

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Molekularbiologische und immunhistologische  
Leberveränderungen beim Mausmodell eines  
Kachexie-induzierenden Pankreas-Karzinoms:  
Effekte einer Monoaminoxidase-A-Inhibition**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Elisa Marie Wächtershäuser**

aus Wetzlar

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

27.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. W. Hildebrandt

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Buchholz

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	7
Abbildungsverzeichnis.....	13
Tabellenverzeichnis.....	15
1. Einleitung.....	16
1.1 Tumorkachexie .....	16
1.1.1 Definition und Bedeutung von Kachexie.....	16
1.1.2 Definition und Epidemiologie der Tumorkachexie .....	17
1.1.3 Pathophysiologie der Tumorkachexie .....	18
1.1.4 Kachexie beim Pankreaskarzinom .....	20
1.2 Das Pankreaskarzinom.....	21
1.2.1 Anatomie und Funktion des Pankreas.....	21
1.2.2 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms.....	21
1.2.3 Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms .....	22
1.2.4 Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms .....	23
1.2.5 Molekulargenetische Grundlagen des Pankreaskarzinoms.....	25
1.3 Therapieansätze bei Tumorkachexie .....	26
1.3.1 Monoaminoxidase-A-Hemmer.....	28
1.4 Hepatische Faktoren der Tumorkachexie .....	29
1.4.1 Anatomie und Funktion der Leber .....	29
1.4.2 Die Rolle der Leber bei Tumorkachexie .....	33
1.4.2.1 Glutaminstoffwechsel bei Tumorkachexie.....	36
1.4.2.1.1 Glutaminsynthetase .....	38
1.4.2.2 Aminosäuretransporter .....	40
1.4.2.2.1 FXR.....	40

1.4.2.2.2 Ammoniumtransporter: RhBG .....	42
1.4.2.2.3 Glutamattransporter: SLC1A2 .....	42
1.4.2.2.4 SCL1A4.....	44
1.4.2.2.5 Glutamintransporter: SLC1A5 .....	45
1.4.2.3 Monoaminoxidasen.....	46
1.4.2.4 Inflammation .....	48
1.4.2.4.1 Interleukin-1 $\beta$ .....	50
1.4.2.4.2 Interleukin-6 .....	50
1.4.2.4.3 TNF- $\alpha$ .....	52
1.4.2.4.4 COX-1 und COX-2 .....	53
1.4.2.4.5 CD68.....	54
1.4.2.4.6 SOCS-3.....	54
1.4.2.4.7 MIF .....	55
1.4.2.5 Apoptose.....	56
1.4.2.5.1 BAX und BCL-2.....	56
1.4.2.5.2 Caspase-3.....	57
1.4.2.6 Proliferation: PCNA.....	57
1.4.2.7 Glykogengehalt der Leber (PAS-Reaktion).....	58
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	59
2. Material und Methode.....	61
2.1 Das Mausmodell .....	61
2.1.1 Histologie des Pankreasgewebes .....	66
2.2 Histologische Methoden.....	67
2.2.1 Fixierung .....	67
2.2.2 Beschichtung mit Chromalaun .....	67
2.2.3 Anfertigung von 6 $\mu$ m-Kryoschnitten .....	67

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	68
2.2.5 Periodic-Acid-Schiff-Solution-Reaktion.....	69
2.2.6 Immunhistochemische Färbungen .....	70
2.2.7 Immunhistochemische Auswertung.....	74
2.2.8 Histologische Auswertung mittels zählbarer Segmentierung.....	76
2.3 PCR .....	78
2.3.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion .....	79
2.3.1.1 Prinzip der Real-Time PCR mit SYBR Green I .....	79
2.3.2 RNA-Isolierung .....	82
2.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Qualität.....	83
2.3.4 DNase-Verdau .....	84
2.3.5 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels Reverser Transkription ..	84
2.3.6 Herstellung eines cDNA-Standards.....	86
2.3.7 Durchführung der Real-Time PCR mit SYBR Green I.....	86
2.3.8 Auswertung der Real-Time PCR mit SYBR Green I.....	87
2.3.9 Housekeeping-Gene .....	88
2.4 Statistische Analyse.....	88
2.5. Substanzen und Geräte .....	90
3. Ergebnisse .....	98
3.1 Gewicht der Versuchstiere.....	98
3.2 Immunhistochemische Färbungen.....	99
3.2.1 Glutaminsynthetase.....	99
3.2.2 MAO-A .....	101
3.2.3 Interleukin-1 $\beta$ .....	104
3.2.4 COX-2 .....	107
3.2.5 CD68 .....	111

3.3 PAS.....	115
3.4 PCR.....	117
3.4.1 Glutaminstoffwechsel.....	117
3.4.1.1 Glutaminsynthetase.....	117
3.4.1.2 FXR.....	118
3.4.1.3 RhBG.....	119
3.4.1.4 SLC1A2.....	120
3.4.1.5 SLC1A4.....	121
3.4.1.6 SLC1A5.....	122
3.4.2 Monoaminoxidasen.....	123
3.4.2.1 MAO-A.....	123
3.4.2.2 MAO-B.....	124
3.4.3 Inflammation.....	125
3.4.3.1 Interleukin-1 $\beta$ .....	125
3.4.3.2 Interleukin-6.....	126
3.4.3.3 TNF- $\alpha$ .....	127
3.4.3.4 COX-1.....	128
3.4.3.5 CD68.....	129
3.4.3.6 SOCS-3.....	130
3.4.3.7 MIF.....	131
3.4.4 Apoptose.....	132
3.4.4.1 BAX.....	132
3.4.4.2 BCL-2.....	133
3.4.4.3 Caspase-3.....	134
3.4.5 Proliferation.....	135
3.4.5.1 PCNA.....	135

4. Diskussion .....	136
4.1 Das Mausmodell .....	136
4.1.1 Studienpopulation.....	136
4.1.2 Statistische Analyse .....	141
4.2 Glutaminstoffwechsel.....	141
4.2.1 Glutaminsynthetase.....	141
4.2.2 FXR .....	145
4.2.3 RhBG .....	146
4.2.4 Glutamattransporter: SLC1A2 .....	147
4.2.5 Glutamattransporter: SLC1A4 .....	147
4.2.6 Glutamintransporter: SLC1A5 .....	148
4.3 Monoaminoxidasen.....	149
4.4 Inflammation .....	151
4.4.1 Interleukin-1 $\beta$ .....	151
4.4.2 Interleukin-6 .....	152
4.4.3 TNF- $\alpha$ .....	154
4.4.4 COX-1 und COX-2 .....	154
4.4.5 CD68 .....	156
4.4.6 SOCS-3.....	157
4.4.7 MIF .....	157
4.5 Apoptose: BAX, Caspase-3 und BCL-2 .....	158
4.6 Proliferation: PCNA.....	160
4.7 Glykogengehalt der Leber (PAS-Reaktion).....	161
4.8 Ausblick .....	163
5. Zusammenfassung.....	165
6. Summary .....	167

7. Literaturverzeichnis .....	169
Internetquellen .....	205
8. Anhang .....	206
8.1 Tabellen .....	206
8.2 Curriculum vitae .....	214
8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen .....	215
8.4 Danksagung .....	216
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung .....	217



## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACTB	B-Actin
a.e.	am ehesten
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
APR	Akute-Phase-Reaktion
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASC-System	Alanin-Serin-Cystein-System
ASCT1	Alanin-Serin-Cystein-Transporter 1
ASCT2	Alanin-Serin-Cystein-Transporter 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	BCL-2 Associated-X-Protein
BCI-2	B-Cell-Lymphoma-2
BMI	Body-Mass-Index
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C(t)	Cycle treshold
ca.	circa
CA	Karzinomgruppe (3x transgene Mäuse mit Pankreaskarzinom)
CA HH	Harmine-behandelte Karzinomgruppe (Harmine-behandelte 3x transgene Mäuse mit Pankreaskarzinom)

CASCO	CAchexia SCOré
Caspase-3	CysteinyI-Aspartate-Specific-Protease 3
CD68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
Cre	Cyclization recombination
CRP	C-reaktives Protein
DNase	Desoxyribonuklease
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dr.	Doktor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAAT2	Excitatory-Amino-Acid-Transporter 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	und andere
etc.	et cetera
Fa.	Firma
FAMMM-Syndrom	Familial atypical multiple mole melanoma syndrome
FAP-Syndrom	Familiäre adenomatöse Polyposis Syndrom
FOLFIRINOX	Folinsäure, Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FXR	Farnesoid-X-Activated-Receptor
g	Gramm
ges.	Gesamt
ggf.	gegebenenfalls
GLT-1	Glutamatttransporter 1
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein

GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Diwasserstoffmonoxid (Wasser)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HH	Harmine-Hydrochlorid
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
IA	Interaktion
IHC	Immunhistochemie
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
insg.	insgesamt
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LMF	Lipid-mobilisierender Faktor
LSL	Lox-Stop-Lox
M.	Morbus
m	männlich
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MAO-B	Monoaminoxidase-B
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophage Migration Inhibitory Factor
min	Minute(n)
mind.	mindestens

ml	Milliliter
MLH1	MutL homolog 1
mM	Millimolar
MMP-2	Matrixmetalloprotease-2
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
neg.	negativ
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
NSS	Normal-Schweine-Serum
o.e.	oben erwähnt
p	p-Wert
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAS	Periodic Acid Solution
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma (Duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	Paraformaldehyd
PIF	Proteolyse-induzierender Faktor
pos.	positiv
Prof.	Professor
PRSS1	Serinprotease 1

R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
RhBG	Rhesus Blood-Group Associated B Glykoprotein
RIN	RNA integrity number (RNA Integritätswert)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNase-H	Ribonuklease Hybrid
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheiten
s.	siehe
SE	Standard error (Standardfehler)
sec	Sekunde(n)
SLC-1A2	Solute-Carrier-Family-1-Member-2
SLC1A4	Solute-Carrier-Family-1-Member-4
SLC1A5	Solute-Carrier-Family-1-Member-5
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SOCS-3	Suppressor-of-Cytokine-Signaling-3
sog.	sogenannt
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STK11/LKB1	Serine/threonine kinase 11/Liver kinase B1
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TBP	TATA-Binding-Protein
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp53	Tumor Protein 53
u.a.	unter anderem
V.	Vena

vergl.	vergleiche
vs.	versus
Vv.	Venae
w	weiblich
WT	Wildtyp-Gruppe
WT HH	Harmine-behandelte Wildtyp-Gruppe
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms .....	26
Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau der Leber .....	31
Abbildung 3: HE-Färbung Zentralvene .....	32
Abbildung 4: Zonale Verteilung metabolischer Prozesse in der Leber .....	32
Abbildung 5: Kreuzungsschema der 3x transgenen Versuchstiere .....	63
Abbildung 6: Schematische Darstellung der HRP-Detektionsmethode .....	72
Abbildung 7: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	76
Abbildung 8: Segmentierung der GS-Färbung .....	78
Abbildung 9: RT-PCR mit SYBR Green I-Fluoreszenzfarbstoff.....	81
Abbildung 10: Elektropherogramm zur Bestimmung der RNA-Integrität .....	84
Abbildung 11: cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase .....	85
Abbildung 12: Gewicht der Versuchstiere .....	99
Abbildung 13: Prozentanteil der GS-positiven Fläche .....	100
Abbildung 14: GS-Färbung (IHC).....	100
Abbildung 15: GS-Färbung Zentralvenen.....	101
Abbildung 16: Prozentanteil der MAO-A-positiven Fläche.....	102
Abbildung 17: MAO-A-Färbung (IHC).....	102
Abbildung 18: MAO-A-Färbung (IHC) Zentralvenen und Glissontrias .....	103
Abbildung 19: MAO-A-Färbung (IHC) Zentralvenen.....	103
Abbildung 20: Prozentanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen insgesamt.....	104
Abbildung 21: Prozentanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen perivenös und periportal..	105
Abbildung 22: IL-1 $\beta$ -Färbung (IHC) Zentralvenen .....	106
Abbildung 23: IL-1 $\beta$ -Färbung (IHC) Periportalfelder .....	106
Abbildung 24: Prozentanteil COX-2-positiver Zellen insgesamt .....	108
Abbildung 25: Prozentanteil COX-positiver Zellen perivenös und periportal ..	109
Abbildung 26: COX-2-Färbung (IHC) Zentralvenen.....	110
Abbildung 27: COX-2-Färbung (IHC) Periportalfelder .....	110
Abbildung 28: Prozentanteil CD68-positiver Zellen insgesamt.....	112
Abbildung 29: Prozentanteil CD68-positiver Zellen perivenös und periportal .	113
Abbildung 30: CD68-Färbung (IHC) Zentralvenen .....	114
Abbildung 31: CD68-Färbung (IHC) Periportalfelder .....	114

Abbildung 32: Prozentanteil der PAS-positiven Fläche .....	116
Abbildung 33: PAS-Reaktion.....	116
Abbildung 34: Relative mRNA-Expression GS.....	117
Abbildung 35: Relative mRNA-Expression FXR .....	118
Abbildung 36: Relative mRNA-Expression RhBG .....	119
Abbildung 37: Relative mRNA-Expression SLC1A2.....	120
Abbildung 38: Relative mRNA-Expression SLC1A4.....	121
Abbildung 39: Relative mRNA-Expression SLC1A5.....	122
Abbildung 40: Relative mRNA-Expression MAO-A .....	123
Abbildung 41: Relative mRNA-Expression MAO-B .....	124
Abbildung 42: Relative mRNA-Expression IL-1 $\beta$ .....	125
Abbildung 43: Relative mRNA-Expression IL-6.....	126
Abbildung 44: Relative mRNA-Expression TNF- $\alpha$ .....	127
Abbildung 45: Relative mRNA-Expression COX-1 .....	128
Abbildung 46: Relative mRNA-Expression CD68 .....	129
Abbildung 47: Relative mRNA-Expression SOCS-3.....	130
Abbildung 48: Relative mRNA-Expression MIF .....	131
Abbildung 49: Relative mRNA-Expression BAX.....	132
Abbildung 50: Relative mRNA-Expression BCL-2.....	133
Abbildung 51: Relative mRNA-Expression Caspase-3.....	134
Abbildung 52: Relative mRNA-Expression PCNA .....	135



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studienpopulation.....	64
Tabelle 2: Primersequenzen zur Genotypisierung der 3x transgenen Mäuse ..	66
Tabelle 3: Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	68
Tabelle 4: Färbeprotokoll Periodic-Acid-Schiff-Solution-Reaktion .....	70
Tabelle 5: Antikörperverdünnung für immunhistochemische Färbungen.....	71
Tabelle 6: Färbeprotokoll immunhistochemische Färbungen .....	73
Tabelle 7: Thermoprofil PCR.....	87
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.....	90
Tabelle 9: Verwendete Biochemikalien für molekularbiologische Analysen .....	91
Tabelle 10: Verwendete Hilfsstoffe.....	92
Tabelle 11: Verwendete 1. Antikörper für immunhistochemische Färbungen ..	92
Tabelle 12: Verwendete 2. Antikörper für immunhistochemische Färbungen ..	92
Tabelle 13: Verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR.....	93
Tabelle 14: Verwendete Einwegmaterialien und sonstiger Laborbedarf.....	94
Tabelle 15: Verwendete Geräte.....	95
Tabelle 16: Verwendete Software .....	97
Tabelle 17: Verwendete Labortiere .....	97
Tabelle 18: Gewicht und Färbungen: Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test ....	206
Tabelle 19: Gewicht und Alter der Mäuse: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA .....	207
Tabelle 20: IHC GS-positive Fläche (%): Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA .....	207
Tabelle 21: IHC MAO-A-positive Fläche (%): Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA....	207
Tabelle 22: IHC IL-1 $\beta$ -positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA.....	208
Tabelle 23: IHC COX-2-positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA .....	208
Tabelle 24: IHC CD68-positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA.....	209
Tabelle 25: PAS-positive Fläche (%): Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA .....	209
Tabelle 26: Gewicht und Färbungen: Tukey-Test.....	210
Tabelle 27: qRT-PCR: Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test.....	211
Tabelle 28: qRT-PCR: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA.....	212
Tabelle 29: qRT-PCR: Tukey-Test .....	213

## 1. Einleitung

### 1.1 Tumorkachexie

#### 1.1.1 Definition und Bedeutung von Kachexie

Der Begriff Kachexie leitet sich vom altgriechischen κακός, „schlecht“, und ἕξις, „Zustand“, ab und beschreibt einen pathologischen, stark ausgeprägten, unbeabsichtigten Gewichtsverlust (Argilés et al., 2014). Definitionsgemäß geht dieser einher mit einem Abbau von Speicherfettdepots, Baufett und Muskulatur. Kachexie ist ein Begleitsymptom einer Vielzahl chronischer Erkrankungen, wie der chronischen Herz- oder Niereninsuffizienz, der chronischen obstruktiven Bronchitis, der zystischen Fibrose, der rheumatoiden Arthritis und der Alzheimer-Demenz, aber auch infektiöser Erkrankungen und maligner Tumorerkrankungen (von Haehling und Anker, 2010). Es existieren zahlreiche unterschiedliche Definitionen der Kachexie, denen jedoch meist die Faktoren Gewichtsverlust, hauptsächlich durch Verlust von Skelettmuskulatur und Körperfett, sowie Inflammation zugrunde liegen (Argilés et al., 2014). Gemäß der Cachexia Consensus Conference von 2006 ist Kachexie definiert als ein komplexes metabolisches Syndrom, welches im Zusammenhang mit einer Grunderkrankung steht und durch einen Verlust an Muskelmasse mit oder ohne einen Verlust an Fettmasse charakterisiert ist (Evans et al., 2008). Als Diagnosekriterien der Kachexie wurden ein Gewichtsverlust von mehr als 5 % des Körpergewichtes in zwölf oder weniger Monaten bzw. ein BMI unter 20 kg/m<sup>2</sup> bei Patienten mit einer zugrundeliegenden Erkrankung (wie oben aufgeführt) festgelegt (Evans et al., 2008). Zusätzlich müssen drei der folgenden fünf Faktoren vorliegen: Anorexie, Fatigue, verminderte Muskelkraft, erniedrigter Fettfreie-Masse-Index und laborchemische Veränderungen wie erhöhte Inflamationsparameter (CRP, Interleukin-6), Anämie (Hb < 12 mg/dl) oder ein erniedrigtes Serumalbumin (< 3,2 g/dl) (Evans et al., 2008). Diesem Konzept liegt die Annahme zugrunde, dass Kachexie durch die auf die Grunderkrankung zurückzuführenden Faktoren Appetitverlust, Inflammation, Insulinresistenz, erniedrigte Spiegel anaboler Hormone und Anämie verursacht

wird. Diese führen wiederum zu Gewichtsabnahme, Verlust von Muskelmasse, reduzierter Muskelkraft und Fatigue (Argilés et al., 2014). Evans et al. (2008) unterteilen die Kachexie anhand der Gewichtsabnahme innerhalb von zwölf oder weniger Monaten in eine milde (Verlust von >5 % des Körpergewichts), eine moderate (>10 %) und eine schwere Form (>15 %). Eine weitere Definition, welche speziell für Tumorkachexie entwickelt wurde, stammt von Fearon et al. (2011). Hier werden als Diagnosekriterien ein Gewichtsverlust von >5 % des Körpergewichtes in den letzten sechs Monaten oder ein Verlust von >2 % des Körpergewichtes in den letzten zwei Monaten bei einem BMI von <20 kg/m<sup>2</sup> oder eine Sarkopenie (definiert als Appendicular skeletal muscle index <7,26 kg/m<sup>2</sup> bei Männern oder <5,45 kg/m<sup>2</sup> bei Frauen) in Verbindung mit einem Gewichtsverlust von >2 % des Körpergewichtes (Fearon et al. 2011) angeführt. Ergänzt wird diese Klassifikation durch das Vorliegen einer onkologischen Grunderkrankung, sowie dadurch, dass die Tumorkachexie als voranschreitende und nicht durch zusätzliche Nahrungsaufnahme reversible Erkrankung beschrieben wird, welche zu fortschreitender funktioneller Einschränkung des Patienten führt (Fearon et al., 2011).

Aufgrund der uneinheitlichen Definition der Kachexie sowie des Fehlens charakteristischer Marker wird die Erkrankung zu selten diagnostiziert (Argilés et al., 2011). Deshalb wurde zum besseren Staging insbesondere von Tumorpatienten mit Kachexie der Kachexie-Score CASCO von Argilés et al. (2011) entwickelt, welcher sich aus fünf Hauptfaktoren zusammensetzt: Verlust von Körpergewicht und fettfreier Körpermasse, Anorexie, inflammatorische, immunologische und metabolische Störungen, körperliche Leistungsfähigkeit und Lebensqualität. Dieses Staging-Instrument soll nicht nur eine bessere Klassifizierung der Schwere des Kachexie-Syndroms ermöglichen, sondern zugleich Entscheidungshilfen bzgl. dessen Therapie liefern (Argilés et al., 2011).

### **1.1.2 Definition und Epidemiologie der Tumorkachexie**

Von Tumorkachexie spricht man bei Auftreten eines Kachexie-Syndroms im Rahmen einer Tumorerkrankung. Insgesamt leiden zwischen 50-80 % aller

Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung an Kachexie (von Haeling et al., 2016) und etwa 25 % aller Krebstodesfälle sind durch Kachexie bedingt (Tisdale, 2010a). Am häufigsten tritt eine Gewichtsabnahme bei Patienten mit soliden Tumoren wie Magen-, Pankreas- und kolorektalen Karzinomen, seltener bei Mammakarzinomen oder hämatologischen Tumorerkrankungen auf (Dewys et al., 1980). In Studien konnte die Tumorkachexie als negativer Prognosemarker bezüglich des Gesamtüberlebens (Deans und Wigmore, 2005; Bachmann et al., 2008), des progressionsfreien Überlebens und des Ansprechens auf eine Chemotherapie (Andreyev et al., 1998; Blum et al., 2014) ermittelt werden. Des Weiteren reduziert Tumorkachexie die Lebensqualität (Ravasco et al., 2004) und den Performance Status (Deans und Wigmore, 2005). Pathophysiologisch liegt der Tumorkachexie eine negative Protein- und Energiebilanz zugrunde, welche durch eine Kombination aus reduzierter Nahrungsaufnahme und Stoffwechseleränderungen verursacht wird (Fearon et al., 2011). Argilés et al. (2014) beschreiben die Kachexie als eine Störung der Energiebalance durch reduzierte Energieaufnahme bzw. einen erhöhten Energieverbrauch, wobei der Anteil dieser beiden Komponenten an der Kachexieentstehung abhängig von der Tumorart und dem Wachstum des Tumors ist.

### **1.1.3 Pathophysiologie der Tumorkachexie**

Die Pathophysiologie der Tumorkachexie ist noch nicht vollständig verstanden. Als wesentliche Faktoren wurden eine verminderte Nahrungsaufnahme der Patienten, eine katabole Stoffwechsellage und eine generalisierte Entzündungsreaktion identifiziert (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Ursachen einer reduzierten Nahrungsaufnahme bei Tumorpatienten können neben einem verminderten Appetit, Veränderungen in der Geschmacks- und Geruchswahrnehmung (Spotten et al., 2017), Nebenwirkungen der Antitumortherapie (Laviano et al. 2017), eine reduzierte körperliche Aktivität, eine Tumorobstruktion des Gastrointestinaltraktes (Argilés et al., 2014) oder psychologische Faktoren (Hopkinson, 2014) darstellen. Die Regulation des Appetits scheint durch vom Tumor produzierte Faktoren beeinträchtigt zu sein.

Normalerweise führen Gewichtsverlust sowie Hungerperioden über eine vermehrte Produktion Appetit-stimulierender Faktoren wie Ghrelin und Neuropeptid Y und eine Reduktion entgegengesetzt wirkender Faktoren wie Corticotropin-releasing Faktor und Melanocortin, zu einer verminderten Leptin-Ausschüttung (Suzuki et al., 2013). Das Hormon Leptin bewirkt eine Reduktion des Appetits sowie eine Erhöhung des Energieumsatzes und reguliert die Fettgewebismenge. Im Rahmen einer Tumorerkrankung produzierte Zytokine können im Hypothalamus ähnliche Effekte wie Leptin vortäuschen und über einen negativen Feedbackmechanismus zu einer Suppression der appetitanregenden Hormone Ghrelin und Neuropeptid Y führen (Suzuki et al., 2013). Ein gleichzeitig erhöhter Grundumsatz bei Tumorpatienten u.a. aufgrund dysfunktionaler mitochondrialer ATP-Synthese in Skelettmuskelzellen, führt zu einer Störung der Energiebilanz und zu weiterer Gewichtsabnahme (Argilés et al., 2014).

Einen weiteren bedeutsamen Faktor bei der Entstehung der Tumorkachexie stellt die systemische Inflammation dar. Diese beruht auf einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers auf den Tumor im Sinne einer Akuten-Phase-Reaktion (APR) mit vermehrter Synthese der APR-Proteine wie CRP,  $\alpha$ -Antitrypsin, Fibrinogen und Interleukin-6 (IL-6) in der Leber, was zu Lasten der Albuminsynthese erfolgt. Zudem kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welche über Aktivierung von NF $\kappa$ B zur Proteolyse im Skelettmuskel beitragen können (Argilés et al., 2014). Andererseits produzieren Tumorzellen selbst Zytokine, von denen insbesondere IL-6 zur Entstehung von Kachexie u.a. als Mediator der Lipolyse beitragen soll (Chen et al., 2016). Neben Zytokinen führen auch die vom Tumor produzierten Faktoren LMF (Lipid mobilizing factor) und PIF (Proteolysis inducing factor) zu Lipolyse und Muskelatrophie (Tishdale, 2009). Der Gewichtsverlust im Rahmen der Tumorkachexie kommt durch einen Verlust von weißem Fettgewebe aufgrund gesteigerter Lipolyse sowie durch Verlust von Muskelmasse durch Faser-Atrophie, -Hypoplasie oder -Apoptose zustande (Argilés et al., 2014). Für die Faseratrophie der Muskelmasse werden Veränderungen in Proteinsynthese und -degradation sowie im

Aminosäurestoffwechsel verantwortlich gemacht (Tishdale, 2009). Durch den gesteigerten Proteinabbau im Skelettmuskel bei Tumorkachexie werden Aminosäuren frei, welche in der Leber zur Glukoneogenese und zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen eingesetzt werden. Gleichzeitig nutzen Tumorzellen freiwerdendes Glutamin als Stickstoffquelle zur Sythese von Proteinen und DNA sowie zur Bereitsstellung von Glukose. Der Glukoseverbrauch durch den Tumor führt zur Entstehung von Laktat, welches in der Leber als Substrat der Glukoneogenese eingesetzt wird, auch um die durch die Laktatproduktion entstehende azidotische Stoffwechsellaage zu kompensieren. Durch die Produktion von Glukose aus vom Tumor freigesetztem Laktat entsteht zwischen Leber und Tumor ein energetisch ineffizienter Kreislauf, da die Produktion von Glukose aus Laktat deutlich mehr Energie erfordert, als bei der Entstehung von Laktat aus der Glukose in Form von ATP entsteht (Argilés et al., 2014). Zusammenfassend wird deutlich, dass die Kachexie eine Multiorganerkrankung ist, an deren Entstehung neben Muskulatur und Fettgewebe weitere Organsysteme wie die Leber, der Magen-Darm-Trakt und das Zentrale Nervensystem beteiligt sind (Argilés et al., 2014).

### **1.1.4 Kachexie beim Pankreaskarzinom**

Kachexie ist ein charakteristisches Symptom von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC). Die Mehrzahl der betroffenen Patienten ist bereits zum Diagnosezeitpunkt kachektisch, etwa 80 % entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung eine Kachexie und ein Drittel verstirbt an deren Komplikationen (Tan et al., 2014). Studien zeigen bei PDAC-Patienten mit Tumorkachexie neben verminderter körperlicher Funktionsfähigkeit niedrigere Ansprechraten auf die Antitumorthherapie (Dewys et al., 1980), ein schlechteres postoperatives Outcome nach Tumorresektion (Pausch et al., 2012) und ein erniedrigtes Gesamtüberleben (Bachmann et al., 2008).

## **1.2 Das Pankreaskarzinom**

### **1.2.1 Anatomie und Funktion des Pankreas**

Die Bauchspeicheldrüse ist ein etwa 15 cm langer Drüsenstrang, welcher beim Menschen retroperitoneal an der Hinterwand der Bursa omentalis zwischen Duodenum und Milzhilus der hinteren Bauchwand anliegt (Lippert, 2003). Unterteilt wird das Pankreas in Caput mit dem der Arteria und Vena mesenterica von dorsal anliegenden Processus uncinatus, Corpus und Cauda. Der Ductus pancreaticus durchzieht das Organ in ganzer Länge und mündet an der Papilla duodeni major in den Zwölffingerdarm. Funktionell ist das Pankreas in einen endokrinen und einen exokrinen Anteil gegliedert. Die endokrine Funktion wird von den Zellen der Langerhans-Inseln erfüllt, welche über das gesamte Organ verteilt sind und insgesamt einen Anteil von ca. 2-3 % am Pankreasgewebe haben (Lippert, 2003). Im endokrinen Teil des Pankreas erfolgt durch spezialisierte Zellen die Produktion der Hormone Glukagon, Insulin, Somatostatin und des Pankreaspolypeptids. Der exokrine Anteil des Pankreas besteht aus exkretorischen Drüsenzellen, welche das dünnflüssige, bicarbonatreiche Pankreassekret produzieren. Dieses enthält Vorstufen der Proteasen Trypsin und Chymotrypsin für die Eiweiß-,  $\alpha$ -Amylase für die Kohlenhydrat- und Pankreaslipase für die Fettverdauung, welche über das Ausführungssystem ins Duodenum sezerniert werden (Lippert, 2003).

### **1.2.2 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms**

441.000 Menschen starben im Jahr 2017 weltweit an Bauchspeicheldrüsenkrebs (GBD 2017 Pancreatic Cancer Collaborators, 2019). In Deutschland erkrankten 2018 rund 19.000 Menschen; aufgrund der ungünstigen Prognose des Pankreaskarzinoms verstarben fast ebenso viele Menschen im selben Jahr an der Krankheit (RKI, 2021). Insgesamt war das Pankreaskarzinom im Jahr 2018 bei Männern die siebthäufigste, bei Frauen die sechsthäufigste Krebserkrankung in Deutschland und verantwortlich für 7,2 % der Krebstodesfälle bei Männern sowie für 8,6 % der Krebstodesfälle bei Frauen (RKI, 2021). Damit stellt das Pankreaskarzinom insgesamt die vierthäufigste Krebstodesursache dar. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2016

bei Männern bei 72 Jahren und bei Frauen bei 76 Jahren (RKI, 2021). Die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten sind seit 10-15 Jahren nahezu konstant geblieben, jedoch verbunden mit einem Anstieg der absoluten Fallzahlen, welcher durch die demographische Alterung der Bevölkerung bedingt ist (RKI, 2021). Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 10 % weist das Pankreaskarzinom neben dem Mesotheliom die derzeit niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf (RKI, 2021). Ursächlich für die ungünstige Prognose sind vor allem die fehlenden Möglichkeiten der Früherkennung (Chiorean und Coveler, 2015). In frühen Stadien verursachen bösartigen Neubildungen des Pankreas keine oder nur unspezifische Symptome, wie Oberbauchbeschwerden, Rückenschmerzen, Übelkeit, Appetit- und Gewichtsverlust (Böhm et al., 2009). Auch eine akute Pankreatitis oder Neuauftreten bzw. Verschlechterung eines Diabetes mellitus können auf ein Pankreaskarzinom hinweisen (Gallmeier und Gress, 2018). Symptome wie Ikterus mit Pruritus oder ein positives Courvoisier-Zeichen durch Verschluss des Ductus choledochus treten zumeist erst bei fortgeschrittenen Tumorstadien auf (Böhm et al., 2009). Bei mehr als der Hälfte der Patienten finden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen (Freelove und Walling, 2006). Bisher ist es nicht gelungen, einen spezifischen Tumormarker für die Früherkennung des Pankreaskarzinoms zu etablieren. Neben der Computertomographie kommen transabdominelle Sonographie, MRT, Cholangio-MRT, Endosonographie und ERCP sowie auch die explorative Laparotomie bei Diagnostik und Staging zum Einsatz (Müller, 2011). Weitere Ursachen für die ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms sind in seiner aggressiven Tumorbilogie, der bisher weitgehenden Therapieresistenz (Chiorean und Coveler, 2015) sowie in der mit der Krankheit einhergehenden rapiden Kachexieentwicklung (Tan et al., 2014) begründet. Histologisch stellen duktale Adenokarzinome (PDAC) mit 85 % der Pankreasneoplasien die mit Abstand häufigste Entität dar (Gallmeyer und Gress, 2018). Lokalisation ist in 70 % der Fälle der Pankreaskopf (Gallmeyer und Gress, 2018).

### **1.2.3 Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms**

Als Risikofaktoren für die Entstehung eines PDAC wurden bisher



Tabakkonsum, Adipositas und starker Alkoholkonsum identifiziert (Alsamarrai et al., 2014), während dem Verzehr von Obst und Gemüse protektive Effekte zugeschrieben werden (Lowenfels und Maisonneuve, 2004). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und dem Auftreten eines PDAC beschrieben (Batabyal et al. 2014), welcher einerseits auf Effekten des Tumors wie einem pankreopriven Diabetes beruht, andererseits scheint ein langjähriger Diabetes mellitus das Risiko für ein PDAC zu erhöhen (Song et al., 2015). Dieser Effekt lässt sich sowohl bei Diabetes mellitus Typ 1 (Stevens et al., 2007) als auch bei Diabetes mellitus Typ 2 (Huxley et al., 2005) beobachten. Auch eine chronische Pankreatitis gilt als Risikofaktor (Whitcomb und Pogue-Geile, 2002), ebenso wie die hereditäre Pankreatitis (Lowenfels et al., 1997). Neben Umweltfaktoren wie einer Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen, beispielsweise Pestiziden (Ji et al., 2001), werden lebensstilbezogene Risikofaktoren wie der Verzehr verarbeiteter Fleischwaren, insbesondere gegrillter Fleischprodukte, diskutiert (Anderson et al., 2002). Ein erhöhtes Risiko stellen auch eine positive Familienanamnese (Klein et al., 2004), vor allem für Verwandte ersten Grades (Tersmette et al., 2001), und eine Reihe genetisch bedingter Krebs syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom (Giardiello et al., 2000), das FAMMM-Syndrom (Rulyak et al., 2003), das FAP-Syndrom (Giardiello et al., 1993) und Keimbahnmutationen der Gene BRCA 1 und 2 (Zhen et al., 2015; Hahn et al., 2003) dar. Auch für das HNPCC-Syndrom (Aarnio et al., 1999), das Li-Fraumeni-Syndrom und das von-Hippel-Lindau-Syndrom (Lilley und Gilchrist, 2004) sowie für die Fanconi-Anämie (Couch et al., 2005) wird ein Zusammenhang diskutiert.

### **1.2.4 Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms**

Die einzige potentiell kurative Therapieoption des PDAC ist dessen vollständige chirurgische Resektion, wobei nur ca. 20 % der Karzinome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung resektabel sind (Versteijne et al., 2020). Bei Lokalisation des Karzinoms im Pankreaskopf beinhaltet die Resektion die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Erhalt des Pylorus (S3-Leitlinie exokrines Pankreaskarzinom, 2013). Bei größerer Ausdehnung des Karzinoms muss der Eingriff zur totalen Pankreatektomie erweitert werden. Bei Tumoren

des Pankreasschwanzes erfolgt die Resektion als Pankreaslinksresektion, Pankreaskorpustumore erfordern je nach Ausdehnung eine subtotale Pankreaslinksresektion oder eine totale Duodenopankreatektomie. Nach R0-Resektion treten Tumorrezidive im Verlauf durch Lokalrezidive und Fernmetastasen auf (Hishinuma et al. 2006). Eine adjuvante Chemotherapie nach R0-Resektion kann das Auftreten solcher Tumorrezidive verzögern (Oettle et al., 2007). Zurzeit stehen Chemotherapieprotokolle mit Gemcitabin, 5-Fluoruracil (Neoptolemos et al. 2010), eine Kombination von Gemcitabin mit Capecitabin oder Paclitaxel sowie FOLFIRINOX (Gallmeier und Gress, 2018) zur Verfügung. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablem PDAC kann ein sequentielles Behandlungskonzept bestehend aus Chemotherapie, ggf. auch in neoadjuvanter Intention durchgeführt werden (S3-Leitlinie exokrines Pankreaskarzinom, 2013). Bei metastasierten oder lokal weit fortgeschrittenen Tumoren besteht eine Palliativsituation. Hier kann eine palliative Chemotherapie zur Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität des Patienten beitragen (Sultana et al., 2007). Als Erstlinientherapie werden eine Gemcitabin-Monotherapie (Burriss et al., 1997), eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Moore et al., 2007) oder eine Kombinationschemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Protokoll (5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) (Conroy et al., 2011) empfohlen. Kommt es unter einer Erstlinienchemotherapie zum Progress, kann eine Zweitlinientherapie, z.B. mit 5-Fluoruracil/Folinsäure und Oxaliplatin durchgeführt werden (Pelzer et al., 2011). Mit zunehmendem Verständnis molekularer Grundlagen des PDAC wie der Aktivierung des Kras-Onkogens, der Überexpression von COX-2, der Inaktivierung des Tumorsuppressors p16<sup>INK4A</sup> und dem Verlust der Aktivität des Tumorsuppressors p53 werden neue Ansätze einer zukünftigen zielgerichteten Therapie des PDAC diskutiert (Tang und Chen, 2014).

### **1.2.5 Molekulargenetische Grundlagen des Pankreaskarzinoms**

Wie alle Krebserkrankungen entsteht auch das PDAC durch Akkumulation somatischer und zum Teil vererbter Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Wood und Hruban, 2015). Die Kenntnis dieser molekulargenetischen Basis trägt zum tieferen Verständnis der Krankheit bei und ermöglicht die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapiestrategien. Die häufigste Mutation beim PDAC betrifft das Onkogen Kras, welches für ein G-Protein kodiert, das an Signaltransduktionswegen für Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt ist (Hruban et al., 1993). Eine Mutation zumeist im Codon 12 bewirkt eine Aktivierung des Onkogens. Weitere häufig mit dem PDAC assoziierte Mutationen betreffen die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. So kann eine Inaktivierung von p16<sup>INK4A</sup> in mehr als 90 % (Schutte et al., 1997), eine Inaktivierung von p53 in ca. 75 % (Rozenblum et al., 1997) und eine Inaktivierung von SMAD4 in ca. 50 % (Iacobuzio-Donahue et al., 2004) der Fälle nachgewiesen werden. Daneben werden zurzeit 26 bis 63 weitere Genmutationen diskutiert, die mit dem PDAC assoziiert sein sollen (Wood und Hruban, 2015), auch Veränderungen in der Expression von micro-RNA sind beschrieben worden (Szafranska et al., 2007). Desweiteren gehen eine Reihe von Keimbahnmutationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines PDAC einher. Im Einzelnen sind hier vor allem die folgenden Gene betroffen: BRCA1 und 2, p16<sup>INK4A</sup>, PRSS1, STK11/LKB1 und MLH1 (Hezel et al., 2006).

Wie andere epitheliale Tumoren durchläuft auch das PDAC eine schrittweise Progression von regelrechtem, gesundem Epithel über histologisch gut differenzierte, nicht-invasive Vorläuferläsionen hin zu einem invasiven Karzinom (Koorstra et al., 2008). Diese Vorläuferläsionen werden als PanIN (intraepitheliale Neoplasien des Pankreas) bezeichnet. Man unterscheidet anhand der Histologie PanIN Grad 1A, 1B, 2 und 3 (Ott et al., 2007). PanIN Grad 1 sind flache (1A) bzw. papilläre (1B) Zylinderepithelläsionen mit muzinöser Hyperplasie, aber ohne Zellkernatypien oder Veränderungen der Zellkernpolarität. PanIN Grad 2 sind meist papilläre, muzinöse Epithelläsionen mit Kernatypien, jedoch ohne Vorliegen atypischer Mitosen. PanIN Grad 3

stellen auf zellulärer Ebene bereits ein Karzinom dar, welches jedoch die Basalmembran nicht überschreitet. Sie weisen papilläre Läsionen mit schweren Dysplasien, Kernatypien sowie gehäuft und atypischen Mitosen auf. Auf molekulargenetischer Ebene geht die Entwicklung der PanIN mit einer zunehmenden Anhäufung von Mutationen, angefangen bei Kras-Onkogen-Mutationen und Verkürzung der Telomere, einher (Koorstra et al., 2008), wie in Abbildung 1 illustriert.

