Entwicklung neuer Diagnose- und Therapiekonzepte, die der frühzeitigen und prognosebestimmenden Lebermetastasierung des PDAC Rechnung tragen.

Entzündliche Prozesse der Leber können hierbei die Metastasierung begünstigen. Beispielsweise fördern entzündlich aktivierte hepatische Sternzellen als hepatische Myofibroblasten das Wachstum disseminierter PDEZ und werden mit dem Auswachsen zu Makrometastasen assoziiert (124, 125, 134). Dies entspricht der tumorfördernden Entzündung als Tumorkennzeichen (92). Obwohl der veränderte Stoffwechsel neoplastischer Zellen ebenfalls die Rolle eines Tumorkennzeichens einnimmt,

ist die Bedeutung metabolischer Anpassungen in PDEZ im Rahmen der Lebermetastasierung unklar (92). Gänzlich unklar ist, ob und wie eine physiologische beziehungsweise entzündliche Lebermikroumgebung Einfluss auf den Metabolismus in disseminierten PDEZ nimmt und auf diesem Weg das Auswachsen zu einer Metastase beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst der Stoffwechsel von PDEZ unterschiedlicher Entartungsstufen grundsätzlich charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss einer physiologischen mit dem Einfluss einer entzündlichen Lebermikroumgebung auf den Stoffwechsel von PDEZ verglichen und schließlich auf hierdurch vermittelte Verhaltensänderungen überprüft.

5.1 Der Stoffwechsel benigner PDEZ ist von oxidativer Phosphorylierung und maligner PDEZ von Glykolyse sowie dem oxidativen Pentosephosphatweg geprägt, während prä-maligne PDEZ einen Mischtyp aufweisen

Der Zustand des Zellstoffwechsels ist eng verbunden mit zellulären Funktionen wie Wachstum oder Ruhephasen. Während der Stoffwechsel ausdifferenzierter Zellen von aktiver oxidativer Phosphorylierung geprägt ist, weisen sich schnell teilende Zellen eine erhöhte Glykolyserate auf (80). Um zu prüfen, ob ähnliche Unterschiede im Stoffwechsel von PDEZ unterschiedlicher Entartungsstufen bestehen, wurde die Expression stoffwechselassoziierter Proteine nach Monokultur mittels Westernblotverfahren untersucht.

Maligne PDEZ zeigten im Vergleich mit benignen PDEZ eine starke Expression des Laktatexporters MCT4 sowie des Schlüsselenzyms des oxidativen PPW G6PD (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.3). Diese Expressionsmuster werden dabei durch andere Arbeiten bestätigt. Zwei Studien zeigten ebenfalls eine hohe Expression des MCT4 in PANC-1 Zellen mittels Westernblotverfahren (135, 136). Baek *et al.* wiesen zusätzlich sowohl eine hohe Expression des MCT4 in PANC-1 Zellen als auch im epithelialen Tumorgewebe nach. Die hohe Expression des MCT4 stellte sich als negativer Prognosefaktor dar. Darüberhinaus etablierte diese Studie durch kombinierte Expressionssuppression und *Seahorse-Analyse* (siehe Kapitel 3.5) MCT4 als Glykolysemarker in PDEZ (137). Dies steht in Einklang mit einer stärkeren Expression von Enzymen der Glykolyse in PANC-1 Zellen im Vergleich zu benignen PDEZ, die mittels Massenspektrometrie-basierter Proteomanalyse dargestellt wurde (94). Zusätzlich beschreibt diese Studie dabei die erhöhte Expression des Schlüsselenzyms des oxidativen PPW G6PD in PANC-1 Zellen

(94). Dies passt zur tendenziell erhöhten Aktivität der G6PD, die in humanem PDAC-Gewebe nachgewiesen wurde (138). Die Expression der G6PD ist dabei in mehreren Tumorentitäten erhöht und im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sowie im Magenkarzinom ein negativer Prognosefaktor (139, 140). Darüberhinaus scheint die Expression der G6PD im Mammakarzinom mit einer erhöhten Metastasierungsrate assoziiert zu sein (141).

Im Gegensatz zur hohen Proteinexpression in den Wegen der Glykolyse und des oxidativen PPW zeigten maligne im Vergleich zu benignen PDEZ eine schwächere Expression der Enzymuntereinheit SDHB. Als einziges Enzym ist die SDH sowohl an der oxidativen Phosphorylierung als auch am Zitratzyklus beteiligt (77). Während Keimbahnmutationen der SDHB eng mit familiären Tumoren verbunden sind und ebenfalls einige sporadische Tumorentitäten eine verringerte SDHB-Expression aufweisen, erweist sich die Datenlage im PDAC zunächst als scheinbar uneinheitlich (142-144). Eine ältere Studie beschreibt eine hohe SDH-Expression in durch Nitrosamin induzierten PDAC. Diese Studie weist jedoch mehrere Schwächen auf, die ihre Aussagekraft in Frage stellen. Erstens entspricht die Tumorinduktion durch das karzinogene Nitrosamin nicht der üblichen Pathogenese des PDAC (siehe Kapitel 1.1.2). Zweitens weisen die Autoren daraufhin, dass die Tumoren weder von lokaler Entzündung begleitet wurden noch Fernmetastasen ausbildeten, obwohl beides ein Kennzeichen des PDAC ist (siehe Kapitel 1.1.2 und 1.1.3). Im Gegensatz zum sporadischen humanen PDAC handelte es sich drittens überwiegend um gut differenzierte Karzinome (siehe Kapitel 1.1.2). Tatsächlich scheint die Expression der SDHB vom Differenzierungsgrad abzuhängen. Im kolorektalen Karzinom wurde gezeigt, dass gut differenzierte Tumoren eine hohe Expression aufwiesen, während entdifferenzierte Tumoren, wie sie für das PDAC charakteristisch sind, eine niedrige Expression zeigten (144). Miettinen *et al.* zeigten ferner immunhistochemisch an humanen PDAC-Präparaten, dass ein kompletter Expressionsverlust der SDHB nicht nachzuweisen ist (145). Diese Studie stellte dabei eine vorhandene Expression einem kompletten Expressionsverlust gegenüber, wie er beispielsweise in homozygoten Keimbahnmutationen denkbar ist (142). Im Falle einiger sporadischer Karzinome erscheint die SDHB-Expression jedoch lediglich herabgesetzt und nicht gänzlich zu fehlen. So zeigte sich sowohl am Ovarkarzinom als auch am kolorektalen Karzinom eine verringerte SDHB-Expression im Vergleich zum Normalgewebe (143, 144). Im Einklang

mit diesen und den eigenen Befunden beschreiben Zhou *et al.* eine herabgesetzte Expression der SDHB in PANC-1 Zellen im Vergleich zu benignen PDEZ mittels Massenspektrometrie-basierter Proteomanalyse (94). Schließlich bestätigt sich die herabgesetzte SDHB-Expression in PANC-1 Zellen im Westernblotverfahren durch eine weitere Studie (146).

Zusammengenommen ergeben die eigenen Befunde gemeinsam mit Daten anderer Arbeitsgruppen das Bild zweier distinkter metabolischer Phänotypen in benignen beziehungsweise malignen PDEZ. Während benigne PDEZ eine aktive oxidative Phosphorylierung aufweisen, zeichnen maligne PDEZ das Bild einer dem Warbureffekt entsprechenden erhöhten Glykolyse sowie eines aktiven oxidativen PPW. Diese metabolischen Phänotypen benigner und maligner PDEZ stehen daher in Einklang mit dem eingangs formulierten typischen Metabolismus ausdifferenzierter beziehungsweise hochproliferativer Zellen (80).

Neben der vergleichenden Untersuchung zwischen benignen und malignen PDEZ rücken prä-maligne Vorstufen in den Fokus der Erforschung von Metastasierungsmechanismen des PDAC. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass PDEZ bereits frühzeitig vor der vollständigen Entartung den Zellverband verlassen, in das Gefäßsystem einbrechen und die Leber besiedeln können (115). Dies repräsentiert das Modell der parallelen Progression, das eine frühzeitige Metastasierung während der Karzinogenese postuliert (siehe Kapitel 1.1.3 und vgl. Abbildung 1-2) (37). Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde der Metabolismus auch in prä-malignen PDEZ untersucht. Die eingesetzte Zelllinie weist eine aktivierende Mutation des Onkogens KRAS und einen Wildtyp des Tumorsuppressorgens TP53 mit allerdings relativ geringer Expression auf (116, 147). Im Mausmodell initiiert diese Zelllinie nach subkutaner Injektion in der Hälfte der Fälle Tumoren (116). Die Westernblotanalyse ergab im Vergleich zu benignen PDEZ eine gesteigerte MCT4-Expression (siehe Kapitel 4.1.1). Dem gegenüber stand eine ebenfalls geringe G6PD-Expression bei weiterhin robuster Expression der SDHB (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.1.4). Damit in Einklang steht die Arbeit von Ying *et al.*, die auf einem KRAS-induzierbaren Mausmodell des PDAC beruht. Nach KRAS-Aktivierung wiesen PDEZ eine gesteigerte Glykolyserate mit erhöhtem Laktatefflux bei unverändertem oxidativen PPW auf. Zusätzlich zeigte sich kein KRAS-abhängiger Einfluss auf Intermediate des Zitratzyklus (85). Die Unterschiede im Stoffwechsel zu malignen PDEZ könnten sich dabei durch den Mutationsstatus des TP53 erklären lassen. Ein Wildtyp TP53 fördert

den Fluss von Pyruvat über Acetyl-CoA in den Zitratzyklus bei gleichzeitiger Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung (148, 149). Darüberhinaus inaktiviert der Wildtyp von TP53 direkt die G6PD (87). Beides lässt sich im metabolischen Phänotyp prämaligener PDEZ erkennen. Während sie eine KRAS-vermittelt erhöhte Glykolyserate aufweisen, hemmt TP53 den oxidativen PPW und hält den Zitratzyklus sowie die oxidative Phosphorylierung aufrecht. Damit nehmen prämaligene PDEZ einen Mischtyp zwischen den metabolischen Phänotypen benigner und maligner PDEZ ein.

5.2 Der Entzündungszustand der Lebermikroumgebung entscheidet in prämaligen PDEZ über die Einnahme des metabolischen Phänotyps benigner oder maligner Zellen

Der Metabolismus von Tumoren wurde durch den Einfluss Otto Warburgs klassischerweise an monokultivierten neoplastischen Zellen untersucht (97). Auch wenn dies durch die einfache und reine Analyse des Stoffwechsels neoplastischer Zellen geeignet erscheint und eine orientierende Charakterisierung zulässt, blendet dieses Vorgehen die Interaktionen neoplastischer Zellen mit ihrer Mikroumgebung aus. Tatsächlich bestehen hierbei vielfältige Wechselwirkungen mit Einfluss auf den Metabolismus neoplastischer Zellen.