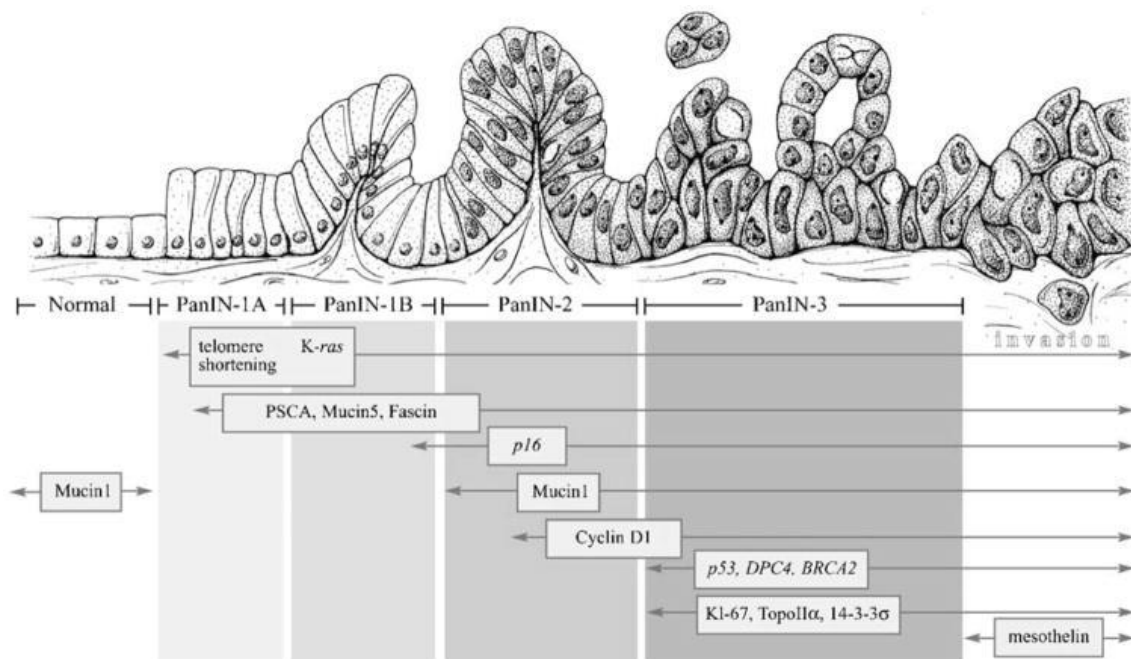


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Koorstra et al., 2008)

### 1.3 Therapieansätze bei Tumorkachexie

Wie bereits dargestellt ist Tumorkachexie eine Multisystemerkrankung mit komplexen metabolischen Störungen. Aus diesem Grund kann nur ein multimodaler Behandlungsansatz bestehend aus onkologischer Therapie zur Tumorkontrolle, spezieller Ernährungstherapie und pharmakologischen Interventionen erfolgversprechend sein (Tan et al., 2014). Voraussetzung für eine Therapie stellt die effektive Behandlung sekundärer Faktoren wie Schmerzen, Übelkeit, Obstipation sowie endokriner und exokriner Pankreasinsuffizienz dar (Tan et al., 2014). Eine spezielle Ernährungstherapie stellt die Grundlage der Kachexiebehandlung dar. Hier kommen Diätempfehlungen zur Steigerung der

der Kalorien- und Proteinzufuhr, sowie orale, enterale und parenterale Supplementation zum Einsatz (Tan et al., 2014). Studien zeigen u.a. positive Effekte für die Zufuhr von L-Carnitin (Kraft et al., 2012) und Omega-3-Fettsäuren (Barber et al., 1999b). Insbesondere für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, welchen auch immunmodulatorische und antientzündliche Effekte zugeschrieben werden, konnte eine Stabilisierung des Gewichtes bei Tumorkachexiepatienten gezeigt werden (Wigmore et al., 1996). Des Weiteren existieren zahlreiche pharmakologische Therapieansätze zur Behandlung der Tumorkachexie, welche im Hormon- und Zytokin-Haushalt sowie an weiteren Schnittstellen der Pathogenese der Tumorkachexie ansetzen (Tan et al., 2014). Appetitstimulanzien wie Dronabinol und antiserotoninerge Wirkstoffe können über Appetitsteigerung und Minderung von Übelkeit zu einer Gewichtsstabilisierung führen (Suzuki et al., 2013). Für Corticosteroide konnten ebenfalls positive Effekte bezüglich Appetit- und Gewichtszunahme bei Tumorpatienten nachgewiesen werden, welche mit einer Inhibition von IL-1, TNF- $\alpha$  und Leptin zusammenzuhängen scheinen (Plata-Salamán, 1991). Für das Gestagen Megestrolacetat konnten signifikante Verbesserungen von Appetit und Nahrungsaufnahme bei Tumorkachexiepatienten nachgewiesen werden, welche ebenfalls über verminderte Freisetzung und Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie über Stimulation von NPY vermittelt werden (Westmann et al., 1999). Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens durch Megestrolacetat konnte jedoch nicht gezeigt werden (Westmann et al., 1999). Die systemische Inflammationsreaktion hat maßgeblich Anteil an der Pathogenese der Tumorkachexie. Aus diesem Grund wurden zahlreiche entzündlich wirkende Pharmaka als potentielle Kachexietherapeutika untersucht. Für nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wie z.B. COX-2-Hemmer konnte eine reduzierte Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen sowie eine Zunahme von Gewicht und Muskelmasse (Wigmore et al., 1995) und ein verlängertes Überleben bei Tumorkachexie-Patienten gezeigt werden (Lundholm et al., 1994). Auch der antiinflammatorischen Substanz Thalidomid werden aufgrund ihrer hemmenden Wirkung auf die Produktion von Zytokinen

positive Effekte bezüglich Appetit- und Gewichtszunahme bei Tumorkachexie-Patienten zugeschrieben (Gordon et al., 2005).

Trotz zahlreicher Therapieansätze, konnten bisher für keine der verfügbaren Therapien dauerhafte Effekte auf die Stabilisierung des Körpergewichtes und eine Verlängerung des Überlebens gezeigt werden (Tan et al., 2014). Hier besteht also dringender Forschungsbedarf.

### **1.3.1 Monoaminoxidase-A-Hemmer**

Im Rahmen der Erforschung von Therapeutika der Tumorkachexie wurden in dieser Arbeit Monoaminoxidasehemmer untersucht. Hintergrund ist die Beobachtung von Manoli et al. (2005), dass in einem Kachexiemodell eine erhöhte MAO-A-Expression zu Zellschädigung im Skelettmuskel führt. Durch MAO-A-vermittelte Entstehung von reaktiven Aldehyden und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommt es zu oxidativem Stress und resultierender Zellschädigung im Muskel und damit zu dem bei Kachexie beobachteten Skelettmuskelabbau (Manoli et al., 2005). Die dieser Arbeit zugrunde liegende These ist, dass auch in der Leber eine erhöhte MAO-A-Expression durch oxidativen Stress zu Zellschädigung und damit zu Veränderungen des Lebermetabolismus bei Tumorkachexie beitragen könnte.

Auf die Funktion der Monoaminoxidasen in der Leber und deren Veränderungen im Rahmen von Tumorerkrankungen und Kachexie wird in Abschnitt 1.4.2.3 näher eingegangen. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Therapie mit dem Monoaminoxidase-Hemmer Harmine-Hydrochlorid (HH) auf hepatische Faktoren der Tumorkachexie untersucht. Harmine, ein  $\beta$ -Carbolinalkaloid, ist ein reversibler selektiver Hemmer der MAO-A (Kim et al., 1997; Santillo et al., 2014), welcher unter anderem aus der Pflanze *Peganum harmala* gewonnen wird und bereits in der traditionellen Medizin zahlreiche Anwendungsbereiche fand (Farouk et al., 2008). Des Weiteren ist Harmine ein potentes Halluzinogen (Nakagawa et al., 2010) und hat aufgrund der zentralen MAO-A-Hemmung antidepressive Effekte (Fortunato et al. 2010), wird aufgrund von Nebenwirkungen wie Agitiertheit, Herzrhythmusstörungen und Halluzinationen jedoch derzeit nicht als Antidepressivum verwendet. In Studien

haben sich antineoplastische (EL Gendy und El-Kadi, 2009) und antinozizeptive Effekte (Farouk et al., 2008) sowie eine Hemmung der DNA-Topoisomerase durch Harmine gezeigt (Cao et al., 2013). Cao et al. (2011) konnten an humanen Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HepG2-Zellen) eine Hemmung der Zellproliferation und eine Steigerung der Apoptoserate durch Harmine, vermittelt durch Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung und Downregulation antiapoptotischer Faktoren wie BCL-2 nachweisen. Auch Zhang et al. (2014) konnten an einem Modell zum Magenkarzinom eine Hemmung von Zellproliferation, Migration und Invasivität sowie eine Steigerung der Apoptose und eine Hemmung von Tumorwachstum durch Harmine zeigen. Diese Effekte wurden über eine Hemmung der Expression von COX-2, PCNA, BCL-2 und MMP-2 sowie über eine Steigerung der BAX-Expression vermittelt (Zhang et al., 2014). Liu et al. (2017) konnten zeigen, dass Harmine eine antiinflammatorische Wirkung über Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges zeigt, was mit erniedrigten Serumleveln von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 einhergeht.

Aufgrund der zonalen Verteilung der Monoaminoxidasen in der Leber (Huang et al., 2008) stellt sich die Frage, ob eine eventuelle entzündliche MAO-Hochregulierung in der periportalen oder perivenösen Zone der Leber im Rahmen der Tumorkachexie mit einhergehender MAO-induzierter Leberzellschädigung (Nocito et al., 2007) eine Bedeutung für Harnstoffsynthese, Glutamatscavenging und Glutaminsynthese hat. Dies ist bisher nicht untersucht und Gegenstand dieser Arbeit. In diesem Kontext sollen die Effekte einer MAO-A-Inhibition mit HH auf hepatische Faktoren der Tumorkachexie an einem Mausmodell des Kachexie-induzierenden Pankreaskarzinoms untersucht werden.

### **1.4 Hepatische Faktoren der Tumorkachexie**

#### **1.4.1 Anatomie und Funktion der Leber**

Mit einem Gewicht von 1,5 kg stellt die Leber die größte Drüse des menschlichen Körpers dar (Lippert, 2003). Im rechten Oberbauch gelegen, wird die Leber in vier Lappen unterteilt: Lobus hepatis dexter und sinister sowie Lobus caudatus und Lobus quadratus. Ca.  $\frac{1}{4}$  der Leberdurchblutung erfolgt

über die Arteria hepatica propria, welche sauerstoffreiches Blut transportiert. Ca.  $\frac{3}{4}$  der Leberdurchblutung erfolgt über die Vena portae, welche sauerstoffarmes, nährstoffreiches Blut aus den Bauchorganen zuführt. Die abführenden Gefäße bilden die Zentralvenen, welche über Sammelvenen in die Vv. hepaticae einmünden. Eine bindegewebige Kapsel (Tunica fibrosa) überzieht das Organ, von welcher bindegewebige Trabekel ins Organinnere ziehen, die Blutgefäße mit sich führen und den mikroskopischen Aufbau des Organs (Abb. 2 und 3) bestimmen (Lippert, 2003). Als kleinste Funktionseinheiten der Leber fungieren das Leberläppchen (Zentralvenen-Leberläppchen) und das Portalvenen-Leberläppchen (Lippert, 2003). Das Zentrum des sechseckigen Zentralvenen-Leberläppchens bildet als abführendes Blutgefäß die Zentralvene, ein Ast der Lebervene. Zwischen den Leberläppchen verlaufen die zuführenden Blutgefäße A. interlobularis und V. interlobularis, welche Äste der A. hepatica propria bzw. der V. portae hepatis sind, sowie die ableitenden Gallengänge (Ductus interlobularis bilifer). Diese sog. Glisson-Trias oder Periportalfelder, bestehend aus A. und V. interlobularis und abführendem Gallengang, finden sich jeweils an den sechs Eckpunkten des Leberläppchens. Innerhalb des Leberläppchens lagern sich die Hepatozyten zu einschichtigen Balken zusammen, welche von den Sinusoiden umgeben sind. Diese werden aus den zuführenden Gefäßen gespeist und führen arterielles sauerstoffreiches Blut sowie venöses nährstoffreiches Blut mit sich und münden schließlich in die Zentralvenen (Lüllmann-Rauch, 2012). Die Wand der Sinusoide ist mit diskontinuierlichem Endothel sowie mit phagozytierenden Kupffer-Zellen ausgekleidet, welche zu den Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems gezählt werden. Zwischen den Sinusoiden und den Hepatozyten verbleibt der ca. 0,5-2  $\mu\text{m}$  breite Perisinusoidalraum, in welchem Fettspeicherzellen (Ito-Zellen) lokalisiert sind, die sich in Fibroblasten umwandeln können, weshalb ihnen eine wichtige Rolle u.a. bei der Entwicklung der Leberzirrhose zugeschrieben wird (Lippert, 2003). Dem Blutfluss entgegengesetzt erfolgt der Gallefluss durch apikal der Hepatozyten gelegene Gallekanälchen, welche vom Zentrum des Leberläppchens ausgehend in der Peripherie in die interlobuläre Gallengänge münden, die Teil der Glissontrias



sind. Eine funktionelle Einheit stellt der Leberazinus dar, welcher sich rhombenförmig zwischen zwei Zentralvenen und den benachbarten Glisson-Trias aufspannt und alle Zellen einschließt, die von einem Gefäß der terminalen Strombahn versorgt werden. Innerhalb des Azinus können drei Zonen unterschieden werden, welche sich anhand der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen unterscheiden (Abb. 4). In der zentralen Zone 1 des Azinus ist die Versorgung am besten. Dies ist gleichzeitig die periphere Zone eines Leberläppchens. Nach der intermediär versorgten mittleren Zone 2 schließt sich die am schlechtesten versorgte Zone 3 in der Peripherie des Azinus an, welche gleichzeitig den zentralen Bereich des Leberläppchens um die Zentralvene darstellt (Lüllmann-Rauch, 2012).

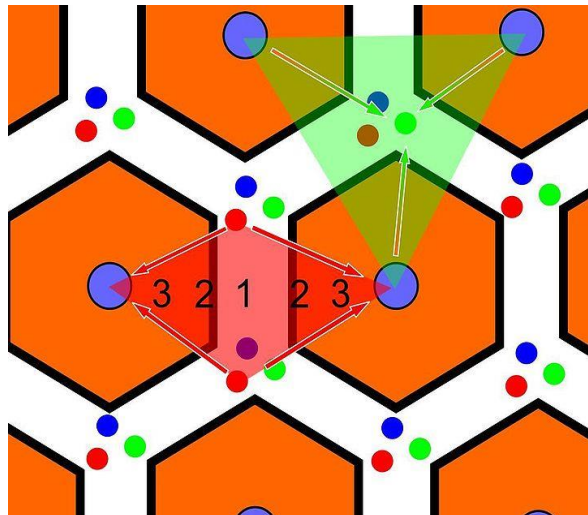


Abbildung 2: Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus der Leber (Wikibooks, 2011)

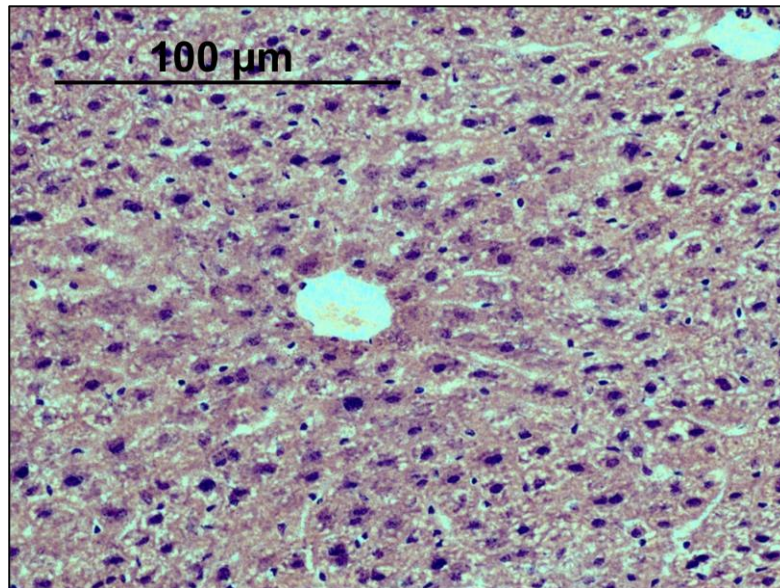


Abbildung 3: HE-Färbung Zentralvene; Originalvergrößerung x200

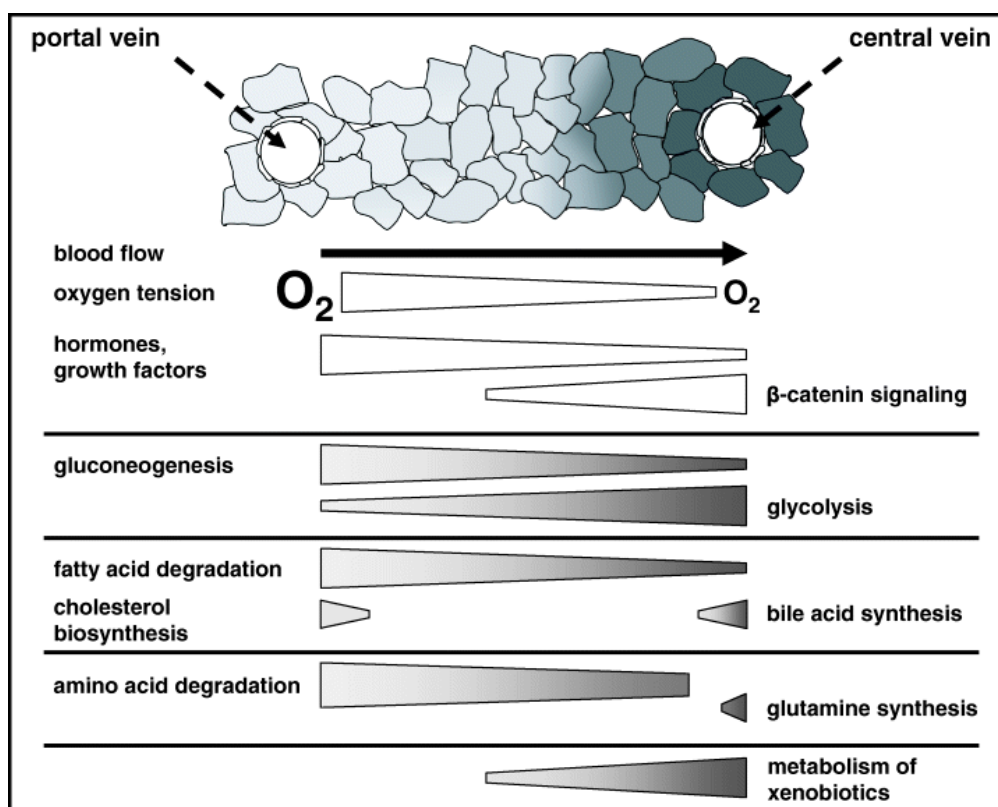


Abbildung 4: Zonale Verteilung metabolischer Prozesse in der Leber (Braeuning et al., 2006)

Die Leber übernimmt vielfältige Funktionen im Stoffwechsel. Sie ist u.a. für den Aufbau von Plasmaproteinen und Enzymen aus Aminosäuren zuständig und im Rahmen des Harnstoffzyklus am Abbau von Aminosäuren beteiligt, welche

durch Proteolyse im Muskel anfallen. Ebenso erfolgen in der Leber Aufbau, Speicherung und Abbau von Glykogen sowie die Neusynthese von Glukose aus Laktat und Produkten aus dem Proteinabbau (Koolmann und Röhm, 2009). Am Fettstoffwechsel ist die Leber durch Auf- und Abbau von Fettsäuren, Phospholipiden und Cholesterin sowie durch die Bildung der für die Fettverdauung im Darm benötigten Gallenflüssigkeit beteiligt. Des Weiteren erfolgt in der Leber die Synthese von Serumproteinen wie Albumin, Akute-Phase-Proteinen und Gerinnungsfaktoren. Eine weitere Funktion der Leber stellt die Biotransformation mit Inaktivierung von Stoffwechselabfallprodukten und Fremdstoffen wie beispielsweise Pharmaka durch Oxidation, Reduktion, Hydroxylierung und Konjugation dar (Koolmann und Röhm, 2009).

### **1.4.2 Die Rolle der Leber bei Tumorkachexie**

Die Leber spielt eine zentrale Rolle für die Regulierung des Körperstoffwechsels. Dabei besteht eine Interaktion mit der Skelettmuskulatur bzgl. des Aminosäure- und Kohlenhydratstoffwechsels, was pathophysiologisch im Hinblick auf katabole Zustände wie die Tumorkachexie von Bedeutung ist (Argilés et al., 2001). Der gesteigerte Katabolismus in Skelettmuskel und Fettgewebe sowie die generalisierte Entzündungsreaktion bei Tumorkachexie führen zu einer Aktivierung der Leber (Schmitt et al., 2007), indem durch Proteolyse im Skelettmuskel freiwerdende Aminosäuren von der Leber aufgenommen und für die Synthese von Akute-Phase-Proteinen oder für die Glukoneogenese (Noguchi et al., 1999) verwendet werden. Diese durch Proteolyse freigesetzten Aminosäuren dienen jedoch auch als Stickstoffquelle für das Wachstum des Tumors (Argilés et al., 2001).

Im Aminosäurestoffwechsel nimmt die Leber eine zentrale Rolle ein. Werden im Muskel Proteine durch Proteolyse zu Aminosäuren abgebaut, werden diese größtenteils in der Leber erneut zur Proteinsynthese genutzt (Argilés et al., 2001). Ein kleiner Anteil der Aminosäuren wird jedoch auch zur Synthese von Nukleotiden, Ammoniak und zur Energiegewinnung verwendet sowie in Form von Harnstoff über den Urin ausgeschieden (Koolmann und Röhm, 2009). Der Proteinmetabolismus wird durch Hormone wie das anabole Insulin und das

katabole Glukagon gesteuert. Während beim Gesunden ein Gleichgewicht zwischen Proteinaufbau und –abbau besteht, ist dieses bei Tumorkachexie gestört (Tisdale, 2009). Ursächlich könnte u.a. eine verminderte Insulinsensitivität im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion bei Tumorkachexie sein (Wang und Ye, 2015).

Auch der Glukosestoffwechsel ist im Rahmen von Tumorerkrankungen in vielfältiger Weise verändert. Bei Tumorpatienten treten metabolischen Veränderungen wie Glukoseintoleranz, Insulinresistenz, gesteigerte hepatischen Glukoneogenese und gesteigertes Glukoserecycling im Rahmen des Cori-Zyklus auf (Tayek, 1992). Bei Tumorkachexie besteht ein erhöhter Glukoseumsatz, welcher einerseits durch vermehrte Verstoffwechslung, andererseits durch erhöhte hepatische Glukoneogenese bedingt ist (Argilés et al., 2001). Tumorzellen metabolisieren große Mengen Glukose und Glutamin zur Produktion von Aminosäuren, Ribonukleotiden, Laktat, Glutathion und Ammonium-Ionen durch Glutaminolyse. Glutamin ist somit eine essentielle Grundlage anaboler Stoffwechselvorgänge in Tumorzellen. Kann der erhöhte Glutaminverbrauch des Tumors nicht ausreichend gedeckt werden, wird Glutamin durch Proteolyse aus dem Skelettmuskel gewonnen. Das Glutamin wird durch die tumoreigene Glutaminase abgebaut, wobei Glutamat entsteht, welches der Synthese des Antioxidans Glutathion dient. Dieses schützt die Tumorzelle vor Schädigungen, z.B. durch Radio- oder Chemotherapie (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Im Rahmen des Tumorwachstums setzen Tumorzellen Laktat als anaerobes Produkt des Energiestoffwechsels frei. In der Leber wird dieses Laktat zu Glukose recycelt, wobei sechs Moleküle ATP verbraucht werden. Dieser Prozess ist energetisch ineffizient, jedoch notwendig zur Kompensation der durch Laktat entstehenden Azidose. Die im Rahmen dieses, als Cori-Zyklus bezeichneten, Kreislaufs von der Leber produzierte Glukose wird anschließend erneut von Tumorzellen zur Energiegewinnung genutzt (Argilés et al., 2001). Des Weiteren findet in Tumorzellen eine gesteigerte Glykolyse (Abbau von Glukose zur ATP-Gewinnung), insbesondere in Form der ineffizienten aeroben Glykolyse (Warburg-Effekt) sowie eine vermehrte Translokation von Glutamintransportern in die Zellmembran statt,

was zu einem Anstieg des intrazellulären Glutamins führt. Durch den Warburg-Effekt fallen große Mengen Laktat an, welches anschließend, wie bereits beschrieben, über den Cori-Zyklus in der Leber zur Synthese von Glukose verwendet wird (Schcolnik-Cabrera et al., 2017).

Die hepatische Proteinsynthese ist bei Tumorerkrankungen gesteigert, was Lundholm et al. (1978 und 1979) sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten zeigen konnten. Diese wiesen außerdem eine erhöhte Aktivität proteinabbauender lysosomaler Enzyme in der Leber auf (Lundholm et al., 1980). Bei tumortragenden Tieren konnte bei insgesamt erhöhter Proteinsynthese (Argilés et al., 2001) in der Leber eine Verschiebung zu erhöhter Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie CRP, Procalcitonin, Haptoglobin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin bei gleichzeitiger Abnahme der Albuminsynthese und daraus resultierender Hypoalbuminämie gezeigt werden (Kern und Norton, 1988). Schmitt et al. (2007) bestätigten die erhöhte hepatische Proteinsynthese bei Patienten mit Tumorkachexie. Die Auswirkungen von Tumorerkrankungen auf den Energiestoffwechsel der Leber zeigt eine Studie von Dumas et al. (2011), in welcher im Tiermodell bei Peritonalkarzinose eine Reduktion der oxidativen Phosphorylierung und damit der Energiegewinnung in den Lebermitochondrien, verbunden mit einem erhöhten Energieverbrauch (und somit auch erhöhtem Sauerstoffverbrauch) und der Entstehung von Sauerstoffradikalen nachgewiesen wurde.

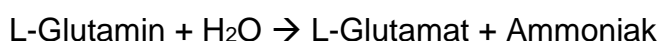
In einer Studie konnte Harrison (1952) eine Abnahme des Glykogengehaltes der Leber sowie eine Schrumpfung der Hepatozyten durch Verlust von Zytosol während Hungerperioden zeigen. Narsale et al. (2015) konnten ebenfalls eine Abnahme des Glykogengehaltes der Leber bei Mäusen mit Tumorkachexie zeigen, des Weiteren wiesen sie eine erhöhte Expression von Enzymen der Glykolyse und Glukoneogenese nach. Interessanterweise zeigt sich bei Tumorkachexie - im Gegensatz zu der von Harrison (1952) beschriebenen Schrumpfung der Hepatozyten bei Hungerperioden - eine Hypertrophie der Leber, obwohl die Effekte von Mangelernährung und Inflammation eigentlich zu einer Reduktion von Lebermasse führen sollten (Liefers et al., 2009). Narsale

et al. (2015) vermuten, dass die Leberzellhypertrophie durch den erhöhten Grundumsatz sowie die gesteigerte metabolische Aktivität der Leber zum Fortschreiten der Tumorkachexie beiträgt. Eine gesteigerte hepatische Entzündungsreaktion konnten Martignoni et al. (2009) bei PDAC-Patienten mit Kachexie im Vergleich zu PDAC-Patienten ohne Kachexie anhand des Nachweises einer vermehrten Infiltration durch Makrophagen zeigen. Aktivierte Makrophagen wiederum können durch Produktion von IL-6 die Synthese von Akute-Phase-Proteinen stimulieren (Castell et al., 1989). Teli et al. (1995) beschrieben bei Patienten mit Tumorkachexie Leberveränderungen im Sinne einer Steatosis hepatis.

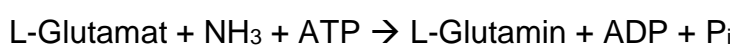
Zusammenfassend nimmt die Leber durch Aufnahme und Verstoffwechslung der vom Skelettmuskel freigesetzten Aminosäuren sowie durch die Produktion von Akute-Phase-Proteinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Tumorkachexie ein.

### **1.4.2.1 Glutaminstoffwechsel bei Tumorkachexie**

Durch die Proteolyse im Muskel im Rahmen der Tumorkachexie wird Stickstoff in Form von Aminosäuren aus dem Muskel freigesetzt (Argilés et al., 2014). Die quantitativ häufigste Aminosäure im Körper ist Glutamin, welches vor allem dem Stickstofftransport zwischen den Organen dient (Watford, 2000). Außerdem wird es zur Nukleotidsynthese verwendet und ist damit essentiell in Situationen gesteigerter Zellteilung, zum Beispiel für Zellen des Immunsystems, jedoch auch als Substrat für Tumorwachstum (Medina et al., 1992). In der Leber wird Glutamin periportal durch das Enzym Glutaminase zu Glutamat und Ammoniak hydrolysiert, um Substrate für die Harnstoffsynthese und die Glukoneogenese bereitzustellen.



Die Glutaminsynthese aus Glutamat und Ammoniak hingegen erfolgt ATP-abhängig durch die perivenös lokalisierte Glutaminsynthetase (Watford, 2000).



Bezüglich der zonalen Verteilung in der Leber konnte Häussinger (1990) zeigen, dass neben der Glutaminase weitere Enzyme des Aminosäureabbaus wie die Transaminasen und die Enzyme des Harnstoffzyklus vermehrt in der periportalen Zone lokalisiert sind. Nach Häussinger (1990) erfolgt der Glutaminstoffwechsel in der Leber folgendermaßen: Über das portalvenöse Blut werden große Mengen Glutamin und Ammoniak an die Leber geliefert. Die periportalen Zellen verarbeiten den Großteil des Glutamins, welches über die Glutaminase und andere Enzyme abgebaut wird, sowie des Ammoniaks, welcher in den Harnstoffzyklus eingeschleust wird, zu Harnstoff. Ein Teil des Ammoniaks wird jedoch nicht in der periportalen Zone verstoffwechselt, sondern gelangt weiter in die perivenöse Zone. Durch die hier lokalisierte Glutaminsynthetase (GS) erfolgt dann eine effektive Detoxifikation des Ammoniaks durch Einbau in Glutamin (Häussinger, 1990). Über die beiden Enzyme Glutaminase und GS kann die Leber je nach Stoffwechsellage Glutamin für den Kreislauf bereitstellen, z.B. in Hungerperioden oder bei metabolischer Azidose, oder aus ihm eliminieren, z.B. bei erhöhter exogener Proteinzufuhr (Häussinger, 1990). Für die Glutaminase konnten Curthoys und Watford (1995) eine erhöhte Aktivität bei Diabetes, Mangelernährung oder proteinreicher Diät sowie eine erniedrigte Aktivität bei proteinarmer Diät nachweisen. Die GS-Aktivität ist vermindert bei Leberatrophie als Folge von Energie- und Proteinrestriktion, wobei dies durch eine Abnahme der GS-positiven Zellen, nicht durch eine Abnahme der Enzymaktivität selbst in den Zellen bedingt zu sein scheint (Lie-Venema, 1997).

Im Rahmen kataboler Zustände wie Tumorkachexie kommt es einerseits zu einem starken Anstieg des Glutaminbedarfs durch Zellen des Immunsystems (Argilés et al., 2001). Andererseits benötigen auch Tumorzellen Glutamin zur Energiegewinnung und um Makromoleküle für das Tumorstadium bereitzustellen (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Glutaminfreisetzung aus dem Skelettmuskel durch Muskelkatabolismus und negative Stickstoffbilanz bei Tumorkachexie führt also zur Bereitstellung von Glutamin, welches als Substrat des Tumorstadiums dient (Argilés et al., 2001). Bei Patienten mit Tumorkachexie wurden verminderte Glutamin- sowie erhöhte Glutamatlevel bei

einer negativen Stickstoffbilanz im Blutplasma nachgewiesen (Holm et al., 2007), woraus Muskelkatabolismus resultieren kann (Kinscherf et al., 1996). Neben seiner Funktion als Stickstofflieferant hemmt Glutamin das proteinkatabole Myostatin (Bonetto et al., 2011; Hakvoort et al., 2017).

Trotz der zentralen Rolle des Glutaminstoffwechsels bei Tumorkachexie sind insbesondere die hepatischen Veränderungen des Glutaminstoffwechsels bei Tumorkachexie nur wenig untersucht. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit Veränderungen der hepatischen GS sowie von hepatischen Glutamin- und Glutamattransportern bei Tumorkachexie näher charakterisiert werden.

### **1.4.2.1.1 Glutaminsynthetase**

Das Enzym Glutaminsynthetase wird im Körper in Leber, Skelettmuskulatur, Fettgewebe und weiteren Organen (Wang und Watford, 2007) sowie in Tumorzellen (Pilkington und Lantos, 1982) exprimiert. Die GS katalysiert die ATP-abhängige Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). Als einziges Enzym ist die GS in der Lage, Glutamin zu synthetisieren, wodurch gleichzeitig eine Detoxifikation von Glutamat und Ammoniak erfolgt. Van Straaten et al. (2006) zufolge dient in Organen mit hoher zellulärer GS-Konzentration die GS vor allem dem Abbau von Glutamat und Ammoniak, in Organen mit geringer zellulärer GS-Konzentration hingegen vor allem der Glutaminproduktion. Die höchste GS-Aktivität konnten van Straaten et al. (2006) im Mausmodell in perivenösen Hepatozyten nachweisen, sodass in der Leber vor allem die Entgiftungsfunktion der GS im Vordergrund zu stehen scheint. In der Leber ist die GS streng perivenös lokalisiert. Gebhardt und Mecke (1983) konnten zeigen, dass die GS in einer schmalen Zellschicht (1-3 Zelllagen) um die Zentralvenen lokalisiert ist. Somit exprimieren nur ca. sieben Prozent der Hepatozyten eines Leberazinus GS (Rémésy et al., 1997). Aufgrund der Leberarchitektur ist die perivenöse Zone die am wenigsten mit Sauerstoff versorgte Zone der Leber, welche somit als erste von einem periportalen Mehrverbrauch an Sauerstoff durch gesteigerte Synthese von Akute-Phase-Proteinen (Schmitt et al., 2007) und Harnstoff (Gross et al., 1996) sowie gesteigerte Glykolyse und Glukoneogenese (Tayek, 1992) bei



Tumorkachexie, betroffen ist (Jungermann und Kietzmann, 2000). Denkbar ist auch, dass es durch erhöhten periportalen Stickstoffverbrauch im Rahmen der gesteigerten Protein- und Harnstoffsynthese zu einem perivenöse Substratmangel für die GS kommt. Wie Chance et al. (1991) an Ratten zeigen konnten, ist Hyperammonämie eine wesentliche metabolische Veränderung bei Tumorkachexie, was nahelegt, dass die Ammoniak-Detoxifikation, welche durch die GS erfolgt, bei Tumorkachexie gestört sein könnte. Die erhöhten Ammoniakspiegel bei Tumorkachexie können zu proteinanaboler Resistenz im Skelettmuskel beitragen (Dasarathy und Merli, 2016). Eine reduzierte hepatische GS-Aktivität konnte bei Leberatrophie durch Energie- und Proteinrestriktion beobachtet werden (Watford, 2000). Nach Lie-Venema (1997) beruht dieser Effekt auf einer Reduktion der GS-positiven Zellen, nicht auf einer Reduktion der Enzymaktivität pro Zelle. Durch kalorienrestriktive Ernährung konnte Spindler (2001) im Mausmodell eine Verminderung der GS-Aktivität sowie der -mRNA in der Leber nachweisen. Durch Elimination der hepatischen GS-Expression konnten Hakvoort et al. (2017) eine Reduktion der Muskelmasse im Mausmodell zeigen. Die GS ist das wichtigste Glutamat- und Ammoniak-Scavenging-System des Körpers (Hakvoort et al., 2017).

Eine mögliche Hemmung der GS im Rahmen der Tumorkachexie könnte insofern relevant sein, als Glutamin im Muskel eine Hemmung der TNF- $\alpha$ -vermittelten Proteolyse und Myostatinaktivierung zu bewirken scheint (Bonetto et al., 2011). Denkbar wäre somit, dass erniedrigte Glutaminspiegel durch erniedrigte GS-Aktivität in der Leber den Proteinkatabolismus im Muskel und damit die Kachexieentwicklung weiter mitunterhalten. Da durch Überexpression der GS eine effektive Steigerung der Ammoniak-Detoxifikation gezeigt werden konnte (Soria et al., 2019), stellt die GS möglicherweise auch ein therapeutisches Target in der Therapie der Tumorkachexie dar. Zusammenfassend ist aufgrund der vielfältigen Veränderungen des Glutaminmetabolismus bei Tumorkachexie eine zentrale Rolle der GS in der Kachexieentstehung anzunehmen. Diese ist jedoch vergleichsweise wenig untersucht und aus diesem Grund Gegenstand dieser Arbeit.

### **1.4.2.2 Aminosäuretransporter**

Da die Veränderungen des Glutaminmetabolismus bei Tumorkachexie möglicherweise nicht allein von Veränderungen von Enzymen der Glutaminsynthese und des Glutaminabbaus, sondern auch von der zonalen Verfügbarkeit dieser Metabolite abhängen, wurden in dieser Arbeit weitere hepatische Faktoren des Glutamin- und Glutamatstoffwechsels betrachtet. Aufgrund seiner Rolle für Glutamin- und Glutamat-Transport und -Metabolismus wurde Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) untersucht (Renga et al. 2011). Des Weiteren wurde die Expression des Glutamintransporters SLC1A5 betrachtet, welcher abhängig von der Glutaminverfügbarkeit exprimiert wird (Bungard und McGivan, 2004). Aufgrund der Kolokalisation des Ammoniumtransporter RhBG (Weiner und Verlander, 2003) sowie der Glutamatttransporter SLC1A2 (Hu et al., 2018) und SLC1A4 (Hashimoto et al., 2004) mit der GS in den perivenösen Hepatozyten kommt diesen Transportern möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der Stoffwechselveränderungen bei Tumorkachexie zu. Eine in dieser Arbeit vermutete Schädigung der perivenösen Zone der Leber bei Tumorkachexie würde vermutlich zu einer veränderten Expression der genannten Transporter führen. Dies soll daher in dieser Arbeit untersucht werden.

#### **1.4.2.2.1 FXR**

Eine wichtige Rolle im Glutamin- und Glutamatstoffwechsel der Leber spielt Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor aus der Familie der Kernrezeptoren (Renga et al., 2011). FXR ist in der Leber hoch exprimiert, wo er an der Regulation von Genen für die Gallensäure-Synthese, den Cholesteroll-, Lipid- und Glukosemetabolismus sowie für Detoxifikation und Exkretion beteiligt ist (Koutsounas et al., 2012). Des Weiteren wird FXR eine Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose, nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung, entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei Apoptose und Tumorerkrankungen zugeschrieben (Koutsounas et al., 2012). So konnte im Mausmodell die Entstehung hepatozellulärer Karzinome bei FXR-Knockout-Mäusen beobachtet werden (Kim et al., 2007). Guo et al. (2015) beschreiben eine Funktion von FXR als Tumorsuppressor beim hepatozellulären Karzinom,

welche durch FXR-induzierte Hochregulation von SOCS-3 vermittelt wird. Des Weiteren wurde beschrieben, dass FXR-Aktivierung die NF $\kappa$ B-vermittelte hepatische Inflamationsreaktion hemmt (Wang et al., 2008). Auch für die Regulation von Transport und Verstoffwechslung von Glutamin und Glutamat in der Leber spielt FXR eine wichtige Rolle (Renga et al., 2011). Glutamin wird über den Transporter SLC1A5 in die periportalen Hepatozyten aufgenommen und dort durch die Glutaminase durch hydrolytische Desaminierung zu Glutamat und Ammoniak abgebaut (Renga et al., 2011). Glutamat wird entweder in N-Acetylglutamat umgewandelt, welches als Co-Faktor der Carbamoylphosphatsynthetase, des Schlüsselenzyms der Harnstoffsynthese, fungiert, oder es erfolgt die Umwandlung von Glutamat in  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase, wobei Ammoniak entsteht (Watford, 2000). Durch die Transporter SLC1A2 und SLC1A4 erfolgt die Aufnahme von Glutamat in die perivenösen Hepatozyten, wo Glutamat zur Glutaminsynthese durch die GS verwendet wird (Braeuning et al., 2006). Renga et al. (2011) konnten zeigen, dass Aktivierung von FXR zu Steigerung der N-Acetylglutamatsynthetase-Transkription sowie der Harnstoffproduktion führt. In FXR-Knockout-Mäusen konnten Renga et al. (2011) eine signifikante Downregulation der Expression des Glutamintransporters SLC1A5, der Glutaminase sowie der N-Acetylglutamatsynthetase nachweisen, während die Expression der Glutamattransporter SLC1A2 sowie SLC1A4, der Carbamoylphosphatsynthetase sowie der GS im Vergleich zum Wildtyp unverändert war. Im Blutplasma der untersuchten FXR-Knockout-Mäuse waren erhöhte Ammoniak- und erniedrigte Harnstoffspiegel nachweisbar (Renga et al., 2011).