Der reverse Warbureffekt beschreibt beispielsweise eine metabolische Kooperation von tumorassoziierten Fibroblasten (TAF) und neoplastischen Zellen (107). Neoplastische Zellen sollen in TAF über oxidativen Stress eine gesteigerte Glykolyse provozieren, die zum vermehrten Export von Laktat führt. Dieses soll von neoplastischen Zellen wiederum aufgenommen und zur ATP-Produktion über den Zitratzyklus in die oxidative Phosphorylierung eingebracht werden (150). Dies stünde im Gegensatz zum in neoplastischen Zellen ursprünglich postulierten Warbureffekt mit einer aktiven aeroben Glykolyse bei beeinträchtigter mitochondrialer Atmung (siehe Kapitel 1.3.3). Unter anderem wurde dieser Effekt im Mamma- und Prostatakarzinom beschrieben. Im Mammakarzinom ist er mit einem schlechteren Überleben und im Prostatakarzinom mit einem höheren Tumorstadium assoziiert (151, 152). Im Falle des PDAC beschreibt eine Studie mittels Immunhistochemie unterschiedliche metabolische Subtypen in Gewebepräparaten, darunter den reversen Warbureffekt. Dieser wird jedoch als seltenster metabolischer Subtyp beschrieben und ist mit einer besseren Prognose assoziiert als der deutlich häufigere klassische Warburgsubtyp (153). Zudem untersuchte die Studie Operationspräparate des PDAC. Hierdurch werden

fortgeschrittene Tumorstadien ausgeblendet (siehe Kapitel 1.1.5), obwohl diese die Mehrzahl der Fälle darstellen (52). Somit bleibt die Bedeutung des reversen Warbureffektes im PDAC weiterhin unklar.

Bei gänzlich fehlenden Studien zum Einfluss der Lebermikroumgebung auf den Metabolismus disseminierter PDEZ konnten zwei jüngere Arbeiten jedoch den Einfluss der Tumormikroumgebung auf neoplastische PDEZ im Primarius näher beschreiben. Wu *et al.* haben dazu tumorassoziierte pankreatische Sternzellen humanen PDAC-Operationspräparaten entnommen und *in vitro* kultiviert. Die Kultur in ihren Mediumüberständen verstärkte im Anschluss die Transkription der G6PD in TP53-mutierten PDEZ. Dies weist auf eine Aktivierung des oxidativen PPW hin (154). Eine weitere Studie beschreibt Exosomen, die TAF des PDAC entstammen und den Metabolismus von PDEZ beeinflussen. Durch *Seahorse-Analysen* wurde gezeigt, dass neoplastische PDEZ im Beisein dieser Exosomen eine verringerte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung aufweisen (siehe Kapitel 3.5). Wie an neoplastischen Prostatazellen näher beschrieben, spiegelte sich dies in einer verringerten Expression aller Gene der oxidativen Phosphorylierung wieder, einschließlich der SDHB. Möglicherweise wird dieser Effekt dabei durch miRNA vermittelt, die in den Exosomen enthalten ist (109).

Diese beiden Studien stehen in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Um den Einfluss des Entzündungsstatus der Lebermikroumgebung auf den Metabolismus von PDEZ im Rahmen der Lebermetastasierung zu untersuchen, wurden diese mit HSC beziehungsweise ihrer entzündlich aktivierten Form als HMF kokultiviert (siehe Kapitel 3.1.4). HSC repräsentierten dabei eine physiologische Lebermikroumgebung, während HMF eine entzündliche Lebermikroumgebung simulierten. Anschließend wurde mittels Westernblotanalyse die Expression Metabolismus-assoziiierter Proteine untersucht. Im Vergleich beider Kokulturbedingungen zeigte sich im Beisein von HMF eine gesteigerte G6PD-Expression bei verminderter SDHB-Expression. Demgegenüber stand im Beisein von HSC eine schwächere G6PD-Expression bei prominenter SDHB-Expression (siehe Kapitel 4.1.3 und 4.1.4). In Abhängigkeit der Kokulturbedingung waren G6PD und SDHB die am stabilsten unterschiedlich exprimierten Proteine. Dabei war der Expressionsunterschied in prämaligen PDEZ am deutlichsten und statistisch signifikant. In Einklang mit diesen Befunden zeigten prämalige PDEZ nach Kokultur mit HMF im Gegensatz zur HSC-

Kokultur in der funktionellen *Seahorse-Analyse* eine geringere Aktivität und Reservekapazität des mitochondrialen oxidativen Metabolismus. Dies spricht für eine herabgesetzte oxidative Phosphorylierung (siehe Kapitel 4.3.1).

Zusammengenommen scheint eine entzündliche Lebermikroumgebung im Gegensatz zur physiologischen Lebermikroumgebung in prämaligen PDEZ den oxidativen PPW zu fördern, während sie die oxidative Phosphorylierung mit herabgesetzter SDHB-Expression hemmt. Somit nähern sich prämalige PDEZ in einer entzündlichen Lebermikroumgebung dem Stoffwechsel maligner PDEZ an, während sie in einer physiologischen Lebermikroumgebung dem Stoffwechsel benigner PDEZ ähneln (siehe Kapitel 5.1).

5.3 Der Entzündungszustand der Leber determiniert den Stoffwechsel in prämaligen PDEZ und dadurch Seneszenz sowie Zellwachstum

Eine entzündliche Lebermikroumgebung in Form von HMF senkt die Seneszenzrate und fördert das Zellwachstum disseminierter PDEZ (120, 124, 125). Um zu untersuchen, ob der Entzündungszustand der Lebermikroumgebung diese Verhaltensunterschiede durch das Hervorrufen der beobachteten metabolischen Phänotypen provoziert, wurden siRNA-vermittelte Suppressionsversuche der G6PD beziehungsweise SDHB in PDEZ bei gleichzeitiger entsprechender Kokultur durchgeführt. Hierfür wurden prämalige PDEZ ausgewählt. Zum einen, da sie die stärksten Expressionsunterschiede der G6PD und SDHB in Abhängigkeit der Kokultur aufwiesen. Zum anderen, da ihnen eine zunehmende Bedeutung in der Lebermetastasierung des PDAC zukommt, seitdem Rhim *et al.* im Mausmodell die frühzeitige Disseminierung prämaliger PDEZ bereits aus Vorläuferläsionen nachweisen konnten (115).

Die Suppression der G6PD bei gleichzeitiger HMF-Kokultur ergab keinen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten prämaliger PDEZ. Hierbei stellten sich weder Folgeänderungen im Metabolismus noch ein Einfluss auf das Zellwachstum dar (siehe Kapitel 4.2.2, 4.3.3 und 4.4.1). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu Arbeiten, die die Rolle der G6PD in neoplastischen Zellen untersucht haben. Zahlreiche Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich des PDAC beschrieben eine Abnahme des Zellwachstums beziehungsweise des Tumorwachstums an G6PD-supprimierten neoplastischen Zellen (154-157). Lediglich die beobachtete statistisch nicht signifikante Zunahme der Seneszenzrate nach G6PD-Suppression steht in Einklang mit dieser

allgemeinen Datenlage (siehe Kapitel 4.4.2). Die Ursache der Diskrepanz zur Studienlage ist unklar. Es können jedoch Einflussfaktoren vermutet werden. Kulturbedingt könnte zunächst ein Effekt zeitabhängig sein und nur vor oder erst nach den untersuchten fünf Tagen in Kultur auftreten. Darüber hinaus untersuchten die zitierten Studien den Einfluss der G6PD-Suppression in neoplastischen Zellen unter Monokultivierung oder nach subkutaner Injektion. Im Kontext einer Lebermetastase könnte die fortlaufende Kokultivierung mit HMF jedoch das Zellwachstum in PDEZ über einen einflussreicheren Weg aufrechterhalten.

Tatsächlich zeigte die Suppression der SDHB in prämaligen PDEZ bei gleichzeitiger ursprünglich expressionsverstärkender HSC-Kokultur einen tiefgreifenden Einfluss auf ihren Metabolismus und ihr Wachstumsverhalten. Übereinstimmend mit der Enzymfunktion ergab eine *Seahorse-Analyse* nach Suppression der SDHB eine deutlich verringerte mitochondriale Atmung und somit oxidative Phosphorylierung bei gleichzeitiger Einnahme eines tendenziell glykolytischen Phänotyps (siehe Kapitel 4.3.2). Zusätzlich wiesen SDHB-supprimierte prämalige PDEZ eine verstärkte Expression der Enzyme des PPW G6PD und TKT auf (siehe Kapitel 4.2.3). Der PPW ist ein wichtiger Stoffwechselweg in proliferierenden Zellen, indem er Zellbausteine beispielsweise zur Nukleotidsynthese bereitstellt (siehe Kapitel 1.3.2). Damit in Einklang zeigte die SDHB-Suppression trotz gleichzeitiger Kokultur mit HSC eine signifikante Zunahme der Zellzahl prämaligener PDEZ. Bemerkenswerterweise erreichte dabei das Zellwachstum nach SDHB-Suppression und HSC-Kokultur das gleiche gesteigerte Niveau wie nach einfacher Kokultur mit HMF (siehe Kapitel 4.4.1). Dazu passend verringerte sich der Anteil seneszenten prämaligener PDEZ nach SDHB-Suppression signifikant (siehe Kapitel 4.4.2).

Dieser Einfluss des Expressionsniveaus der SDHB auf das Zellverhalten deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien. Aspuria *et al.* wiesen in SDHB-supprimierten Zellen des Ovarkarzinoms ebenfalls die Abnahme der mitochondrialen Atmung nach. Ferner erhöhte sich unter SDHB-Suppression die Konzentration von Metaboliten innerhalb des PPW, was in Einklang mit der erhöhten G6PD- und TKT-Expression steht (158). Dieser Einfluss auf den Metabolismus bestätigte sich zusätzlich in SDHB-defizienten Zellen des Nierenzellkarzinoms (159). Während eine Studie an Zellen des Zervixkarzinoms eine Abnahme des Zellwachstums beobachtet, beweisen zahlreiche Studien ebenfalls eine

statistisch signifikante Zunahme des Zellwachstums nach SDHB-Suppression (160). Dies wurde unter anderem an Zellen des Osteosarkoms, Ovarkarzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms beschrieben (144, 158, 161, 162). Zusätzlich wurde das Expressionsverhalten der SDHB *in vivo* in einem Tiermodell der hepatischen Karzinogenese untersucht. Interessanterweise zeigte sich eine herabgesetzte SDHB-Expression besonders in hochproliferativen präneoplastischen Vorläuferläsionen, die in diesem Modell mit hoher Wahrscheinlichkeit in hepatozelluläre Karzinome münden. Die geringe SDHB-Expression hielt dabei auch im Karzinomstadium an (163). Insgesamt betrachtet scheint die herabgesetzte SDHB-Expression in der Mehrzahl der Tumorentitäten zu einem verstärkten Zellwachstum zu führen und ein Prozess zu sein, der offenbar bereits in prämaligen Vorläuferläsionen beginnt.

Zum Einfluss der SDHB-Expression beziehungsweise der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung auf den Zustand der Seneszenz neoplastischer Zellen bestehen zunächst unterschiedliche Beobachtungen. Beispielsweise zeigte eine Studie eine gesteigerte Seneszenzrate nach Hemmung der oxidativen Phosphorylierung (164). Dabei beschränkt der methodische Ansatz dieser Arbeit möglicherweise ihre Deutungsweite. Der Komplex III der Atmungskette wurde hierin chemisch mittels Antimycin A gehemmt, ohne dafür im Vorfeld einen direkten Zusammenhang zur eigentlichen pathobiochemischen Regulation der Seneszenz in neoplastischen Zellen herzustellen. In der Tat betonen mehrere Studien die Abhängigkeit der Seneszenz von einer aktiven oxidativen Phosphorylierung beziehungsweise mitochondrialen Atmung. So beschrieb eine Studie die Hochregulation von Enzymen der oxidativen Phosphorylierung und eine weitere Studie wies eine funktionell gesteigerte mitochondriale Atmung in seneszenten Zellen nach (165, 166). Insbesondere zeigten Kaplon *et al.*, dass der Zustand der Seneszenz in neoplastischen Zellen maßgeblich von dem Fluss von Pyruvat in den Zitratzyklus mit anschließender mitochondrialer Atmung abhängt (167). Im Kontext neoplastischer Zellen scheint der Zustand der Seneszenz somit eng mit einer aktiven oxidativen Phosphorylierung verbunden zu sein, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Viale *et al.* verknüpften ebenfalls die aktive oxidative Phosphorylierung eng mit einem ruhenden Zustand tumorinitiierender PDEZ (168). In einem PDAC-Mausmodell mit pharmakologisch vermittelter KRAS-Induktion beobachteten sie, dass nach Beendigung dieses Signals eine scheinbar vollständige Rückbildung der PDAC erfolgte. Allerdings traten nach einer Latenzzeit

ohne externe Signalinduktion erneut PDAC auf. In der Folge charakterisierten sie ruhende PDEZ, die nach einer temporären Tumorinduktion persistierten und nach einer Latenzzeit erneut PDAC initiierten. Diese tumorinitiierenden PDEZ zeichneten sich durch eine starke Abhängigkeit von der oxidativen Phosphorylierung aus, die bei ihrer Hemmung zum Zelltod führte. Dies lag möglicherweise an der fehlenden KRAS-Mutation in dieser Form von tumorinitiierenden PDEZ, die ihre glykolytische Kapazität und somit die metabolische Flexibilität steigern kann (85). Ein Einblick in das letztendlich aktivierende Signal zur erneuten Tumorbildung durch die tumorinitiierenden PDEZ bleibt in dieser Studie jedoch verschlossen. Übertragen auf den Kontext einer frühzeitigen Leberbesiedlung durch prämaligne PDEZ und in Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnet sich daher die folgende Hypothese (vgl. Abbildung 5-1). In die Leber disseminierte PDEZ werden von einer physiologischen Lebermikroumgebung durch Expressionssteigerung sowie Aktivierung der SDHB und der oxidativen Phosphorylierung in einem ruhenden Zustand gehalten. Demgegenüber kann dieser innerhalb einer entzündlichen Lebermikroumgebung durch die Hemmung der SDHB und der oxidativen Phosphorylierung aufgehoben und in ein aktives Zellwachstum überführt werden. Durch diese Alterationen im Metabolismus könnten entzündliche Prozesse der Lebermikroumgebung ein entscheidender Trigger sein, der schließlich das Auswachsen von prämaligen disseminierten PDEZ zu Mikrometastasen begünstigt.

5.4 Limitationen

Das zur Untersuchung des Einflusses der Lebermikroumgebung auf PDEZ eingesetzte Modell weist neben expliziten Vorteilen ebenfalls Limitationen auf. Der Einfluss der Lebermikroumgebung wurde dabei *in vitro* an drei immortalisierten PDEZ Zelllinien analysiert. Die Zelllinien repräsentierten benigne, prämaligne oder maligne disseminierte PDEZ, wobei lediglich eine Zelllinie je Entartungsstufe eingesetzt wurde. Da sich unterschiedliche Zelllinien der gleichen Entartungsstufe jedoch in ihrem Verhalten unterscheiden können, sind die Befunde bei diesem Vorgehen nur eingeschränkt generalisierbar (117). PDEZ wurden dabei entweder allein oder in einem indirekten Transwellsystem mit HSC oder HMF kokultiviert. HSC repräsentierten in diesem Modell eine physiologische Lebermikroumgebung, während ihre entzündlich aktivierte Form als HMF eine entzündliche Lebermikroumgebung repräsentierten (siehe Kapitel 3.1.4).

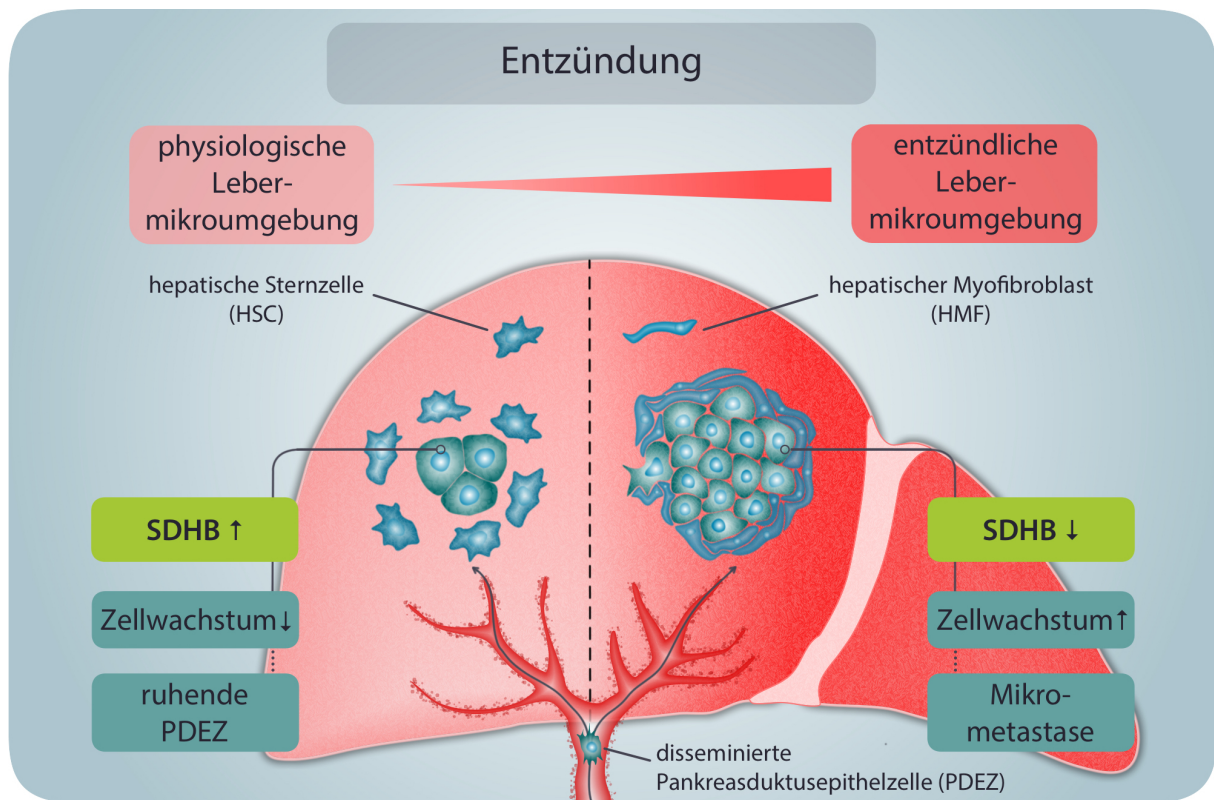


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der Metastasierungsmechanismen des PDAC in Abhängigkeit des Entzündungszustandes der Leber. Durch Alterationen des Expressionsniveaus der SDHB in pankreatischen duktalem Epithelzellen (PDEZ) nimmt der Entzündungszustand der Leber Einfluss auf ihr Wachstum. Hierdurch könnte eine physiologische Lebermikroumgebung einen ruhenden Zustand disseminierter PDEZ fördern, während eine entzündliche Lebermikroumgebung ihr Auswachsen zu einer Mikrometastase fördern könnte. Hepatische Sternzellen (HSC) repräsentieren eine physiologische, hepatische Myofibroblasten (HMF) eine entzündliche Lebermikroumgebung. Abbildung modifiziert nach (169).

Die Lebermikroumgebung kann hiermit jedoch nicht ganzheitlich modelliert werden und die Vereinfachung mindert die Repräsentativität im Vergleich zur Situation *in vivo*. Beispielsweise fehlen weitere Zellpopulationen, direkter Zellkontakt zwischen den Zelltypen, Teile der Extrazellulärmatrix, authentische Strömungsverhältnisse oder eine gemäß der Gefäßnähe heterogene Verteilung des Sauerstoffpartialdruckes. Zusätzlich wurde nur ein bestimmtes Zeitfenster der Kultur untersucht. Dies limitiert die Detektion zeitabhängiger Interaktionen. Schließlich ist das Modell mit murinen hepatischen Stromazellen und humanen PDEZ nicht rein human. Auch wenn in Folgeuntersuchungen die erhobenen Befunde im rein humanen System teilweise bereits validiert wurden (mündliche Kommunikation Prof. Sebens), führt dieses Vorgehen potentiell zu Einschränkungen im Interaktionsspektrum. Dennoch verfügt das Modell über systembedingte Vorteile. Das indirekte Transwellsystem ermöglicht die einfache, saubere und reproduzierbare Analyse einzelner Kompartimente nach Kokultur

beispielsweise durch Proteinanalyse oder Zellzählung. Ferner kann die Zellkommunikation nur durch lösliche Faktoren übermittelt werden. Diese können potentiell detektiert und im Anschluss ihre Bedeutung in der Zellkommunikation weiter gezielt untersucht werden. Das murin-humane System erlaubt zusätzlich die Bestimmung des Signalursprungs durch den Einsatz speziesspezifischer Antikörper. Durch den Tausch des Transwells nach Kokultur kann darüber hinaus überprüft werden, ob die jeweilige Kokulturbedingung einen reversiblen oder irreversiblen Einfluss ausübt. So kann beispielsweise das Ende eines Entzündungszustandes durch den Tausch von HMF mit HSC bei im Well verbleibenden PDEZ simuliert werden. Schließlich simuliert das Modell die Situation *in vivo* mit der Einflussnahme der Lebermikroumgebung auf PDEZ bereits besser, als es klassischerweise in der Metabolismusuntersuchung monokultivierter Tumorzellen der Fall ist. Darüber hinaus eignet sich eine höhere Komplexität mit mehreren Zellpopulationen oder Tierversuchen erst, sobald grundlegende Kenntnisse zur Fragestellung zur Verfügung stehen. Zusammengefasst eignet sich das Modell daher, trotz seiner bestehenden Limitationen, sowohl zur grundlegenden Charakterisierung des Stoffwechsels von PDEZ als auch zur Untersuchung des Einflusses der Lebermikroumgebung auf den Metabolismus disseminierter PDEZ und dadurch vermittelter Verhaltensänderungen.