Aufgrund der regulatorischen Rolle, welche FXR im Rahmen des Glutamin- und Glutamatmetabolismus sowie der Harnstoffsynthese in Hepatozyten spielt, sind Veränderungen der FXR-Expression bei Tumorkachexie anzunehmen. Bisher existieren hierzu jedoch keine Daten, weshalb Veränderungen von FXR bei Tumorkachexie in dieser Arbeit erstmals untersucht werden sollen.

### **1.4.2.2.2 Ammoniumtransporter: RhBG**

RhBG (Rhesus family B Glycoprotein) gehört zur Rh-Glykoproteinfamilie, einer Gruppe spezifischer Ammonium-(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)-Transporter (Nakhoul und Lee Hamm, 2013). In der Leber findet die Detoxifikation des u.a. aus dem Darm stammenden Ammoniaks durch Verstoffwechslung zu Harnstoff oder Glutamin statt. Dies geschieht einerseits über in periportalen und mittelzonalen Hepatozyten erfolgende Umwandlung von Ammoniak in Harnstoff und andererseits über Metabolisierung von Ammoniak zu Glutamin in den perivenösen Hepatozyten.

Sowohl in der menschlichen Leber (Liu et al., 2001) als auch in der Leber von Mäusen (Weiner und Verlander, 2003) konnte eine Expression von RhBG nachgewiesen werden. Dabei zeigten Weiner und Verlander (2003) eine hepatische mRNA-Expression von RhBG ebenso wie eine basolaterale Immunreaktivität von RhBG in perivenösen Hepatozyten von Mäusen, während in periportalen oder in der Mittelzone gelegenen Hepatozyten keine RhBG-Immunreaktivität feststellbar war. Auch konnten Weiner et al. (2003) eine Kolo-kalisation von RhBG-Immunreaktivität mit der GS in perivenösen Hepatozyten zeigen. So war RhBG-Immunreaktivität ausschließlich in Hepatozyten mit GS-Expression vorhanden und in allen Hepatozyten mit GS-Immunreaktivität war auch RhBG-Immunreaktivität nachweisbar (Weiner et al., 2003). Qvartskhava et al. (2019) konnten im Mausmodell zeigen, dass eine Down-Regulation des Ammonium-Transporters RhBG die Glutaminsynthese in der Leber von Mäusen limitiert und somit zu einer Hyperammonämie führen kann. Aufgrund der Veränderung der hepatischen GS-Expression im Rahmen der Tumorkachexie sind auch Veränderungen der Expression des kolokalisierten Ammoniumtransporters RhBG zu vermuten und werden in dieser Arbeit untersucht.

### **1.4.2.2.3 Glutamattransporter: SLC1A2**

SLC1A2 (Solute Carrier Family 1 Member 2) wird auch als EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporter 2) oder GLT-1 (Glutamattransporter 1) bezeichnet (Zhou und Danbolt, 2013). SLC1A2 ist ein Glutamattransporter, welcher vor

allem im ZNS vorkommt. Dort ist SLC1A2 als astrogliales Protein für die Aufnahme von Glutamat aus dem Extrazellulärraum zuständig (Berger und Hedinger, 2006) und übernehmen damit eine zentrale Rolle in der glutamatergen Neurotransmission. Laut Studien führt eine SLC1A2-Dysfunktion über Anstieg des extrazellulären Glutamats zu neurotoxischen Effekten und könnte dadurch für neurologische Störungen wie Amyotrophe Lateralsklerose (Li et al., 2011) oder Morbus Alzheimer (Meeker et al., 2015) mitverantwortlich sein.

Hu et al. (2018) konnten zeigen, dass das SLC1A2-Protein auch in der Leber von Mäusen exprimiert wird. Als Lokalisation konnten die Hepatozyten in der ersten bis dritten Zellreihe um die Zentralvenen identifiziert werden und in Doppelfärbungen wurde nachgewiesen, dass SLC1A2 in der Plasmamembran GS-positiver Zellen lokalisiert ist (Hu et al., 2018). Somit besteht eine Kolokalisation des Glutamattransporters SLC1A2 und der hepatischen GS, welche aus dem aufgenommenen Glutamat Glutamin synthetisiert. In der Leber scheint SLC1A2 also eine Rolle im Rahmen der Glutamataufnahme für metabolische Prozesse und der Umwandlung in Glutamin zu spielen (Berger und Hedinger, 2006). Körperzellen benötigen Glutamin als Stickstoff- und als Energiequelle. Während der Muskel den größten Anteil der freien Aminosäuren im Blut generiert, erfolgt in der Leber über den Harnstoffzyklus die Beseitigung stickstoffhaltiger Stoffwechselabfallprodukte. Aus dem Muskel freigesetzte Aminosäuren wie Glutamin gelangen über den Blutweg zu den periportal Hepatozyten, welche Glutamin aufnehmen und zu Glutamat und Ammoniak abbauen. Das so entstandene Glutamat gelangt erneut in den Körperkreislauf. Ein Teil dieses Glutamats scheint jedoch durch den in perivenösen Hepatozyten lokalisierten Glutamattransporter SLC1A2 wieder aufgenommen und in diesen Zellen durch die GS zu Glutamin umgewandelt zu werden, welches dann erneut im Körperkreislauf zur Verfügung steht (Berger und Hedinger, 2006).

Im Bezug auf die Wirkung von Harmine konnten Li et al. (2011) in astroglialen Zellen im Tiermodell eine Steigerung der Genexpression von SLC1A2 und damit der funktionellen Glutamataufnahme durch Harmine zeigen. Auch Sun et

al. (2014) konnten neuroprotektive Effekte von Harmine nach ischämischen Schlaganfällen durch Steigerung der Expression von SLC1A2 zeigen.

Veränderungen der SLC1A2-Expression in der Leber bei Kachexie sowie eine mögliche Beeinflussung der hepatischen SLC1A2-Expression durch Harmine sind bisher nicht untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

#### **1.4.2.2.4 SCL1A4**

SLC1A4 (Solute Carrier Family 1 Member 4) gehört zur SLC1-Familie und ist ein Transporter für kleine neutral geladene Aminosäuren wie Alanin (durch welches auch Ammonium transportiert wird), Serin, Cystein und Threonin (Kanai und Hedinger, 2003), aber auch für Glutamat (Braeuning et al., 2006). Synonym wird die Bezeichnung ASCT1 (Alanin-Serin-Cystein-Transporter 1) verwendet (Kanai und Hedinger, 2003). Die Expression des Transporters ist vor allem im Gehirn beschrieben, Hashimoto et al. (2004) konnten jedoch ein Vorkommen von SLC1A4 auch in zahlreichen nicht-neuronalen Geweben, u.a. in der Leber, nachweisen. So zeigte sich in der Arbeit von Hashimoto et al. (2004) eine SLC1A4-Immunreaktivität in der Plasmamembran perivenöser Hepatozyten im Lebergewebe von Mäusen. Auch Braeuning et al. (2006) beschrieben in der Leber eine perivenöse Lokalisation von SLC1A4. Die Kolokalisation von SLC1A4 in perivenösen Hepatozyten mit der GS, welche für die Synthese von Glutamin aus Glutamat Ammoniumionen bindet, legt nahe, dass SCL1A4 für die Ammoniak-Entgiftung, z.B. über die Aufnahme der neutralen Aminosäure Alanin, welche als Mittel des Ammoniumtransports fungiert, und anschließender Glutaminsynthese in den Hepatozyten von Bedeutung ist (Hashimoto et al., 2004).

Daten zur hepatischen Expression von SCL1A4 bei Tumorkachexie oder deren möglicher Beeinflussung durch Harmine-Behandlung sind bisher nicht veröffentlicht, weshalb die Expression von SLC1A4 bei Tumorkachexie in dieser Arbeit untersucht wurde.

### **1.4.2.2.5 Glutamintransporter: SLC1A5**

SLC1A5 (Solute Carrier Family 1 Member 5) ist ein Natrium-abhängiger Transporter für neutral geladene Aminosäuren und wird auch als ASCT2 (Alanin-Serin-Cystein-Transporter 2) bezeichnet, obwohl das bevorzugte Substrat des Transporters die Aminosäure Glutamin ist (Scalise et al., 2018). Als Aminosäuretransporter ist SLC1A5 in der Plasmamembran von Zellen in zahlreichen Gewebetypen lokalisiert (Scalise et al., 2018). In stark proliferierenden Zellen wie Stammzellen und Entzündungszellen konnte eine Steigerung der SLC1A5-Expression zur Deckung des erhöhten Glutaminbedarfs nachgewiesen werden (Scalise et al., 2018). Auch in verschiedenen Tumoren, u.a. beim humanen Magenkarzinom, Leberzellkarzinom und Nierenzellkarzinom, konnte eine gesteigerte SLC1A5-Expression nachgewiesen werden, auch hier a.e. aufgrund des erhöhten Glutaminbedarfs proliferierender Tumorzellen (Kasai et al., 2017). Sun et al. (2016) konnten immunhistochemisch eine starke Expression von SLC1A5 im Tumor bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) bei nur geringer Expression in angrenzendem tumorfreien Lebergewebe nachweisen. Für das HCC wird sogar postuliert, dass die Expression des Glutamintransporters SLC1A5 in der Zellmembran einen entscheidenden Schritt in der malignen Transformation darstellt (Bode et al., 2002) und essentiell für das Wachstum und Überleben der Tumorzellen ist (Fuchs et al., 2004). Während Bode et al. (2002) keine SLC1A5-mRNA-Expression in normalen humanen Hepatozyten nachweisen konnten, war diese in Proben von Lebertumoren sowie auch bei Leberzirrhose nachweisbar. Während in normalen Hepatozyten der Glutamintransport vor allem über das sogenannte System N erfolgt, konnten bei humanen HCC-Zellen ein stark gesteigerter Glutamintransport durch Expression von SLC1A5 (ASC-System), nachgewiesen werden, wodurch das glutaminabhängige Wachstum von HCC-Zellen ermöglicht wird (Bode et al., 2002). Die Expression von SLC1A5 scheint abhängig von der Verfügbarkeit von Glutamin zu sein. So konnten Bungard und McGivan (2004) in HepG2-Zellen eine Hochregulation der SLC1A5-Expression bei erhöhtem Glutaminangebot zeigen. Auch für das PDAC konnte eine verstärkte Expression von SLC1A5 in

Tumorzellen nachgewiesen werden, wodurch es zu einer gesteigerten Glutaminaufnahme in die Tumorzellen (Wang et al., 2019a) und damit einhergehend zu Tumorwachstum und einer Verschlechterung der Prognose kommt (Kaira et al., 2015). Während SLC1A5 aufgrund seiner gesteigerten Aktivität in zahlreichen Tumorentitäten als vielversprechender Prognosemarker und möglicher Angriffspunkt für Antitumortheraeutika diskutiert wird (Liu et al., 2018), sind mögliche Auswirkungen der umfassenden metabolischen Veränderungen bei Tumorkachexie auf die hepatische SLC1A5-Expression bisher nicht untersucht.

### **1.4.2.3 Monoaminoxidasen**

Monoaminoxidasen sind Enzyme der äußeren Mitochondrienmembran, welche für den Abbau von Monoaminen wie Serotonin, Adrenalin, Noradrenalin, Melatonin, Benzylamin und Dopamin durch oxidative Desaminierung zuständig sind. Dabei entstehen als Abbauprodukte reaktive Aldehyde, Ammoniak und Wasserstoffperoxid (Graham und Karnovsky, 1965). Man unterscheidet die Subtypen MAO-A und MAO-B. MAO-A metabolisiert vor allem Noradrenalin und Serotonin während MAO-B bevorzugt Benzylamin und Phenylethylamin abbaut. Tyramin, Tryptamin und Dopamin werden von beiden Isoformen gleichermaßen metabolisiert (Kalgutkar et al., 2001). Beide Subtypen sind vor allem im ZNS, aber auch in anderen Geweben lokalisiert (Santillo et al., 2014). Mit zunehmendem Alter zeigt sich erhöhte MAO-Expression, weshalb den Monoaminoxidasen eine Beteiligung am Alterungsprozess zugesprochen wird (Maggiorani et al., 2017). Im Tiermodell haben sich sogar Anhaltspunkte für eine verlängerte Lebenserwartung durch MAO-B-Inhibition ergeben (Stoll et al., 1997). MAO-B scheint bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten wie M. Parkinson und M. Alzheimer durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle zu spielen (Naoi et al., 2012). MAO-A/B-Knockout-Mäuse zeigten eine vermehrte Ängstlichkeit sowie ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zum Wildtyp (Chen et al., 2004). Bei MAO-A-Knockout-Mäusen konnte eine vermehrte Aggressivität nachgewiesen werden (Chen et al., 2004). Beim Menschen kommt es durch Ausfall der MAO-A im



Rahmen des Brunner-Syndroms zu vermehrter Aggressivität, Verhaltensauffälligkeiten und Intelligenzminderung (Brunner et al., 1993).

In der Leber konnte bei Ratten eine Expression sowohl von MAO-A also auch MAO-B (Lenzen et al., 1983) gezeigt werden. MAO-B wird laut Huang et al. (2008) bei Ratten in allen Hepatozyten exprimiert, wobei die Expression einer zonalen Verteilung folgt: in der gut mit Sauerstoff versorgten Periportalzone wird MAO-B stärker exprimiert als in der perivenösen Zentralzone. In Kupfer- und Endothelzellen konnten Huang et al. (2008) hingegen keine MAO-Expression nachweisen. Aufgabe der hepatischen Monoaminoxidasen ist der Abbau von Xenobiotika und mit der Nahrung aufgenommenen Aminen (Santillo et al., 2014). Bei inflammatorischen Lebererkrankungen wie der nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) konnte im Mausmodell eine vermehrte MAO-A-Expression nachgewiesen werden (Nocito et al., 2007). Diese führt über den Abbau von Serotonin zur Entstehung von Sauerstoffradikalen und darüber zu mitochondrialen Störungen, Zellschädigung und Inflammation (Nocito et al., 2007). In der gleichen Studie konnte durch MAO-A-Inhibition eine signifikante Senkung der Leberzellschädigung, gemessen an der Transaminasenfreesetzung, gezeigt werden.

Auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie dem Prostatakarzinom, dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), dem Glioblastom und dem Hodgkin-Lymphom, konnte eine erhöhte Aktivität der Monoaminoxidasen nachgewiesen werden, weshalb MAO-Hemmer als Antitumortheraeutika Gegenstand aktueller Forschung sind (Shih, 2018).

Im Bezug auf inflammatorische Prozesse scheinen Monoaminoxidasen ebenfalls eine Rolle zu spielen. So konnten Cathcart und Bhattacharjee (2014) eine Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch MAO-A nachweisen. Liu et al. (2017) konnten zeigen, dass der MAO-A-Hemmer Harmine über eine Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges eine antiinflammatorische Wirkung zeigt, was mit erniedrigten Serumleveln von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 einhergeht.

Am Beispiel Glukokortikoid-induzierter Sarkopenie, einem Kachexie-Modell,

konnten Manoli et al. (2005) MAO-A als Vermittler von Muskelzellschädigung durch Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies identifizieren.

In Zusammenschau dieser Befunde kann für die Monoaminoxidasen neben der Bedeutung bei der Entstehung von Tumorerkrankungen auch eine Rolle für die Entstehung von Kachexie vermutet werden. Aufgrund der zonalen Verteilung der Monoaminoxidasen in der Leber (Huang et al., 2008) stellt sich die Frage, ob eine eventuelle entzündliche MAO-Hochregulierung in der periportalen oder perivenösen Zone der Leber eine Bedeutung für Harnstoffsynthese, Glutamatscavenging und Glutaminsynthese im Rahmen der Tumorkachexie hat. Dies ist bisher nicht untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

### **1.4.2.4 Inflammation**

Chronische Inflammation wird als wesentlicher Mitverursacher der Tumorkachexie angesehen. Erhöhte Serumlevel proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 wurden bei Krebspatienten gefunden (Tishdale, 2009) und scheinen mit der Prognose einiger Tumorerkrankungen (Moses et al., 2009), sowie mit reduzierter Nahrungsaufnahme und Kachexieentwicklung zu korrelieren (Suzuki et al., 2013). Auch konnte in Tierversuchen durch Verabreichung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 (Strassmann et al., 1992) und TNF- $\alpha$  (Oliff et al., 1987) Kachexie ausgelöst werden.

Ein erhöhter Grundumsatz wird als wichtiger Faktor für die Entstehung von Tumorkachexie angesehen. Zu dem erhöhten Energieumsatz trägt u.a. eine chronische Entzündungsreaktion bei, z.B. durch Entstehung von Fieber und Wärmeproduktion aufgrund von Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe durch proinflammatorische Zytokine (Petruzzelli et al., 2014). Die chronische Inflammation geht mit einer verstärkten Produktion Akuter-Phase-Proteine wie CRP,  $\alpha$ 1-Antitrypsin und Fibrinogen in der Leber einher, welche zu Ungunsten der Albuminsynthese erfolgt und somit zu einer begleitenden Hypoalbuminämie beiträgt (Tisdale, 2009). Im Rahmen der chronischen Inflammationsreaktion werden Nährstoffe aus Fett- und Muskelgewebe mobilisiert, welche Tumorzellen aufgrund ihres schnellen Wachstums in hohem Maße zur Energiegewinnung benötigen (Fearon et al.,

2012). Die Tumorzellen nutzen proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , um die Einleitung kataboler Vorgänge in Muskulatur und Fettgewebe zu initiieren (Fearon et al., 2012). Die erhöhten Zytokinkonzentrationen im Blut resultieren dabei im Wesentlichen aus zwei Mechanismen: zum einen können Tumorzellen selbst Zytokine produzieren, so wie dies von Martignoni et al. (2005) für die Produktion von IL-6 durch Pankreaskarzinome beschrieben wurde. Des Weiteren erfolgt, insbesondere bei Tumorkachexie, eine vermehrte Produktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 durch körpereigene Immunzellen, die im Sinne einer Tumorabwehr zu verstehen ist (Argilés et al., 2014). In soliden Tumoren entsteht durch unzureichende Blutversorgung im Inneren des Tumors ein hypoxisches Milieu, wodurch eine chronische Inflamationsreaktion, u.a. durch Einwanderung von Makrophagen und Produktion von Zytokinen induziert wird (Hoesel und Schmid, 2013). Die proinflammatorischen Zytokine entfalten sowohl lokal als auch systemisch ihre Wirkung. So bewirken Zytokine im Hypothalamus eine Minderung des Appetits, woraus eine verminderte Nahrungsaufnahme resultiert (Grossberg et al., 2010). Aufgrund des erhöhten Energiebedarfs durch Tumorwachstum, Akute-Phase-Reaktion und gesteigerte Glukoneogenese in der Leber werden Energiereserven in Muskel- und Fettgewebe mobilisiert. So vermitteln z.B. Zytokine im Fettgewebe die Lipolyse zur Bereitstellung von Fettsäuren. Letztere wiederum nutzen jedoch auch Tumorzellen zur Synthese von Lipoproteinen und ATP (Petruzzelli et al, 2014). Durch zytokinvermittelte Proteolyse im Muskel stellt der Körper Energielieferanten in Form von Aminosäuren bereit. Diese werden einerseits u. a. von der Leber zur Glukoseproduktion durch Glukoneogenese genutzt, andererseits zur Proteinsynthese in Tumorzellen verwendet (Ye, 2013). Zusammenfassend entsteht bei Tumorkachexie ein Kreislauf aus verminderter Protein- und Nährstoffaufnahme bei gleichzeitig erhöhtem Bedarf durch die Akute-Phase-Reaktion, welcher durch tumorassoziierte hypoxische Zellschäden unterhalten (Wang und Ye, 2015) und durch Bereitstellung von Muskelprotein gedeckt wird und so die Kachexieentwicklung vorantreibt.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine und Entzündungsmediatoren genauer erläutert.

### **1.4.2.4.1 Interleukin-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem von im Blut zirkulierenden Monozyten und Makrophagen produziert wird und die Vermittlung der Entzündungsreaktion reguliert. So triggert IL-1 $\beta$  beispielsweise die Freisetzung von IL-6, welches wiederum die Akute-Phase-Reaktion in der Leber anstößt (Dinarello, 2005). Insgesamt sind für IL-1 $\beta$  erhöhte Serumlevel bei Patienten mit Tumorerkrankungen beschrieben (Baicus et al., 2012). IL-1 $\beta$  gilt neben IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und PIF als einer der Stimulatoren des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges und damit als Mediator in der Kachexieentstehung (Melstrom et al., 2007). Bei Patienten mit Tumorkachexie konnten Camargo et al. (2015) erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$  in subkutanem Fettgewebe nachweisen. Erniedrigte IL-1 $\beta$ -Serumlevel durch Ausschaltung des Toll-like-Rezeptor-4-Signalweges gingen im Mausmodell mit verminderter Kachexieentwicklung einher (Cannon et al., 2007). IL-1 $\beta$  scheint auch eine Rolle im Glukosestoffwechsel zu spielen. So konnte Metzger et al. (2004) im Mausmodell eine verminderte Glukoneogenese in der Leber bei gleichzeitig vermehrtem peripheren Glukoseabbau bei Mäusen mit IL-1 $\beta$ -produzierenden Tumoren zeigen. Damit einher gingen eine erniedrigte Nahrungsaufnahme sowie Gewichtsabnahme bei den betroffenen Tieren (Metzger et al., 2004). Im Bezug auf das in dieser Arbeit untersuchte Pharmakon Harmine ist relevant, dass durch Harmine-Behandlung eine Reduktion des IL-1 $\beta$ -Serumspiegels im Mausmodell gezeigt werden konnte (Liu et al., 2017).

### **1.4.2.4.2 Interleukin-6**

IL-6 ist ein Zytokin, welches von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Epithel- und Endothelzellen ausgeschüttet wird und u. a. in der Leber die Synthese von Akute-Phase-Proteinen vermittelt (Castell et al., 1989). Die Sekretion von IL-6 wird durch TNF- $\alpha$  induziert, mit welchem es die Ausschüttung weiterer Zytokine stimuliert (Tan et al. 2014). Verschiedene Studien legen einen Zusammenhang von IL-6 und der Entstehung von

Tumorkachexie nahe. So konnten erhöhte Konzentrationen des Zytokins bei verschiedenen Tumorerkrankungen, wie dem PDAC (Barber et al., 1999a) nachgewiesen werden und waren mit einem niedrigeren Körpergewicht und einem reduzierten Überleben assoziiert (Chen et al., 2016). Strassmann et al. (1992) konnte in einem Mausmodell zum Kolonkarzinom eine Korrelation von erhöhten IL-6-Serumleveln und Kachexieentstehung nachweisen. Durch IL-6-Antikörper konnte eine Steigerung des Körpergewichts bei Patienten mit Bronchialkarzinom gezeigt werden (Bayliss et al., 2011), ein Effekt, der auch bei Patienten, welche aufgrund rheumatischer Erkrankungen mit IL-6-Antikörpern behandelt werden, nachweisbar war (Younis et al., 2013). Aus diesem Grund sind IL-6-Antagonisten als Therapeutika der Tumorkachexie Gegenstand klinischer Forschung (Triakha et al., 2003; Prado und Qian, 2019).

Han et al. (2018) konnten eine gesteigerte Lipolyse im weißen Fettgewebe sowie eine vermehrte Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe durch IL-6 nachweisen, was ebenfalls zur Verstärkung der Tumorkachexie beiträgt. Ein weiterer möglicher Mechanismus der IL-6-vermittelten Kachexieentstehung ist die Aktivierung von STAT3 durch IL-6, welche zu Störungen der Mitochondrienfunktion führt (Wang et al., 2012). So konnte eine Blockade des IL-6-/STAT-Signalweges im Mausmodell eine verminderte Kachexieentwicklung bewirken (Miller et al., 2017). Auch eine IL-6-vermittelte Insulinresistenz wurde beschrieben (Senn et al., 2003), wobei die Insulinresistenz wiederum eine der metabolischen Veränderungen bei Tumorkachexie darstellt (Tisdale, 2010b). Für das PDAC wurden von Martignoni et al. (2005) deutlich erhöhte Serumspiegel von IL-6 beschrieben, welche einerseits durch eine von den Tumorzellen ausgehende vermehrte Produktion, andererseits durch ein starke Stimulation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, die vermehrt IL-6 ausschütten, bedingt sind. In der Leber konnten Catalano et al. (2003) im Tiermodell eine erhöhte Expression von IL-6 bei Ratten mit Tumorkachexie nachweisen. Auch Martignoni et al. (2009) zeigten in Leberproben von PDAC-Patienten mit Tumorkachexie immunhistochemisch eine prozentuale Erhöhung der IL-6-positiven Fläche im Vergleich zu PDAC-Patienten ohne Kachexie. Des Weiteren scheint IL-6 auch Veränderungen im Aminosäure-Stoffwechsel zu

bewirken, welche für die Kachexieentstehung von Bedeutung sind. So konnten Hack et al. (1996) am Tiermodell durch IL-6-Exposition ebenso wie durch Tumordinokulation intrahepatisch eine vermehrte Harnstoffsynthese sowie einen Anstieg des intrahepatischen Glutamats bei gleichzeitigem Abfall des intrahepatischen Glutamins zeigen.

Speziell für die Fragestellung dieser Arbeit ist interessant, dass durch Hormonebehandlung eine Reduktion des IL-6-Serumspiegels im Mausmodell nachgewiesen werden konnte (Liu et al., 2017).

### **1.4.2.4.3 TNF- $\alpha$**

Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Makrophagen produziert wird und Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie die Ausschüttung weiterer Zytokine wie IL-6 induzieren kann. TNF- $\alpha$  nimmt jedoch nicht nur in der Immunabwehr, sondern auch bei Sepsis, Autoimmunerkrankungen sowie bei der Entstehung der Tumorkachexie eine zentrale Rolle ein (Hehlgans und Pfeffer, 2005). So konnten Oliff et al. (1987) zeigen, dass durch Sekretion von TNF durch Tumorzellen im Mausmodell Kachexie ausgelöst werden kann. Zusammen mit PIF gilt TNF- $\alpha$  als Hauptverursacher der Skelettmuskelatrophie bei Kachexiepatienten (Tisdale, 2010b). Im Muskel führt TNF- $\alpha$  zu oxidativem Stress und damit zur Degradation von Muskelprotein und blockiert die Myogenese (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Zusammen mit IL-1 $\beta$  induziert TNF- $\alpha$  über Aktivierung von NF $\kappa$ B die Expression von Genen, welche mittels kataboler Signale über die muskelspezifischen Ubiquitin-Ligasen zu Proteolyse im Skelettmuskel führen (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Zudem stimuliert TNF- $\alpha$  die Lipolyse und hemmt als Inhibitor der Lipoproteinlipase die Fettsynthese (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). In der Leber konnten Catalano et al. (2003) im Tiermodell eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  bei Ratten mit Tumorkachexie nachweisen. Aufgrund der zentralen Rolle von TNF- $\alpha$  bei der Entstehung der Tumorkachexie wurde TNF- $\alpha$  in Studien als mögliches Target einer antikachektischen Therapie untersucht (Torelli et al., 1999). Die Gabe von TNF- $\alpha$ -Antagonisten wie Infliximab zeigte jedoch keinen positiven Effekt auf Appetit und Körpergewicht (Jatoi et al., 2010). Auch der

Aminosäurestoffwechsel scheint durch TNF- $\alpha$  beeinflusst zu werden. So konnten Blumberg et al. (1995) eine Steigerung der hepatischen Glukoneogenese, wie sie im Rahmen von Tumorkachexie zu beobachten ist, durch TNF- $\alpha$  sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen. Für Harmine konnten Li et al. (2018) im Gehirn von Mäusen einen antiinflammatorischen Effekt, u. a. durch Suppression von TNF- $\alpha$  zeigen. Im Mausmodell waren außerdem erniedrigte Serumlevel von TNF- $\alpha$  durch Harmine-Behandlung nachweisbar (Liu et al., 2017), was auf die in dieser Arbeit untersuchte Bedeutung von Monoaminoxidasen für die Kachexie-Entstehung hinweisen könnte.

#### **1.4.2.4.4 COX-1 und COX-2**

Cyclooxygenasen sind Enzyme, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Prostaglandinsynthese katalysieren (Oxidation von Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub>). Damit kommt ihnen eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungsprozessen zu. Man unterscheidet die beiden Isoenzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Während COX-1 konstitutiv in allen Gewebetypen vorkommt, wird COX-2 situativ vor allem von Makrophagen und Endothelzellen exprimiert, konnte aber auch in verschiedenen Tumorzellen vermehrt nachgewiesen werden (Taketo, 1998). Die Synthese von COX-2 wird vor allem im Rahmen von Entzündungen oder Verletzungen durch Zytokine induziert. Aus diesem Grund ergibt sich für selektive COX-2-Hemmer nicht das klassische Nebenwirkungsprofil der nicht-selektiven NSAR. Da in experimentellen Studien eine Stimulation von Apoptose sowie eine Hemmung der Angiogenese durch COX-Hemmer nachweisbar war, sind diese auch als Antitumorthapeutika in Diskussion (Thun et al., 2004). Des Weiteren wurden COX-Hemmer aufgrund der Bedeutung chronischer Entzündungsprozesse für die Entstehung von Tumorkachexie in Studien als mögliche Therapieoptionen untersucht (Mantovani und Madeddu, 2008). So konnten Lundholm et al. (2004) neben einer Reduktion inflammatorischer Marker eine Reduktion des Grundumsatzes sowie einen Erhalt des Körperfettanteils durch NSAR-Einnahme bei Patienten mit Tumorkachexie nachweisen. Auch Gridelli et al. (2007) konnten eine Verminderung des Gewichtsverlustes bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung durch

Einnahme von COX-Hemmern zeigen. Für den selektiven COX-2-Hemmer Meloxicam konnten Hussey und Tisdale (2000) im Mausmodell eine Wirksamkeit gegen die PIF-induzierte Proteolyse nachweisen. Zhang et al. (2014) konnten im Mausmodell eine Induktion von Apoptose sowie eine Hemmung von Zellproliferation, -migration und -invasion von Magenkarzinomzellen durch Harmine nachweisen, welche über eine Downregulation der COX-2-Expression vermittelt sein könnte.

### **1.4.2.4.5 CD68**

CD68 (Cluster of differentiation 68) ist ein vorwiegend intrazellulär in zytoplasmatischer Granula lokalisiertes Glykoprotein, welches besonders stark in Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, weshalb es in histologischen Untersuchungen als Makrophagenmarker verwendet wird. In den Sinusoiden der Leber befinden sich als ortsständige Gewebsmakrophagen die Kupffer-Zellen. CD68-positive Zellen sind neben der Antigenpräsentation für die Produktion von Entzündungsmediatoren in Form von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zuständig. Diese Zytokine wiederum werden, wie bereits erläutert, als prokachektische Faktoren angesehen (Tuca et al., 2013). In Studien konnte bei Magenkarzinompatienten mit Tumorkachexie ein vermehrter Nachweis des Makrophagenmarkers CD68 im subkutanen Fettgewebe gezeigt werden (Batista et al., 2016). Durch Martignoni et al. (2009) konnte bei PDAC-Patienten mit Tumorkachexie eine verstärkte Infiltration der Leber mit CD68-positiven Kupffer-Zellen nachgewiesen werden, wobei eine inverse Korrelation der Anzahl dieser CD68-positiven Makrophagen mit dem Ernährungsstatus des Patienten bestand. Aus diesem Grund kann ein Zusammenhang zwischen CD68-positiven Zellen in der Leber und den hepatischen Faktoren der Tumorkachexie vermutet werden. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit einschließlich des Einflusses einer MAO-A-Inhibition untersucht.

### **1.4.2.4.6 SOCS-3**

SOCS-3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) ist ein Protein, welches als negativer Regulator von Zytokinsignalwegen fungiert, insbesondere durch Inhibition des JAK-STAT-Signalweges unter Bindung und Inhibition der



Januskinasen. Da die Expression von SOCS-3 wiederum durch Zytokine induziert wird, scheint das Protein die Funktion eines negativen Feedback-Mechanismus im Rahmen der Zytokinsignalwege einzunehmen, u. a. durch Regulation der IL-6- und TNF- $\alpha$ -Signaltransduktion (Senn et al., 2003). Als eine der metabolischen Veränderungen im Rahmen der Tumorkachexieentwicklung ist eine Insulinresistenz beschrieben. In Hepatozyten konnte durch Senn et al. (2003) eine IL-6 vermittelte Insulinresistenz nachgewiesen werden, welche zumindest teilweise durch IL-6-vermittelte SOCS-3-Induktion bedingt zu sein scheint, da SOCS-3 in vitro als direkter Inhibitor der Insulin-Rezeptor-Autophosphorylation wirkt. Aus diesem Grund wird SOCS-3 eine zentrale Rolle bei der Steatosis hepatis und dem metabolischen Syndrom zugesprochen (Ueki et al., 2004). Des Weiteren scheint SOCS-3 bei verschiedenen Tumorentitäten wie Leber- und Lungenkarzinomen als Tumorsuppressor zu wirken (Culig, 2013). Umaña et al., (2003) konnten eine vermehrte SOCS-3-Expression in der Leber von Ratten unter proteinrestriktiver Diät nachweisen. Somit ist denkbar, dass SOCS-3 eine Rolle in der Entstehung der Tumorkachexie spielt, wobei dies bislang nicht untersucht ist und daher in dieser Arbeit berücksichtigt werden soll.

#### **1.4.2.4.7 MIF**

MIF (Macrophage migration inhibitory factor) ist ein pluripotentes Zytokin, welches von verschiedenen Zelltypen wie Immunzellen, Endothel- und Epithelzellen freigesetzt wird und über Aktivierung weiterer Immunzellen an der akuten Immunantwort beteiligt ist. In der Leber wird MIF sowohl von den Hepatozyten als auch von den Kupffer-Zellen produziert (Marin et al., 2017). Marin et al. (2017) vermuten in MIF einen Faktor für die Leberzellschädigung im Rahmen Alkohol-induzierter Leberschädigung. Von Dessein et al. (2010) wird ein Zusammenhang zwischen MIF-Produktion und dem Metastasierungspotential sowie der Chemotherapieresistenz kolorektaler Karzinome vermutet. Benigni et al. (2000) konnten nachweisen, dass MIF katabole Effekte im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion induziert. Auch eine Beteiligung von MIF am Glukosestoffwechsel ist beschrieben. So beeinflusst MIF die Glukoseaufnahme, Glykolyse und Insulinresistenz in

Fettgewebe und Muskelzellen (Toso et al., 2008). Im Rahmen der Tumorkachexie konnte im Mausmodell eine Zunahme der MIF-Expression im Fettgewebe mit Fortschreiten der Kachexie nachgewiesen werden (Batista et al., 2012). Zusammenfassend ist eine Beteiligung von MIF an den metabolischen Prozessen der Tumorkachexie wahrscheinlich, bisher jedoch wenig untersucht.

### **1.4.2.5 Apoptose**

#### **1.4.2.5.1 BAX und BCL-2**

Die BCL-2-Familie umfasst Proteine, welche die Permeabilität der Mitochondrienmembran steuern und damit eine zentrale Rolle für die Apoptose spielen. Zu dieser Proteinfamilie gehören sowohl proapoptotische Proteine wie B-Cell-Lymphoma-Associated-X-Protein (BAX) als auch antiapoptotische Proteine wie B-Cell-Lymphoma-2 (BCL-2) (Gross et al., 1999). Während die proapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie eine Funktion als Tumorsuppressor einnehmen, führt eine Überexpression ihrer antiapoptotischen Mitglieder im Mausmodell wie auch beim Menschen zu Tumorentstehung (Delbridge und Strasser, 2015). BAX ist ein proapoptotisches Protein, welches als Cofaktor des Tumorsuppressorproteins p53 die Einleitung der Apoptose beschleunigt. Fukuda et al. (2009) konnten eine erhöhte Expression von BAX in der Leber von tumortragenden Hasen im Vergleich zu gesunden Tieren nachweisen.

Im Bezug auf Harmine konnten Zhang et al. (2014) an einem Modell zum Magenkarzinom eine dosisabhängige Hemmung von Zellproliferation, Migration und Invasivität sowie eine Steigerung der Apoptose und eine Hemmung von Tumorwachstum durch Harmine nachweisen. Diese Effekte wurden u.a. über eine Hemmung der Expression von BCL-2 sowie über eine Steigerung der BAX-Expression vermittelt (Zhang et al., 2014). Cao et al. (2001) konnten zeigen, dass Harmine in vitro Apoptose in HepG2-Zellen auslöst, einhergehend mit einer Herunterregulation des antiapoptotischen BCL-2, während sich für die Expression von BAX keine Unterschiede ergaben. In Bezug auf Veränderungen

der hepatischen BAX- und BCL-2-Expression bei Tumorkachexie gibt es bisher keine Untersuchungen.

### **1.4.2.5.2 Caspase-3**

Die Cystein-Aspartat-Protease-3 (Caspase-3) gehört zu den Caspasen, einer Familie von Cystein-Proteasen, welche wichtiger Bestandteil des Apoptose-Signalweges sind. Caspase-3 ist eines der Schlüsselenzyme der Apoptose und wirkt über eine Interaktion mit weiteren Caspasen proapoptotisch (McIlwain et al., 2013). Bei zahlreichen Tumorerkrankungen konnte eine Inaktivierung proapoptotischer Caspasen in Tumorzellen dokumentiert werden (Philchenkov et al., 2004). Im Rahmen der Antitumorthherapie führen viele Chemotherapeutika den Zelltod von Krebszellen über eine Caspase-Aktivierung herbei (Zhou et al., 2018).

Silva et al. (2015) konnten zeigen, dass in Skelettmuskelzellen von krebserkrankten Mäusen eine Aktivierung von Caspase-3 über den STAT3-Signalweg erfolgt, welche zu Proteinabbau im Muskel führt. Eine Hemmung der STAT3-vermittelten Caspase-Aktivierung führte im Mausmodell zu einem verminderten Verlust an Muskelmasse (Silva et al., 2015). Im Vergleich von tumorkranken Mäusen mit und ohne Kachexie konnte bei den kachektischen Mäusen eine deutlich gesteigerte Caspase-3-Aktivität im Skelettmuskel im Vergleich zur den nicht-kachektischen Mäusen gezeigt werden (Belizário et al., 2001).

In humanen Magenkarzinom-Zellen konnte *in vitro* eine Up-Regulation proapoptotischer Proteine wie Caspase-3 durch den auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten MAO-A-Inhibitor Harmine beobachtet werden (Li et al., 2017). Ebenso zeigte Harmine bei HepG2-Zellen eine gesteigerte Apoptoserate durch Caspase-3-Aktivierung und Downregulation des antiapoptotisch wirkenden BCL-2, hingegen keine Veränderungen bei BAX (Cao et al., 2011).

### **1.4.2.6 Proliferation: PCNA**

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ist ein Protein, welches die DNA während der Replikationsphase als Ringstruktur umgibt (sog. Ringklemmenprotein) und somit essentiell für DNA-Replikation und –Reparatur

ist (Boehm et al., 2016). Klinische und wissenschaftliche Verwendung findet PCNA als Proliferationsmarker (Hall et al., 1994). Im Rahmen von Tumorerkrankungen konnte eine Induktion von PCNA in normalen Zellen in der Umgebung von Tumorzellen nachgewiesen werden, was als direkter Effekt von Tumorzellen auf ihre Umgebung interpretiert wird (Hall et al., 1994). Zhang et al. (2014) konnten in Magenkarzinomzellen durch Harmine-Behandlung eine signifikante Reduktion der Expression von PCNA nachweisen, was auf eine Hemmung von Zellproliferation und Tumorwachstum durch Harmine schließen lässt. Veränderungen der hepatischen PCNA-Expression im Rahmen von Tumorkachexie scheinen bislang nicht untersucht worden zu sein.