Die angewandten analytischen Methoden zur Beurteilung des zellulären Metabolismus sind ebenfalls von Limitationen betroffen. Die Expressionsanalyse metabolismusassoziierter Proteine mittels Westernblotverfahren ist einer begrenzten Aussagekraft hinsichtlich des Zellstoffwechsels unterworfen. Zwar kann durch das strukturell vermehrt oder verminderte Vorliegen metabolismusassoziierter Proteine die Aktivität von Stoffwechselwegen grundsätzlich abgeschätzt werden, ob dies jedoch auch funktionell zu einem erhöhten und gerichteten Fluss von Intermediaten durch den jeweiligen Weg führt, ist dadurch nicht abschließend zu klären (170). Daher wurde der Stoffwechsel in PDEZ zusätzlich funktionell und in Echtzeit mittels *Seahorse-Analyse* beurteilt. Dies ermöglichte die Übersetzung einer alterierten Proteinexpression in einen tatsächlich funktionell alterierten Stoffwechsel im Falle der SDHB-Expression beziehungsweise oxidativen Phosphorylierung. Das im Rahmen der *Seahorse-Analyse* eingesetzte Untersuchungsverfahren konzentriert sich allerdings auf den mitochondrialen oxidativen Metabolismus (siehe Kapitel 3.5). Auch wenn die in Abhängigkeit der Lebermikroumgebung stabilsten Expressionsunterschiede diesen

mitochondrialen oxidativen Metabolismus betreffen, wurde die Glykolysekapazität durch dieses Verfahren nicht detailliert bestimmt. Darüber hinaus erlaubt keines der Verfahren der *Seahorse-Analyse* eine gezielte funktionelle Untersuchung des oxidativen PPW, obwohl dies aufgrund der Expressionsunterschiede der G6PD wünschenswert gewesen wäre. Zusätzlich ist mit zwei Wiederholungen die Zahl der *Seahorse-Experimente* im Falle der Enzym-Suppression zu gering für eine endgültige Aussage. Ein exakter Nachweis von Intermediärmetaboliten würde darüber hinaus die strukturelle und funktionelle Analyse des Stoffwechsels ergänzen und sollte ein Ziel folgender Untersuchungen sein. Schließlich wurde aufgrund der beobachteten Expressionsunterschiede der Einfluss des Expressionsniveaus der SDHB und G6PD auf das Wachstums- und Seneszenzverhalten von PDEZ überprüft. Zum einen wurde hierfür die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dies erlaubt zwar die Beurteilung des Zellwachstums insgesamt, lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen wie Apoptose oder Proliferation zu. Zum anderen wurde die Seneszenzrate mittels Färbung der SABG bestimmt (siehe Kapitel 3.6). Die Aktivität der SABG scheint dabei in prämaligen PDEZ der verlässlichste Indikator der Seneszenz zu sein (171). Dennoch wird vorgeschlagen die Seneszenz nur gemeinsam mit weiteren Indikatoren zu beurteilen. Auch wenn zusätzlich die Zellmorphologie betrachtet und die Seneszenzrate suggestiv mit dem Zellwachstum verglichen wurde, hätte die Analyse beispielsweise des Proliferationsmarkers Ki-67 oder des Seneszenzmarkers p16 die Beurteilung der Seneszenzrate weiter absichern können (130).

5.5 Ausblick

Um die in Kapitel 5.3 aufgestellte Hypothese weiter zu validieren, bieten sich auf Basis dieser Arbeit zahlreiche Folgeuntersuchungen an. Der Einfluss des in Abhängigkeit der Lebermikroumgebung alterierten Metabolismus auf das Verhalten disseminierter PDEZ sollte zunächst an weiteren Zelllinien überprüft werden. Hierfür eignen sich unter anderen maligne PDEZ mit TP53-Mutation wie PANC-1 oder AsPC-1, um die Rolle der SDHB- und vor allem der G6PD-Expression in Abhängigkeit des TP53-Mutationsstatus weiter zu charakterisieren (117). Insbesondere da eine erhöhte G6PD-Expression auch in der Zelllinie PANC-1 nach Kokultur mit einer entzündlichen Lebermikroumgebung beobachtet wurde (siehe Kapitel 4.1.3). Ferner bietet sich eine detailliertere Modellierung der Lebermikroumgebung *in vitro* an. Im Rahmen des Primäris üben tumorassoziierte Makrophagen ebenfalls einen Einfluss auf den Metabolismus

neoplastischer PDEZ aus (146). Um ein ganzheitlicheres Bild der Lebermikroumgebung und ihres Einflusses auf disseminierte PDEZ zu simulieren, könnten daher HSC beziehungsweise HMF mit Makrophagen (Kupferzellen) und gegebenenfalls unter Zunahme von Hepatozyten gemeinsam mit PDEZ indirekt kokultiviert werden. Dies sollte in eine Untersuchung *in vivo* münden. Eine Folgeuntersuchung am Mausmodell des PDAC analysierte bereits mittels immunhistochemischer Färbung das Niveau der SDHB-Expression in Abhängigkeit der Größe von Lebermetastasen. Im Sinne der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen darin Mikrometastasen beziehungsweise disseminierte PDEZ eine tendenziell höhere SDHB-Expression auf als Makrometastasen (172). Zusätzlich sind bereits kombinierte immunhistochemische Färbungen der SDHB und des Proliferationsmarkers Ki67 an hepatisch metastasierten PDEZ im Mausmodell erfolgt. Hierdurch soll der Zusammenhang zwischen SDHB-Expression und Proliferation *in vivo* untersucht werden. Ergänzend könnte das SDHB-Expressionsverhalten mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Beisein von HSC beziehungsweise HMF verglichen und somit die Rolle entzündlicher Prozesse der Lebermikroumgebung *in vivo* weiter analysiert werden. In diesem Kontext zeigten Lenk *et al.* bereits *in vivo* den wachstumsfördernden Einfluss altersabhängiger entzündlicher Prozesse der Leber auf disseminierte PDEZ (173). Weiterhin sollten die Befunde in einem rein humanen System validiert werden, um speziesabhängige Störfaktoren auszuschließen. Hierfür werden bereits Folgeversuche mit humanen primären HSC und daraus transdifferenzierten HMF durchgeführt. Nach umfassender Validierung wäre die Übertragung in ein humanes System *in vivo* im Sinne von immunhistochemischen Färbungen von OP-Präparaten wünschenswert. Erkrankte profitieren allerdings üblicherweise nicht von einer Resektion von Lebermetastasen des PDAC (174). Mangelnde Gewebepräparate, insbesondere im Stadium der Mikrometastase, könnten daher die Untersuchung in einem humanem *in vivo* System limitieren.

Obwohl sich ebenfalls für die LDHA signifikante Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Kokultur in H6c7eR-Kr und Panc1 Zellen zeigten, mündete dies in der vorliegenden Arbeit nicht in eine weitere Untersuchung. Eine mögliche Bedeutung dieses Expressionsunterschiedes in Bezug auf das Wachstumsverhalten von PDEZ könnte mittels siRNA-Untersuchungen analysiert werden.

Weitere Folgeuntersuchungen sollten die Wege der Zellkommunikation zwischen hepatischen Stromazellen und disseminierten PDEZ analysieren, um die vermittelnden

Signale der metabolischen Alterationen zu identifizieren. Beispielsweise könnte auf Basis dieser Arbeit und der Arbeit von Zhao *et al.* ein Einfluss miRNA-haltiger Exosomen aus HMF überprüft werden (109). In diesem Rahmen sollte ebenso der Einfluss von Zytokinen auf den Metabolismus disseminierter PDEZ untersucht werden. TAF beziehungsweise HMF sezernieren beispielsweise SDF-1 α oder VEGF und verstärken dadurch das Wachstum von neoplastischen PDEZ (154, 173).

Schließlich sollten auch die intrazellulären Mechanismen in PDEZ untersucht werden, die das erhöhte Zellwachstum im Rahmen einer verringerten SDHB-Expression in der entzündlichen Lebermikroumgebung vermitteln. Dabei scheint das Enzymsubstrat Succinat über zwei Wege in das Zellverhalten einzugreifen. Zum einen stabilisiert Succinat den hypoxiesensiblen Transkriptionsfaktor HIF1- α (90). Ein aktives HIF1- α kann in neoplastischen PDEZ zum Zellwachstum und möglicherweise durch Hypoxieresistenz und gesteigerte Migration zur Metastasierung beitragen (103, 175). Zum anderen kann Succinat epigenetische Alterationen wie DNA-Hypermethylierungen hervorrufen (101, 176). DNA-Hypermethylierungen sind dabei auch im PDAC von Bedeutung, da die Hypermethylierung bestimmter Gene mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist. Entsprechend können Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen das Wachstum neoplastischer PDEZ *in vitro* und *in vivo* hemmen (177, 178). Daher sollte die Rolle von HIF1- α und der DNA-Methylierungsstatus in disseminierten PDEZ in Abhängigkeit der Lebermikroumgebung und der SDHB-Expression weiter analysiert werden.

Abschließend vermittelt die vorliegende Arbeit einen neuen Ansatz, wie eine entzündliche Lebermikroumgebung den Stoffwechsel sowie damit verbunden das Wachstumsverhalten von PDEZ beeinflusst und hierdurch die Etablierung von Lebermetastasen des PDAC begünstigen kann.