### **1.4.2.7 Glykogengehalt der Leber (PAS-Reaktion)**

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Periodic-Acid-Schiff-Reaktion ist ein histologisches Verfahren, mit welchem sich Glykoproteine, Muzine und Polysaccharide anfärben lassen. Sie wird zur Bestimmung des Glykogengehaltes der Leber verwendet (Kudryavtseva et al., 1992). Glykogen liegt in Leber und Skelettmuskulatur als Speicherform der Glukose vor. Postprandial überschüssige Glukose wird von der Leber aufgenommen und in Form von Glykogen gespeichert. In Phasen der Nahrungskarenz kann Glykogen wieder abgebaut und Glukose freigesetzt werden, um den Blutglukosespiegel konstant zu halten. Wenn in Hungerphasen die Glykogenreserven aufgebraucht sind, können die Leber und zu einem kleineren Anteil auch die Nieren im Rahmen der Glukoneogenese selbst Glukose bereitstellen (Koolmann und Röhm, 2009). Bei Tumorpatienten konnten multiple Veränderungen im Glukosestoffwechsel nachgewiesen werden. So sind eine gesteigerte Glukoneogenese sowie eine gesteigerte Glykolyseaktivität in der Leber beschrieben (Tayek, 1992). Narsale et al. (2015) konnten zeigen, dass bei Mäusen mit Tumorkachexie eine Abnahme des Leberglykogengehaltes sowie eine Zunahme der Expression von Enzymen der Glykolyse (Phosphofruktokinase) und Glukoneogenese (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) auftritt, wohingegen bei Mäusen mit Tumorerkrankung ohne Kachexieentwicklung keine Veränderung des Leber-Glykogengehaltes

nachweisbar war. Dies scheint Ausdruck des erhöhten Glukoseumsatzes im Rahmen der Tumorkachexie zu sein.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Veränderungen ausgewählter o.g. kachexierelevanter Faktoren des Lebermetabolismus bei Tumorkachexie anhand des 3x transgenen LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Mausmodells des PDAC im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren (WT). Des Weiteren soll der Einfluss einer MAO-A-Inhibition auf Leberveränderungen bei Tumorkachexie untersucht werden. Ausgangspunkt ist die These, dass die in der Leber perivenös lokalisierte Glutaminsynthese als Grundlage des Glutamatscavenging bei Tumorkachexie eingeschränkt sein könnten, was zu den typischen Stoffwechselveränderungen mit erhöhten Glutamat- und erniedrigten Glutaminspiegeln bei Tumorkachexie (Holm et al., 2007) beitragen könnte. Hierfür könnte eine zonale Steigerung des Leberstoffwechsels periportal mit gesteigerter Glutamat- und Harnstoffsynthese sowie gesteigerter Synthese von Akute-Phase-Proteinen mit resultierendem relativem Sauerstoffmangel und möglicher inflammatorischer Schädigung in der vaskulär nachgeschalteten perivenösen Zone verantwortlich sein. Hieraus könnte eine verminderte Expression der streng perivenös lokalisierten Glutaminsynthetase resultieren. Vorbefunde aus der eigenen Arbeitsgruppe, welche eine erniedrigte Proteinexpression der GS beim Menschen bei Tumorkachexie zeigten (Bruns, 2019), stützen diese These. Die Rolle hepatischer Aminosäure- und Ammoniumtransporter ist in diesem Zusammenhang noch unklar und soll ebenfalls in dieser Arbeit mitbetrachtet werden. Ob hier auch eine MAO-Überexpression oder –aktivierung eine Rolle spielt, wie Vorarbeiten nahelegen (Manoli et al., 2005; Nocito et al., 2007), soll in dieser Arbeit ebenso untersucht werden, wie die Frage, ob eine Intervention mit dem MAO-A-Inhibitor Harmin-Hydrochlorid einen möglichen Therapieansatz bei Tumorkachexie bietet. Die wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit sind:

- 1) Wie unterscheiden sich PDAC-Mäuse mit Tumorkachexie bezüglich der hepatischen Expression von GS, hepatischen

Aminosäuretransportern, Monoaminoxidasen, hepatischen Inflammations-, Apoptose- und Proliferationsmarkern sowie des hepatischen Glykogengehalts von Wildtyp-Mäusen?

- 2) Hat MAO-A-Inhibition in der Leber einen Einfluss auf GS-Expression, relevante hepatische Aminosäure-Transporter, Inflammations-, Apoptose- und Proliferationsmarker und auf den Glykogengehalt bei PDAC-Mäusen mit Tumorkachexie und findet sich ein Einfluss von MAO-A auf die Kachexieentstehung?
- 3) Ergibt sich hieraus für eine MAO-A-Inhibition ein möglicher Therapieansatz bei Tumorkachexie?

## 2. Material und Methode

### 2.1 Das Mausmodell

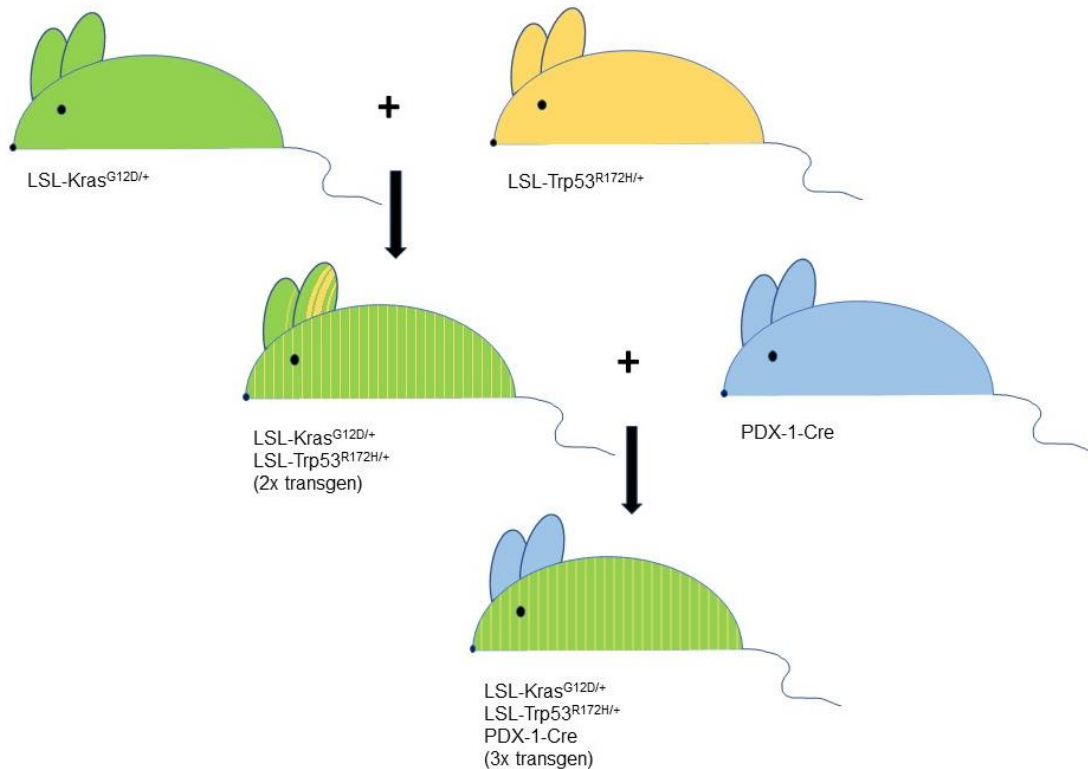
Für die vorliegende Arbeit wurden Leberproben aus dem etablierten 3-fach transgenen Mausmodell des PDAC (LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Maus) (Hingorani et al., 2005) gewonnen und mit Leberproben von Wildtyp-Kontrolltieren verglichen (Abb. 5). Bei einem Teil der Tiere wurde zusätzlich eine Behandlung mit dem MAO-A-Inhibitor Harmine-Hydrochlorid durchgeführt. Das LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe um David Tuveson entwickelt und spiegelt das Mutationsbasierte Tumorprogressionsmodell des humanen PDAC wider. Bereits 2003 hatte die Arbeitsgruppe ein erstes Tumormausmodell entwickelt, welches die mehrstufige Tumorprogression des menschlichen PDAC nachzeichnet (Hingorani et al., 2003). Grundlage des Tumormausmodells bildet die Entdeckung, dass eine Mutation im Kras-Codon 12 besonders häufig beim PDAC auftritt (Smit et al., 1988). Im Modell von Hingorani et al. (2003) wird unter der Kontrolle des Pdx-1-Promotors eine onkogene Form des Kras exprimiert, welche eine Mutation (T → A Transversion in Codon 12) enthält, die in der Proteinsequenz von Kras zu einem Austausch von Glycin durch Asparaginsäure führt (Hingorani et al., 2003). Eben diese Punktmutation kann auch bei humanen PDAC in über 90 % der Fälle nachgewiesen werden (Wood und Hruban, 2015). Die Transkription und Translation dieser Kras-Mutation, wird zunächst noch durch die Mutation flankierende Lox-Stop-Lox (LSL)-Elemente verhindert (Hingorani et al., 2003). Eine Expression der mutierten Form des Kras kann jedoch durch die Kreuzung dieser LSL-Kras<sup>G12D</sup>-Mäuse mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pdx1-Promotors exprimieren, erreicht werden, wodurch es zum Herausschneiden des die Mutation flankierenden LSL-Elements kommt (Hingorani et al., 2003). Mit diesem Tumormausmodell konnte die Arbeitsgruppe von Hingorani 2003 die Entwicklung von PanIN-Läsionen bei allen transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras<sup>G12D</sup>-Mäusen (n=33) ihrer Studie induzieren (Hingorani et al., 2003). Ein invasives oder metastasiertes PDAC konnte jedoch nur in 6 % der transgenen Pdx1-Cre-

LSL-Kras<sup>G12D</sup>-Mäuse nachgewiesen werden, sodass dieses Modell zwar die mehrstufige Karzinogenese des PDAC nachbilden kann (Hingorani et al., 2003), aufgrund der geringen Penetranz invasiver Karzinome jedoch zur Untersuchung des Effekts therapeutischer Interventionen beim PDAC eher ungeeignet ist. Es gelang jedoch die Entwicklung eines weiteren Tumormausmodells, in welchem die Penetranz invasiver PDAC erheblich gesteigert werden konnte. Dazu kreuzte die Gruppe um David Tuveson die LSL-Kras<sup>G12D</sup>-Mäuse mit LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>-Mäusen (Hingorani et al., 2005). Im Genom von LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>-Mäusen findet sich eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53, deren Transkription und Translation durch ein flankierendes LSL-Element verhindert wird (Olive et al., 2004). Durch anschließendes Kreuzen von LSL-Kras<sup>G12D</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>-Mäusen mit Pdx-1-Cre-Mäusen kam es wie schon im ersten Modell zu einem Herausschneiden der LSL-Elemente und hierdurch zu einer Expression der Mutationen (Abb. 5). Von den aus dieser Kreuzung hervorgegangenen dreifach transgenen LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Tieren (Abb. 5) entwickelten 96 % ein invasives PDAC, malignen Aszites und fortschreitende Kachexie (Hingorani et al., 2005). Die lokale Ausbreitung des Tumors stellte sich bei diesen Tieren analog zum humanen PDAC dar, es fanden sich metastatische Infiltrationen von peripankreatischen, mesenterialen und retroperitonealen Lymphknoten sowie Metastasen in Leber, Lunge, Diaphragma und Nebennieren (Hingorani et al., 2005). Damit besteht eine deutliche Ähnlichkeit des klinischen Bildes wie auch der Lokalisation metastatischer Absiedelungen zwischen den Pankreaskarzinomen des dreifach transgenen Tumormausmodells und dem humanen PDAC. Die mittlere Überlebenszeit der dreifach transgenen LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Tiere im Modell von Hingorani et al. betrug fünf Monate, keines der Tiere überlebte zwölf Monate lang (Hingorani et al., 2005). Bei Autopsien junger dreifach transgener Tiere (4-6 Wochen alt) konnten noch keine histologischen Veränderungen im Pankreas nachgewiesen werden. Ab einem Alter von 10 Wochen entwickelte sich jedoch eine signifikante Tumormasse bei den dreifach transgenen Mäusen (Hingorani et al., 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurde das dreifach transgene LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-



Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Mausmodell ausgewählt, weil es die Tumorprogression des humanen PDAC widerspiegelt und aufgrund der hohen Penetranz invasiver Pankreaskarzinome mit Kachexieentwicklung Aussagen über den Effekt therapeutischer Interventionen ermöglicht.



**Abbildung 5: Kreuzungsschema der 3x transgenen Versuchstiere**

Das Mausmodell und der Behandlungsansatz wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes (Förderung durch den UKGM-Kooperationsvertrag § 2 Absatz 3, 2011) mit Prof. Dr. Volker Fendrich (Universitätsklinik für Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Marburg) zur Verfügung gestellt.

Insgesamt standen für das Projekt 84 C57BL/6-Mäuse zur Verfügung. Das Studiendesign sah eine genomische Wildtyp-Gruppe (WT n=13) und eine genomisch 3x transgene Gruppe mit insgesamt 22 Tieren vor. Von diesem 3x transgenen Tieren konnten bei 11 Tieren histologisch invasive Pankreaskarzinome nachgewiesen werden (CA n=11). Die restlichen 3x transgenen Tiere wiesen in der Pankreashistologie PanIN-Veränderungen verschiedener Grade auf und wurden für die vorliegende Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Des Weiteren sah das Studiendesign zwei Interventionsgruppen

vor: eine mit Harmine-Hydrochlorid-behandelte Wildtyp-Gruppe (WT HH n=11) und eine HH-behandelte Gruppe 3x transgener Tiere, welche insgesamt 10 Mäuse umfasste. Von diesen wurde bei sieben Tieren ein invasives Pankreaskarzinom nachgewiesen (CA HH n=7), die restlichen drei Tiere wurden für diese Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Zusätzlich umfasste das Projekt insgesamt 24 unbehandelte 2x transgene Mäuse, welche für diese Arbeit jedoch nicht weiter betrachtet wurden. Daten zum Vergleich mit den 2x transgenen Tieren sowie den 3x transgenen Mäusen mit Pan-IN-Veränderungen werden in einem separaten Dissertationsprojekt erhoben. Bei zwei unbehandelten Mäusen konnte keine zweifelsfreie Zuordnung zu einem Genotyp erfolgen, diese Tiere wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Die Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten Labortiere auf die unterschiedlichen Gruppen ist Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Studienpopulation**

	Unbehandelt			HH-behandelt		
	gesamt	m	w	gesamt	m	w
<b>WT</b>	13	6	7	11	8	3
<b>CA</b>	11	7	4	7	4	3

Alle Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg geboren. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen in steril belüfteten Käfigen bei einer Raumtemperatur von 21 ( $\pm 1$ ) °Celsius und einer Luftfeuchtigkeit von 55 ( $\pm 5$ ) %. Die Beleuchtung des offenen Tierstalls erfolgte nach einem zwölfstündigen Hell-/Dunkel-Zyklus (Lichtphasen von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr und Nachtphasen von 18.00 Uhr bis 6:00 Uhr). Wasser und Trockenfutter (pelletiertes Zucht- oder Haltungsfutter) wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Die Käfige mit Gitterdeckeln wurden wöchentlich gewechselt. Zur Verbesserung der Haltungsbedingungen wurden die Käfige entsprechend des sog. *enriched environment* mit Nest- und Nagematerialien, Schutzräumen und

Beschäftigungsobjekten ausgestattet. Der allgemeine gesundheitliche Zustand und das Gewicht der Tiere wurden regelmäßig kontrolliert. Zur Kreuzung der dreifach transgenen Tiere wurden jeweils ein transgenes Männchen und zwei transgene Weibchen aus der Parenteralgeneration zusammengehalten. Ab der dritten Lebenswoche wurden die Tiere nach Geschlecht getrennt und mit maximal fünf weiteren Artgenossen zusammengehalten.

Alle Tiere wurden mit einem Ohrclip mit fortlaufender Nummer markiert, um eine zweifelsfreie Zuordnung der Tiere zu den jeweiligen Gruppen zu gewährleisten. Der Genotyp aller im Verlauf der Studie geborenen Tiere wurde in der Mitte der vierten Lebenswoche überprüft. Hierzu wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze jeder Maus entnommen. Die letzten 0,5 cm der Schwanzspitzen der Mäuse wurden abgesetzt, aus diesem Gewebe wurde mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) genomische DNA extrahiert. Anschließend wurde eine Genotypisierungs-PCR anhand eines etablierten PCR-Protokolls mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primersequenzen durchgeführt.

Die Tiere in der HH-Behandlungsgruppe wurden ab dem dritten Lebensmonat über einen Zeitraum von zwei Monaten täglich mit einer Dosis von 0,6 mg Harmine-Hydrochlorid gelöst in 200  $\mu$ l (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -Cyclodextrin behandelt. Die Gabe erfolgte intraperitoneal. Vor jeder Injektion wurde der Injektionsbereich desinfiziert, die intraperitoneale Injektion erfolgt unter sterilen Bedingungen. Bei einem Tier (Lab-ID 7513 = PK105HH) aus der CA HH-Gruppe wurde die HH-Behandlung aufgrund des schlechten Gesundheitszustands des Tieres bereits nach einem Monat beendet und das Tier vorzeitig getötet. Eine intraperitoneale Placeboinjektion (bzw. sham-Injektion) fand bei den Kontrolltieren der WT- und CA-Gruppe nicht statt.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Nach Eintritt des Todes wurden die Tiere gewogen und auf äußere Auffälligkeiten inspiziert. Danach erfolgte die schrittweise Entnahme der Organe und Körperflüssigkeiten. Die Aufarbeitung der Proben und die histologischen Färbungen sowie die molekularbiologischen Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten Präparate erfolgten nach den folgenden Protokollen.

Alle Tierversuche erfolgten im Einklang mit dem geltenden Tierschutzgesetz und den ethischen Richtlinien und wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Tierversuchsantrag V 54-19 c20-15 (1) MR 20/11-Nr.70/2009).

**Tabelle 2: Primersequenzen zur Genotypisierung der Pdx-1-Cre, der LSL-KrasG12D/+ und der LSL-Tpr53R172H/+ Mäuse (FW= Forward Primer; REV= Reverse Primer)**

Primer	Sequenz 5' → 3'	Produkt (bp)
K-ras WT FW	GTC GAC AAG CTC ATG CGG GTG	500
K-ras 006 WT	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT	
REV	AGA	
K-ras Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A	550
K-ras 006 Mutant	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT	
REV	AGA	
P53 WT FW	TTA CAC ATC CAG CCT CTG TGG	170
P53 WT REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
P53 Mutant FW	AGC TAg CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A	270
P53 Mutant REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
Cre FW	CCT GGA AAA TGC TTG TGT CCG	400
Cre REV	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	

### 2.1.1 Histologie des Pankreasgewebes

Zur Untersuchung der histologischen Veränderungen des Pankreas wurden von jeder Maus repräsentative Serienschritte (n=10) des Pankreasgewebes von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Fendrich (Universitätsklinik für Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Marburg) angefertigt, um die Gesamtzahl der PanINs und ihren spezifischen Grad bzw. das Vorhandensein eines invasiven Karzinoms zu dokumentieren. Hierbei wurden nur die jeweils höchsten PanIN-Läsionen von jedem Pankreaslobus berücksichtigt, um eine mehrfache Erfassung der gewundenen Pankreasgänge zu vermeiden. Das Pankreas der Wildtyp-Mäuse wurde ebenfalls untersucht, um hier die Entwicklung von PanIN-Läsionen auszuschließen.

## **2.2 Histologische Methoden**

### **2.2.1 Fixierung**

Die für diese Arbeit entnommenen Leberproben wurden direkt nach der Organentnahme mit Tissue-Tek®-Einbettmedium (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf einem Stück Papier fixiert und abschließend in mit Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan konserviert. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **2.2.2 Beschichtung mit Chromalaun**

Vor Anfertigung der Kryoschnitte wurden die Objektträger mit Chromalaun-Gelatine beschichtet. Dies dient der besseren Haftung des Probenmaterials auf dem Objektträger.

Es wurden 1 g Gelatine mit 140 ml Aqua dest. in einem Becherglas vermennt und unter ständigem Rühren auf  $40\text{ °C}$  erhitzt. Anschließend wurden 0,1 g Kalium-Chrom-III-Sulfat mit 40 ml Aqua dest. vermischt und zur erwärmten Gelatine-Lösung hinzugegeben. Die Chromalaun-Gelatine wurde mit Papiertüchern auf die Objektträger aufgebracht, welche bis zur weiteren Verarbeitung in Objektträgerkästen gelagert wurden.

### **2.2.3 Anfertigung von $6\text{ }\mu\text{m}$ -Kryoschnitten**

Zur Anfertigung von  $6\text{ }\mu\text{m}$ -Kryoschnitten wurde ein Kryotom der Firma Leica verwendet (Kryostat Jung FRIGOCUT 2800E, Leica, Wetzlar). Die Leberpräparate wurden mittels Tissue-Tek®-Einbettmedium (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf dem Scheideblock des Kryotom fixiert. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte im Kryotom bei  $-20\text{ °C}$ . Die  $6\text{ }\mu\text{m}$ -Kryoschnitte wurden mit Chromalaun-Gelatine-beschichteten Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurden die Kryopräparate bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglichte einen ersten Überblick über die Präparate und diente der Orientierung im Präparat sowie der Beurteilung der Schnittqualität. Das angewendete Färbeprotokoll ist in Tabelle 3 dargestellt. Zuerst erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin, an welche sich das Bläuen der Kerne durch dreimaliges Spülen der Präparate in Leitungswasser anschloss. Im nächsten Schritt wurde die Zytoplasma-Färbung mit Eosin durchgeführt. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. wurden die Präparate mittels Ethanol 96 % und Isopropanol entwässert und mittels Xylol geklärt. Danach wurden die Präparate mit Microscopy dePEX Mounting Medium (VWR International, Darmstadt) eingedeckt. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

**Tabelle 3: Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

<b>Medium</b>	<b>Zeit</b>
Hämatoxylin	3 min
Leitungswasser	4 min
Leitungswasser	4 min
Leitungswasser	4 min
Eosin	1 min
Aqua dest.	4 min
Ethanol 96 %	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min

### **2.2.5 Periodic-Acid-Schiff-Solution-Reaktion**

Zur Darstellung Glykogen-speichernder Zellen in den Präparaten wurde die Periodic-Acid-Schiff-Solution-Reaktion durchgeführt. Die PAS-Reaktion dient dem Nachweis von Kohlenhydraten wie Glykogen und Cellulose, sowie von Mucopolysacchariden und Glykoproteinen in Gewebeschnitten (Hotchkiss, 1948). Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass durch die Behandlung mit Perjodsäure Glykole zu Aldehyden oxidiert werden. Durch die anschließende Reaktion mit Schiffs-Reagenz wird ein Pararosanilin-Addukt freigesetzt, wodurch die glykolhaltigen Zellbestandteile magentafarben angefärbt werden (Hotchkiss, 1948). Die Färbung wurde mit dem Periodic-Acid-Schiff-Färbekit von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim) nach Angaben des Herstellers entsprechend dem in Tabelle 4 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Begonnen wurde mit der Fixierung der Kryopräparate in Paraformaldehyd 4 %. Nach kurzem Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate für fünf Minuten in Periodic Acid Solution 1 % inkubiert und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Hiernach wurden die Präparate in Schiffs-Reagenz inkubiert. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer und nachfolgendem Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser. Abschließend wurden die Präparate mittels Ethanol 96 % und Isopropanol entwässert und mittels Xylol geklärt. Danach wurden die Präparate mit Microscopy dePEX Mounting Medium (VWR International, Darmstadt) eingedeckt.

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Inkubation der Präparate in PAS 1 % und in Schiffs Reagenz erfolgte unter Lichtschutz.

**Tabelle 4: Färbeprotokoll Periodic-Acid-Schiff-Solution-Reaktion**

<b>Medium</b>	<b>Zeit</b>
PFA 4 %	10 min
Waschen unter fließendem Leitungswasser	1 min
PAS 1 %	5 min (bei Raumtemperatur)
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	5 min
Schiffs Reagenz	15 min (bei Raumtemperatur)
Waschen unter fließendem Leitungswasser	5 min
Hämalaun Bläuen unter fließendem Leitungswasser	30 sec 10 min
Ethanol 96 %	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min

### **2.2.6 Immunhistochemische Färbungen**

Zur Darstellung der zonalen Verteilung und der topographischen Expressionsmuster verschiedener Enzyme des Leberstoffwechsels sowie von Zytokinen wurden immunhistochemische (IHC) Färbungen durchgeführt. Das Prinzip der IHC beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, wodurch antigene Komponenten in Gewebeschnitten nachgewiesen und



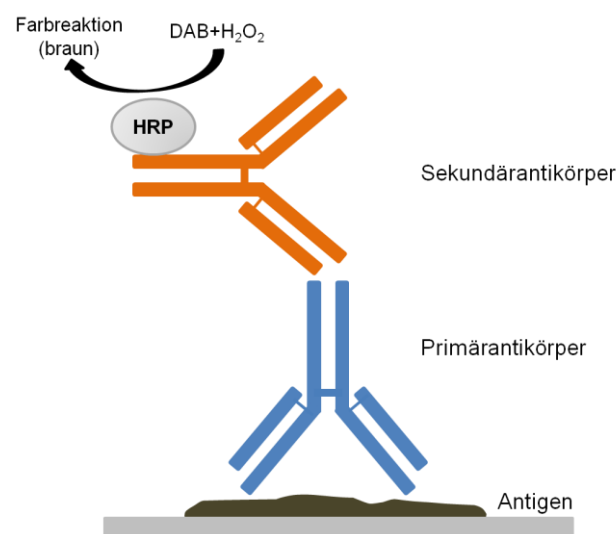
identifiziert werden können (Lang, 2006). Der Antikörper ist an ein Detektionssystem gekoppelt, welches seine Bindung auf dem Gewebeschnitt sichtbar macht. Ausschlaggebend für die Verwertbarkeit der Färbung ist die Spezifität des verwendeten Antikörpers sowie die Stabilität des nachzuweisenden Antigens. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen COX-2 (Anti-COX-2 Antibody, polyklonales rabbit-IgG, abcam, Cambridge, Großbritannien), CD-68 (Rat anti mouse CD68, monoklonales IgG2a, AbD Serotec, Kidlington, Großbritannien), Interleukin-1 $\beta$  (Anti-IL1beta Antibody, polyklonaler rabbit-Antikörper, abcam, Cambridge, Großbritannien), Glutaminsynthetase (Anti-Glutamine Synthetase Antibody, polyklonales rabbit-IgG, abcam, Cambridge, Großbritannien) sowie gegen Monoaminoxidase-A (Anti-Monoamine Oxidase A Antibody, monoklonales rabbit-IgG, abcam, Cambridge, Großbritannien) in den angegebenen Verdünnungen (Tabelle 5) verwendet. Die optimale Verdünnung des jeweiligen Antikörpers wurde in einer Verdünnungsreihe an Probeschnitten bestimmt.

**Tabelle 5: Antikörperverdünnung für immunhistochemische Färbungen**

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
COX-2 (rabbit)	1:400	anti-rabbit	1:100
CD-68 (rat)	1:100	anti-rat	1:100
IL-1 $\beta$ (rabbit)	1:25	anti-rabbit	1:100
Glutaminsynthetase (rabbit)	1:1000	anti-rabbit	1:100
MAO-A (rabbit)	1:100	anti-rabbit	1:100

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach der Horseradish-Peroxidase (HRP)-Detektionsmethode (schematisch dargestellt in Abb. 6), wobei das in Tabelle 6 aufgeführte Färbeprotokoll verwendet wurde. Zuerst wurden die Kryopräparate in Paraformaldehyd 4 % fixiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungen in den Gewebeschnitten mittels Serum-Block mit Normal-Schweine-Serum 1 % geblockt, wozu die Präparate für 30

Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Es folgte die Inkubation der Präparate mit dem Primärantikörper über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C. Daran schloss sich die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur an. Während der Inkubationszeiten wurden die Objektträger in einer feuchten Inkubationskammer aufbewahrt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Nach jedem Schritt wurden die Präparate in einer Pufferlösung (Phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Chromogen-Substrat mit Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym HRP erfolgt die Umwandlung von DAB in Anwesenheit von  $H_2O_2$  zu einem dunkelbraunen Reaktionsprodukt. Die Anfärbung erfolgte unter Sicht am Mikroskop. Zur Kernfärbung wurde Hämalaun nach Mayer verwendet. Nach zehnminütigem Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate mittels Ethanol 96 % und Isopropanol entwässert und mit Xylol geklärt. Danach wurden die Präparate mit Microscopy dePEX Mounting Medium (VWR International, Darmstadt) eingedeckt. Negativkontrollen wurden jeweils ohne den entsprechenden Primär- bzw. Sekundärantikörper nach dem gleichen Färbeprotokoll angefertigt. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der HRP-Detektionsmethode**

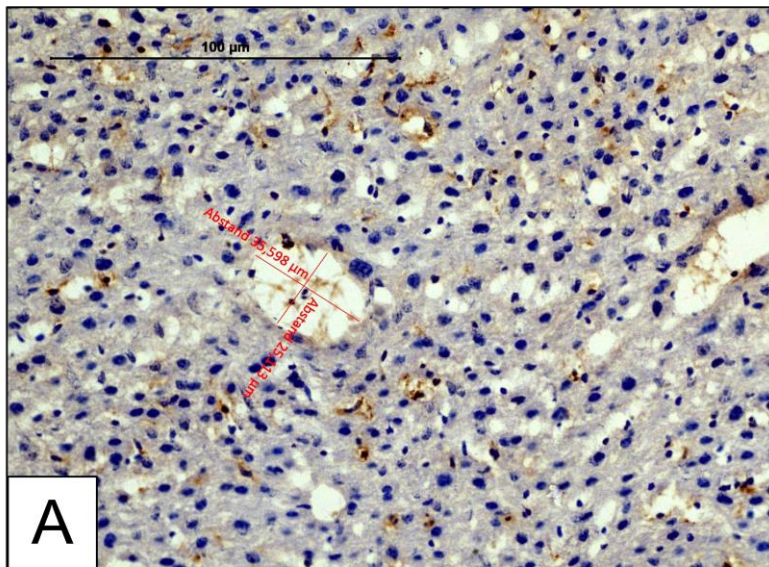
**Tabelle 6: Färbeprotokoll immunhistochemische Färbungen**

<b>Medium</b>	<b>Zeit</b>
PFA 4 %	10 min
PBS	5 min
PBS	5 min
PBS	5 min
Serumblock mit NSS 1 %	30 min (bei 37 °C)
Primär-Antikörper	18 h / über Nacht (bei 4 °C)
PBS	5 min
PBS	5 min
PBS	5 min
Sekundär-Antikörper	50 min (bei Raumtemperatur)
PBS	5 min
PBS	5 min
PBS	5 min
DAB-Lösung 1:10 mit Puffer verdünnt	50 sec
PBS	5 min
PBS	5 min
Hämalaun Bläuen unter fließendem Leitungswasser	30 sec 10 min
Ethanol 96 %	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Isopropanol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min
Xylol	4 min

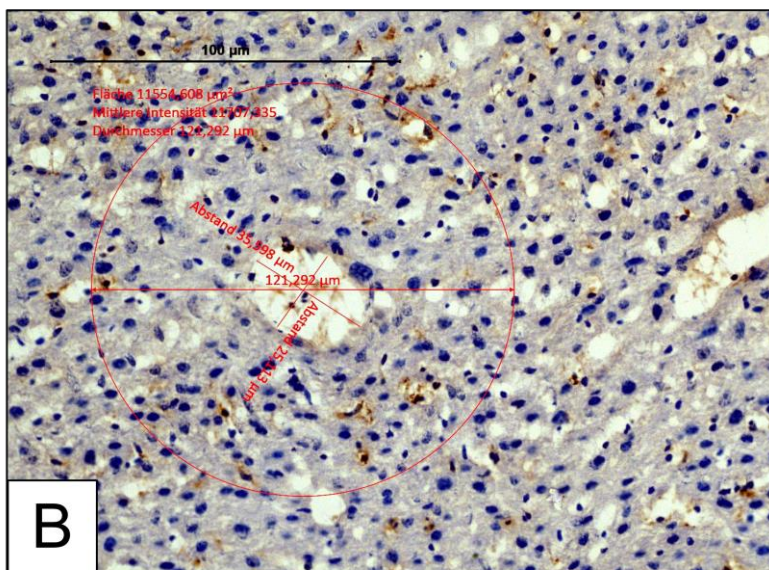
### **2.2.7 Immunhistochemische Auswertung**

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für CD-68, COX-2 und IL-1 $\beta$  wurde mit der ZEN-Mikroskopie-Software (Carl Zeiss, München) durchgeführt. Vorbereitend wurde die Qualität der jeweiligen Färbung unter dem Mikroskop (Imager M2 Zeiss, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) beurteilt. Anschließend wurden mithilfe der Software AxioVision (Carl Zeiss, München) Fotografien in 200-facher Vergrößerung von Bildausschnitten der gefärbten Schnitte zur weiteren Auswertung angefertigt. Da besonders die zonale Verteilung sowie die topographischen Expressionsmuster der untersuchten Zytokine und Enzyme von Interesse waren, wurden als Bildausschnitte Zentralvenen (ZV) und Glisson-Trias (GT) als strukturelle Elemente der Mikroarchitektur der Leber ausgewählt. Je nach Qualität der Schnitte wurden pro Probe 3-4 Zentralvenen und 1-3 Glisson-Trias fotografiert und ausgewertet. Anschließend wurden die Bilder im Bildverarbeitungsprogramm ZEN bearbeitet. Um in jedem Bild einen vergleichbaren Ausschnitt auszuwerten, wurde folgender Algorithmus angewendet: Zuerst wurde in jedem Bild eine Linie entlang des größten Längsdurchmessers der Zentralvene bzw. der Vene der Glisson-Trias und senkrecht dazu eine zweite Linie entlang des größten Querdurchmessers des Gefäßes gezogen. Die Längen dieser beiden Linien wurden addiert und die Summe als Radius eines Kreises verwendet, dessen Mittelpunkt durch den Schnittpunkt der beiden Geraden im Lumen des Gefäßes festgelegt wurde. Innerhalb dieses Kreises wurden jeweils alle positiven und negativen Zellen, außer den eindeutig dem Endothel von Arterien und Venen oder dem Gallengangsepithel zuzuordnenden Zellen, gezählt. Das Lumen der größeren Gefäße wie der Zentralvene oder den Gefäßen der Glisson-Trias wurde ausgeschnitten und von der Gesamtfläche des Kreises abgezogen. Ebenso wurde mit eventuell vorhandenen Rissartefakten im Bildausschnitt verfahren. Anschließend wurde der Prozentanteil immunhistologisch positiver Zellen an allen Zellen im ausgewerteten Kreis berechnet. Die einzelnen Schritte der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sind in Abbildung 7 exemplarisch aufgeführt. Aus ausgezählten ZV- bzw. GT-Anschnitten wurde jeweils ein Mittelwert für die jeweilige Leberprobe ermittelt. Anschließend wurde

aus beiden ein Mittelwert gebildet, um den Gesamtanteil positiver Zellen pro Leberprobe zu ermitteln.

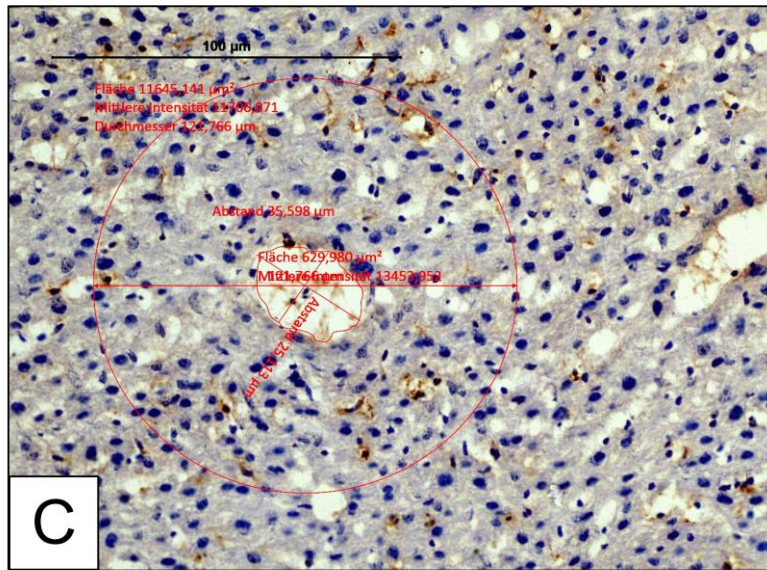


(A): Senkrechte Geraden zur Vermessung des Zentralvenenlumens

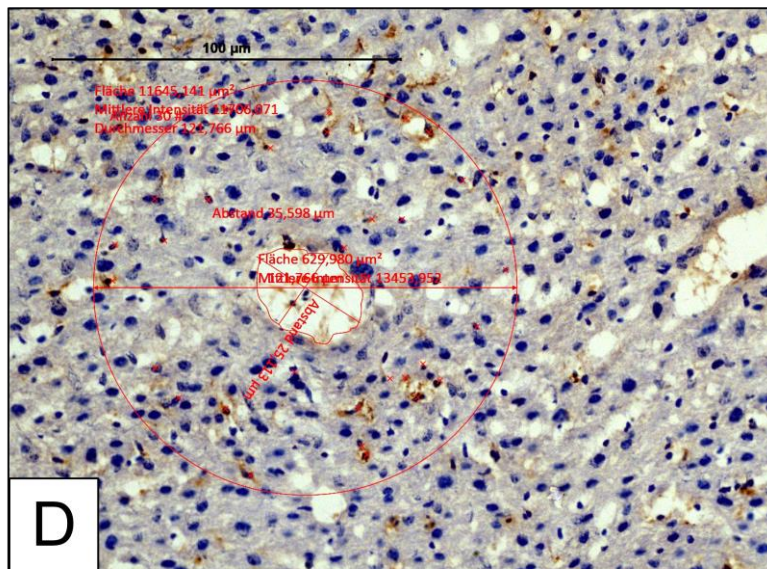


(B): Kreis mit dem Radius der Summe der beiden Geraden





(C): Ausschneiden des Zentralvenenlumen



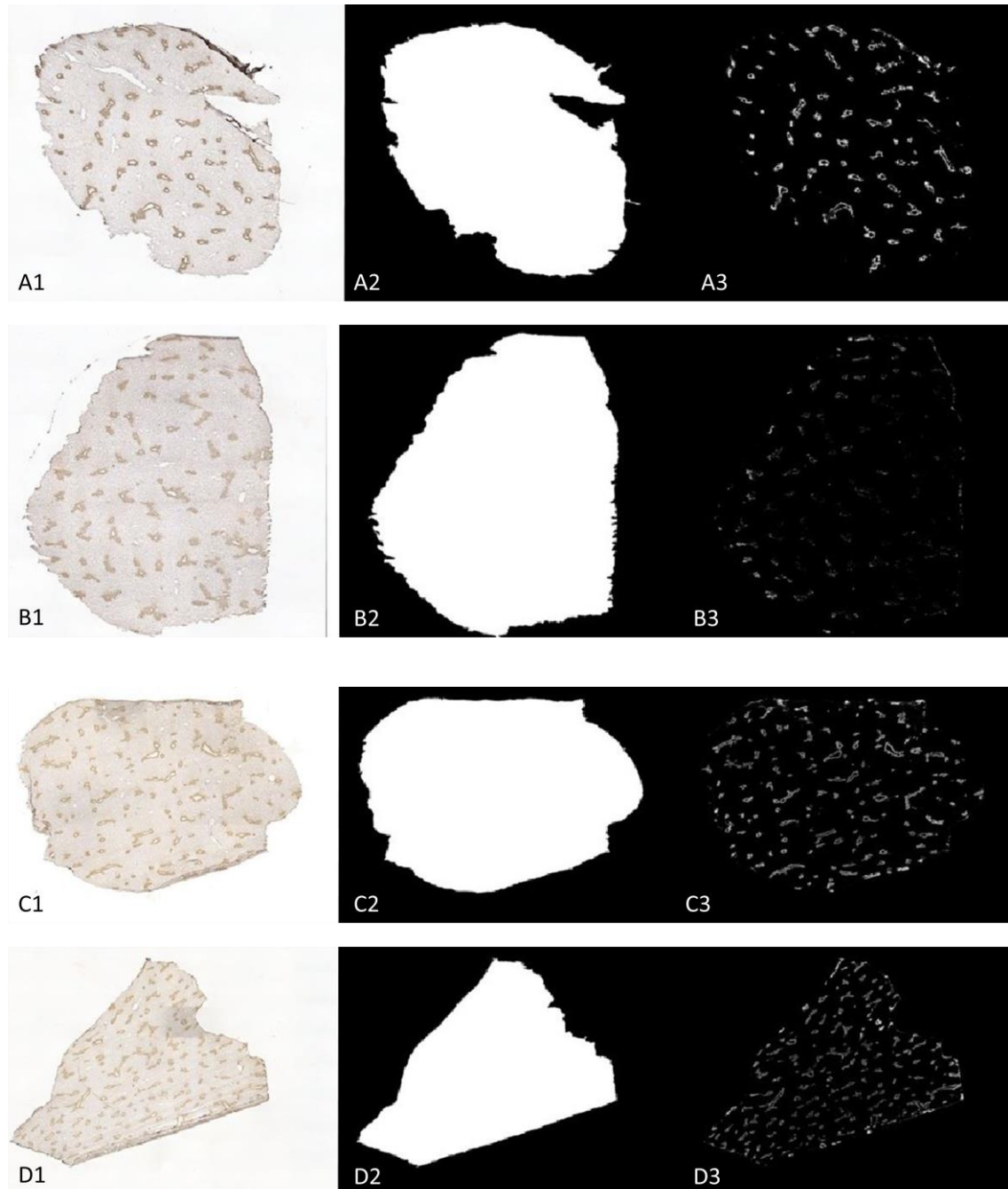
(D): Auszählen der positiven Zellen

Abbildung 7: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen; CD68-Färbung; Zentralvene; WT HH; Originalvergrößerung x200

### 2.2.8 Histologische Auswertung mittels zählbarer Segmentierung

Für Färbungen, welche, anstatt einzelner positiver Zellen, eine flächige Verteilung positiv gefärbter Bereiche aufweisen, wurde eine automatisierte Auswertung angewendet. Anhand der gezielten Definition gefärbter Bereiche wurde eine Segmentierung der gefärbten Fläche im Bezug auf die Gesamtfläche eines Präparates durchgeführt. Hierdurch erhält man als Ergebnis den prozentualen Anteil positiv gefärbter Pixel an der Gesamtanzahl

der Pixel in einem Schnitt. Da Pixel als Flächenmaß verwendet werden, wurden die Ergebnisse in % positiver Fläche angegeben. Im Einzelnen wurde diese Form der automatisierten Auswertung für die immunhistochemischen Färbungen für GS und MAO-A sowie für die PAS-Reaktion angewendet. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Leica DM6000\_B in Kombination mit der Kamera Leica DFC310 FX eingescannt, um so ein virtuelles Abbild der Präparate zu generieren. Die Auflösung betrug 1 Pixel  $\triangleq$  1  $\mu\text{m}^2$ . Anschließend wurden die virtuellen Präparate im Bildbearbeitungsprogramm Microsoft Paint manuell nachbearbeitet, um Artefakte wie Umschlagsfalten, Risse oder Farbstoffakkumulationen zu entfernen. Als Nächstes erfolgte die Bestimmung der Gesamtfläche des virtuellen Präparats mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ. Anhand der Parameter Farbton, Sättigung und Helligkeit wurden Grenzen für die Ermittlung der positiv gefärbten Fläche festgelegt, innerhalb dieser Grenzen liegende Farbbereiche wurden in die Berechnung des Anteils positiv gefärbter Pixel und damit als positiv gefärbte Fläche gewerteter Bildausschnitte einbezogen. Indem der prozentuale Anteil der positiven Pixel an den Gesamtpixelzahl des virtuellen Präparats berechnet wurde, konnte der Flächenanteil der positiv gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Präparats bestimmt werden (Abb. 8). Die Digitalisierung der gefärbten Schnitte sowie die technische Durchführung der Segmentierung erfolgte durch Hans Schwarzbach, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abteilung Medizinische Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg.



**Abbildung 8: Segmentierung der GS-Färbung; (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH; (1): Originalbild. (2): Berechnung der Nettofläche. (3): Berechnung der gefärbten Fläche (weiße Areale).**

### 2.3 PCR

Die Expression bestimmter Gene auf RNA-Ebene zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme kann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht



werden. Die physiologisch bei der Zellreplikation ablaufende PCR kann gentechnisch mithilfe spezifischer Primer zur selektiven Amplifikation und Quantifizierung von Gensequenzen genutzt werden (Vosberg, 1989). Das Prinzip der PCR besteht aus der wiederholten Abfolge von Denaturierung der DNA durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf bis zu 96 °C, dem Anlagern spezifischer Primer (Annealing) an den Einzelstrang, welches durch Abkühlung auf 60 °C ermöglicht wird, und der anschließenden Synthese (Elongation) des komplementären Strangs in 5`-3`-Richtung durch die Taq-Polymerase (Hill und Stewart, 1992; Saiki et al., 1988). Aus der erforderlichen Zykluszahl bis zum Erreichen eines Schwellenwertes können Rückschlüsse auf die in der ursprünglichen Probe enthaltene RNA-Menge und damit die Expression der Zielgene getroffen werden.

### **2.3.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion**

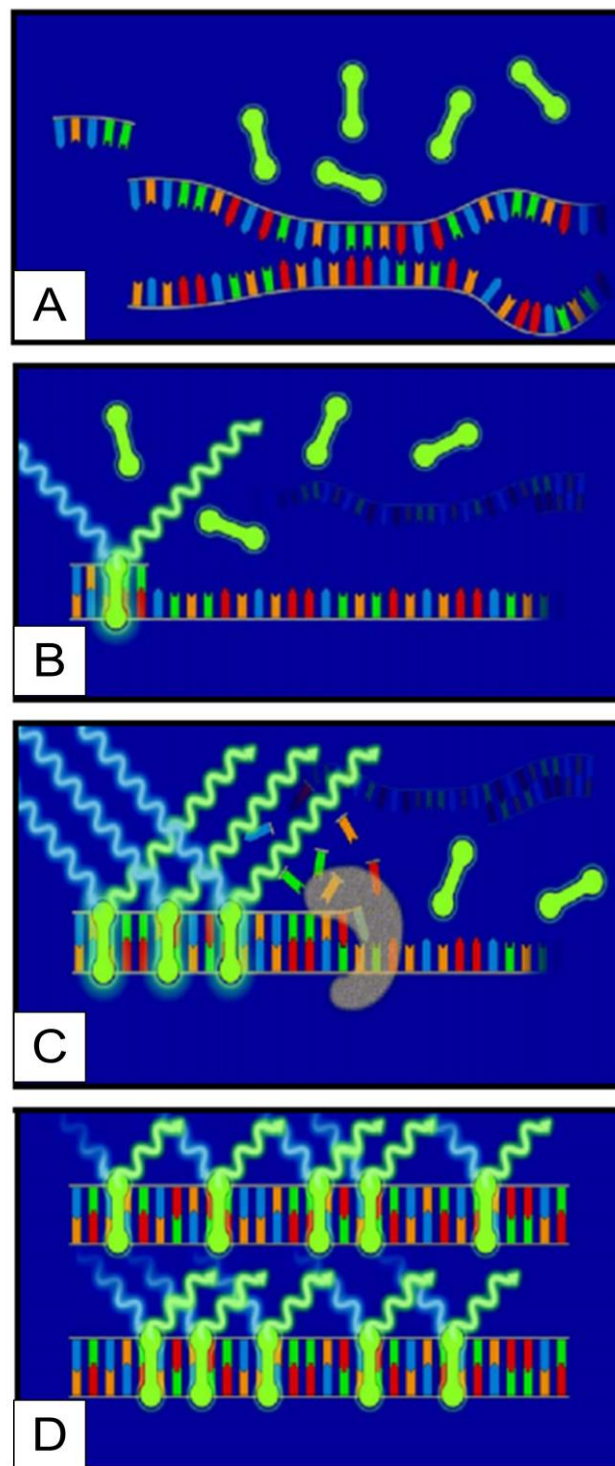
In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) angewendet, welche die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen sowie die gleichzeitige Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit ermöglicht (Heid et al., 1996). Die Quantifizierung erfolgt anhand von Fluoreszenz-Messungen, die während des PCR-Zyklus durchgeführt werden. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional zu der Menge der PCR-Produkte zu. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde die in den Leberproben enthaltene RNA isoliert und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

#### **2.3.1.1 Prinzip der Real-Time PCR mit SYBR Green I**

In der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR mit dem Stratagene Mx3005P System (Agilent, Waldbronn) durchgeführt. Als DNA-Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green I eingesetzt. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, welcher in die doppelsträngige DNA-Helix interkaliert (Zipper et al. 2004). Während der Bindung emittiert der Farbstoff Licht einer Wellenlänge von 520 nm, welches vom Gerät gemessen wird (Woodford und Johnson, 2004). Zu Beginn des PCR-Zyklus liegt die cDNA als Einzelstrang vor. Bei Bindung von SYBR Green I an Einzelstrang-DNA entsteht nur eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Nach Anlagerung der spezifischen Primer und

Synthese des doppelsträngigen DNA-Amplifikats durch die Taq-Polymerase können SYBR Green I Moleküle an den DNA-Doppelstrang binden (Abb. 9). Während der Elongation werden weitere SYBR Green I Moleküle von den Doppelsträngen gebunden. Die Intensität der Fluoreszenz steigt während der zyklischen Amplifikation direkt proportional zur Zahl der vorhandenen DNA-Doppelstränge an, woraus Rückschlüsse auf die Anzahl der Kopien des entsprechenden DNA-Abschnitts im PCR-Ansatz gezogen werden können. Die Fluoreszenz muss eine gewisse Stärke haben, um die Hintergrundfluoreszenz zu überdecken und detektiert zu werden. Je weniger PCR-Zyklen notwendig sind, um diese Schwelle zu erreichen, desto größer ist die Anzahl der vorhandenen DNA-Kopien zu Beginn der Reaktion (Higuchi et al., 1993). Der Schwellenwert bzw. Zyklus, ab dem die gemessene Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt wird als Cycle Threshold (C(t)-Wert) bezeichnet. Da die Menge von DNA-Amplifikaten abhängig von der in der ursprünglichen Probenlösung vorhandenen RNA-Menge zunimmt und die Fluoreszenz den Schwellenwert umso schneller überschreitet, je mehr DNA-Amplifikate vorliegen, ermöglicht der C(t)-Wert Aussagen über die in den Proben vorhandene RNA-Menge und damit über die Expression der Zielgene.

Zur Signalquantifizierung werden Proben einer Standardreihe mit bekannter Konzentration verglichen. Mit Hilfe dieser Kalibrierungsgeraden lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln. Nach der Amplifikation erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse, wofür die Proben von 55 °C alle 30 Sekunden um 1 °C bis auf eine Temperatur von 95 °C erhitzt werden. Die Hitze führt zu einer Denaturierung der DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge, wodurch der interkalierende Farbstoff SYBR Green I wieder freigesetzt wird und somit die Fluoreszenz abnimmt. Da die Temperatur der Schmelzpunkte eventuell auftretender unspezifischer Amplifikationsprodukte oder Primerdimere unter der Temperatur der Schmelzpunkte der spezifischen Amplifikationsprodukte liegt, können diese so unterschieden werden. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in der Ultraviolet Sterilization PCR Workstation (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Handschuhe getragen und ausschließlich sterile Materialien verwendet.



**Abbildung 9: Schematischer Ablauf einer RT-PCR mit SYBR Green I-Fluoreszenzfarbstoff (www.pcr.at, zitiert nach Schultz, 2005)**

Die SYBR-Green-Moleküle (A) binden an den neu synthetisierten DNA-Doppelstrang (B). Die emittierte Fluoreszenz wird durch die Bindung des Farbstoffs frei (C). Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge (D).

### 2.3.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA aus den Leberproben wurde die Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Pro verwendeter Probe wurde 50-100 mg Lebergewebe fein gemörsert und mit je 1 ml peqGOLD TriFast™ homogenisiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, ruhten die Proben anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von jeweils 0,2 ml Chloroform. Nach 15 Sekunden kräftigen Schüttelns der Proben wurden diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und zwischendurch gelegentlich aufgeschüttelt. Dann erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 12.000 x g, um eine Phasentrennung zu erreichen. Es stellten sich drei Phasen dar. In der oberen wässrigen, farblosen Phase reicherte sich ausschließlich die RNA an, während sich die DNA und die Proteine in der unteren roten Phenol-Chloroform-Phase sowie in der zwischen den beiden Phasen gelegenen Interphase befanden. Zur weiteren Verarbeitung wurde die wässrige Phase abpipettiert, während die DNA- und proteinhaltige Inter- und Phenolphase zur ggf. späteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert wurden. Zur Präzipitation der RNA wurden der RNA-haltigen Phase je 0,5 ml Isopropanol zugesetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C auf Eis inkubiert und im Anschluss für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000x g zentrifugiert. Das entstandene RNA-Präzipitat wurde zweimal mit je 1 ml 75 % Ethanol durch vortexen und anschließende Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 x g gewaschen. Anschließend trocknete das RNA-Pellet kurz an der Luft, bevor es in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Dies geschah zur Verbesserung der Löslichkeit der RNA bei 62 °C im Heizblock.

Während der gesamten Extraktion wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen Handschuhe getragen und ausschließlich RNase-freie Lösungen und Geräte verwendet.

### 2.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Qualität

Die Konzentrationsmessung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte mit dem Nano drop 2000c Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen). Die Ziel-RNA-Konzentration der Proben sollte unter 0,5 µg/µl betragen. Wurden höhere Konzentrationen gemessen, wurden die RNA-Lösungen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt.

Zur Bestimmung der Integrität der RNA wurden das Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) und der Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Waldbronn) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle RNA-Proben wurden mit RNasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl bis 500 ng/µl verdünnt. Nachdem der NanoChip entsprechend dem Herstellerprotokoll mit einer RNA 6000 Nano-Gel-Matrix, RNA 6000 Nano-dye-concentrate sowie dem RNA 6000 Nano-Marker befüllt wurde, wurden je 1 µl der RNA-Proben sowie der mitgeführte Standard in die Proben-Wells des NanoChip pipettiert. Die Messung mit dem Agilent 2100 Bioanalyser beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese (Thiemann et al., 2015). Dabei wird die denaturierte und fluoreszenzmarkierte RNA über ein System von Mikrokapillaren im elektrischen Feld fortgeleitet und entsprechend ihrer Fragmentgröße aufgetrennt. Die RNA-Fragmente und ihre Laufzeiten werden über einen Fluoreszenzdetektor registriert. Anhand dieser Daten generiert der Bioanalyser ein Elektropherogramm und ein daraus abgeleitetes Gelbild. Bei der Auftrennung stellen sich die 18 S rRNA und die 28 S rRNA als deutlich abgrenzbare RNA-Banden (im Gelbild) bzw. Peaks (im Elektropherogramm) dar. Die 2100 Expert Software generiert aus dem Verhältnis von 18 S rRNA und 28 S rRNA zur Basislinie sowie zum Gesamterscheinungsbild des Elektropherogramms einen RNA-Integritätswert (RNA integrity number, RIN). Dieser ermöglicht die Beurteilung des Degradationsstatus der RNA. Die RIN kann Werte von RIN 1 (starke Degradation) bis RIN 10 (exzellente Integrität) annehmen (Schroeder et al., 2006).

Für die verwendeten Proben wurden RIN-Werte zwischen 7,0 und 9,1 gemessen. Exemplarisch sind in Abbildung 10 ein Elektropherogramm sowie die daraus abgeleitete Bandendarstellung und die errechnete RIN dargestellt.

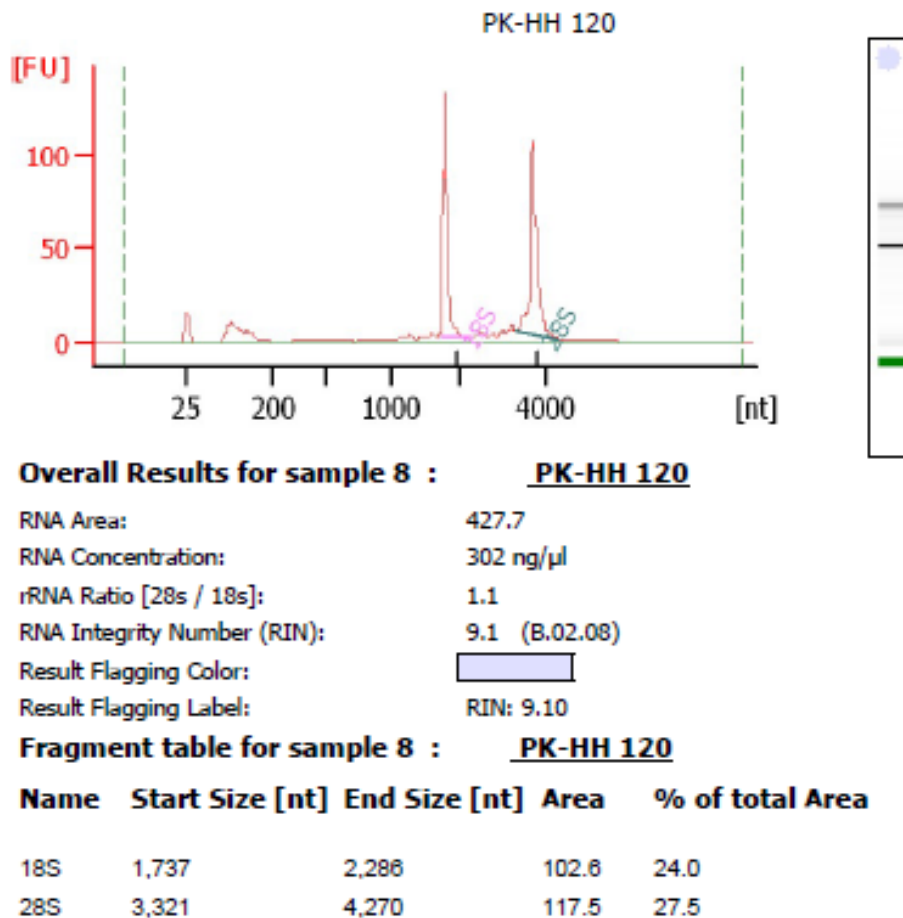


Abbildung 10: Elektropherogramm zur Bestimmung der RNA-Integrität

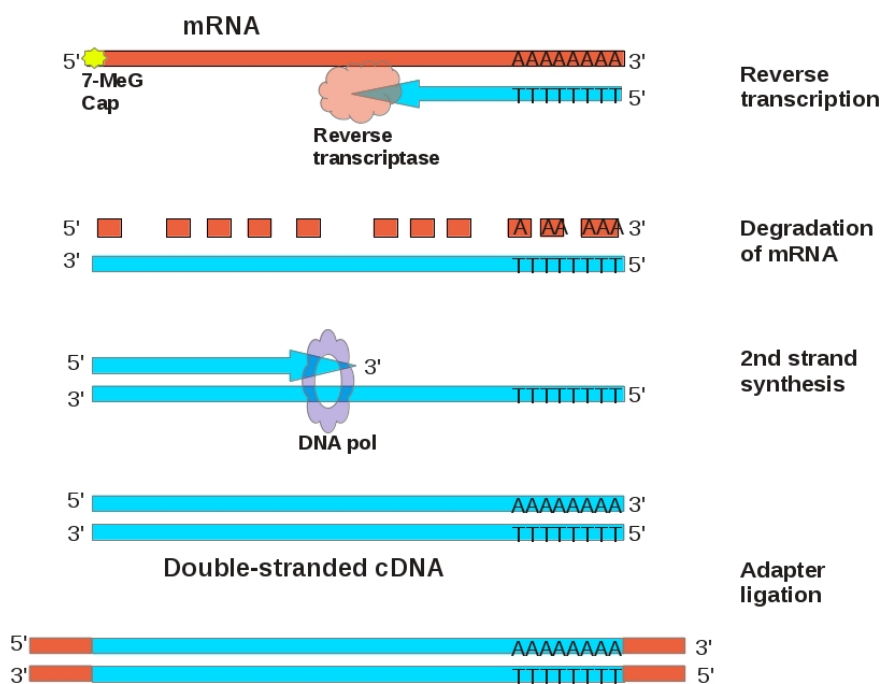
### 2.3.4 DNase-Verdau

Zur Beseitigung eventueller DNA-Rückstände in der isolierten Gesamt-RNA vor der Umschreibung wurde ein DNase-Verdau angeschlossen. Dazu wurden pro Probe zu 1 μg Gesamt-RNA jeweils 1 μl 10X Reaktionspuffer (100 mM TRIS, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) sowie 1,5 μl DNase I hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl 50 mM EDTA pro Probe erfolgte die Inkubation für weitere zehn Minuten bei 65 °C.

### 2.3.5 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mittels Reverser Transkription

Mittel Reverser Transkription wurde aus der isolierten Gesamt-RNA die für die quantitative Real-Time-PCR benötigte cDNA hergestellt. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche ausgehend

von einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert (Coffin et al., 1997). Durch den RNase-H-Anteil des Enzyms erfolgt der Abbau der RNA. Die einzelsträngige DNA wird durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms anschließend zu doppelsträngiger DNA vervollständigt. In Abbildung 11 ist der schematische Ablauf der cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase dargestellt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase (Choi, 2012)**

Für die Reaktion wurden im ersten Schritt je Probe zu 1 µg Gesamt-RNA 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer sowie 1,7 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O hinzugegeben und diese für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden zu diesem Ansatz pro Probe folgenden Reagenzien hinzugefügt:

2 µl Reverse Transkriptase Puffer (500 mM Tris-HCL (pH 8,3), 750 mM KCl, 30 mM EDTA)

2 µl 100 mM DTT (Dithiothreitol Enzymstabilisator)

0,8 µl 100 mM dNTP-Mix (Desoxynukleotidmix)

1 µl Reverse Transkriptase

0,5 µl RNase-Inhibitor (RiboLock)

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 63 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten inaktiviert.

Die gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:20 mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C eingefroren.

### **2.3.6 Herstellung eines cDNA-Standards**

Zur Herstellung eines cDNA-Standards wurde isolierte RNA von allen verwendeten Proben gepoolt. Von der gepoolten RNA wurde je 1 µg in 4 Cups verteilt, welche jeweils mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 7,5 µl aufgefüllt wurden, und entsprechend dem in Abschnitt 2.3.5 erläuterten Verfahren in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde erneut gepoolt. Anschließend wurde die gepoolte Standard-cDNA wie folgt mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt:

1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160.

Die verdünnte Standard-cDNA wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C eingefroren. Ebenso wurde mit einer Maus-Referenz-RNA (Stratagene QPCR Mouse Reference Total RNA, Agilent Technologies, Waldbronn) verfahren.

### **2.3.7 Durchführung der Real-Time PCR mit SYBR Green I**

Vorbereitend wurden entsprechend der Herstellerangabe 2 ml Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix mit je 6 µl 1:100 verdünntem Reference Dye gemischt. Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmungen gemessen. Bei jeder qRT-PCR wurden eine Standardreihe zur Erzeugung einer Eichgeraden sowie eine Leerwertkontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen mitgeführt. Der Reaktionsansatz pro Well setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl Proben-cDNA (zuvor im Verhältnis 1:20 mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt)

1,5 µl Primer

7,5 µl Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix

1 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O



Nach Verschluss und kurzer Zentrifugation der 96-Well-PCR-Mikrotiterplatten wurde die Reaktion im Real-Time-Thermal-Cycler Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Waldbronn) gestartet. Dabei wurde folgendes Thermoprofil (Tabelle 7) verwendet:

**Tabelle 7: Thermoprofil PCR**

Temperatur	Zeit	Zyklen
95° C	3 Min	1 Zyklus
95° C	10 Sec	42 Zyklen
60° C	20 Sec	
95° C	1 Min	1 Zyklus
55° C	30 Sec	
95° C	30 Sec	

### 2.3.8 Auswertung der Real-Time PCR mit SYBR Green I

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt mit der von Agilent Technologies bereit gestellten Software (Agilent Technologies, 2012).

Zunächst erfolgte die Kontrolle des Leerwertes. Aus der mitgeführten Verdünnungsreihe von Standard-cDNA (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) wurde eine Effizienzkurve nach folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{m}\right)}$$

*E = Effizienz der PCR – Reaktion*

*m = Anstieg der lineren Regressionsgeraden*

Eine optimale Effizienz liegt vor, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird (Wiedemann et al., 2004). Für die weiteren

Berechnungen wurde der Standard ausgewählt, dessen Effizienz nahe 100 % liegt.

Aus den als Doppelbestimmung vorliegenden Probenmesspunkten wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Dieser wurde anschließend auf den Wert eines ebenfalls sequenzierten konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gens bezogen (Normalisierung).

### **2.3.9 Housekeeping-Gene**

Zur Bestimmung der relativen Menge cDNA pro Probe wurde eine Normalisierung der jeweils untersuchten Gene über einen Abgleich mit den Expressionswerten von Housekeeping-Genen durchgeführt. Dies sind definitionsgemäß Gene, welche grundlegende Zellfunktionen besitzen, weil sie z.B. Strukturmoleküle oder Enzyme des Zellstoffwechsels codieren und somit in allen Zellen unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen, wie z.B. den Versuchsbedingungen, exprimiert werden (Wiedemann et al., 2004). Für die vorliegende Arbeit wurden die Housekeeping-Gene ACTB (Sun et al., 2012), HPRT (Valadan et al., 2015) und TBP (Tatsumi et al., 2008) analysiert. Zur Analyse und Auswahl des am besten geeigneten Housekeeping-Gens wurde die Software NormFinder (Andersen et al., 2004) verwendet. NormFinder ist ein Add-in für Microsoft Excel und identifiziert anhand eines Algorithmus aus einer Reihe von Housekeeping-Genen das für die Normalisierung optimale Gen. Dazu ordnet die Software die verwendeten Housekeeping-Gene entsprechend ihrer Expressionsstabilität im durchgeführten Versuch. Für die untersuchten Housekeeping-Gene ergab sich die höchste Expressionsstabilität für HPRT, gefolgt von TBP und zuletzt ACTB. Für die weitere Auswertung wurde für jede Probe der Mittelwert der Expressionswerte von HPRT und TBP gebildet, welcher dann zur Normalisierung der untersuchten Gene verwendet wurde.

### **2.4 Statistische Analyse**

Für die statistische Auswertung wurden Microsoft Excel sowie die freie Statistiksoftware R (R Core Team, 2017) verwendet. Als deskriptive Maße wurden für die vier Gruppen WT, CA, WT HH und CA HH jeweils der Mittelwert

(M) und der Standardfehler (engl. standard error, SE) des Mittelwertes berechnet. Für die statistische Analyse wurde eine zweifaktorielle ANOVA (engl. analysis of variance, Varianzanalyse) mit den beiden Faktoren „Pankreaskarzinom“ (PDAC) und „Harmine-Hydrochlorid-Behandlung“ (HH) durchgeführt sowie auf Interaktionseffekte (IA) getestet. Die ANOVA prüft, ob die Varianz der Zielvariablen durch den Einfluss einer oder mehrerer Einflussfaktoren (in dieser Arbeit PDAC und HH) erklärt werden kann. Hierfür testet das Verfahren, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb einer Gruppe, um so signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren (Timischl, 2013). Als Modellvoraussetzungen für die ANOVA werden Normalverteilung und Varianzhomogenität angenommen (Timischl, 2013). Deshalb wurden die erhobenen Parameter für jede Gruppe mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test verwendet. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu beschreiben, wurde als Post-hoc-Test ein Tukey-Test durchgeführt. Wurden nur zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte anstatt der ANOVA ein T-Test zur Prüfung auf signifikante Unterschiede. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Entsprechend wurden p-Werte von  $<0,01$  bzw.  $<0,001$  als hoch- bzw. höchstsignifikant gewertet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit R. Die Grafiken wurden anschließend mit Microsoft PowerPoint bearbeitet. Die Ergebnisse der ANOVA bezüglich der Faktoren PDAC, HH und IA wurden unter Angabe des jeweiligen Signifikanzniveaus in einem Legendekasten neben der Grafik aufgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen im Post-Hoc-Test (Tukey-Test) wurden in den Grafiken durch Klammern über den jeweiligen Gruppenbalken visualisiert und mit folgenden Symbolen gekennzeichnet: \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ . Zusätzlich wurden signifikante Unterschiede im Post-Hoc-Test auch im Legendenkasten unter Angabe des jeweiligen Signifikanzniveau dargestellt. Alle erhobenen Mittelwerte  $\pm$  SE sowie die p-Werte von Shapiro-Wilk-Test, Levene-Test, ANOVA und Tukey-Test sind in Tabellenform (Tabellen 18 - 29) im Anhang aufgeführt.

## 2.5. Substanzen und Geräte

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Chloroform for analysis	Merck (Darmstadt)
DAB Substrate	Roche Diagnostics (Mannheim)
Dulbecco´s PBS (1x) Powdered Buffer without Ca & Mg Sterile	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Dulbecco´s PBS Powdered Buffer without Ca & Mg	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
EDTA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethanol 70%	Merck (Darmstadt)
Gelantine gepulvert	Merck (Darmstadt)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol for analysis	Acros organics (Geel, Belgien)
Kaliumchrom-3-Sulfat reinst.	Merck (Darmstadt)
NSS (Normal-Schweine-Serum)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
peqGOLDTrifast TM (=Guanidinisothoncyanat/Phenol Methode)	Peqlab (Erlangen)
Periodic acid solution	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Schiff´s Reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TE (Tris-EDTA) Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylol	Merck (Darmstadt)

**Tabelle 9: Verwendete Biochemikalien für molekularbiologische Analysen**

<b>Biochemikalien</b>	<b>Firma</b>
100mM Deoxynucleotide Mix	Agilent Technologies (Waldbronn)
100mM DTT, 200 µl	Agilent Technologies (Waldbronn)
10x AffinityScript RT Buffer, 1ml	Agilent Technologies (Waldbronn)
10x Reaktionspuffer MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase, 50µl (50 reactions)	Agilent Technologies (Waldbronn)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies (Waldbronn)
DNase I, Rnase-Free	Fermentas Life Science (Waltham, USA)
EDTA	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Oligo(dT)18 primer	Fermentas Life Science (Waltham, USA)
RiboLock Rnase Inhibitor	Fermentas Life Science (Waltham, USA)
Ribolock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
RNase Away	Molecular BioProducts (San Diego, USA)
Rnase-freies H <sub>2</sub> O	Peqlab (Erlangen)
Stratagene QPCR Mouse Reference Total RNA	Agilent Technologies (Waldbronn)

**Tabelle 10: Verwendete Hilfsstoffe**

<b>Hilfsstoffe</b>	<b>Firma</b>
Microscopy dePEX Mounting Medium	VWR International (Darmstadt)
Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe (Alphen aan den Rijn, Niederlande)

**Tabelle 11: Verwendete 1. Antikörper für immunhistochemische Färbungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>
Anti-COX-2 Antibody, polyklonales rabbit-IgG	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Glutamine Synthetase Antibody, polyklonales rabbit-IgG	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-II1beta Antibody, polyklonaler rabbit-Antikörper	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Monoamine Oxidase A Antibody, monoklonales rabbit-IgG	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Rat anti mouse CD68, monoklonales IgG2a	AbD Serotec (Kidlington, Großbritannien)

**Tabelle 12: Verwendete 2. Antikörper für immunhistochemische Färbungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>
Goat anti-Rabbit IgG (H+L):HRP Human adsorbed	Linaris (Dossenheim)
Goat anti-Rat IgG:HRP (mouse adsorbed)	AbD Serotec (Kidlington, Großbritannien)

**Tabelle 13: Verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR**

Verwendet wurde jeweils der QuantiTect® Primer Assay For use with QIAGEN kits for SYBR® Green-based real-time RT-PCR von Qiagen (Hilden).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primer</b>	<b>Firma</b>
ACTB	Mm_Actb_2_SG	Qiagen (Hilden)
BAX	Mm_Bax_1_SG	Qiagen (Hilden)
BCL-2	Mm_Bcl2_3_SG	Qiagen (Hilden)
Caspase-3	Mm_Casp3_2_SG	Qiagen (Hilden)
CD68	Mm_Cd68_1_SG	Qiagen (Hilden)
GS	Mm_Glul_1_SG	Qiagen (Hilden)
HPRT	Mm_Hprt_1_SG	Qiagen (Hilden)
IL-1 $\beta$	Mm_Il1b_2_SG	Qiagen (Hilden)
IL-6	Mm_Il6_1_SG	Qiagen (Hilden)
FXR	Mm_LOC669338_1_SG	Qiagen (Hilden)
MAO-A	Mm_Maoa_1_SG	Qiagen (Hilden)
MAO-B	Mm_Maob_1_SG	Qiagen (Hilden)
MIF	Mm_Mif_1_SG	Qiagen (Hilden)
PCNA	Mm_Pcna_1_SG	Qiagen (Hilden)
COX-1	Mm_Ptgs1_1_SG	Qiagen (Hilden)
RhBG	Mm_Rhbg_1_SG	Qiagen (Hilden)
SLC1A2	Mm_Slc1a2_vc.1_SG	Qiagen (Hilden)
SLC1A4	Mm_Slc1a4_1_SG	Qiagen (Hilden)
SLC1A5	Mm_Slc1a5_1_SG	Qiagen (Hilden)
SOCS-3	Mm_Socs3_3_SG	Qiagen (Hilden)
TBP	Mm_Tbp_1_SG	Qiagen (Hilden)
TNF- $\alpha$	Mm_Tnf_1_SG	Qiagen (Hilden)

**Tabelle 14: Verwendete Einwegmaterialien und sonstiger Laborbedarf**

<b>Einwegmaterialien und sonstiger Laborbedarf</b>	<b>Firma</b>
8er Kette opt. Klar fl. Deckel	Sarstedt (Nümbrecht)
96 MultiPLY PCR-Platte natur	Sarstedt (Nümbrecht)
Biozym steril aerosol piper Tips (100 µl)	Labcon (Petatuma, USA)
Cap-It Positionierer	Peqlab (Erlangen)
Combitips advanced 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Deckgläschen, Menzel-Gläser 24x32, 24x36, 24x40	Gerhard Menzel (Braunschweig)
Dewar Transport Gefäß	KGW Isotherm (Karlsruhe)
Einmal-Kanülen, stumpf 100 Sterican	Braun (Melsungen)
Eppendorf-Mirkoreaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf (Hamburg)
Filter Tips (0,5-20 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Histoknife H	Heraeus Kulzer (Wehrheim/ts.)
Inkubationskammern	Carl Roth (Karlsruhe)
Keramikmörser und Keramikpistill	KOBE Laborbedarf (Marburg)
Laborglaswaren	Schott (Mainz)
Magnetührstäbchen PTFE-ummantelt	Brand (Wertheim)
Menzel-Gläser Thermo scientific	Gerhard Menzel (Braunschweig)
Multipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Pinzetten	KOBE Laborbedarf (Marburg)
Pipetman Pipetten, verschiedenen Volumina	Gilson (Middleton, USA)
Pipetten für verschiedene Volumina	Eppendorf (Hamburg)
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Global Sale (Roswell, USA)



Rasierklinge Apollo	Herkenrath (Solingen)
Safe-Lock Tubes	Eppendorf (Hamburg)
SafeSeal Micro Tubes,	Sarstedt (Nümbrecht)
Spatel und Löffelspatel	KOBE Laborbedarf (Marburg)
Spritzen Omnifix 100 Duo	Braun (Melsungen)
Ständer für Eppendorf- Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
TipOne Graduated Filter Tips (1-200 µm)	Starlab (Ahrensburg)

**Tabelle 15: Verwendete Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Abzug Airflow-control EN 14175	Bense Laborbau (Hardeggen)
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies (Waldbronn)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
Analysewaage Mettler H6T	E. Mettler (Zürich)
Autoklav Heratherm Oven OMS 100	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
AxioCam HRc	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Brutschrank Typ B 5042	Heraeus (Hanau)
Chip Priming Station	Agilent Technologies (Waldbronn)
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems (Milan, Italien)
Fireboy IBS	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Harmony Mixer Uzusiuo, VTX-3000L	Laboratory & Medical Supplies LTD. (Tokyo, Japan)
Heizblock Grant-bio Typ PHMT mit Aufsatz PSC-15, 20*1,5ml	Grant Instruments (Shepreth, Großbritannien)
IKA Ms 3 Vortexer	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Imager M2 Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)

## Material und Methode

Inkubationsschrank T6030	Hereus Instruments (Hanau)
Kamera Leica DFC310 FX	Leica Camera AG (Wetzlar)
Kryostat Jung FRIGOCUT 2800E	Leica (Wetzlar)
Kühlung	Pfeifer Vacuum (Aslar)
Magnetrührer mit Heizung	IKA Labortechnik (Staufen i Br.)
Mikroskop Axio Imager M2	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Mikroskop CX21LEDFS2	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop Leica DM 6000B	Leica Camera AG (Wetzlar)
Nano drop 2000c Spectrophotometer	Peqlab (Erlangen)
Päzisionswaage Mettler K7T	E. Mettler (Zürich, Schweiz)
PC Bildschirm HP ZR22w	HP (Palo Alto, USA)
PC HP Z800 Workstation	HP (Palo Alto, USA)
Perfect Spin P	Peqlab (Erlangen)
Pico 17 centrifuge	Heraeus (Hanau)
Power Supply 232, Vero Power	EPLAX (Bremen)
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Reserach (Watertown, USA)
Pumpe: Pfeifer	Pfeifer Vacuum (Aslar)
RNA Nano Chip	Agilent Technologies (Waldbronn)
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies (Waldbronn)
TKA MicroPur 08.1203	TKA Wasseraufbereitungssysteme (Niederelbert)
Ultraviolet Sterilization PCR Workstation	Peqlab (Erlangen)
Vacuum Concentrater	Bachofer (Reutlingen)
Variomag Elektrorührer Mono	H+P Labortechnik (München)
Vortex Typ VF2	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Vortexer Grant-bio Typ PV-1	Grant Instruments (Shepreth, Großbritannien)
Waage, Kern 470	Kern und Sohn (Balingen)

**Tabelle 16: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Betriebssystem Windows 7, Ult OA HP	Microsoft (Redmond, USA)
2100 Expert Software	Agilent Technologies (Waldbronn)
AxioVision	Carl Zeiss (München)
ImageJ	Open Source Software (National Institute of Health)
Microsoft Excel	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Paint	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft Word	Microsoft (Redmond, USA)
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies (Waldbronn)
R	R Core Team, 2017 (Wien, Österreich)
ZEN Mikroskopsoftware	Carl Zeiss (München)
NormFinder	Open Source Software (Andersen et al., 2004)

**Tabelle 17: Verwendete Labortiere**

<b>Labortiere</b>	<b>Zur Verfügung gestellt von</b>
LSL-Kras <sup>G12D/+</sup> ; LSL-Trp53 <sup>R172H/+</sup> ; Pdx-1-Cre-Mäuse	Tierexperimentelle Einrichtung der Universität Marburg
Wildtyp-Mäuse	Tierexperimentelle Einrichtung der Universität Marburg

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gewicht der Versuchstiere

Das mittlere Gewicht der Mäuse war in den einzelnen Gruppen normalverteilt und es bestand Varzianzhomogenität (Anhang Tab. 18). Das mittlere Gewicht der Versuchstiere betrug  $27,04 \pm 0,73$  g. Männliche Tiere wogen im Mittel  $29,44 \pm 0,92$  g und waren signifikant (T-Test:  $p < 0,001$ ) schwerer als weibliche Tiere ( $23,51 \pm 0,46$  g). Insgesamt waren Mäuse mit Karzinom (CA und CA HH:  $26,29 \pm 0,87$  g) tendenziell leichter (T-Test:  $p = 0,38$ ) als Wildtyp-Mäuse (WT und WT HH:  $27,6 \pm 1,1$  g). Harmine-behandelte Mäuse (WT HH und CA HH:  $25,95 \pm 1,0$  g) waren tendenziell leichter (T-Test:  $p = 0,201$ ) als unbehandelte Mäuse (WT und CA:  $27,86 \pm 1,02$  g).

In der ANOVA konnte in der Gesamtstichprobe kein signifikanter Effekt von PDAC, HH oder deren Interaktion gezeigt werden. Da die Verteilung männlicher und weiblicher Tiere in den unterschiedlichen Gruppen nicht gleich war (Abb. 12), erfolgte zusätzlich eine geschlechtergetrennte Analyse. Hier zeigte sich in der ANOVA für die männlichen Tiere ein signifikanter Einfluss sowohl von PDAC ( $p = 0,01$ ) als auch von HH ( $p = 0,006$ ). Die Interaktion (IA) von PDCA und HH war bei den männlichen Tieren nicht signifikant. Die männlichen Karzinom-Tiere waren sowohl in der unbehandelten (CA) als auch in der HH-behandelten (CA HH) Gruppe leichter als die männlichen Wildtyp-Tiere (WT bzw. WT HH). Ein signifikanter Gewichtsunterschied konnte im Post-hoc-Test bei den männlichen Tieren jedoch nur zwischen WT und CA HH gezeigt werden ( $p = 0,003$ ). Bei den weiblichen Tieren lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor.