6 Zusammenfassung

Menschen mit einem duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) leben im Median weniger als 5 Monate. Bei Diagnosestellung sind 80 % der Erkrankten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, häufig mit Fernmetastasen. Die Leber ist der Hauptmetastasierungsort des PDAC. Obwohl Lebermetastasen mit einem schlechteren Überleben verbunden sind als extrahepatische Metastasen, sind die Mechanismen der Lebermetastasierung des PDAC kaum verstanden. Dieses Verständnis ist zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte jedoch von zentraler Bedeutung. Entzündung sowie ein veränderter Metabolismus sind Tumorkennzeichen und tragen entscheidend zum Verhalten neoplastischer Zellen bei. Ob die Lebermikroumgebung in Abhängigkeit ihres Entzündungszustandes den Metabolismus von Pankreasduktusepithelzellen (PDEZ) und dadurch ihr Wachstumsverhalten beeinflusst, ist bisher nicht untersucht und daher Ziel dieser Arbeit. Da eine frühzeitige Streuung von prämaligen PDEZ nachgewiesen wurde, wurden als Zellmodelle humane benigne H6c7eR-pBp, prämalige H6c7eR-Kr und maligne PANC-1 PDEZ-Zellen verwendet. Eine Expressionsanalyse Metabolismus-assoziiierter Proteine in monokultivierten PDEZ zeigte, dass benigne PDEZ verstärkt die Succinatdehydrogenase B (SDHB) exprimierten, eine Enzymuntereinheit der oxidativen Phosphorylierung. Demgegenüber exprimierten maligne PDEZ verstärkt den Glykolysemarker Monokarboxylat Transporter 4 (MCT4) und das Schlüsselenzym des oxidativen Pentosephosphatweges (PPW) Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Prämalige PDEZ stellten dabei einen Mischtyp mit stärkerer Expression sowohl der SDHB als auch des MCT4 bei geringer G6PD-Expression dar. Um den Einfluss entzündlicher Prozesse der Lebermikroumgebung auf den Metabolismus von PDEZ zu untersuchen, wurden diese indirekt mit murinen hepatischen Stromazellen kokultiviert. Dies erfolgte entweder mit hepatischen Sternzellen (Zelllinie M1-4HSC = HSC) zur Modellierung einer physiologischen oder mit hepatischen Myofibroblasten (Zelllinie M-HT = HMF) zur Modellierung eines entzündlichen Lebermikromilieus. Eine Proteinexpressionsanalyse zeigte insbesondere in prämaligen PDEZ eine verstärkte Expression der SDHB nach HSC-Kokultur, wohingegen die HMF-Kokultur zu einer stärkeren Expression der G6PD führte. Damit in Einklang wies die funktionelle *Seahorse*-Analyse einen gesteigerten oxidativen Metabolismus in den PDEZ nach HSC-Kokultur auf. Ob dieser durch die hepatischen Stromazellen veränderte Metabolismus das Zellverhalten der PDEZ beeinflusst, wurde

durch siRNA-Suppression der SDHB beziehungsweise G6PD in prämaligen PDEZ unter Kokultur untersucht. Die Suppression der G6PD beeinflusste den Metabolismus und das Zellwachstum der PDEZ unter HMF-Kokultur nur unwesentlich. Demgegenüber führte die Suppression der SDHB in den PDEZ unter HSC-Kokultur zu einem vermehrt glykolytischen Phänotyp, steigerte die Expression von Enzymen des PPW und erhöhte signifikant das Zellwachstum. Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass der Metabolismus benigner PDEZ von der oxidativen Phosphorylierung geprägt ist, während maligne PDEZ einen glykolytischen Phänotyp mit gesteigertem PPW aufweisen. Unter Einfluss einer physiologischen Lebermikroumgebung scheinen prämale PDEZ den Metabolismus benigner PDEZ anzunehmen und in einem ruhenden Zustand zu verbleiben. In einer entzündlichen Lebermikroumgebung nähern sich prämale PDEZ jedoch dem Metabolismus maligner PDEZ an, was mit einem gesteigerten Zellwachstum einhergeht. Abschließend könnten somit entzündliche Prozesse der Leber über Veränderungen im Metabolismus das Auswachsen von PDEZ zu Mikrometastasen fördern.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Carrato, A., Falcone, A., Ducreux, M., Valle, J.W., Parnaby, A., Djazouli, K., Alnwick-Allu, K., Hutchings, A., Palaska, C., Parthenaki, I. A systematic review of the burden of pancreatic cancer in europe: real-world impact on survival, quality of life and costs. *J Gastrointest Cancer*. 2015; 46(3): 201-211.
2. Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014; 74(11): 2913-2921.
3. Kaatsch, P.S., C.; Katalinic, A.; Hentschel, S; Luttmann, S.; Stegmaier, C. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. ed. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2015.
4. Permuth-Wey, J., Egan, K.M. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer*. 2009; 8(2): 109-117.
5. Shi, C., Hruban, R.H., Klein, A.P. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133(3): 365-374.
6. Tramacere, I., Scotti, L., Jenab, M., Bagnardi, V., Bellocco, R., Rota, M., Corrao, G., Bravi, F., Boffetta, P., La Vecchia, C. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*. 2010; 126(6): 1474-1486.
7. Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P., Pezzilli, R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010; 24(3): 349-358.
8. Becker, A.E., Hernandez, Y.G., Frucht, H., Lucas, A.L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(32): 11182-11198.
9. Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G.M., Bracci, P.M., Neale, R.E., Muscat, J., Anderson, K., Gallinger, S., Olson, S.H., Miller, A.B., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Scelo, G., Janout, V., Holcatova, I., Lagiou, P., Serraino, D., Lucenteforte, E., Fabianova, E., Ghadirian, P., Baghurst, P.A., Zatonski, W., Foretova, L., Fontham, E., Bamlet, W.R., Holly, E.A., Negri, E., Hassan, M., Prizment, A., Cotterchio, M., Cleary, S., Kurtz, R.C., Maisonneuve, P., Trichopoulos, D., Polesel, J., Duell, E.J., Boffetta, P., La Vecchia, C. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*. 2014; 25(10): 2065-2072.
10. Arslan, A.A., Helzlsouer, K.J., Kooperberg, C., Shu, X.O., Steplowski, E., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fuchs, C.S., Gross, M.D., Jacobs, E.J., Lacroix, A.Z., Petersen, G.M., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Zheng, W., Albanes, D., Amundadottir, L., Bamlet, W.R., Barricarte, A., Bingham, S.A., Boeing, H., Boutron-Ruault, M.C., Buring, J.E.,

- Chanock, S.J., Clipp, S., Gaziano, J.M., Giovannucci, E.L., Hankinson, S.E., Hartge, P., Hoover, R.N., Hunter, D.J., Hutchinson, A., Jacobs, K.B., Kraft, P., Lynch, S.M., Manjer, J., Manson, J.E., McTiernan, A., McWilliams, R.R., Mendelsohn, J.B., Michaud, D.S., Palli, D., Rohan, T.E., Slimani, N., Thomas, G., Tjonneland, A., Tobias, G.S., Trichopoulos, D., Virtamo, J., Wolpin, B.M., Yu, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Patel, A.V. Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Arch Intern Med.* 2010; 170(9): 791-802.
11. Chan, J.M., Gong, Z., Holly, E.A., Bracci, P.M. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *Nutr Cancer.* 2013; 65(1): 157-164.
 12. Aumüller, G. *Duale Reihe Anatomie.* 1. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
 13. Beger, H.G. *Erkrankungen des Pankreas: Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf.* 1. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
 14. Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A.M., Kloppel, G. Neue Einblicke in die Entstehung des Pankreaskarzinoms. Die Rolle der atypischen flachen Läsionen in der Karzinogenese. *Pathologe.* 2012; 33 Suppl 2: 189-193.
 15. Kamisawa, T., Wood, L.D., Itoi, T., Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2016; 388(10039): 73-85.
 16. Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Longnecker, D.S., Luttges, J., Offerhaus, G.J. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(5): 579-586.
 17. Basturk, O., Hong, S.M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Brosens, L.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., Kato, Y., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D.S., Matthaei, H., Offerhaus, G.J., Shimizu, M., Takaori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I., Furukawa, T. A revised classification system and recommendations from the baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 2015; 39(12): 1730-1741.
 18. Han, H., Von Hoff, D.D. SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer Cell.* 2013; 23(3): 424.
 19. Van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., De Marzo, A.M., Hruban, R.H., Maitra, A. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1541-1547.
 20. Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988; 53(4): 549-554.
 21. Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. Presence of somatic mutations in most

- early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012; 142(4): 730-733.
22. Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S.B., Kern, S.E., Herman, J.G. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 1997; 57(15): 3126-3130.
 23. Maitra, A., Adsay, N.V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Hruban, R.H. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003; 16(9): 902-912.
 24. Grzenda, A., Ordog, T., Urrutia, R. Polycomb and the emerging epigenetics of pancreatic cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2011; 42(2): 100-111.
 25. Kumar, V. *Pathologic Basis of Disease*. 8. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
 26. Bosman, F.T., World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.
 27. Xu, Z., Pothula, S.P., Wilson, J.S., Apte, M.V. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(32): 11216-11229.
 28. Lüllmann-Rauch. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
 29. Steele, C.W., Jamieson, N.B., Evans, T.R., McKay, C.J., Sansom, O.J., Morton, J.P., Carter, C.R. Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2013; 108(5): 997-1003.
 30. Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., Apte, M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002; 50(4): 535-541.
 31. Bachem, M.G., Schunemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., Adler, G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 2005; 128(4): 907-921.
 32. Weinberg, R.A. *The Biology of Cancer*. 2. ed. New York: Garland Science; 2013.
 33. Böcker, W. *Pathologie*. 5. ed. München: Elsevier; 2012.
 34. Disibio, G., French, S.W. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132(6): 931-939.
 35. Valastyan, S., Weinberg, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 147(2): 275-292.

36. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139(5): 871-890.
37. Klein, C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): 302-312.
38. Klein, C.A. Cancer. The metastasis cascade. *Science*. 2008; 321(5897): 1785-1787.
39. Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 453-458.
40. Psaila, B., Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): 285-293.
41. Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.M., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.L., Labori, K.J., Lothe, I.M., Kure, E.H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Schwartz, R.E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B.Z., Bromberg, J., Lyden, D. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*. 2015; 17(6): 816-826.
42. Obenauf, A.C., Massague, J. Surviving at a distance: organ specific metastasis. *Trends Cancer*. 2015; 1(1): 76-91.
43. Kamisawa, T., Isawa, T., Koike, M., Tsuruta, K., Okamoto, A. Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas*. 1995; 11(4): 345-349.
44. Ries, L.A.G. Cancer survival among adults : U.S. SEER program, 1988-2001, patient and tumor characteristics. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute; 2007.
45. Bernards, N., Haj Mohammad, N., Creemers, G.J., de Hingh, I.H., van Laarhoven, H.W., Lemmens, V.E. Ten weeks to live: a population-based study on treatment and survival of patients with metastatic pancreatic cancer in the south of the Netherlands. *Acta Oncol*. 2015; 54(3): 403-410.
46. Keane, M.G., Horsfall, L., Rait, G., Pereira, S.P. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open*. 2014; 4(11): e005720.
47. Wang, F., Gupta, S., Holly, E.A. Diabetes mellitus and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(8): 1458-1463.
48. Jacobsson, L., Ottosson, J.O. Initial mental disorders in carcinoma of pancreas and stomach. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1971; 221: 120-127.
49. Porta, M., Fabregat, X., Malats, N., Guarner, L., Carrato, A., de Miguel, A., Ruiz, L., Jarrod, M., Costafreda, S., Coll, S., Alguacil, J., Corominas, J.M., Sola, R., Salas, A., Real,

- F.X. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol.* 2005; 7(5): 189-197.
50. Khorana, A.A., Francis, C.W., Culakova, E., Kuderer, N.M., Lyman, G.H. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer.* 2007; 110(10): 2339-2346.
 51. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). S3-Leitlinie Exokrines Pankreas, Kurzversion 1.0. 2013.
 52. Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H., Kleeff, J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.* 2010; 7(4): e1000267.
 53. Chakraborty, S., Singh, S. Surgical resection improves survival in pancreatic cancer patients without vascular invasion- a population based study. *Ann Gastroenterol.* 2013; 26(4): 346-352.
 54. Schmidt, J., Abel, U., Debus, J., Harig, S., Hoffmann, K., Herrmann, T., Bartsch, D., Klein, J., Mansmann, U., Jager, D., Capussotti, L., Kunz, R., Buchler, M.W. Open-label, multicenter, randomized phase III trial of adjuvant chemoradiation plus interferon Alfa-2b versus fluorouracil and folinic acid for patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(33): 4077-4083.
 55. Koninger, J., Wente, M.N., Muller-Stich, B.P., di Mola, F.F., Gutt, C.N., Hinz, U., Muller, M.W., Friess, H., Buchler, M.W. R2 resection in pancreatic cancer--does it make sense? *Langenbecks Arch Surg.* 2008; 393(6): 929-934.
 56. Conroy, T., Bachet, J.B., Ayav, A., Huguet, F., Lambert, A., Caramella, C., Marechal, R., Van Laethem, J.L., Ducreux, M. Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2016; 57: 10-22.
 57. Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., Von Hoff, D.D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997; 15(6): 2403-2413.
 58. Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J.B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U., Intergroup, P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364(19): 1817-1825.
 59. Barugola, G., Falconi, M., Bettini, R., Boninsegna, L., Casarotto, A., Salvia, R., Bassi, C., Pederzoli, P. The determinant factors of recurrence following resection for ductal pancreatic cancer. *JOP.* 2007; 8(1 Suppl): 132-140.
 60. Hellerbrand, C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch.* 2013; 465(6): 775-778.

61. Friedman, S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008; 88(1): 125-172.
62. Reynaert, H., Urbain, D., Geerts, A. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken).* 2008; 291(6): 693-698.
63. Lemoine, S., Cadoret, A., El Mourabit, H., Thabut, D., Housset, C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832(7): 948-954.
64. Shimizu, S., Yamada, N., Sawada, T., Ikeda, K., Kawada, N., Seki, S., Kaneda, K., Hirakawa, K. In vivo and in vitro interactions between human colon carcinoma cells and hepatic stellate cells. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91(12): 1285-1195.
65. Liu, C., Billadeau, D.D., Abdelhakim, H., Leof, E., Kaibuchi, K., Bernabeu, C., Bloom, G.S., Yang, L., Boardman, L., Shah, V.H., Kang, N. IQGAP1 suppresses TbetaRII-mediated myofibroblastic activation and metastatic growth in liver. *J Clin Invest.* 2013; 123(3): 1138-1156.
66. Tien, Y.W., Wu, Y.M., Lin, W.C., Lee, H.S., Lee, P.H. Pancreatic carcinoma cells stimulate proliferation and matrix synthesis of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2009; 51(2): 307-314.
67. Amann, T., Bataille, F., Spruss, T., Muhlbauer, M., Gabele, E., Scholmerich, J., Kiefer, P., Bosserhoff, A.K., Hellerbrand, C. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009; 100(4): 646-653.
68. Eveno, C., Hainaud, P., Rampanou, A., Bonnin, P., Bakhouché, S., Dupuy, E., Contreres, J.O., Pocard, M. Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *J Surg Res.* 2015; 194(2): 496-504.
69. Kang, N., Gores, G.J., Shah, V.H. Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology.* 2011; 54(2): 707-713.
70. Vidal-Vanaclocha, F. The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron.* 2008; 1(1): 113-129.
71. Van den Eynden, G.G., Majeed, A.W., Illemann, M., Vermeulen, P.B., Bird, N.C., Hoyer-Hansen, G., Eefsen, R.L., Reynolds, A.R., Brodt, P. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res.* 2013; 73(7): 2031-2043.
72. Okabe, H., Beppu, T., Hayashi, H., Ishiko, T., Masuda, T., Otao, R., Horlad, H., Jono, H., Ueda, M., Phd, S.S., Ando, Y., Baba, H. Hepatic stellate cells accelerate the malignant behavior of cholangiocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(4): 1175-1184.
73. Musso, O., Theret, N., Champion, J.P., Turlin, B., Milani, S., Grappone, C., Clement, B. In situ detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 transcripts in human primary hepatocellular carcinoma and in liver metastasis. *J Hepatol.* 1997; 26(3): 593-605.

74. Matsusue, R., Kubo, H., Hisamori, S., Okoshi, K., Takagi, H., Hida, K., Nakano, K., Itami, A., Kawada, K., Nagayama, S., Sakai, Y. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16(9): 2645-2653.
75. Yu, M.C., Chen, C.H., Liang, X., Wang, L., Gandhi, C.R., Fung, J.J., Lu, L., Qian, S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology.* 2004; 40(6): 1312-1321.
76. Olaso, E., Salado, C., Egilegor, E., Gutierrez, V., Santisteban, A., Sancho-Bru, P., Friedman, S.L., Vidal-Vanaclocha, F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology.* 2003; 37(3): 674-685.
77. Stryer, L.B., J. M.; Tymoczko, J. L. *Biochemie.* 7. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
78. Penzlin, H. *Das Phänomen Leben.* 1. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014.
79. Horn, F. *Biochemie des Menschen.* 4. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
80. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324(5930): 1029-1033.
81. Boroughs, L.K., DeBerardinis, R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(4): 351-359.
82. Ward, P.S., Thompson, C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012; 21(3): 297-308.
83. Knudson, A.G. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002; 111(1): 96-102.
84. Vogelstein, B., Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10(8): 789-799.
85. Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J.H., Lim, C., Guimaraes, A.R., Martin, E.S., Chang, J., Hezel, A.F., Perry, S.R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J.M., Weissleder, R., Wang, Y.A., Chin, L., Cantley, L.C., DePinho, R.A. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell.* 2012; 149(3): 656-670.
86. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006; 126(1): 107-120.
87. Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., Yang, X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(3): 310-316.

88. Bardella, C., Pollard, P.J., Tomlinson, I. SDH mutations in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807(11): 1432-1443.
89. Yang, M., Pollard, P.J. Succinate: a new epigenetic hacker. *Cancer Cell*. 2013; 23(6): 709-711.
90. Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., Gottlieb, E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005; 7(1): 77-85.
91. Wishart, D.S. Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? *EBioMedicine*. 2015; 2(6): 478-479.
92. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-674.
93. Sousa, C.M., Kimmelman, A.C. The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis*. 2014; 35(7): 1441-1450.
94. Zhou, W., Capello, M., Fredolini, C., Racanicchi, L., Piemonti, L., Liotta, L.A., Novelli, F., Petricoin, E.F. Proteomic analysis reveals Warburg effect and anomalous metabolism of glutamine in pancreatic cancer cells. *J Proteome Res*. 2012; 11(2): 554-563.
95. Liberti, M.V., Locasale, J.W. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci*. 2016; 41(3): 211-218.
96. Jiang, P., Du, W., Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell*. 2014; 5(8): 592-602.
97. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123(3191): 309-314.
98. Ahn, C.S., Metallo, C.M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab*. 2015; 3(1).
99. Blum, R., Kloog, Y. Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1065.
100. Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., Kang, Y., Fleming, J.B., Bardeesy, N., Asara, J.M., Haigis, M.C., DePinho, R.A., Cantley, L.C., Kimmelman, A.C. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013; 496(7443): 101-105.
101. Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., Zhao, S., Ye, D., Xiong, Y., Guan, K.L. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*. 2012; 26(12): 1326-1338.
102. Masoud, G.N., Li, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015; 5(5): 378-389.

103. Wei, H., Li, F., Fu, P., Liu, X. Effects of the silencing of hypoxia-inducible Factor-1 alpha on metastasis of pancreatic cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013; 17(4): 436-446.
104. Martinez-Outschoorn, U.E., Lisanti, M.P., Sotgia, F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 2014; 25: 47-60.
105. Baldini, N., Sonveaux, P., De Milito, A., Supuran, C.T., Otto, A.M., Stock, C.M., Pedersen, S.F., Favicchio, R., Avnet, S. Metabolism and microenvironment in cancer plasticity. *Cancer & Metabolism.* 2016; 4(1): 1-7.
106. Guillaumond, F., Leca, J., Olivares, O., Lavaut, M.N., Vidal, N., Berthezene, P., Dusetti, N.J., Loncle, C., Calvo, E., Turrini, O., Iovanna, J.L., Tomasini, R., Vasseur, S. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(10): 3919-3924.
107. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R.G., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P. The reverse warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009; 8(23): 3984-4001.
108. Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Flomenberg, N., Birbe, R.C., Witkiewicz, A.K., Howell, A., Pavlides, S., Tsigos, A., Ertel, A., Pestell, R.G., Broda, P., Minetti, C., Lisanti, M.P., Sotgia, F. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle.* 2011; 10(23): 4047-4064.
109. Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J.C., Tudawe, T., Seviour, E.G., San Lucas, F.A., Alvarez, H., Gupta, S., Maiti, S.N., Cooper, L., Peehl, D., Ram, P.T., Maitra, A., Nagrath, D. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife.* 2016; 5.
110. Schulze, A., Harris, A.L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature.* 2012; 491(7424): 364-373.
111. Cirri, P., Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31(1-2): 195-208.
112. Weber, G.F. Metabolism in cancer metastasis. *Int J Cancer.* 2016; 138(9): 2061-2066.
113. Simoes, R.V., Serganova, I.S., Kruchevsky, N., Leftin, A., Shestov, A.A., Thaler, H.T., Sukenick, G., Locasale, J.W., Blasberg, R.G., Koutcher, J.A., Ackerstaff, E. Metabolic plasticity of metastatic breast cancer cells: adaptation to changes in the microenvironment. *Neoplasia.* 2015; 17(8): 671-684.
114. Brodt, P. Role of the microenvironment in liver metastasis: from pre- to prometastatic niches. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(24): 5971-5982.

115. Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., Leach, S.D., Stanger, B.Z. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012; 148(1-2): 349-361.
116. Qian, J., Niu, J., Li, M., Chiao, P.J., Tsao, M.S. In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005; 65(12): 5045-5053.
117. Deer, E.L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A., Mulvihill, S.J. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2010; 39(4): 425-435.
118. Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*. 1975; 15(5): 741-747.
119. Proell, V., Mikula, M., Fuchs, E., Mikulits, W. The plasticity of p19 ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1744(1): 76-87.
120. Viol, F. Mechanisms of liver metastases in pancreatic ductal adenocarcinoma: Analysis of cancer stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells in dependence on the hepatic microenvironment. Masterarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2015.
121. Duxbury, M.S., Whang, E.E. RNA interference: a practical approach. *J Surg Res*. 2004; 117(2): 339-344.
122. Collado, M., Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(1): 51-57.
123. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(20): 9363-9367.
124. Pein, M. Impact of hepatic stromal cells on the phenotype and behavior of pancreatic ductal epithelial cells in dependence on the K-RasG12V oncogene. Masterarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2014.
125. Lenk, L.T.N. Einfluss hepatischer Sternzellen und Myofibroblasten auf den Phänotyp und das Verhalten von Pankreasadenokarzinomzellen. Masterarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2013.
126. Halestrap, A.P., Wilson, M.C. The monocarboxylate transporter family—role and regulation. *IUBMB life*. 2012; 64(2): 109-119.
127. Regel, I., Kong, B., Raulefs, S., Erkan, M., Michalski, C.W., Hartel, M., Kleeff, J. Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg*. 2012; 397(4): 507-512.

128. Valvona, C.J., Fillmore, H.L., Nunn, P.B., Pilkington, G.J. The regulation and function of lactate dehydrogenase A: therapeutic potential in brain tumor. *Brain Pathol.* 2015.
129. Patra, K.C., Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39(8): 347-354.
130. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., Peeper, D.S. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24(22): 2463-2479.
131. Peixoto, R.D., Speers, C., McGahan, C.E., Renouf, D.J., Schaeffer, D.F., Kennecke, H.F. Prognostic factors and sites of metastasis in unresectable locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Med.* 2015; 4(8): 1171-1177.
132. Kim, H.W., Lee, J.C., Paik, K.H., Lee, Y.S., Hwang, J.H., Kim, J. Initial Metastatic Site as a Prognostic Factor in Patients With Stage IV Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Medicine.* 2015; 94(25): e1012.
133. Oweira, H., Petrausch, U., Helbling, D., Schmidt, J., Mannhart, M., Mehrabi, A., Schob, O., Giryas, A., Decker, M., Abdel-Rahman, O. Prognostic value of site-specific metastases in pancreatic adenocarcinoma: A Surveillance Epidemiology and End Results database analysis. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(10): 1872-1880.
134. Viol, F.L., L.; Knaack, H.; Pein, M.; Fabian, A.; Mikulits, W.; Weiskirchen, R.; Boris, F.; Riecken, K.; Wenzel, P.; Schneider, G.; Saur, D.; Sebens, S. . Sleep is the enemy: Cellular dormancy and cancer stem cell properties are influenced by hepatic alterations in disseminated pancreatic ductal epithelial cells. *Tumor Microenvironment, Metabolism and Metastasis DKFZ-ZMBH Alliance Forum; Heidelberg: 2015.*
135. Kong, S.C., Nohr-Nielsen, A., Zeeberg, K., Reshkin, S.J., Hoffmann, E.K., Novak, I., Pedersen, S.F. Monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 regulate migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Pancreas.* 2016; 45(7): 1036-1047.
136. Schneiderhan, W., Scheler, M., Holzmann, K.H., Marx, M., Gschwend, J.E., Bucholz, M., Gress, T.M., Seufferlein, T., Adler, G., Oswald, F. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in vivo and in vitro models. *Gut.* 2009; 58(10): 1391-1398.
137. Baek, G., Tse, Y.F., Hu, Z., Cox, D., Buboltz, N., McCue, P., Yeo, C.J., White, M.A., DeBerardinis, R.J., Knudsen, E.S., Witkiewicz, A.K. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep.* 2014; 9(6): 2233-2249.
138. Schlichtholz, B., Turyn, J., Goyke, E., Biernacki, M., Jaskiewicz, K., Sledzinski, Z., Swierczynski, J. Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer. *Pancreas.* 2005; 30(2): 99-104.

139. Wang, X., Li, X., Zhang, X., Fan, R., Gu, H., Shi, Y., Liu, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase expression is correlated with poor clinical prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2015; 41(10): 1293-1299.
140. Wang, J., Yuan, W., Chen, Z., Wu, S., Chen, J., Ge, J., Hou, F., Chen, Z. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2012; 33(1): 95-101.
141. Pu, H., Zhang, Q., Zhao, C., Shi, L., Wang, Y., Wang, J., Zhang, M. Overexpression of G6PD is associated with high risks of recurrent metastasis and poor progression-free survival in primary breast carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2015; 13: 323.
142. Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Skoldberg, F., Husebye, E.S., Eng, C., Maher, E.R. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet.* 2001; 69(1): 49-54.
143. Chen, L., Liu, T., Zhang, S., Zhou, J., Wang, Y., Di, W. Succinate dehydrogenase subunit B inhibits the AMPK-HIF-1alpha pathway in human ovarian cancer in vitro. *J Ovarian Res.* 2014; 7: 115.
144. Zhang, D., Wang, W., Xiang, B., Li, N., Huang, S., Zhou, W., Sun, Y., Wang, X., Ma, J., Li, G., Li, X., Shen, S. Reduced succinate dehydrogenase B expression is associated with growth and de-differentiation of colorectal cancer cells. *Tumour Biol.* 2013; 34(4): 2337-2347.
145. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., McCue, P., Czapiewski, P., Langfort, R., Waloszczyk, P., Wazny, K., Biernat, W., Lasota, J., Wang, Z. Mapping of succinate dehydrogenase losses in 2258 epithelial neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014; 22(1): 31-36.
146. Piller, M. Metabolismus-abhängige Veränderungen im Pankreasadenokarzinom: Einfluss von Glukose auf Pankreasgangepithelzellen und Makrophagen sowie deren Wechselwirkung. Masterarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2015.
147. Ouyang, H., Mou, L., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J., Tsao, M.S. Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol.* 2000; 157(5): 1623-1631.
148. Contractor, T., Harris, C.R. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res.* 2012; 72(2): 560-567.
149. Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006; 312(5780): 1650-1653.
150. Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F., Lisanti, M.P. Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle.* 2011; 10(15): 2504-2520.

151. Witkiewicz, A.K., Whitaker-Menezes, D., Dasgupta, A., Philp, N.J., Lin, Z., Gandara, R., Sneddon, S., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P. Using the "reverse warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. 2012; 11(6): 1108-1117.
152. Pertega-Gomes, N., Vizcaino, J.R., Attig, J., Jurmeister, S., Lopes, C., Baltazar, F. A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14: 352.
153. Yu, M., Zhou, Q., Zhou, Y., Fu, Z., Tan, L., Ye, X., Zeng, B., Gao, W., Zhou, J., Liu, Y., Li, Z., Lin, Y., Lin, Q., Chen, R. Metabolic phenotypes in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0115153.
154. Wu, Y.S., Looi, C.Y., Subramaniam, K.S., Masamune, A., Chung, I. Soluble factors from stellate cells induce pancreatic cancer cell proliferation via Nrf2-activated metabolic reprogramming and ROS detoxification. *Oncotarget*. 2016; 7(24): 36719-36732.
155. Kathagen-Buhmann, A., Schulte, A., Weller, J., Holz, M., Herold-Mende, C., Glass, R., Lamszus, K. Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol*. 2016; 18(9): 1219-1229.
156. Hu, T., Zhang, C., Tang, Q., Su, Y., Li, B., Chen, L., Zhang, Z., Cai, T., Zhu, Y. Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model. *BMC Cancer*. 2013; 13: 251.
157. Du, W., Jiang, P., Mancuso, A., Stonestrom, A., Brewer, M.D., Minn, A.J., Mak, T.W., Wu, M., Yang, X. TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nat Cell Biol*. 2013; 15(8): 991-1000.
158. Aspuria, P.-J., Lunt, S., Varemo, L., Vergnes, L., Gozo, M., Beach, J., Salumbides, B., Reue, K., Wiedemeyer, W., Nielsen, J., Karlan, B., Orsulic, S. Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. *Cancer & Metabolism*. 2014; 2(1): 21.
159. Cardaci, S., Zheng, L., MacKay, G., van den Broek, N.J., MacKenzie, E.D., Nixon, C., Stevenson, D., Tumanov, S., Bulusu, V., Kamphorst, J.J., Vazquez, A., Fleming, S., Schiavi, F., Kalna, G., Blyth, K., Strathdee, D., Gottlieb, E. Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nat Cell Biol*. 2015; 17(10): 1317-1326.
160. Cervera, A.M., Apostolova, N., Crespo, F.L., Mata, M., McCreath, K.J. Cells silenced for SDHB expression display characteristic features of the tumor phenotype. *Cancer Res*. 2008; 68(11): 4058-4067.
161. Rapizzi, E., Ercolino, T., Fucci, R., Zampetti, B., Felici, R., Guasti, D., Morandi, A., Giannoni, E., Giache, V., Bani, D., Chiarugi, A., Mannelli, M. Succinate dehydrogenase subunit B mutations modify human neuroblastoma cell metabolism and proliferation. *Horm Cancer*. 2014; 5(3): 174-184.