## Ergebnisse

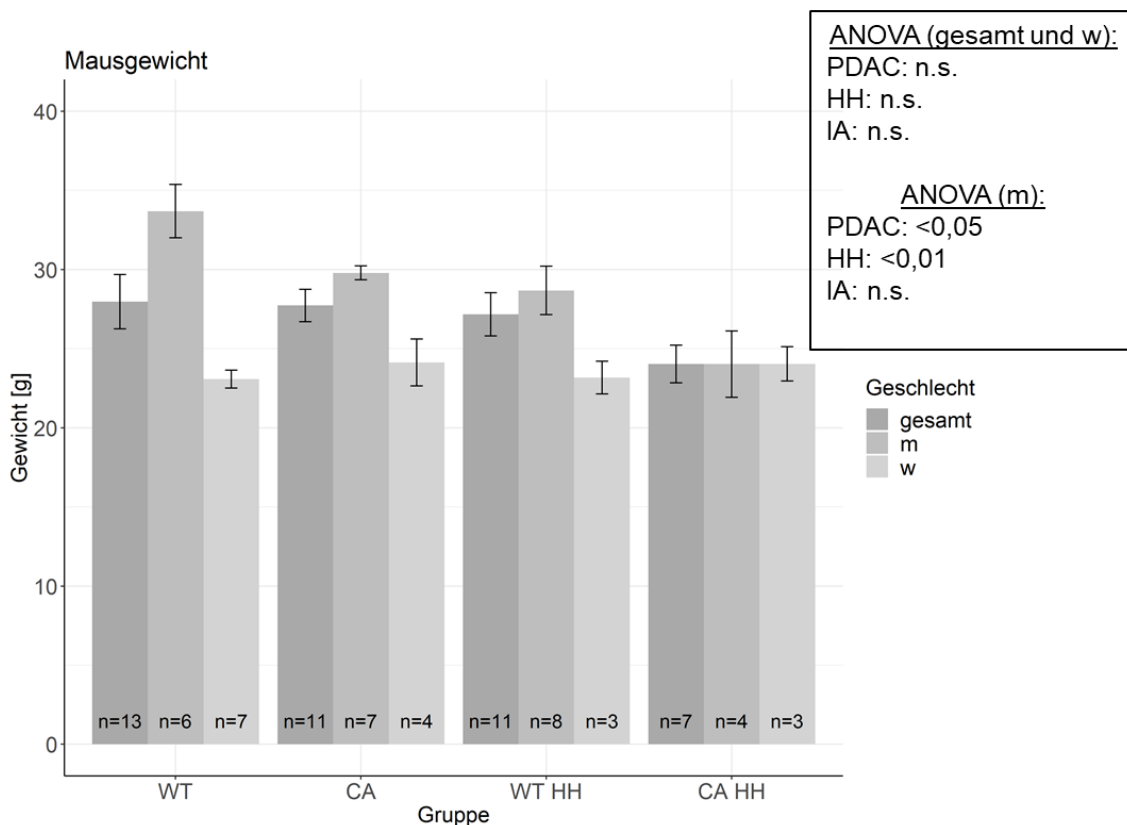


Abbildung 12: Gewicht der Versuchstiere in Gramm (g); Mittelwert  $\pm$  SE

## 3.2 Immunhistochemische Färbungen

### 3.2.1 Glutaminsynthetase

Die immunhistochemische Färbung mit GS-Antikörper bestätigte die vorbeschriebene streng perivenöse GS-Expression in der Leber in 2-3 Zelllagen um die Zentralvene (Gebhardt und Mecke, 1983). Periportal war keine GS-Immunreaktivität nachweisbar (Abb. 14 und 15). Für die GS-positive Fläche zeigte sich in allen vier Gruppen eine Normalverteilung. Es bestand gleiche Varianz (Anhang Tab. 18). In der ANOVA konnte sowohl für PDAC ( $p < 0,001$ ) als auch für HH ( $p = 0,004$ ) ein signifikanter Einfluss gezeigt werden. Die Interaktion beider Faktoren war nicht signifikant ( $p = 0,053$ ). Der Post-hoc-Test ergab eine signifikante Reduktion der GS-positiven Fläche bei CA im Vergleich zu WT um 56 % ( $p < 0,001$ ). Bei CA HH vs. WT HH war die GS-positive Fläche hingegen nur um 15 % reduziert ( $p = 0,703$ ).

## Ergebnisse

(Abb. 13). Im Vergleich zu CA-Mäusen wiesen die CA HH-Mäuse eine signifikant um 210 % erhöhte GS-positive Fläche auf ( $p=0,011$ ).

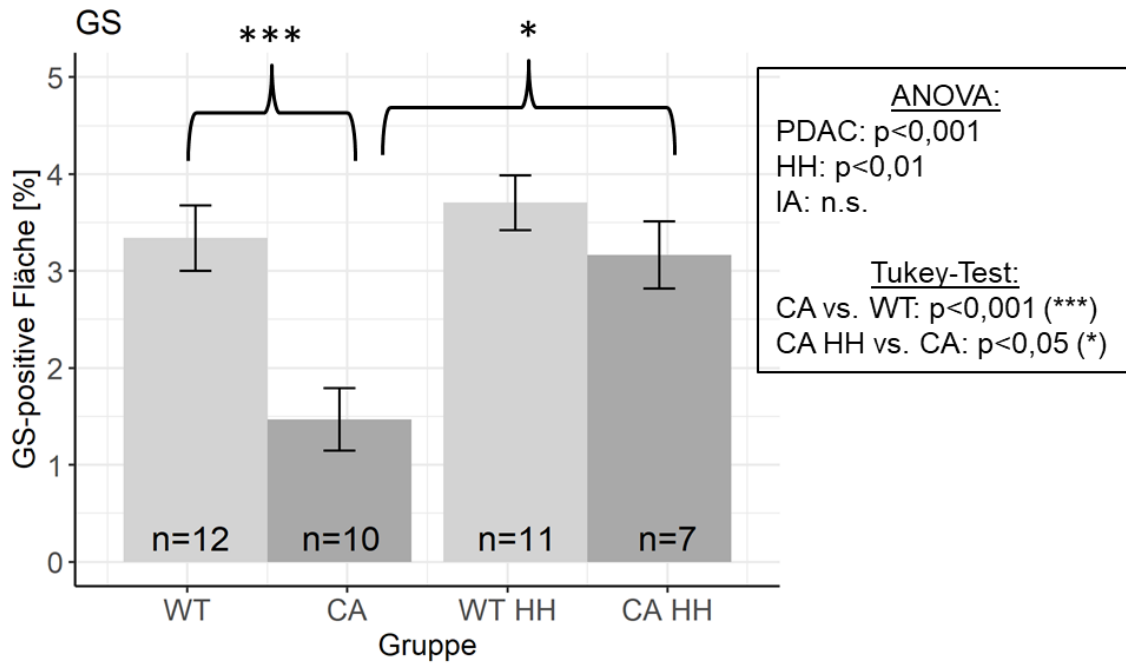


Abbildung 13: Prozentanteil der GS-positiven Fläche, Mittelwert  $\pm$  SE

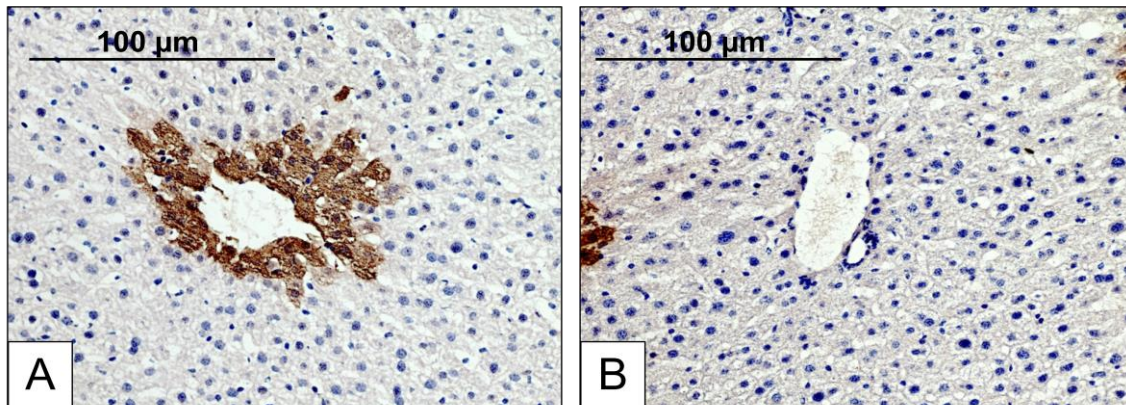
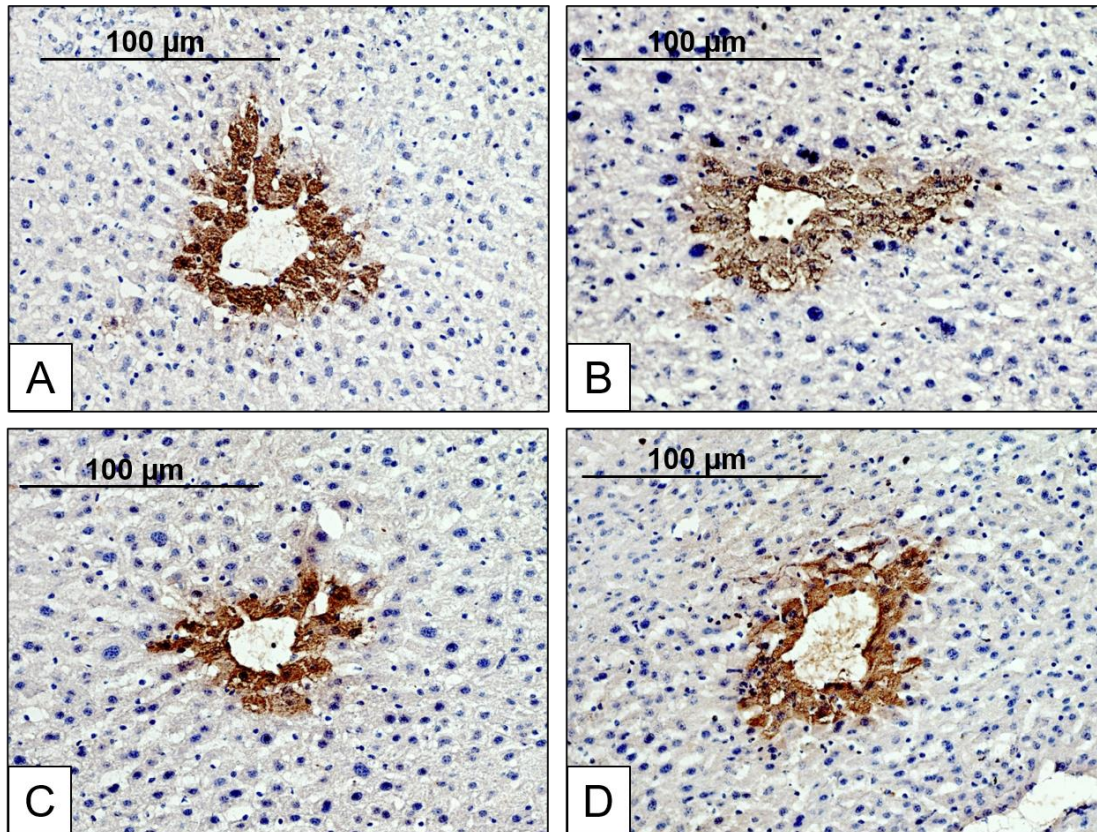


Abbildung 14: GS-Färbung (IHC); Originalvergrößerung x200.  
(A): Zentralvene. (B): Periportalfeld.





**Abbildung 15: GS-Färbung Zentralvenen; Originalvergrößerung x200.**  
 (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH

### 3.2.2 MAO-A

Bezüglich der MAO-A-positiven Fläche zeigte sich in der durchgeführten immunhistochemischen Färbung eine bevorzugt perivenöse Lokalisation der MAO-A analog zur GS, während periportal eine MAO-A-Immunreaktivität nur in den Zellen des Endothels und Gallengangsepithels nachweisbar war (Abb. 17, 18 und 19).

Für die MAO-A-positive Fläche zeigten die untersuchten Gruppen homogene Varianz. Bei WT HH bestand eine Abweichung von der Normalverteilung, während in den anderen drei Gruppen eine Normalverteilung vorlag (Anhang Tab. 18). Für PDAC konnte in der ANOVA kein signifikanter Effekt gezeigt werden (Abb. 16). Zwischen WT und CA sowie zwischen WT HH und CA HH waren keine wesentlichen Unterschiede bzgl. der MAO-A-positiven Fläche nachweisbar. HH stellte sich in der ANOVA als signifikanter Einflussfaktor dar ( $p < 0,001$ ). Ein signifikanter Interaktionseffekt lag in der ANOVA nicht vor.

## Ergebnisse

Zwischen unbehandelten (WT und CA) und HH-behandelten (WT HH und CA HH) Tieren konnte eine deutliche Reduktion der MAO-A-positiven Fläche gezeigt werden. In der CA HH-Gruppe war die MAO-A-positiven Fläche um 53 % im Vergleich zur CA-Gruppe reduziert ( $p=0,069$ ). Bei WT HH war eine signifikante Reduktion der MAO-A-positiven Fläche um 63 % im Vergleich zu WT nachweisbar ( $p=0,004$ ).

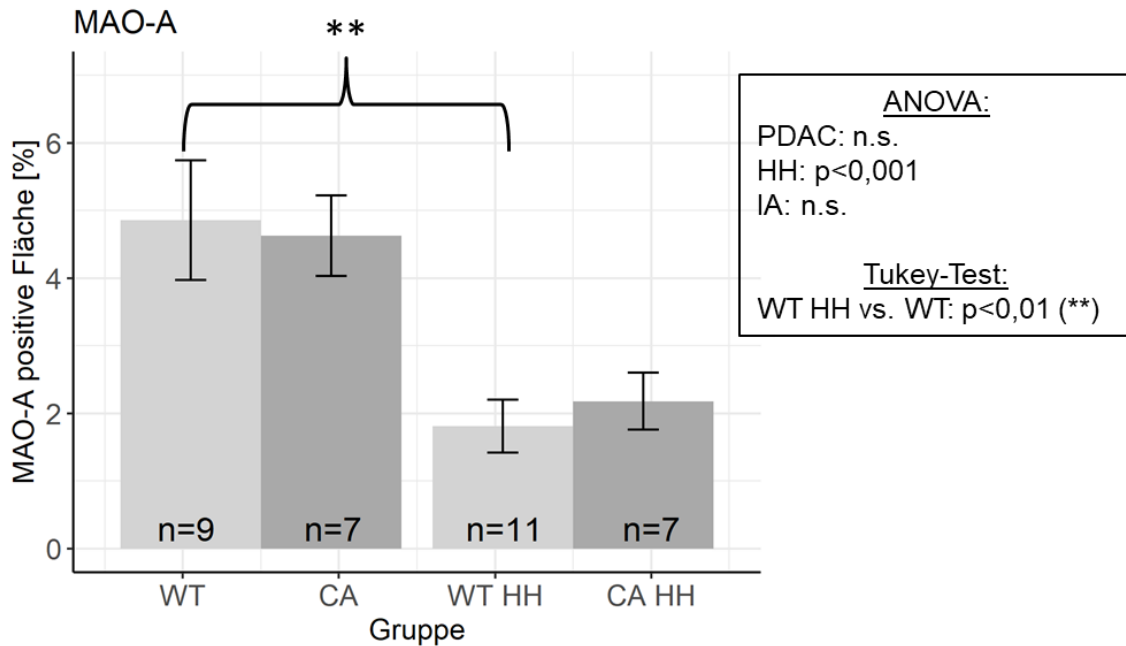


Abbildung 16: Prozentanteil der MAO-A-positiven Fläche, Mittelwert  $\pm$  SE

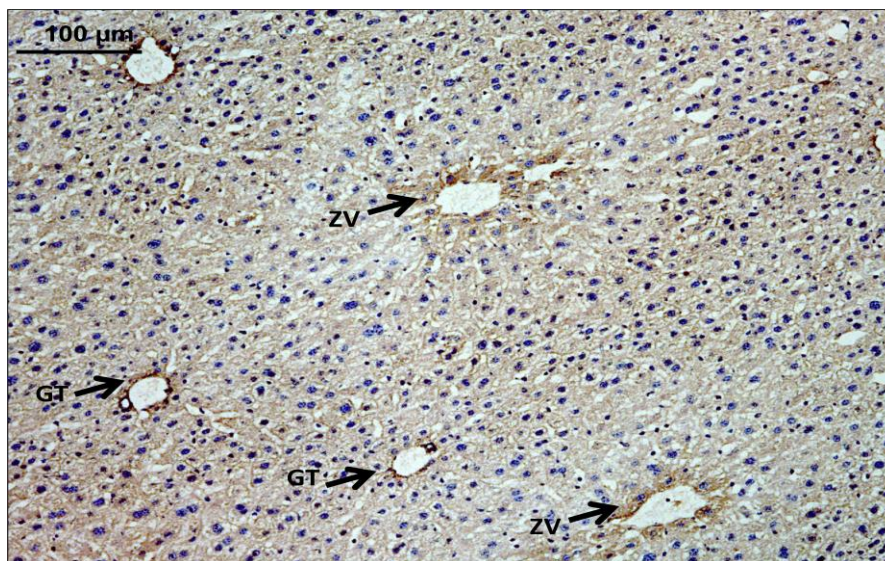


Abbildung 17: MAO-A-Färbung (IHC); Originalvergrößerung x100; Zentralvenen (ZV) und Glisson-Trias (GT)



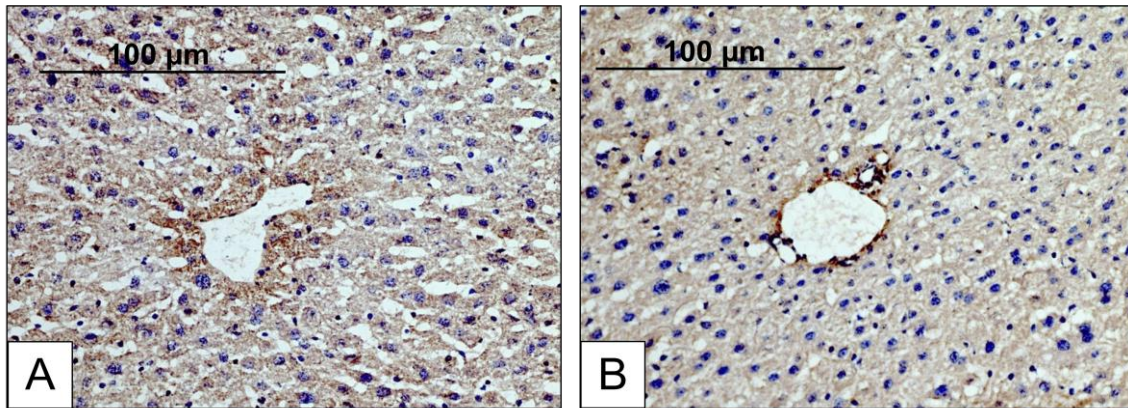


Abbildung 18: MAO-A-Färbung (IHC); Originalvergrößerung x200; (A) Zentralvene; (B) Glissontrias

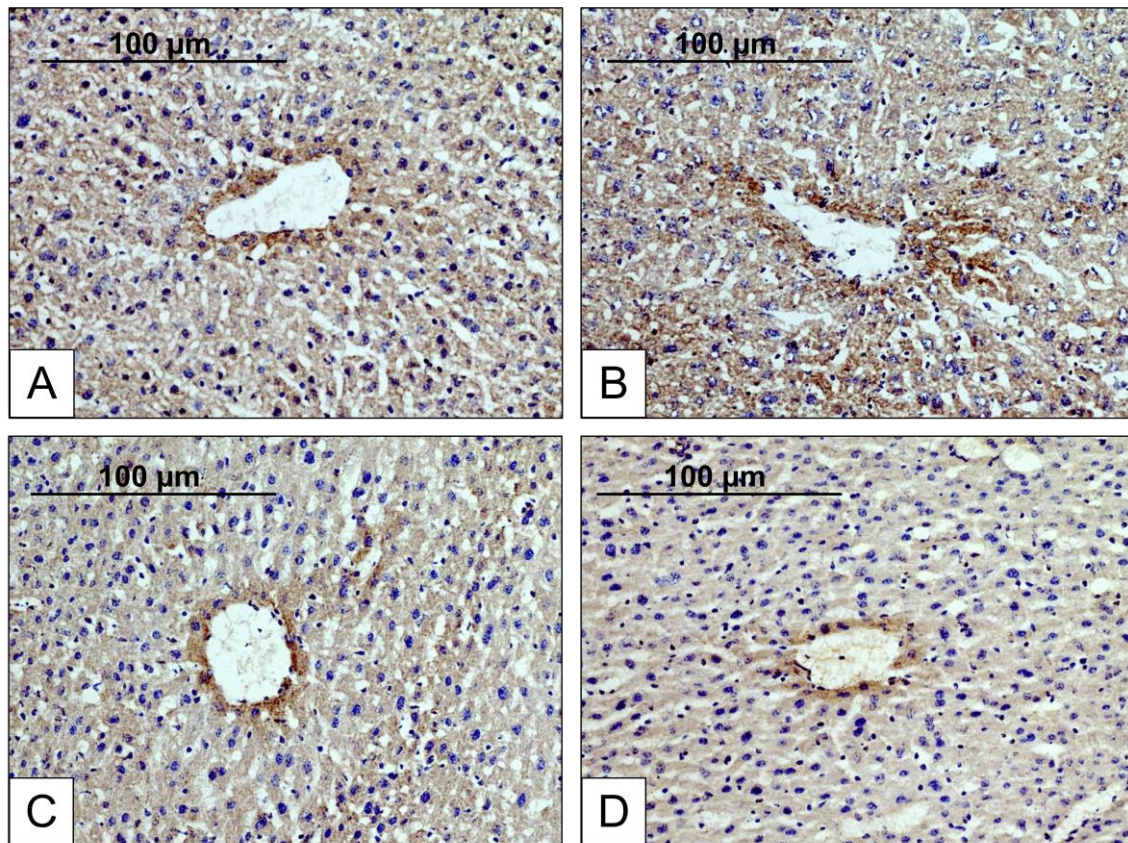


Abbildung 19: MAO-A-Färbung (IHC) Zentralvenen; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH

### 3.2.3 Interleukin-1 $\beta$

Für die untersuchten Parameter ergab sich in allen Gruppen Normalverteilung und homogene Varianz (Anhang Tab. 18). Für den Gesamtanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen zeigte sich in der ANOVA ein signifikanter Einfluss für PDAC ( $p=0,04$ ), HH ( $p=0,012$ ) sowie für deren Interaktion ( $p=0,002$ ). Bei CA-Tieren war der Gesamtanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen 40 % höher als bei WT-Tieren ( $p=0,002$ ). WT HH und CA HH unterschieden sich hingegen nicht wesentlich voneinander (Abb. 20). Bei CA HH-Tieren war der Gesamtanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen 28 % niedriger als bei CA-Tieren ( $p=0,002$ ). Für die perivenösen und periportal Ausschnitte waren in der ANOVA die gleichen signifikanten Einflüsse durch PDAC, HH und Interaktion nachweisbar (Abb. 21).

Bezüglich des Prozentanteils IL-1 $\beta$ -positiver Zellen unterschieden sich perivenöse (Abb. 22) und periportale Ausschnitten (Abb. 23) nicht relevant voneinander (Abb. 21).

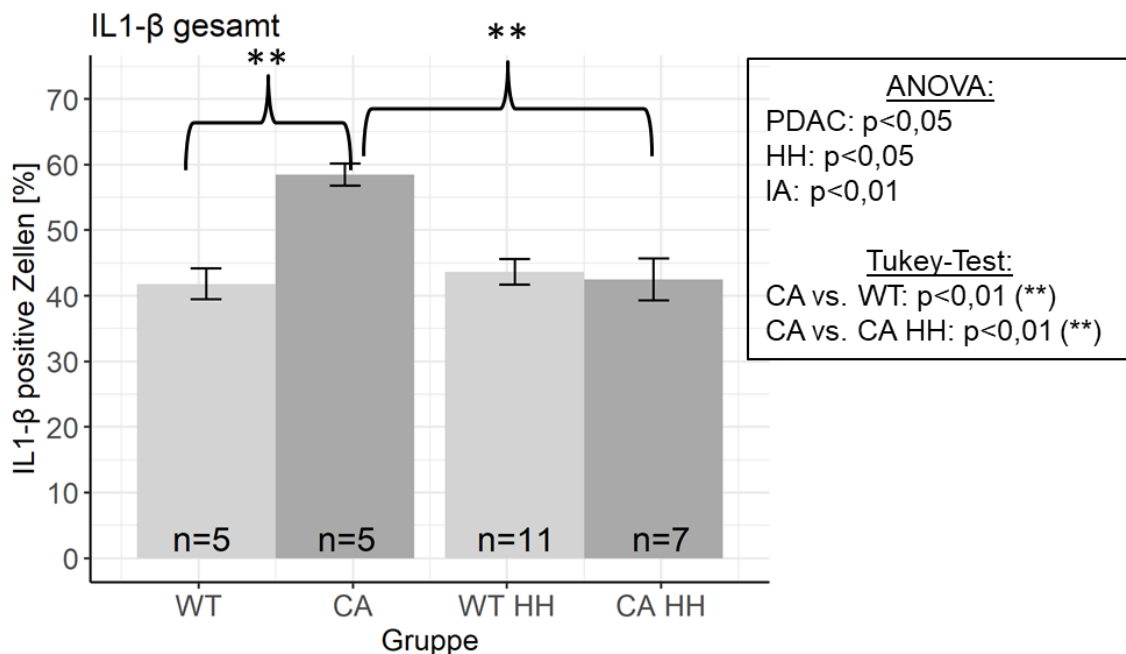


Abbildung 20: Prozentanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen insgesamt, Mittelwert  $\pm$  SE

## Ergebnisse

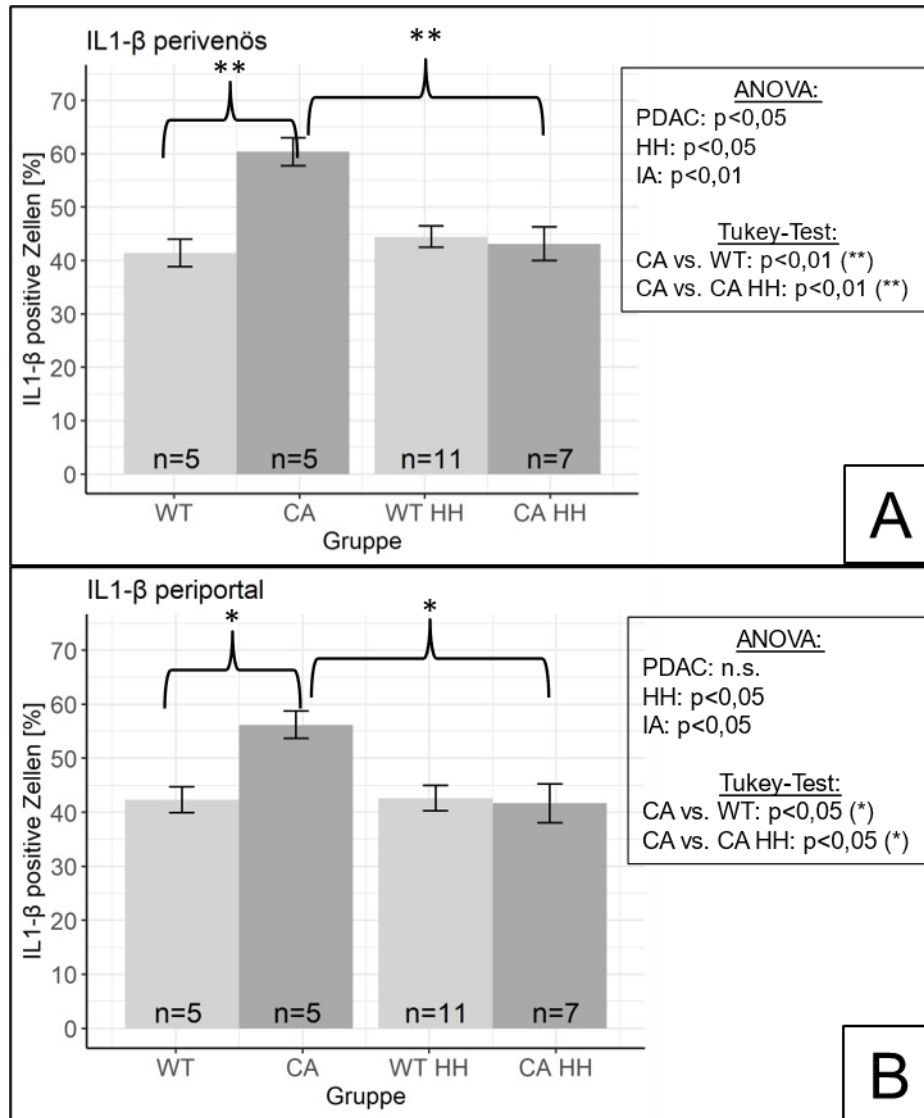


Abbildung 21: Prozentanteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen (A) perivenös und (B) periportal, Mittelwert  $\pm$  SE



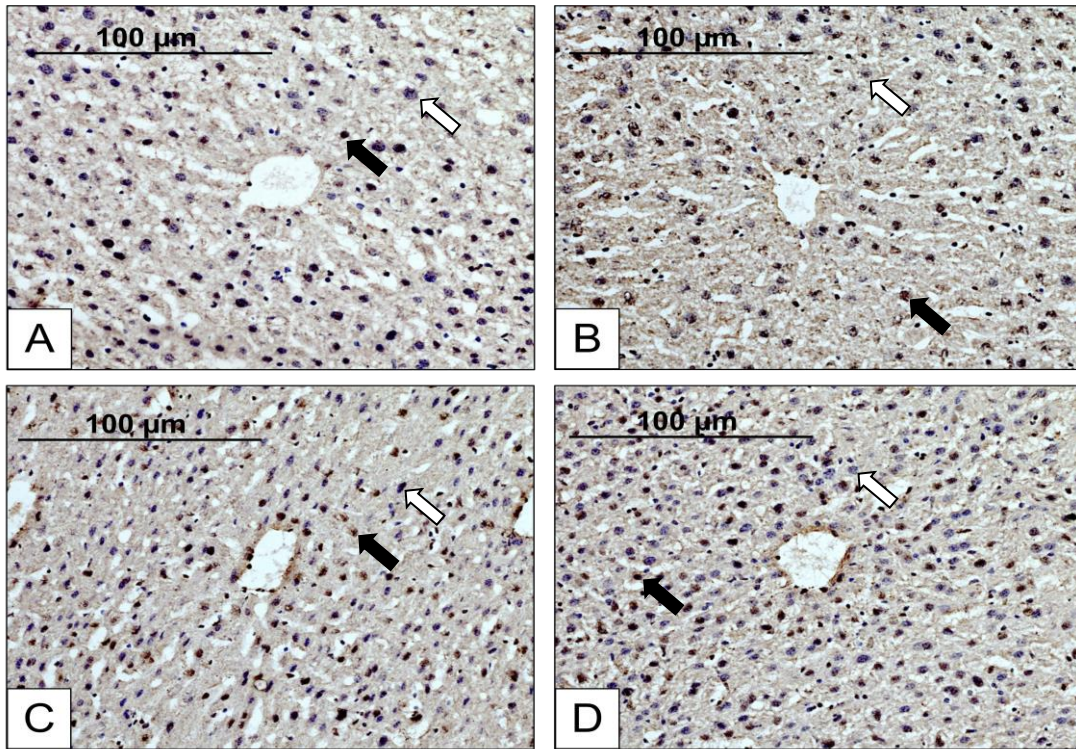


Abbildung 22: IL-1 $\beta$ -Färbung (IHC) Zentralvenen; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

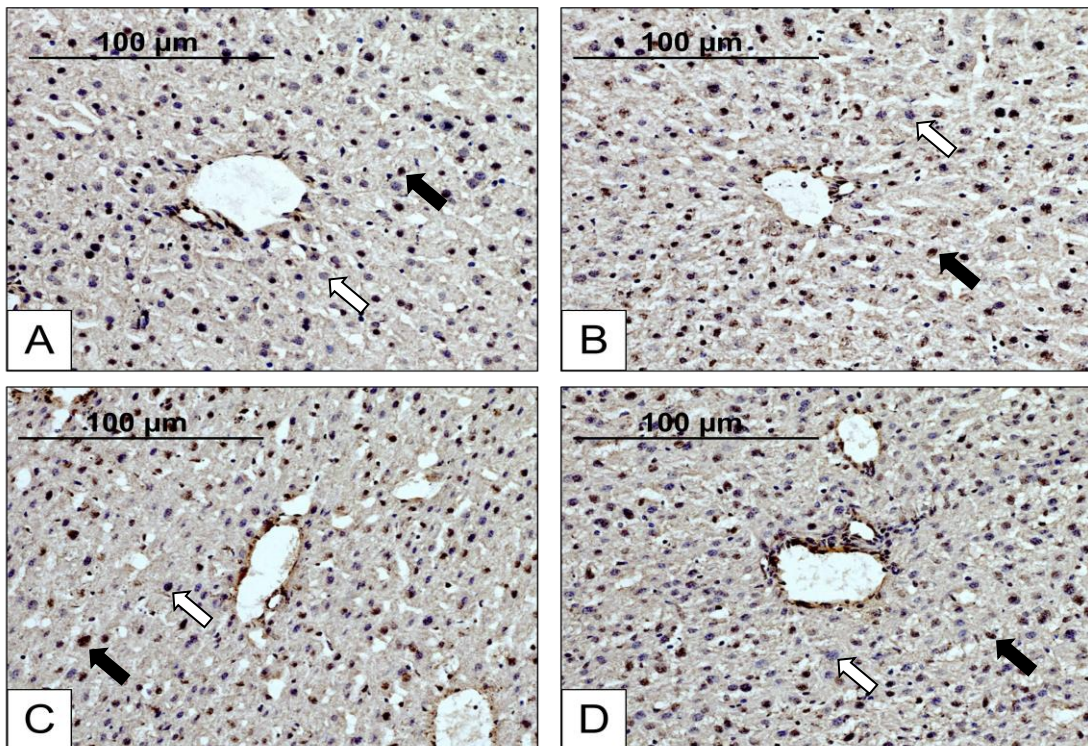


Abbildung 23: IL-1 $\beta$ -Färbung (IHC) Periportalfelder; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

### 3.2.4 COX-2

Für die untersuchten Parameter ergaben sich gleiche Varianzen. Eine Abweichung von der Normalverteilung ergab sich lediglich für den Prozentanteil COX-2-positiver Zellen in Zentralvenen-Ausschnitten in der Gruppe WT HH (Anhang Tab. 18). In der immunhistochemischen COX-2-Färbung konnte ein höherer Gesamtanteil COX-2-positiver Zellen bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) als bei Wildtypen (WT und WT HH) nachgewiesen werden (Abb. 24). In der ANOVA ergab sich ein signifikanter PDAC-Effekt ( $p=0,002$ ). Im Post-hoc-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der Gesamtanteil COX-2-positiver Zellen war bei CA um 49 % höher als bei WT ( $p=0,136$ ) und bei CA HH um 38 % höher als bei WT HH ( $p=0,087$ ). Für HH-Behandlung ergab sich in der ANOVA kein signifikanter Effekt. Die Interaktion von PDAC und HH war nicht signifikant.

Auch für die perivenösen (Abb. 26) und periportalen (Abb. 27) Ausschnitte konnte ein signifikanter PDAC-Effekt (perivenös  $p=0,004$  und periportal  $p=0,004$ ) nachgewiesen werden (Abb. 25). Für HH und Interaktion zeigte sich hier ebenfalls jeweils kein Einfluss. Auch signifikante Gruppenunterschiede waren im Post-hoc-Test nicht nachweisbar.

In der gesamten Studienpopulation war der Anteil COX-2-positiver Zellen in den perivenösen Ausschnitten (insg. 22,44 % COX-2 positive Zellen) signifikant höher (T-Test:  $p=0,009$ ) als in den periportalen Ausschnitten (insg. 17,70 % COX-2 positive Zellen). In den einzelnen vier Gruppen zeigten sich ebenfalls jeweils in den perivenösen Ausschnitten erhöhte Anteile COX-2-positiver Zellen gegenüber den periportalen Ausschnitten, jedoch ergab sich nur für WT HH ein signifikanter Unterschied (T-Test:  $p=0,031$ ).

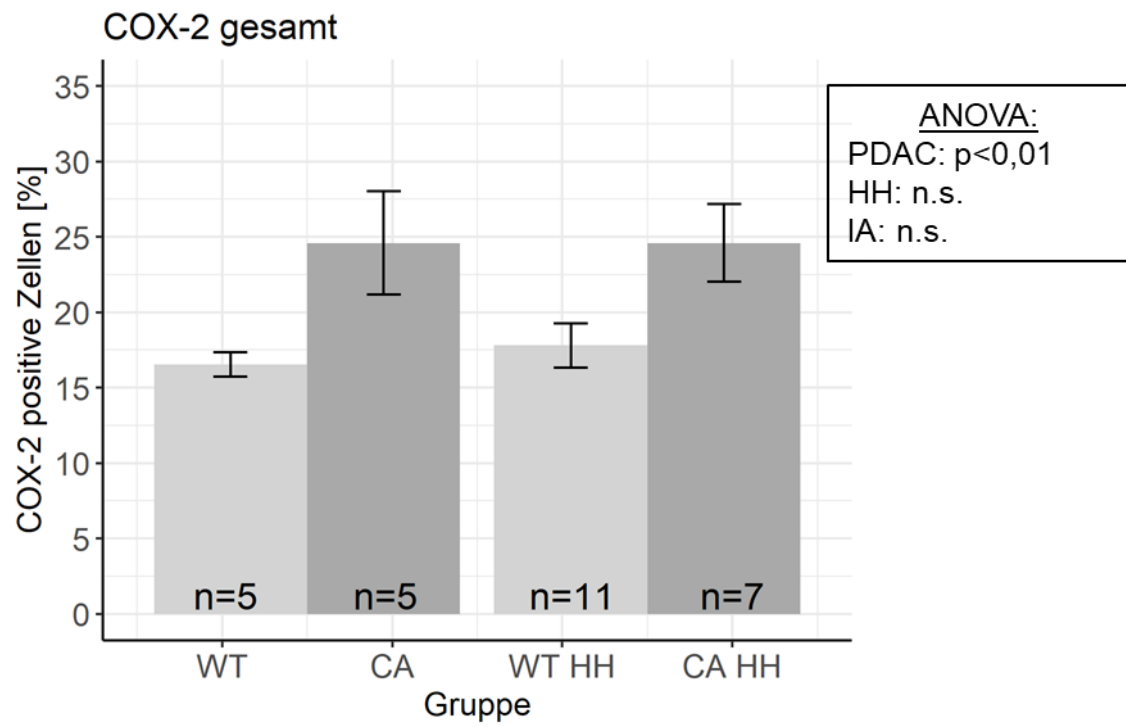


Abbildung 24: Prozentanteil COX-2-positiver Zellen insgesamt, Mittelwert  $\pm$  SE

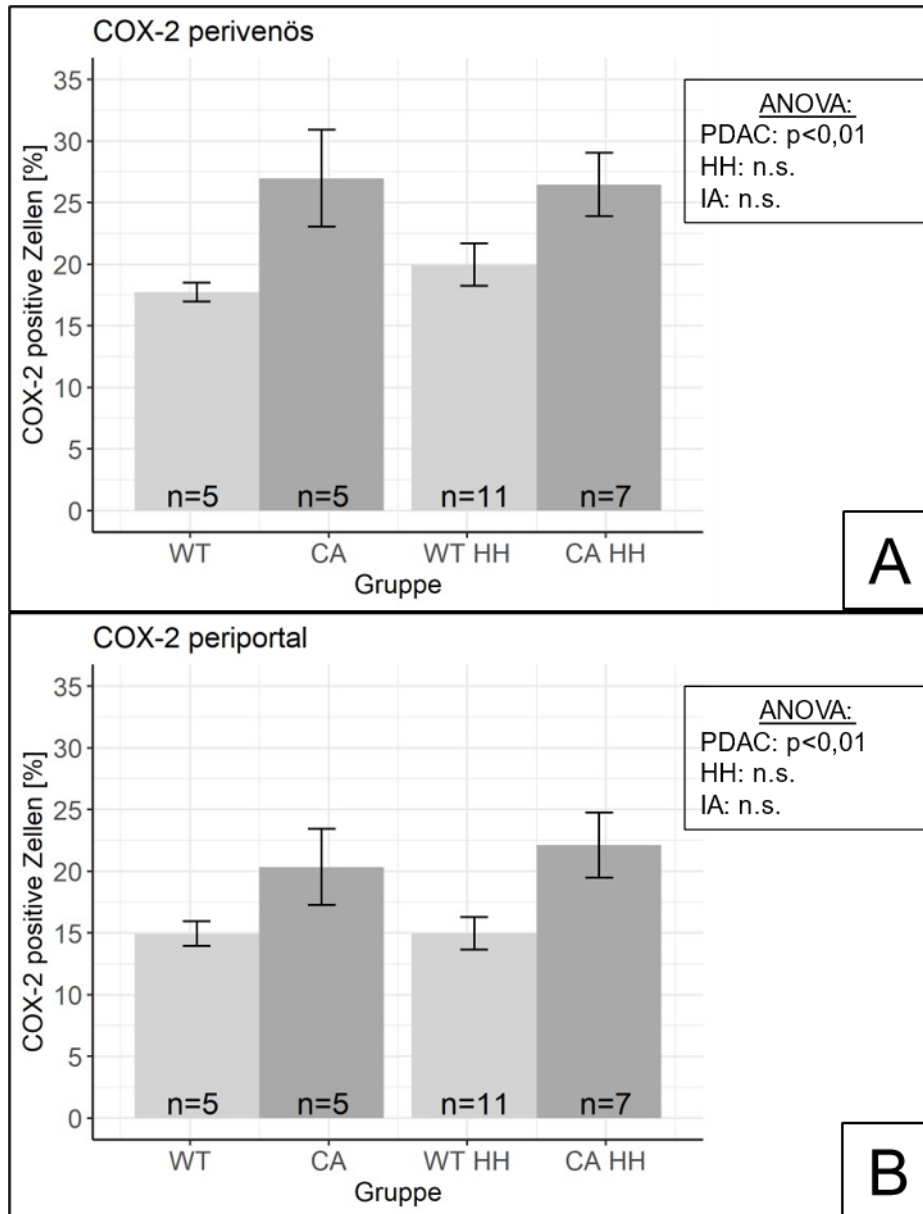


Abbildung 25: Prozentanteil COX-positiver Zellen (A) perivenös und (B) periportal, Mittelwert  $\pm$  SE



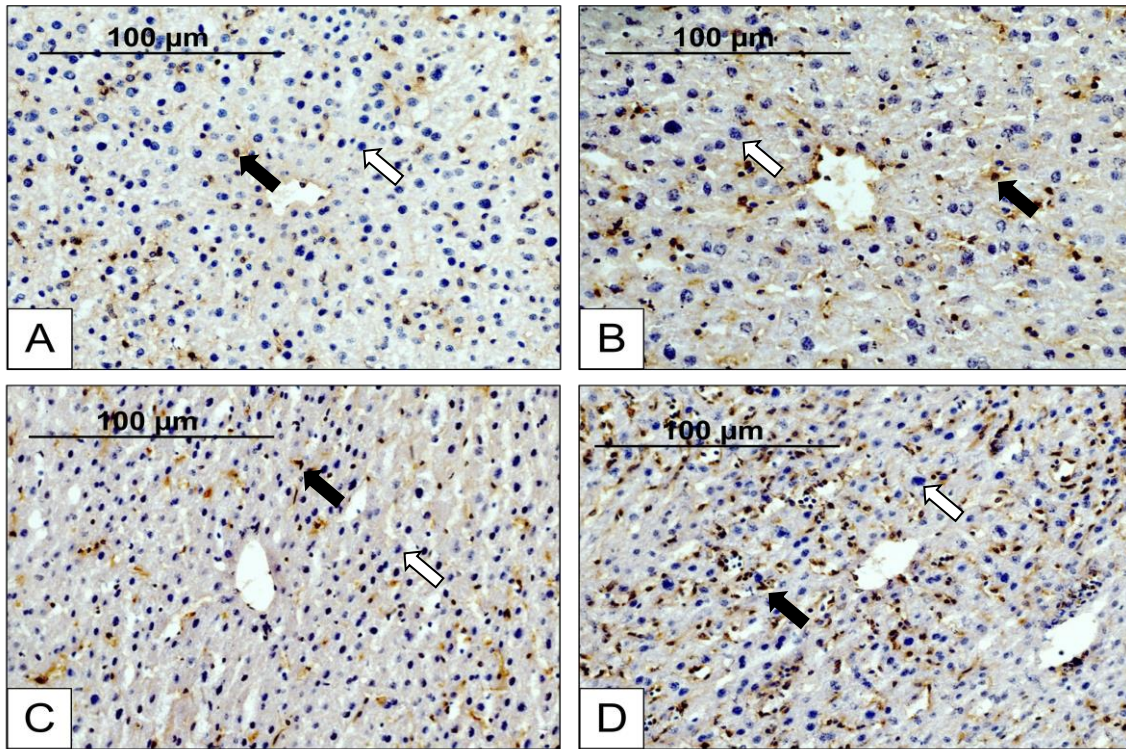


Abbildung 26: COX-2-Färbung (IHC) Zentralvenen; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

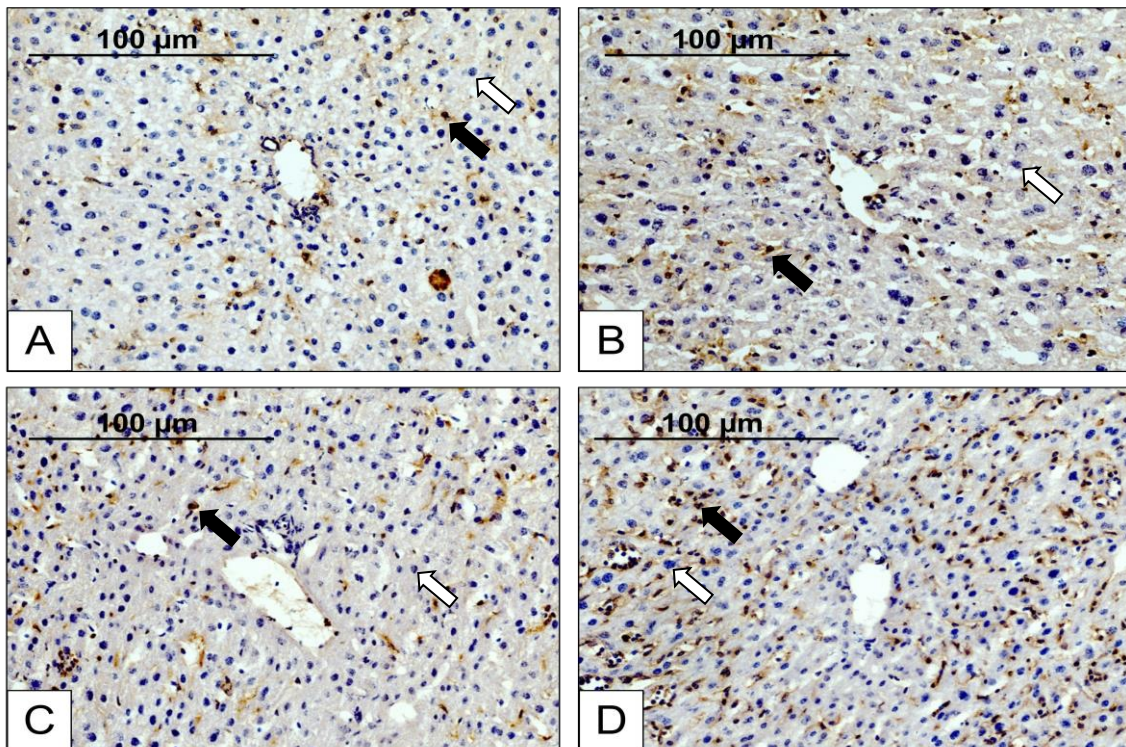


Abbildung 27: COX-2-Färbung (IHC) Periportalfelder; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).



### 3.2.5 CD68

In allen Gruppen zeigte sich Normalverteilung. Homogene Varianz zeigte sich beim Gesamtanteil CD68-positiver Zellen und bei den periportalen Ausschnitten, nicht jedoch bei den perivenösen Ausschnitten (Anhang Tab. 18). Bezüglich des Gesamtanteils CD68-positiver Zellen konnte in der ANOVA ein signifikanter Einfluss von PDAC ( $p > 0,001$ ) und von HH ( $p = 0,031$ ) gezeigt werden (Abb. 28). Für die Interaktion zeigte sich kein signifikanter Effekt. Bei CA-Mäusen war der Gesamtanteil CD68-positiver Zellen 260 % höher als bei WT-Tieren ( $p < 0,001$ ). Bei CA HH-Mäusen war der Gesamtanteil CD68-positiver Zellen 170 % höher als bei WT HH-Mäusen ( $p = 0,046$ ). Tendenziell zeigte sich, dass der Gesamtanteil CD68-positiver Zellen bei CA HH im Vergleich zu CA vermindert war (- 33 %;  $p = 0,064$ ). Bei isolierter Betrachtung der perivenösen (Abb. 30) Ausschnitte ergab sich ebenfalls ein signifikanter PDAC-Effekt ( $p < 0,001$ ), jedoch kein HH-Effekt ( $p = 0,09$ ). Für die periportal (Abb. 31) Ausschnitte konnte für PDAC ( $p < 0,001$ ), für HH ( $p = 0,011$ ) sowie für die Interaktion ( $p = 0,038$ ) ein signifikanter Effekt gezeigt werden (Abb. 29). Im Post-Hoc-Test unterschieden sich in den periportal Ausschnitten CA und WT sowie CA HH und WT HH nicht signifikant, bei CA HH war der periportale Prozentanteil CD68-positiver Zellen jedoch signifikant niedriger als bei CA ( $p = 0,021$ ).

## Ergebnisse

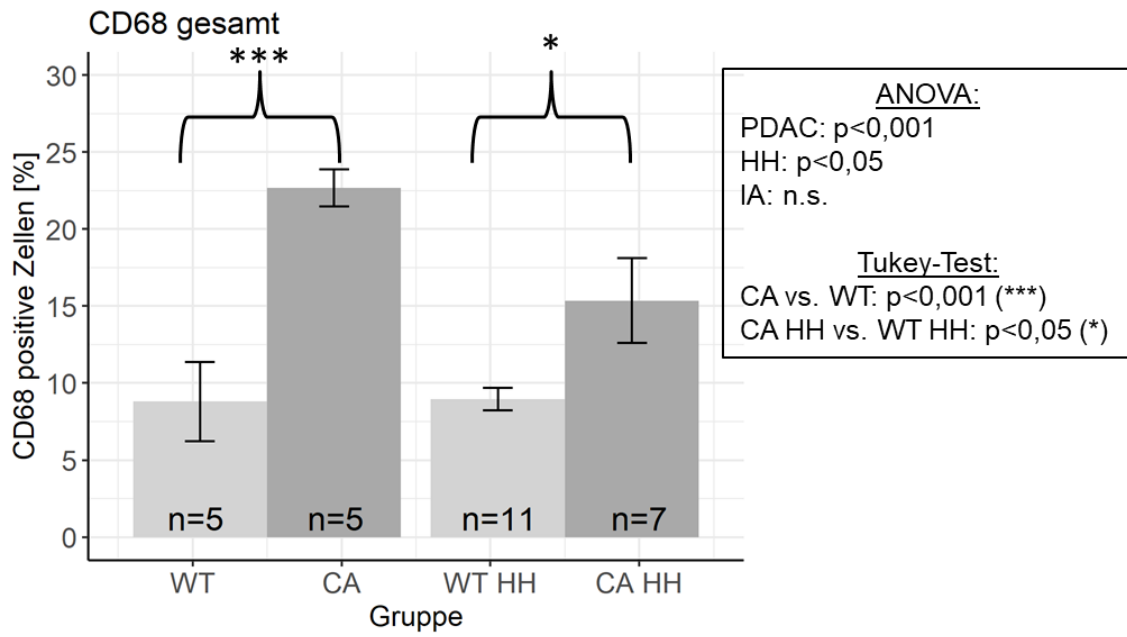


Abbildung 28: Prozentanteil CD68-positiver Zellen insgesamt, Mittelwert  $\pm$  SE

## Ergebnisse

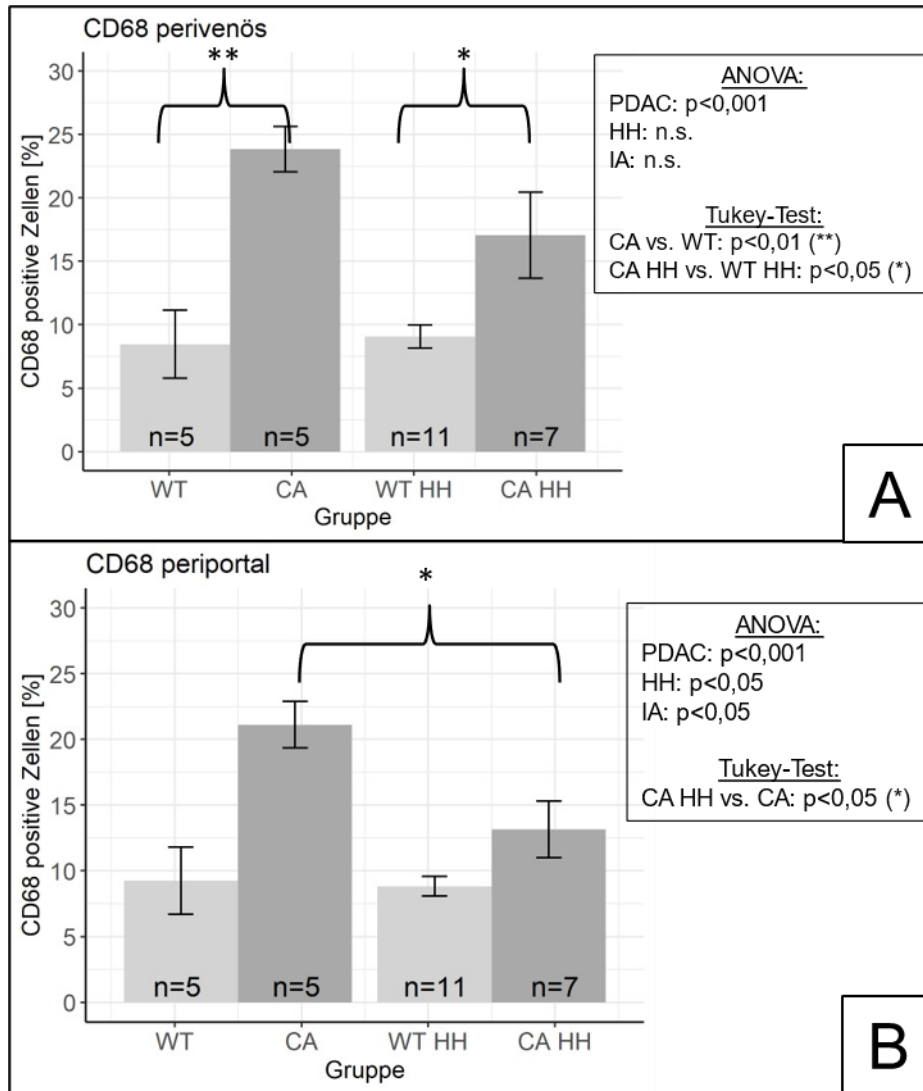


Abbildung 29: Prozentanteil CD68-positiver Zellen (A) perivenös und (B) periportal, Mittelwert  $\pm$  SE



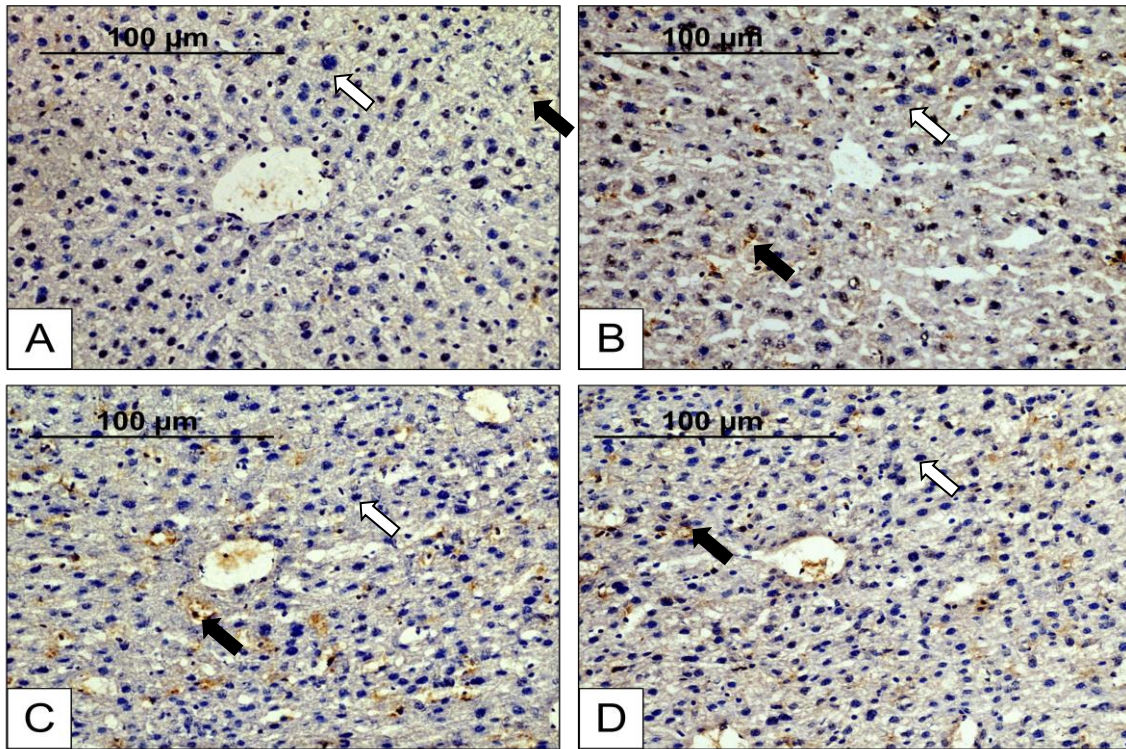


Abbildung 30: CD68-Färbung (IHC) Zentralvenen; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

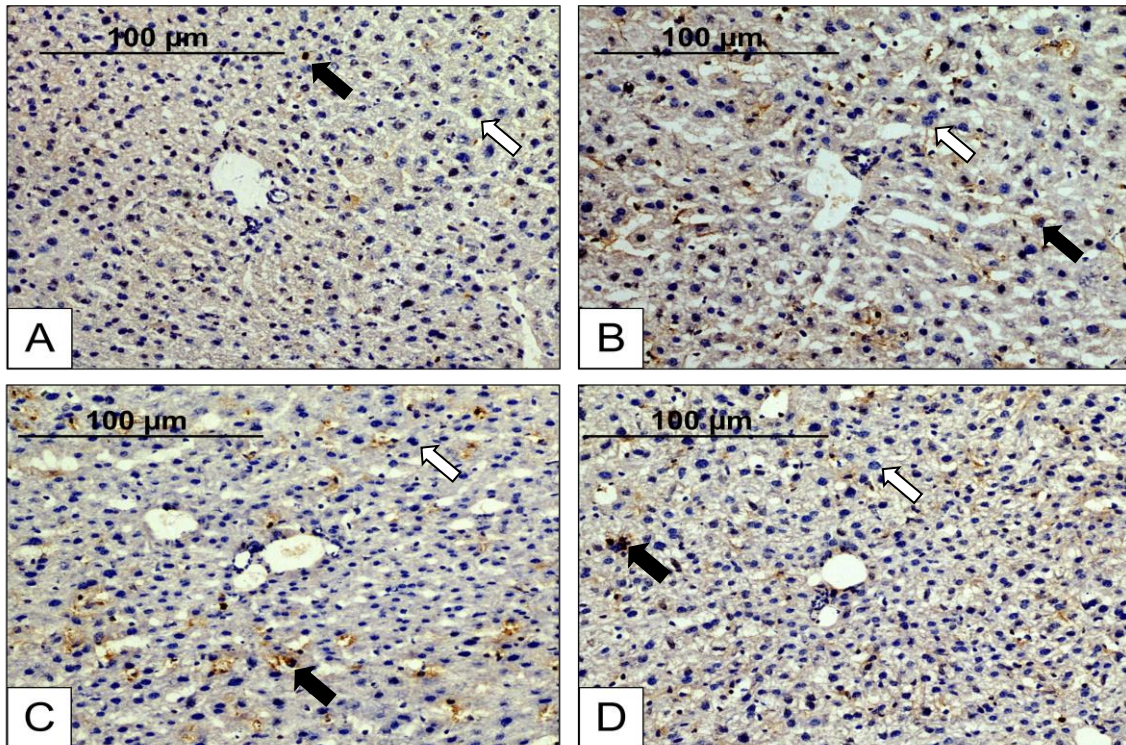


Abbildung 31: CD68-Färbung (IHC) Periportalfelder; Originalvergrößerung x200. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung negativer (weißer Pfeil) und positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

### 3.3 PAS

In der PAS-Färbung grenzten sich die PAS-positiven, glykogenhaltigen Zellen deutlich durch die magentafarbene Färbung gegenüber den PAS-negativen, blassviolett gefärbten Zellen ab. Auffällig war, dass sich vor allem um die Zentralvenen PAS-positive Flächen darstellten, während um die Glisson-Trias keine bzw. nur kleine PAS-positive Flächen nachweisbar waren (Abb. 33). Da die Auswertung mittels automatisierter Segmentierung erfolgte und lediglich die PAS-positive Fläche pro Schnitt bestimmt wurde (nicht die einzelnen Zellen; vergl. Methodenteil), kann aus den Daten keine Schlussfolgerung zur zonalen Verteilung der PAS-positiven Flächen gezogen werden.

Für die PAS-positive Fläche lag Varianzhomogenität und Normalverteilung in allen Gruppen vor (Anhang Tab. 18). Mittels ANOVA konnte ein signifikanter Effekt von PDAC ( $p=0,022$ ) und von HH ( $p=0,006$ ) für die PAS-positive Fläche gezeigt werden. Die Interaktion ergab keinen signifikanten Effekt. Bei CA gegenüber WT war die prozentuale PAS-positive Fläche um 238 % erhöht, bei CA HH gegenüber WT HH um 42 % (Abb. 32). Die prozentuale PAS-positive Fläche war bei CA HH gegenüber CA um 70 % erhöht und bei WT HH gegenüber WT um 303 %. Diese Unterschiede waren im Post-Hoc-Test jedoch nicht signifikant.



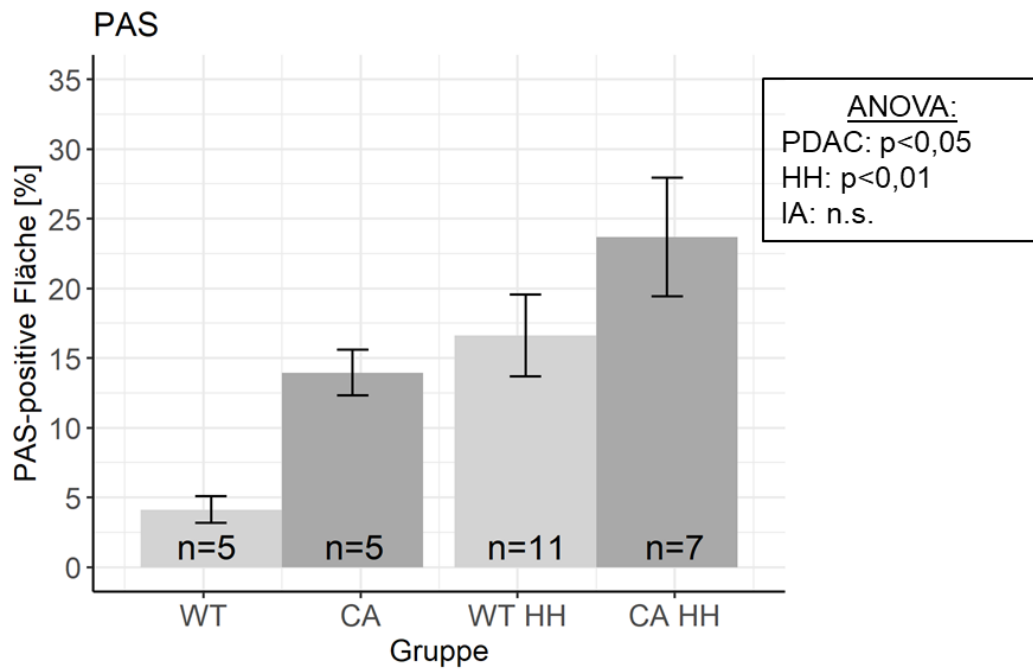


Abbildung 32: Prozentanteil der PAS-positiven Fläche, Mittelwert  $\pm$  SE

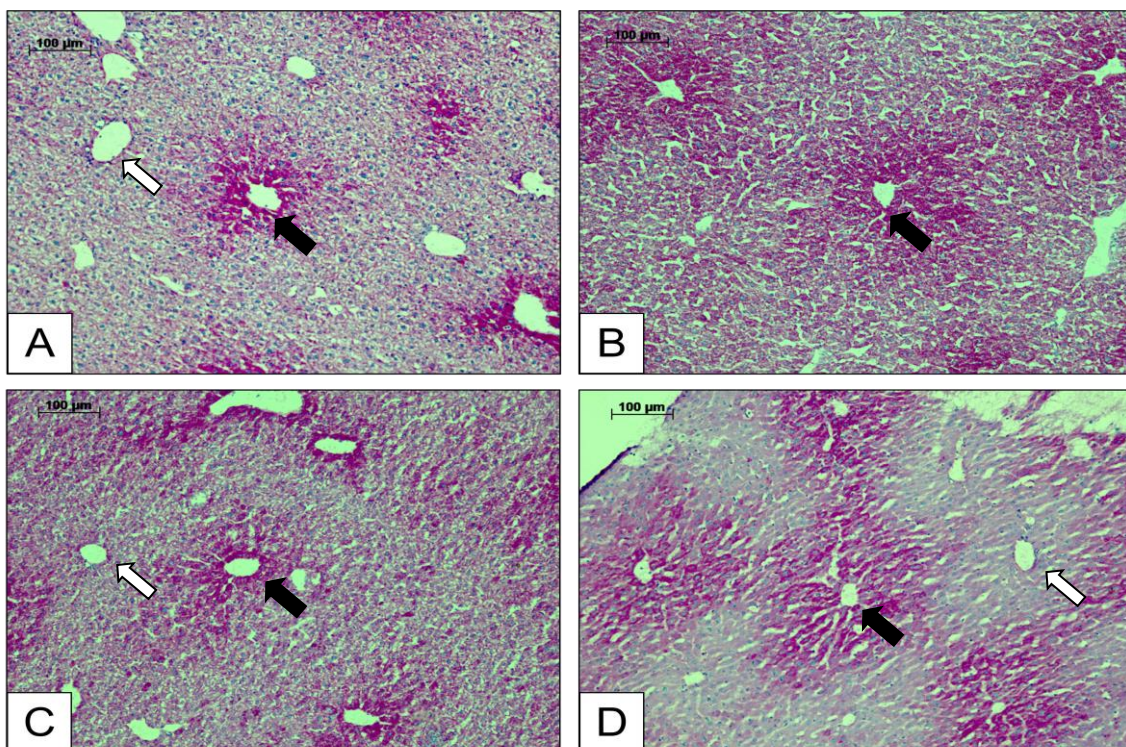


Abbildung 33: PAS-Reaktion; Originalvergrößerung x100. (A): WT (B): CA (C): WT HH (D): CA HH. Exemplarische Markierung von Zentralvenen (schwarzer Pfeil) und Glisson-Trias (weißer Pfeil).

### 3.4 PCR

Von 19 Parametern zeigten 8 eine Normalverteilung in allen Gruppen und homogene Varianz. Bei 11 Parametern wiesen einzelne Gruppen Abweichungen auf (Anhang Tab. 27).

#### 3.4.1 Glutaminstoffwechsel

##### 3.4.1.1 Glutaminsynthetase

Für die relative Expression der GS-mRNA im untersuchten Lebergewebe konnten in der ANOVA ein signifikanter PDAC- ( $p=0,018$ ) und ein signifikanter HH-Effekt ( $p=0,026$ ) gezeigt werden. Die Interaktion war nicht signifikant.

Bei den CA-Tieren war die relative GS-mRNA-Expression um 27 % gesteigert im Vergleich zu den WT-Tieren (Abb. 34). Hingegen war bei CA HH gegenüber CA die relative GS-Genexpression um 21 % vermindert. Auch bei WT HH vs. WT war die relative GS-Genexpression vermindert (-15 %). WT und CA HH unterschieden sich nicht. Im Post-hoc-Test waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

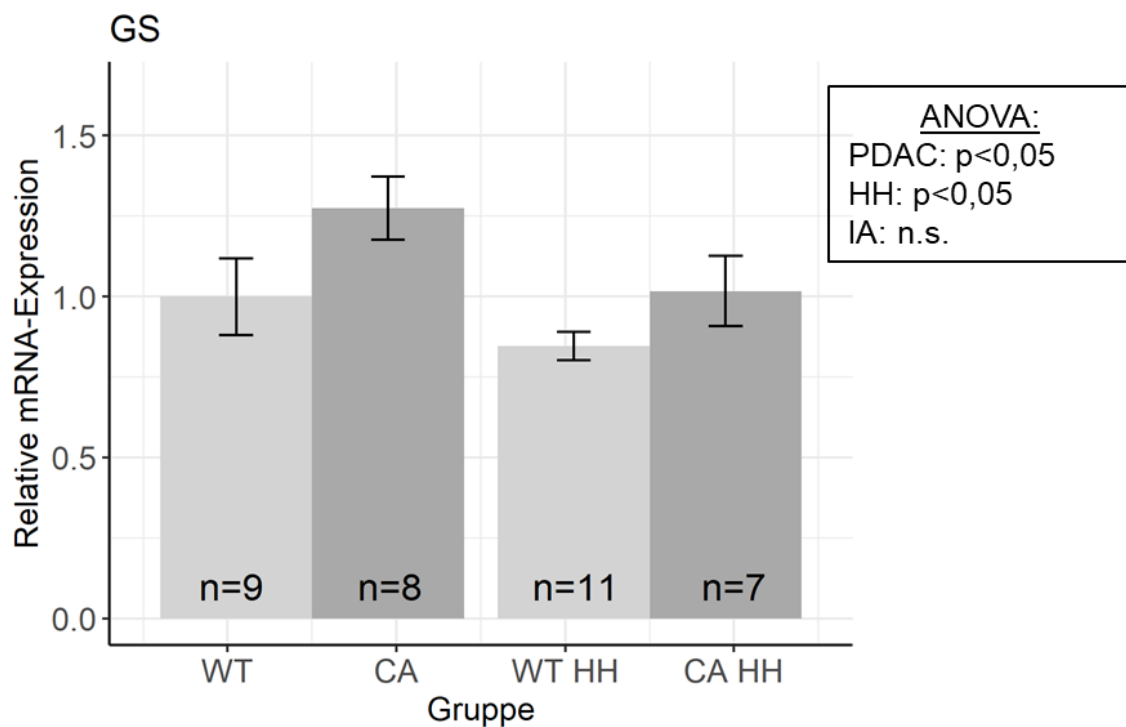


Abbildung 34: Relative mRNA-Expression GS (normiert auf WT), Mittelwert ± SE

### 3.4.1.2 FXR

In der ANOVA konnte kein signifikanter Effekt von PDAC, HH oder deren Interaktion für die relative mRNA-Expression von FXR nachgewiesen werden. Bei CA zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte FXR-mRNA-Expression im Vergleich zu WT um 15 %. Bei CA HH war die FXR-mRNA-Expression um 11 % gegenüber WT HH erniedrigt (Abb. 35). HH steigerte sowohl innerhalb der Karzinom-Gruppe (CA HH vs. CA: +19 %) als auch innerhalb der der Wildtyp-Gruppe (WT HH vs. WT: +13 %) die FXR-mRNA-Expression nicht signifikant.

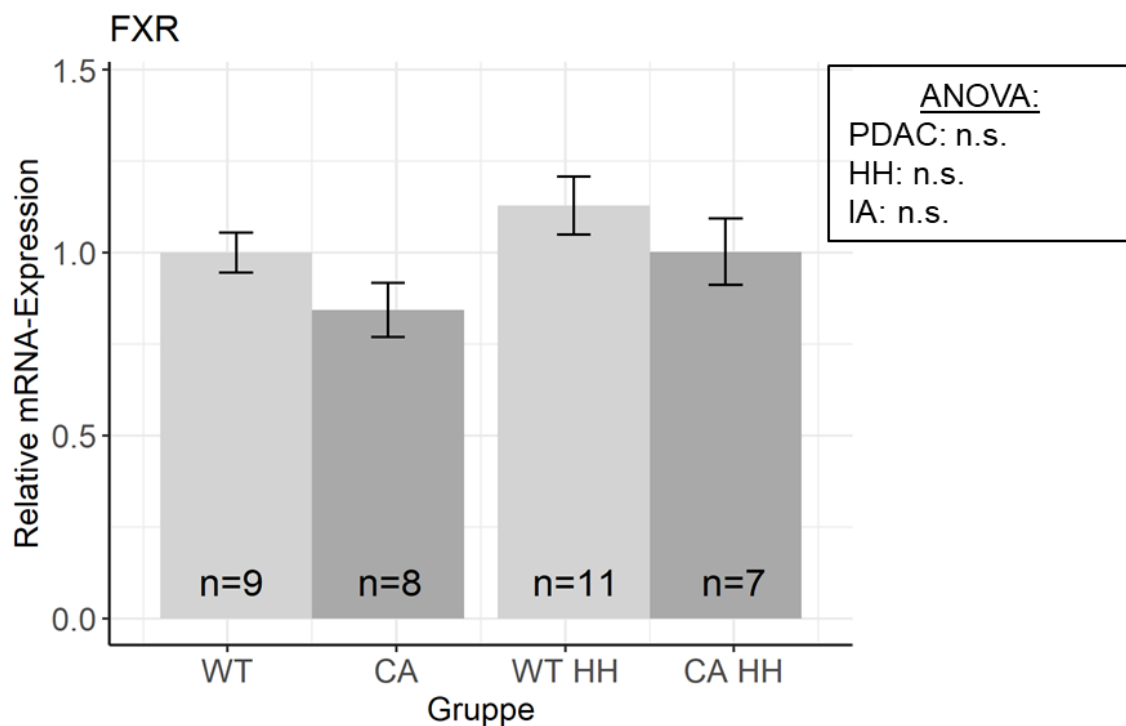


Abbildung 35: Relative mRNA-Expression FXR (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE



### 3.4.1.3 RhBG

In der ANOVA zeigte sich für die relative mRNA-Expression von RhBG kein PDAC- und Interaktionseffekt, jedoch ein signifikanter HH-Effekt ( $p < 0,001$ ). Bei der Betrachtung der einzelnen Gruppen war die relative RhBG-mRNA-Expression der CA-Tiere nicht signifikant gegenüber den WT-Tieren erhöht (+12 %). Auch CA HH und WT HH unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 36). Die CA HH-Gruppe zeigte gegenüber der CA-Gruppe eine signifikant um 45 % verminderte RhBG-mRNA-Expression ( $p = 0,015$ ). Bei WT HH war die mRNA-Expression gegenüber WT ebenfalls signifikant um 38 % vermindert ( $p = 0,044$ ).

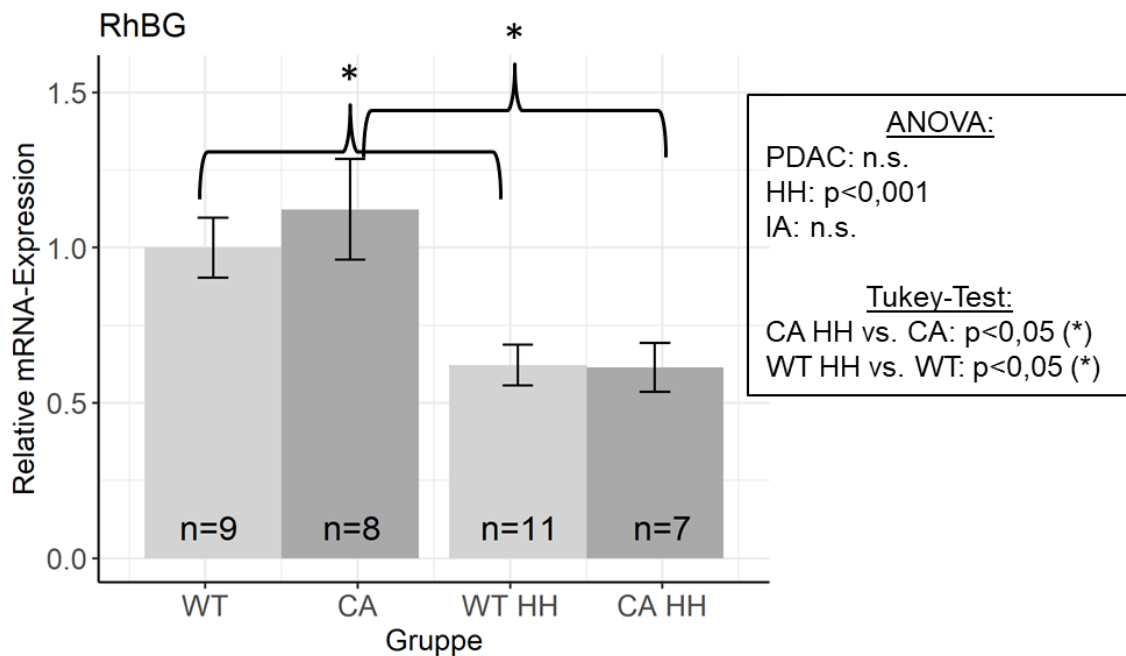


Abbildung 36: Relative mRNA-Expression RhBG (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.1.4 SLC1A2

Bei der relativen mRNA-Expression von SLC1A2 ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 37). In der ANOVA konnte weder für PDAC, für HH noch für deren Interaktion ein signifikanter Effekt gezeigt werden.

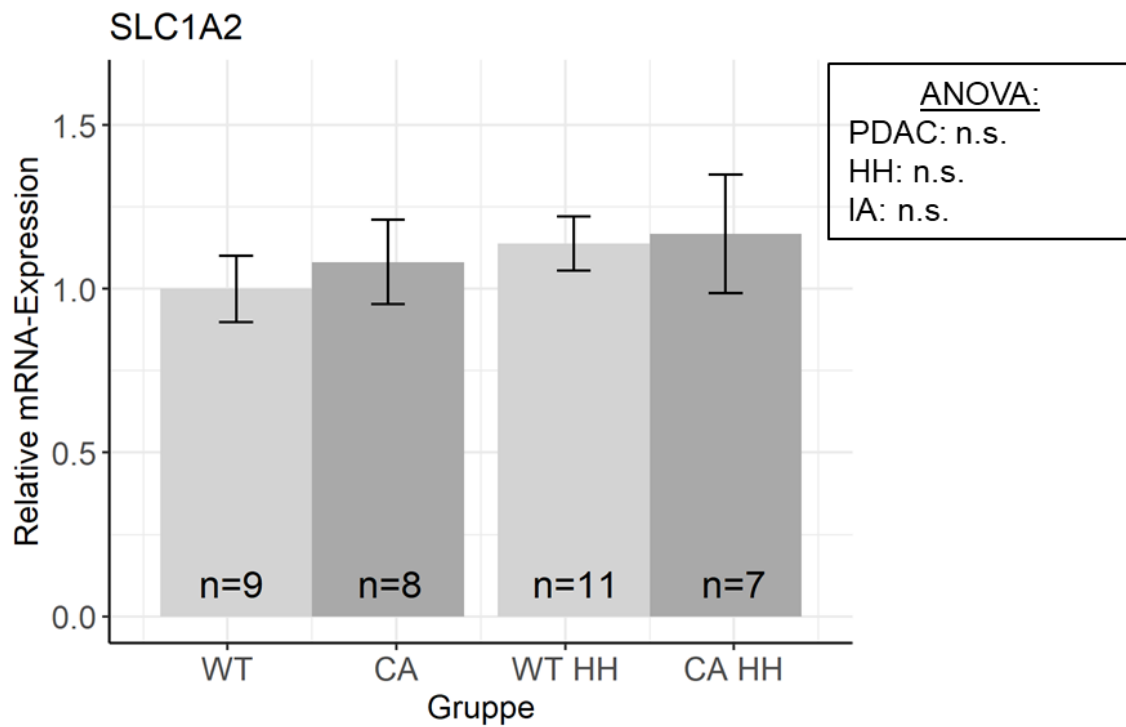


Abbildung 37: Relative mRNA-Expression SLC1A2 (normiert auf WT), Mittelwert ± SE

### 3.4.1.5 SLC1A4

Für die relative mRNA-Expression von SLC1A4 zeigten sich in der ANOVA ein signifikanter PDAC- ( $p=0,003$ ) und HH-Effekt ( $p=0,012$ ), jedoch kein Interaktionseffekt. Dies bedeutet, dass sich bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) eine höhere SLC1A4-mRNA-Expression zeigte als bei den Wildtypen (WT und WT HH) (Abb. 38). Im Post-Hoc-Test war in der CA-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe die mRNA-Expression signifikant ( $p=0,005$ ) um 120 % gesteigert, in der CA HH-Gruppe im Vergleich zu WT HH nicht signifikant um 42 %. Durch HH-Behandlung zeigte sich bei den Karzinom-Tieren (CA HH vs. CA) eine signifikante ( $p=0,028$ ) Reduktion der SLC1A4-mRNA-Expression (-48 %), während sich WT HH und WT nicht signifikant voneinander unterschieden. Auch CA HH und WT unterschieden sich nicht signifikant.