162. Guzy, R.D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N.S., Schumacker, P.T. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(2): 718-731.
163. Kowalik, M.A., Guzzo, G., Morandi, A., Perra, A., Menegon, S., Masgras, I., Trevisan, E., Angioni, M.M., Fornari, F., Quagliata, L., Ledda-Columbano, G.M., Gramantieri, L., Terracciano, L., Giordano, S., Chiarugi, P., Rasola, A., Columbano, A. Metabolic reprogramming identifies the most aggressive lesions at early phases of hepatic carcinogenesis. *Oncotarget.* 2016; 7(22): 32375-32393.
164. Panieri, E., Gogvadze, V., Norberg, E., Venkatesh, R., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med.* 2013; 57: 176-187.
165. Li, M., Durbin, K.R., Sweet, S.M., Tipton, J.D., Zheng, Y., Kelleher, N.L. Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-warburg effect. *Proteomics.* 2013; 13(17): 2585-2596.
166. Zheng, H., Li, S., Hsu, P., Qu, C.K. Induction of a tumor-associated activating mutation in protein tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) enhances mitochondrial metabolism, leading to oxidative stress and senescence. *J Biol Chem.* 2013; 288(36): 25727-25738.
167. Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V.A., Mackay, G., van der Burg, S.H., Verdegaal, E.M., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E., Peeper, D.S. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature.* 2013; 498(7452): 109-112.
168. Viale, A., Pettazzoni, P., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Sanchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A.K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., Kang, Y., Yuan, M., Asara, J.M., Wang, Y.A., Heffernan, T.P., Kimmelman, A.C., Wang, H., Fleming, J.B., Cantley, L.C., DePinho, R.A., Draetta, G.F. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature.* 2014; 514(7524): 628-632.
169. Lenk, L. Metastasis of Pancreatic Cancer: Influence of the hepatic microenvironment on the growth behavior of pancreatic ductal epithelial cells Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2017.
170. Hiller, K., Metallo, C.M. Profiling metabolic networks to study cancer metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24(1): 60-68.
171. Caldwell, M.E., DeNicola, G.M., Martins, C.P., Jacobetz, M.A., Maitra, A., Hruban, R.H., Tuveson, D.A. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene.* 2012; 31(12): 1599-1608.
172. Buttlar, J. Liver metastasis of pancreatic cancer: Influence of succinate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase on metabolism and growth of pancreatic ductal epithelial cells in dependence on the hepatic microenvironment. Masterarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2016.

173. Lenk, L., Pein, M., Will, O., Gomez, B., Viol, F., Hauser, C., Egberts, J.-H., Gundlach, J.-P., Helm, O., Tiwari, S., Weiskirchen, R., Rose-John, S., Röcken, C., Mikulits, W., Wenzel, P., Schneider, G., Saur, D., Schäfer, H., Sebens, S. The hepatic microenvironment essentially determines tumor cell dormancy and metastatic outgrowth of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2017; e1368603.
174. Lu, F., Poruk, K.E., Weiss, M.J. Surgery for oligometastasis of pancreatic cancer. *Chin J Cancer Res*. 2015; 27(4): 358-367.
175. Gao, C., Li, S., Zhao, T., Chen, J., Ren, H., Zhang, H., Wang, X., Lang, M., Liu, J., Gao, S., Zhao, X., Sheng, J., Yuan, Z., Hao, J. SCF, regulated by HIF-1alpha, promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell progression. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121338.
176. Letouze, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara, M., Nguyen, A.T., Benit, P., Buffet, A., Marcaillou, C., Bertherat, J., Amar, L., Rustin, P., De Reynies, A., Gimenez-Roqueplo, A.P., Favier, J. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell*. 2013; 23(6): 739-752.
177. Thompson, M.J., Rubbi, L., Dawson, D.W., Donahue, T.R., Pellegrini, M. Pancreatic cancer patient survival correlates with DNA methylation of pancreas development genes. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128814.
178. Susanto, J.M., Colvin, E.K., Pinese, M., Chang, D.K., Pajic, M., Mawson, A., Caldon, C.E., Musgrove, E.A., Henshall, S.M., Sutherland, R.L., Biankin, A.V., Scarlett, C.J. The epigenetic agents suberoylanilide hydroxamic acid and 5AZA2' deoxycytidine decrease cell proliferation, induce cell death and delay the growth of MiaPaCa2 pancreatic cancer cells in vivo. *Int J Oncol*. 2015; 46(5): 2223-2230.
179. Fabian, A., Lenk, L., Viol, F., Mikulits, W., Schäfer, H., Sebens, S. Metastasierung des duktaalen Pankreasadenokarzinoms – Alterationen der Lebermikroumgebung beeinflussen den Metabolismus und das Wachstumsverhalten disseminierter Pankreasgangepithelzellen. *Z Gastroenterol*. 2015; 53(08): KG219.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Entartungssequenz des duktaalen Pankreasadenokarzinoms am Beispiel von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN).....	2
Abbildung 1-2 Lineare Progression vs. parallele Progression.....	5
Abbildung 1-3 Vereinfachte Darstellung des zellulären Kohlenhydratstoffwechsels.....	12
Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Kokultivierung von PDEZ mit hepatischen Stromazellen.	31
Abbildung 3-2 Proteintransfer mittels <i>semi-dry-blotting</i> -Verfahren.	36

Abbildung 3-3 <i>Seahorse-Analyse</i> . Graphische Darstellung der transienten Mikroammer.....	38
Abbildung 3-4 <i>Seahorse-Analyse</i> . Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im <i>Mito Stress Test</i>	39
Abbildung 4-1 Westernblot-Analyse von Membrantransportproteinen in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen.	43
Abbildung 4-2 Westernblot-Analyse der Laktatdehydrogenase-Untereinheiten LDHB und LDHA in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen.	44
Abbildung 4-3 Westernblot-Analyse von Enzymen des Pentosephosphatweges in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen.....	45
Abbildung 4-4 Analyse der Succinatdehydrogenase-Untereinheit SDHB in H6c7eR-pBp, H6c7eR-Kr und PANC-1 Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit M1-4HSC oder M-HT Zellen.	46
Abbildung 4-5 Analyse der G6PD und SDHB in H6c7eR-Kr Zellen nach siRNA-Transfektion.....	48
Abbildung 4-6 Westernblot-Analyse Metabolismus-assoziierter Proteine in H6c7eR-Kr Zellen nach G6PD-Suppression und 96-stündiger Kokultivierung mit M-HT Zellen.....	49
Abbildung 4-7 Westernblot-Analyse Metabolismus-assoziierter Proteine in H6c7eR-Kr Zellen nach SDHB-Suppression und 96-stündiger Kokultivierung mit M1-4HSC Zellen.....	50
Abbildung 4-8 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an H6c7eR-Kr Zellen nach sechs Tagen Kokultur mit M1-4HSC bzw. M-HT Zellen mittels Seahorse-Analyse.	52

Abbildung 4-9 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an SDHB-supprimierten bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten H6c7eR-Kr Zellen nach 96 Stunden M1-4HSC-Kokultur mittels <i>Seahorse-Analyse</i>	53
Abbildung 4-10 Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate an G6PD-supprimierten bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten H6c7eR-Kr Zellen nach 96 Stunden M-HT-Kokultur mittels <i>Seahorse-Analyse</i>	55
Abbildung 4-11 Auswertung der Zellzahlbestimmung von SDHB- bzw. G6PD-supprimierten H6c7eR-Kr Zellen nach 96-stündiger M1-4HSC- bzw. M-HT-Kokultur.	56
Abbildung 4-12 Auswertung der SABG-Färbung von SDHB- bzw. G6PD-supprimierten H6c7eR-Kr Zellen nach 96-stündiger M1-4HSC- bzw. M-HT-Kokultur.	57
Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der Metastasierungsmechanismen des PDAC in Abhängigkeit des Entzündungszustandes der Leber.	68

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Konzentrationen der Substanzen des <i>XF Cell Mito Stress Test Kit</i>	40
---	----

7.4 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
BLOTTO	<i>Bovine lacto transfer technique optimizer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CDKN2A/p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform p16</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

DTZ	Disseminierte Tumorzelle
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G6PD	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GLUT1	Glukosetransporter 1
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECAR	<i>Extracellular acidification rate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GZL	Ganzzelllysate
HIF1- α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-α</i>
HSC	Hepatische Sternzellen
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HMF	Hepatische Myofibroblasten
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
k	Kilo
KH	Kohlenhydrat
Ki-67	Kiel-67
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDHB	Laktatdehydrogenase B
MCT1	Monokarboxylat Transporter 1
MCT4	Monokarboxylat Transporter 4
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition

NIH	<i>National institutes of health</i>
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i>
p	Piko
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
PDEZ	Pankreatische duktales Epithelzellen
PDGF	<i>Plateled derived growth factor</i>
PGD	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
PPW	Pentosephosphatweg
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SABG	Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase
SDF-1	<i>Stromal-cell derived factor 1</i>
SDH	Succinatdehydrogenase

SDHB	Succinatdehydrogenase B
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	<i>Serum free medium</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
TAF	Tumorassoziierter Fibroblast
TALDO	Transaldolase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TP53	<i>Tumor suppressor p53</i>
TKT	Transketolase
U	Umdrehungen
v/v	<i>Volume per volume</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
ZTZ	Zirkulierende Tumorzelle

8 Danksagung

Susanne Sebens danke ich für die Möglichkeit in unserer Arbeitsgruppe eine Promotion anzufertigen und für das damit entgegengebrachte Vertrauen. Deine Begeisterung und Zuversicht hat mich immer wieder neu motiviert und gezeigt was eine ideale Chefin ist, zielstrebig und respektvoll. Das war stark!

Dagmar Leisner bewundere ich für die stete Hilfsbereitschaft und das immer freundliche Wesen unter ständig neuen Leuten im Labor.

Lennart Lenk danke ich für die selbstlose Betreuung. Die daraus entstandene Freundschaft möchte ich nicht missen und ist ein großer Gewinn.

Fabrice Viol danke ich für die heitere Gesellschaft zu späten Stunden im Labor und eine tolle Freundschaft.

Ole Helm, Hendrike Knaack, Mirjam Piller, Sascha Rahn und Jann Buttler danke ich für den wundervollen Umgang innerhalb und außerhalb des Labors sowie die große gegenseitige Unterstützung. Immer eine Freude euch zu sehen, habt ihr die Arbeit im Labor stark versüßt.

Der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für ein Promotionsstipendium.

Meiner Familie danke ich für die stete Unterstützung.

9 Veröffentlichungen

Bereits veröffentlichtes Abstract:

Vortrag im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2015 unter dem Titel:

„Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms –
Alterationen der Lebermikroumgebung beeinflussen den Metabolismus und das
Wachstumsverhalten disseminierter Pankreasgangepithelzellen“ (179)

Zusätzlich sind Teile dieser Arbeit in einem „*peer-reviewed journal*“ als Erstautor zur
Veröffentlichung eingereicht worden.