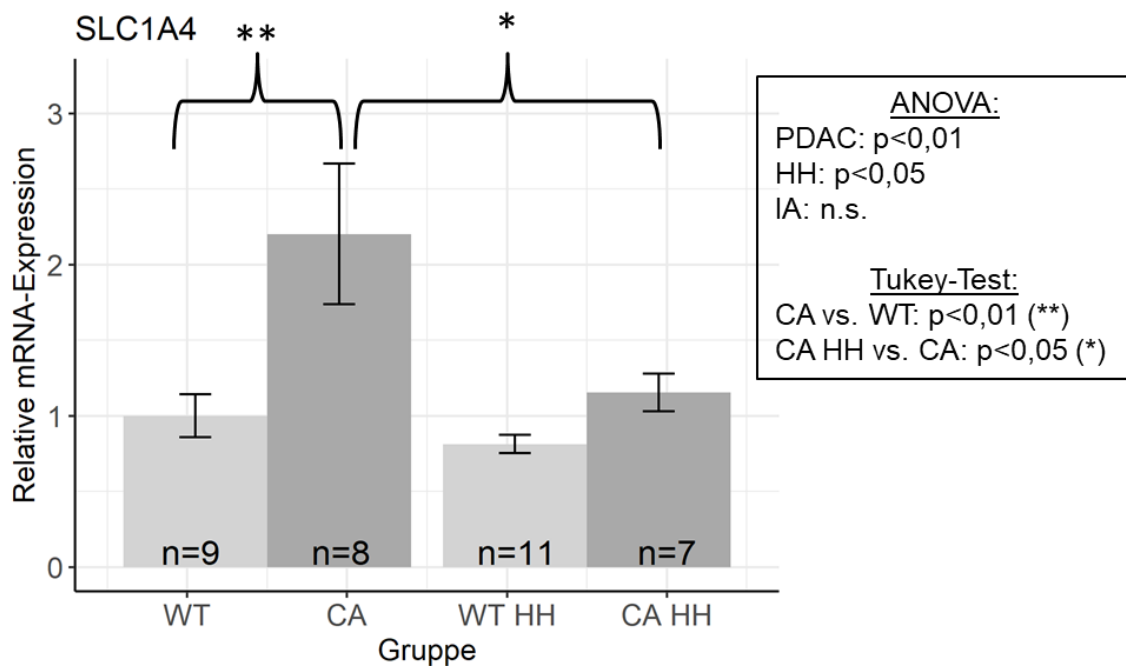


Abbildung 38: Relative mRNA-Expression SLC1A4 (normiert auf WT), Mittelwert ± SE

### 3.4.1.6 SLC1A5

In der ANOVA zeigte sich ein signifikanter PDAC-Effekt ( $p < 0,001$ ) für die relative mRNA-Expression von SLC1A5. Ein signifikanter Effekt von HH und Interaktion lagen nicht vor.

Sowohl in der behandelten als auch in der unbehandelten Gruppe zeigte sich eine deutliche Steigerung der relativen SLC1A5-mRNA-Expression bei den Karzinom-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 39). Bei CA war die mRNA-Expression gegenüber WT nicht signifikant um 63 % gesteigert, bei CA HH gegenüber WT HH hingegen signifikant um 93 % ( $p = 0,016$ ). CA HH und CA sowie WT HH und WT unterschieden sich jeweils nicht signifikant.

Da eine Probe aufgrund eines Pipettierfehlers aus der Auswertung ausgeschlossen wurde, ergibt sich für die Gruppe CA eine Anzahl  $n = 7$ .

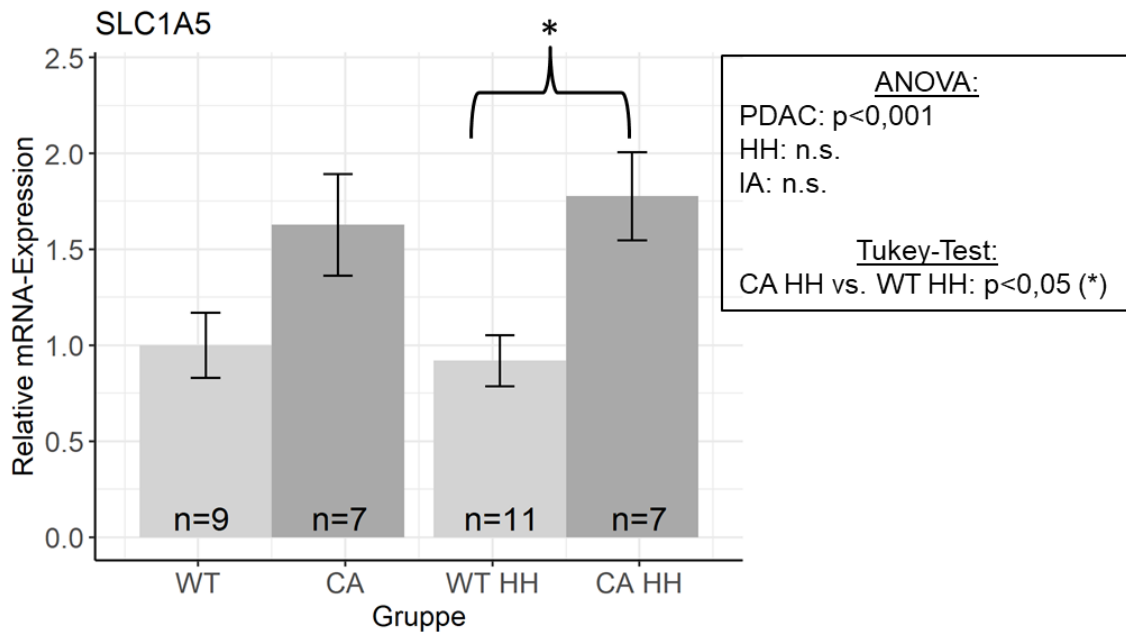


Abbildung 39: Relative mRNA-Expression SLC1A5 (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.2 Monoaminoxidasen

#### 3.4.2.1 MAO-A

In der ANOVA ergab sich für die relative MAO-A-mRNA-Expression kein signifikanter PDAC-Effekt, jedoch ein signifikanter HH- ( $p < 0,001$ ) und Interaktionseffekt ( $p = 0,033$ ).

Während sich CA und WT nicht unterschieden (Abb. 40), war bei CA HH gegenüber WT HH die relative MAO-A-mRNA-Expression um 30 % gesteigert (n.s.). Bei HH-Behandlung war sowohl in der Karzinom- als auch in der Wildtyp-Gruppe die relative MAO-A-mRNA-Expression gegenüber unbehandelten Tieren deutlich gesteigert. Bei CA HH gegenüber CA zeigte sich eine Steigerung um 96 % ( $p < 0,001$ ) und bei WT HH gegenüber WT um 36 % (n.s.).

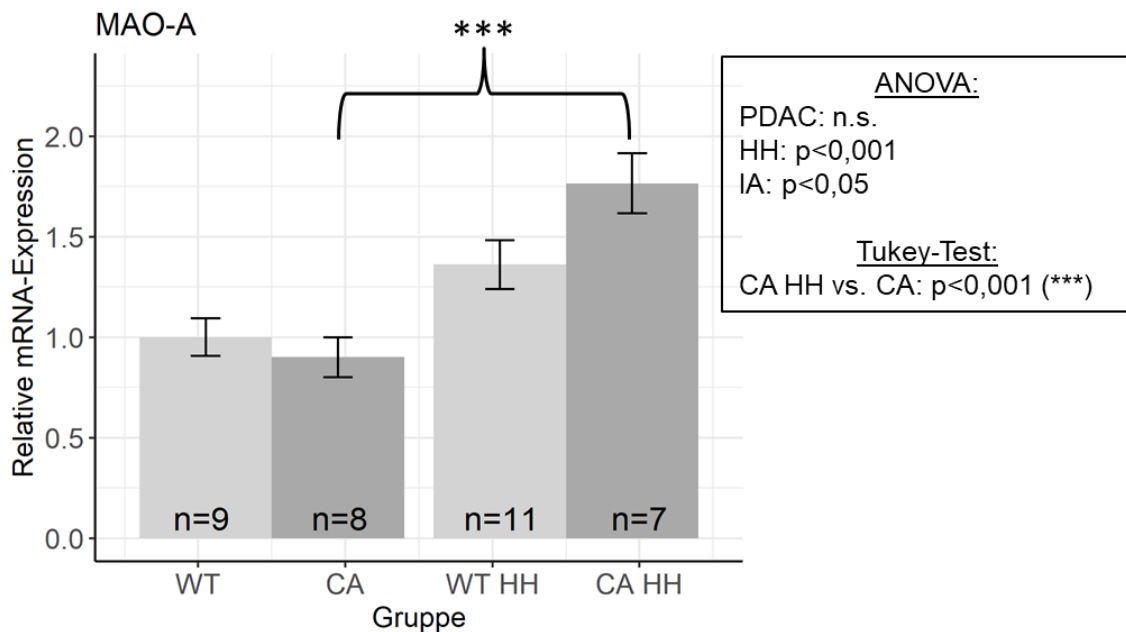


Abbildung 40: Relative mRNA-Expression MAO-A (normiert auf WT), Mittelwert ± SE

### 3.4.2.2 MAO-B

Sowohl PDAC ( $p=0,039$ ) als auch HH ( $p=0,017$ ) stellten sich in der ANOVA als signifikante Einflussfaktoren für die relative MAO-B-mRNA-Expression dar, nicht jedoch die Interaktion. Bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) war die relative MAO-B-mRNA-Expression jeweils niedriger als bei den Wildtypen (WT und WT HH) (Abb. 41). Die CA-Gruppe zeigte eine um 36 % niedrigere mRNA-Expression als die WT-Gruppe, die CA HH-Gruppe eine um 11 % niedrigere mRNA-Expression als die WT HH-Gruppe. Durch HH-Behandlung zeigte sich in beiden Gruppen eine höhere MAO-B-mRNA-Expression (CA HH vs CA: +61 %; WT HH vs. WT: +16 %). CA HH und WT unterschieden sich nicht. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren im Post-Hoc-Test jeweils nicht signifikant.

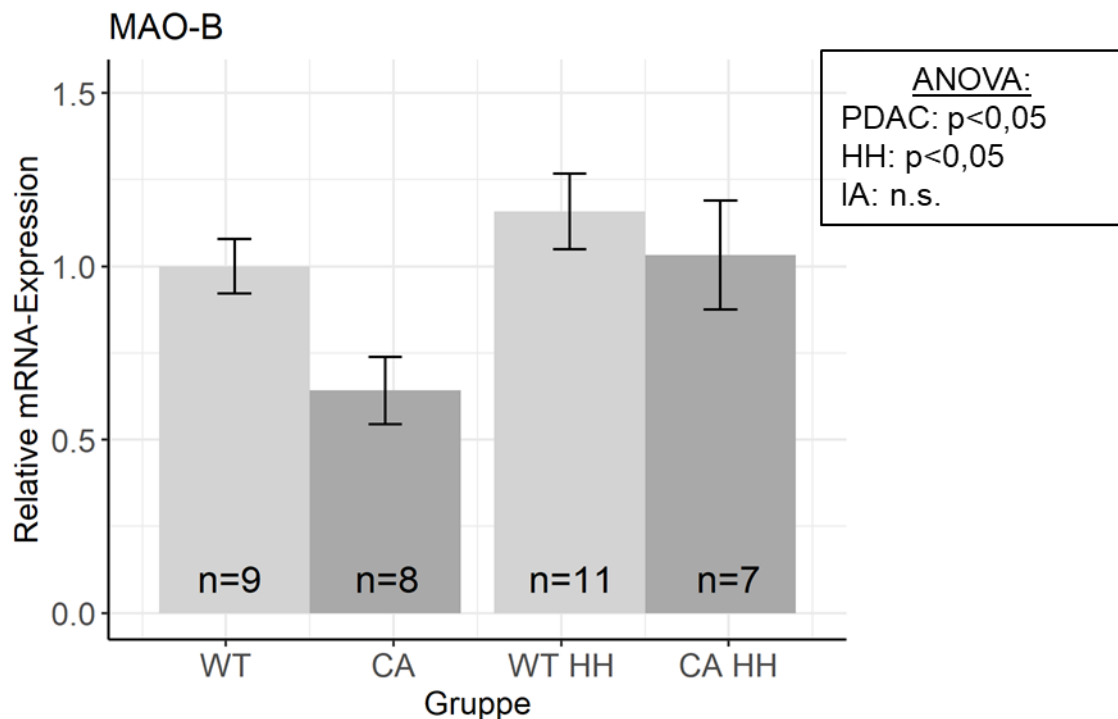


Abbildung 41: Relative mRNA-Expression MAO-B (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3 Inflammation

#### 3.4.3.1 Interleukin-1 $\beta$

Für die relative mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  ergab sich in der ANOVA ein signifikanter Effekt für PDAC ( $p < 0,001$ ), nicht jedoch für HH und Interaktion. Sowohl bei den unbehandelten als auch bei den HH-behandelten Tieren war die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression deutlich höher in der Karzinom-Gruppe als in der Wildtyp-Gruppe (Abb. 42). Bei CA war die mRNA-Expression gegenüber WT um 163 % gesteigert ( $p = 0,045$ ), bei CA HH gegenüber WT HH um 490 % ( $p < 0,001$ ). Gegenüber CA war bei CA HH die mRNA-Expression nicht signifikant um 17 % gesteigert. Bei WT HH war die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression gegenüber WT erniedrigt (- 48 %; n.s.).

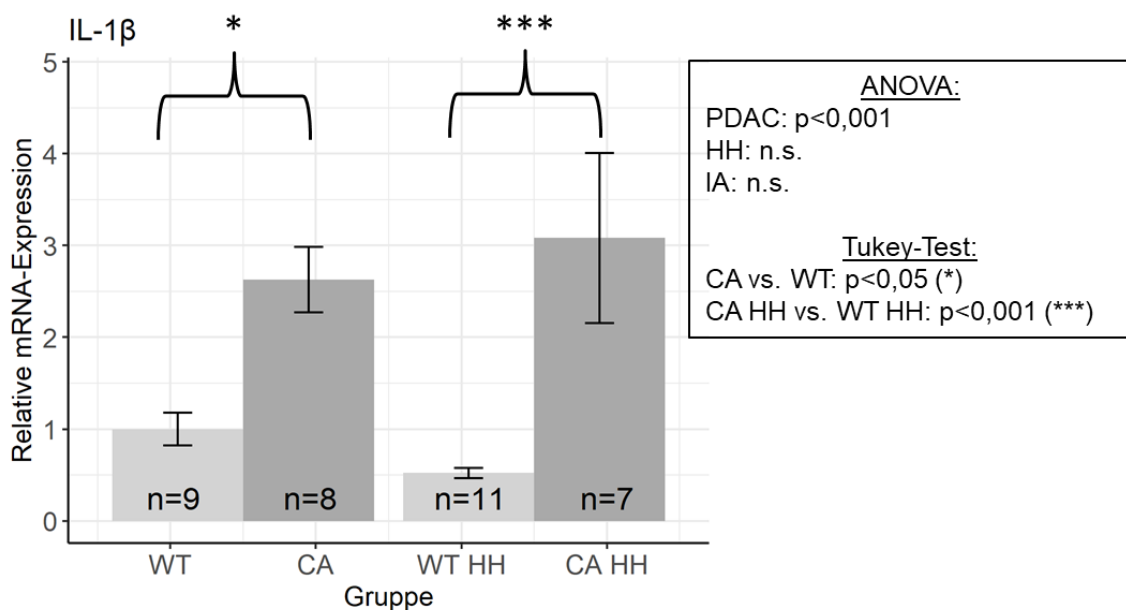


Abbildung 42: Relative mRNA-Expression IL-1 $\beta$  (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3.2 Interleukin-6

In der ANOVA war ein signifikanter PDAC-Effekt ( $p < 0,001$ ) für die relative mRNA-Expression von IL-6 nachweisbar. Ein signifikanter HH- oder Interaktionseffekt lag nicht vor. Sowohl in der unbehandelten als auch in der HH-behandelten Gruppe fand sich bei den Karzinom-Tieren eine höhere IL-6-mRNA-Expression als bei den Wildtyp-Tieren (Abb. 43). Bei CA war die relative IL-6-mRNA-Expression gegenüber WT um 168 % erhöht ( $p = 0,005$ ), bei CA HH gegenüber WT HH um 694 % ( $p < 0,001$ ). Bei CA HH war die IL-6-mRNA-Expression gegenüber CA um 47 % nicht signifikant erhöht, bei WT HH gegenüber WT hingegen nicht signifikant erniedrigt (-44 %).

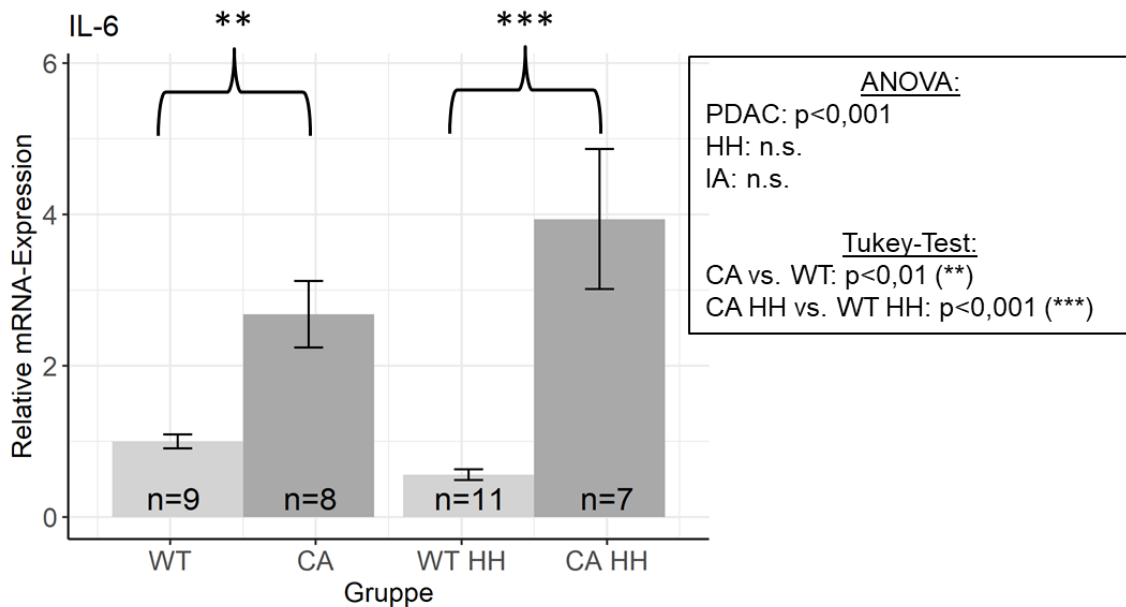


Abbildung 43: Relative mRNA-Expression IL-6 (normiert auf WT), Mittelwert ± SE



### 3.4.3.3 TNF- $\alpha$

Für die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  war in der ANOVA ein signifikanter PDAC-Effekt nachweisbar ( $p=0,005$ ), jedoch kein HH- und kein Interaktions-Effekt. Sowohl bei unbehandelten als auch bei HH-behandelten Tieren zeigte sich in der Karzinom-Gruppe eine höhere TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression als in der Wildtyp-Gruppe (Abb. 44). Bei CA war die relative TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression um 106 % höher als bei WT, bei CA HH um 131 % höher als bei WT HH. Diese Unterschiede waren im Post-Hoc-Test jedoch nicht signifikant. CA HH und CA unterschieden sich nicht wesentlich voneinander, ebenso WT HH und WT.

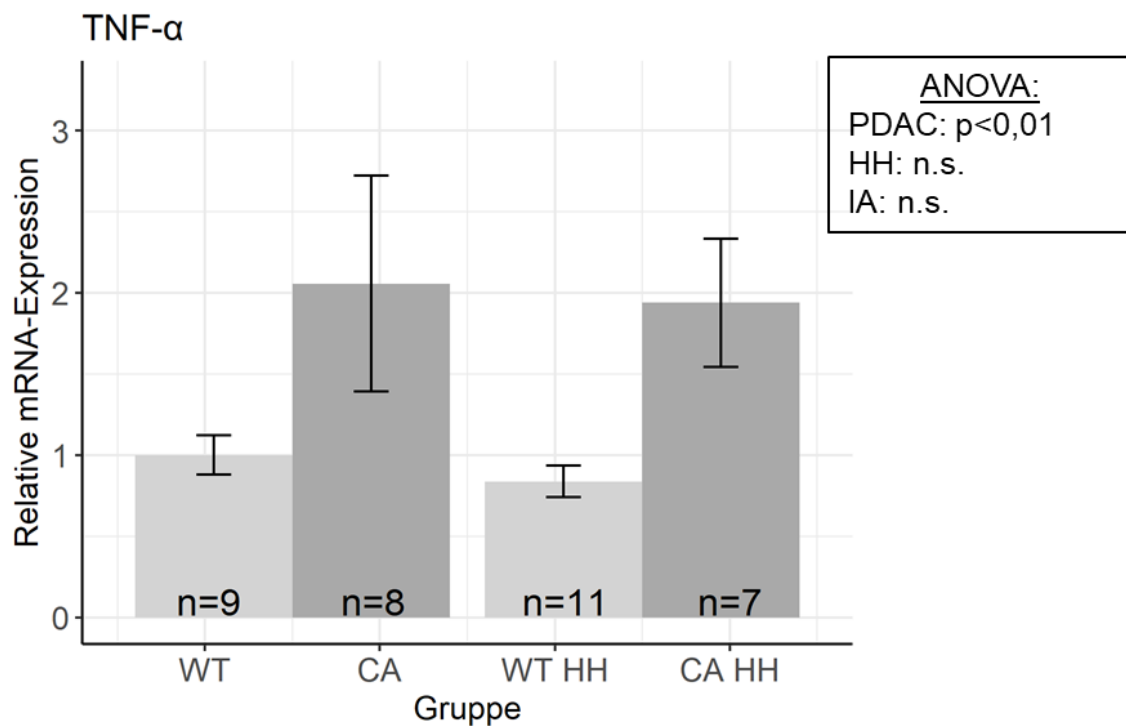


Abbildung 44: Relative mRNA-Expression TNF- $\alpha$  (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3.4 COX-1

Die ANOVA zeigte für die relative COX-1-mRNA-Expression einen signifikanten PDAC-Effekt ( $p < 0,001$ ), jedoch keinen signifikanten Effekt für HH und für die Interaktion beider Faktoren. Bei unbehandelten und bei HH-behandelten Mäusen war jeweils in der Karzinom-Gruppe (CA und CA HH) die relative COX-1-mRNA-Expression gegenüber der Wildtyp-Gruppe (WT und WT HH) erhöht (Abb. 45). Bei CA war die relative COX-1-mRNA-Expression gegenüber WT um 61 % gesteigert (n.s.), bei CA HH gegenüber WT HH um 195 % ( $p < 0,001$ ). Während sich bei CA HH ein nicht signifikanter Anstieg der mRNA-Expression gegenüber CA zeigte (+54 %), zeigte sich bei WT HH eine nicht signifikant verminderte COX-1-mRNA-Expression gegenüber WT (-16 %).

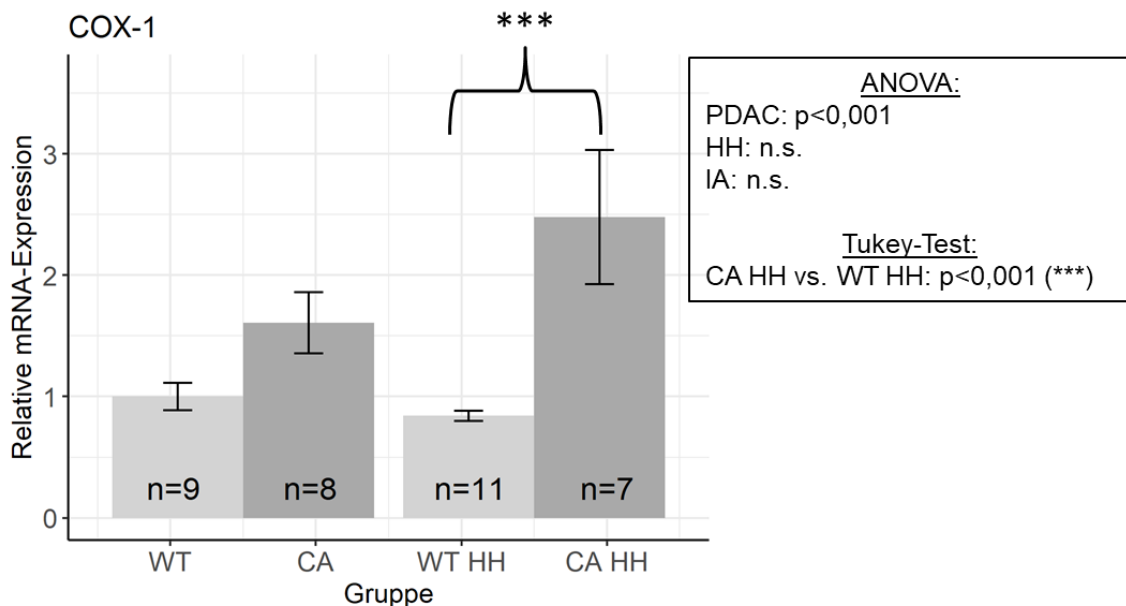


Abbildung 45: Relative mRNA-Expression COX-1 (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3.5 CD68

Für die relative CD68-mRNA-Expression zeigte sich in der ANOVA ein signifikanter PDAC-Effekt ( $p < 0,001$ ). für HH und für die Interaktion war kein signifikanter Effekt nachweisbar. Sowohl bei unbehandelten als auch bei HH-behandelten Tieren zeigte sich eine höhere CD68-mRNA-Expression bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) als bei den Wildtyp-Tieren (WT und WT HH) (Abb. 46). Bei CA war die relative CD68-mRNA-Expression im Vergleich zu WT um 67 % erhöht (n.s.), bei CA HH im Vergleich zu WT HH um 211 % ( $p = 0,003$ ). Während die CD68-mRNA-Expression bei CA HH gegenüber CA um 70 % erhöht war (n.s.), unterschied sie sich zwischen WT HH und WT nicht wesentlich.

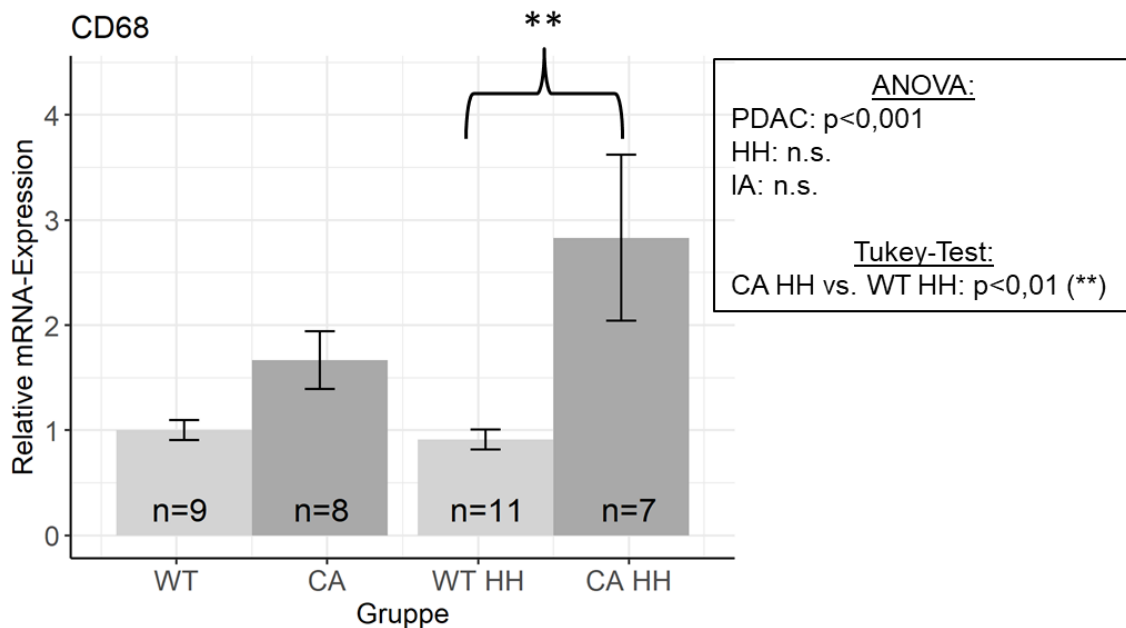


Abbildung 46: Relative mRNA-Expression CD68 (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3.6 SOCS-3

In der ANOVA waren für die relative SOCS-3-mRNA-Expression ein signifikanter PDAC- ( $p < 0,001$ ) und HH-Effekt ( $p = 0,005$ ) nachweisbar. Auch für deren Interaktion ergab sich ein signifikanter Effekt ( $p = 0,001$ ). Die relative SOCS-3-mRNA-Expression war in beiden Karzinom-Gruppen (CA und CA HH) gegenüber den Wildtypen (WT und WT HH) gesteigert (Abb. 47). Bei den CA-Mäusen war die relative SOCS-3-mRNA-Expression signifikant um 826 % gegenüber den WT-Mäusen gesteigert ( $p < 0,001$ ), bei CA HH gegenüber WT HH hingegen nur um 127 % (n.s.). CA HH wies gegenüber CA eine um 64 % signifikant niedrigere SOCS-3-mRNA-Expression auf ( $p < 0,001$ ). WT HH und WT hingegen unterschieden sich nicht signifikant, ebenso CA HH und WT.

Aufgrund eines Pipettierfehlers wurde in der Gruppe WT HH eine Probe ausgeschlossen, sodass sich für diese Gruppe eine Anzahl von  $n=10$  ergibt.

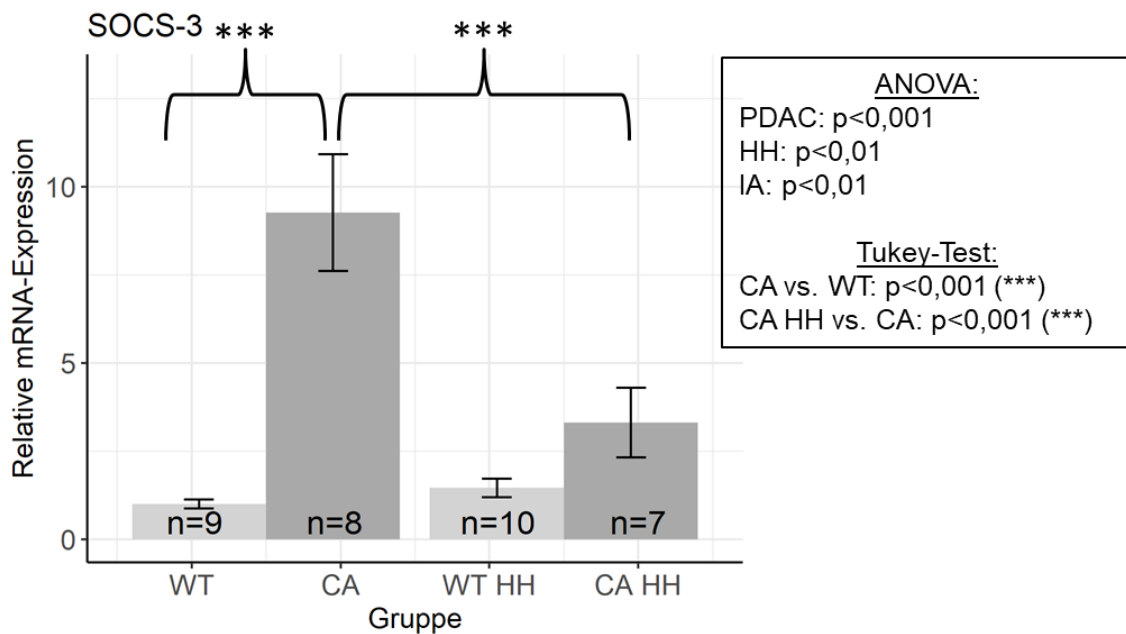


Abbildung 47: Relative mRNA-Expression SOCS-3 (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.3.7 MIF

Die ANOVA erbrachte einen signifikanten HH-Effekt ( $p=0,009$ ) für die relative mRNA-Expression von MIF. Für PDAC und für die Interaktion ergab sich kein signifikanter Effekt. Wie in Abb. 48 gezeigt, war bei CA die relative MIF-mRNA-Expression niedriger als bei WT (-19 %, n.s.). CA HH und WT HH hingegen unterschieden sich nicht voneinander. Bei CA HH war die relative MIF-mRNA-Expression gegenüber CA nur geringfügig um 5 % erniedrigt (n.s.), bei WT HH gegenüber WT hingegen signifikant um 25 % ( $p=0,009$ ).

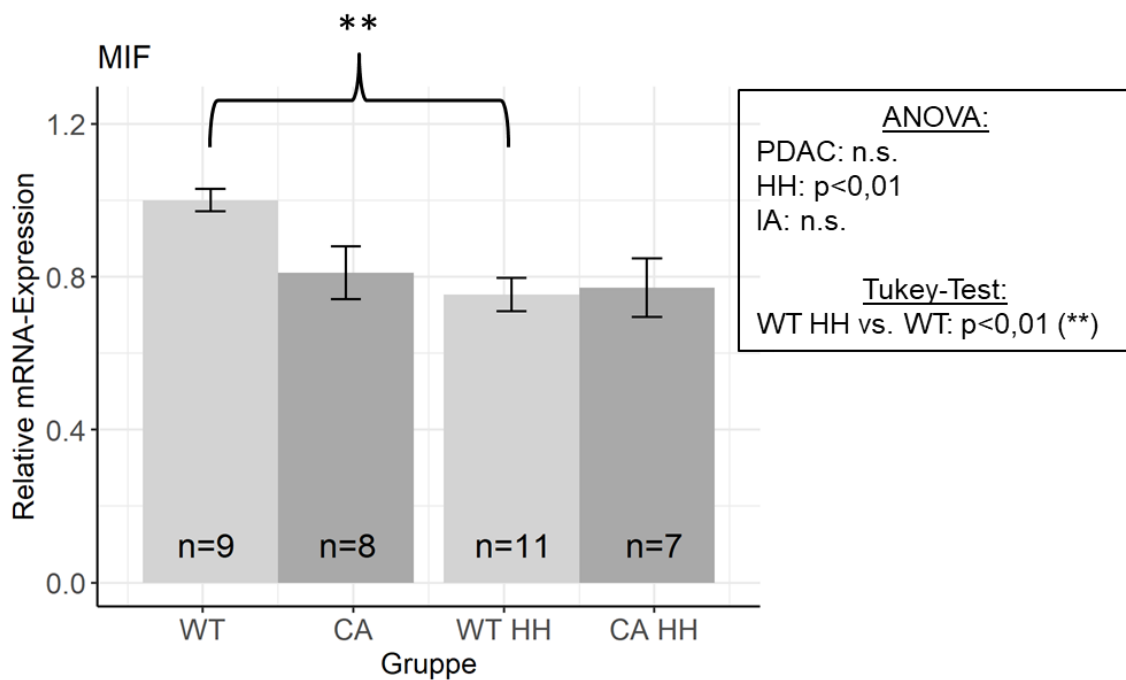


Abbildung 48: Relative mRNA-Expression MIF (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.4 Apoptose

#### 3.4.4.1 BAX

Für die relative Genexpression von BAX ergaben sich in der ANOVA keine signifikanten PDAC-, HH- oder Interaktionseffekte. Die Gruppen WT, CA und CA HH unterschieden sich nicht (Abb. 49). In der WT HH-Gruppe war die relative BAX-mRNA-Expression ca. 16 % niedriger als in den anderen drei Gruppen.

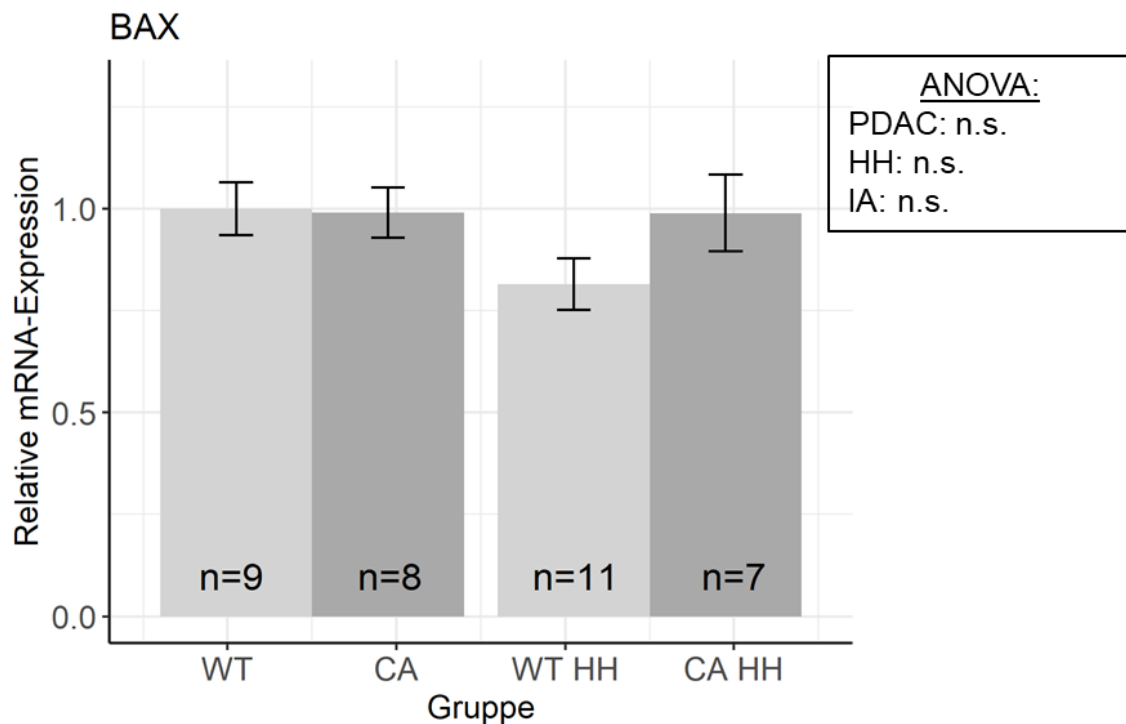


Abbildung 49: Relative mRNA-Expression BAX (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

### 3.4.4.2 BCL-2

In der ANOVA zeigte sich für die relative BCL-2-mRNA-Expression ein signifikanter PDAC- ( $p=0,002$ ) und Interaktionseffekt ( $p=0,023$ ), jedoch kein signifikanter HH-Effekt. Die relative BCL-2-mRNA-Expression war in unbehandelter und HH-behandelter Gruppe jeweils bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) höher als beim Wildtyp (WT und WT HH) (Abb. 50). Die mRNA-Expression bei CA im Vergleich zu WT war nur geringfügig um 11 % gesteigert (n.s.). Bei CA HH hingegen zeigte sich im Vergleich zu WT HH eine signifikante Steigerung um 85 % ( $p=0,002$ ) und im Vergleich zu CA um 30 % (n.s.). Bei WT HH hingegen war die mRNA-Expression gegenüber WT um 22 % reduziert (n.s.).

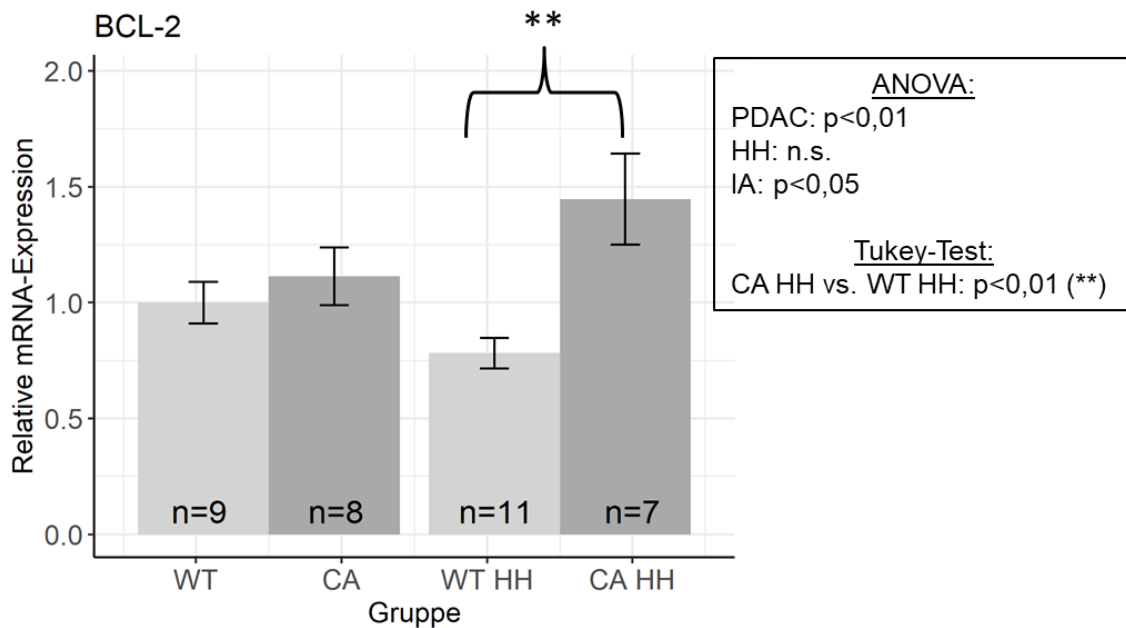


Abbildung 50: Relative mRNA-Expression BCL-2 (normiert auf WT), Mittelwert ± SE

### 3.4.4.3 Caspase-3

In der ANOVA zeigte sich ein signifikanter HH-Effekt ( $p=0,045$ ), jedoch kein signifikanter Einfluss von PDAC oder der Interaktion auf die relative mRNA-Expression von Caspase-3. Die Caspase-3-mRNA-Expression war bei CA im Vergleich zu WT nicht signifikant um 35 % erhöht (Abb. 51). Bei CA, CA HH und WT HH zeigten sich keine Unterschiede in der relativen Caspase-3-mRNA-Expression. Im Vergleich zu WT war die relative Caspase-3-mRNA-Expression von WT HH und CA HH erhöht, dieser Unterschied war im Post-Hoc-Test jedoch nicht signifikant.

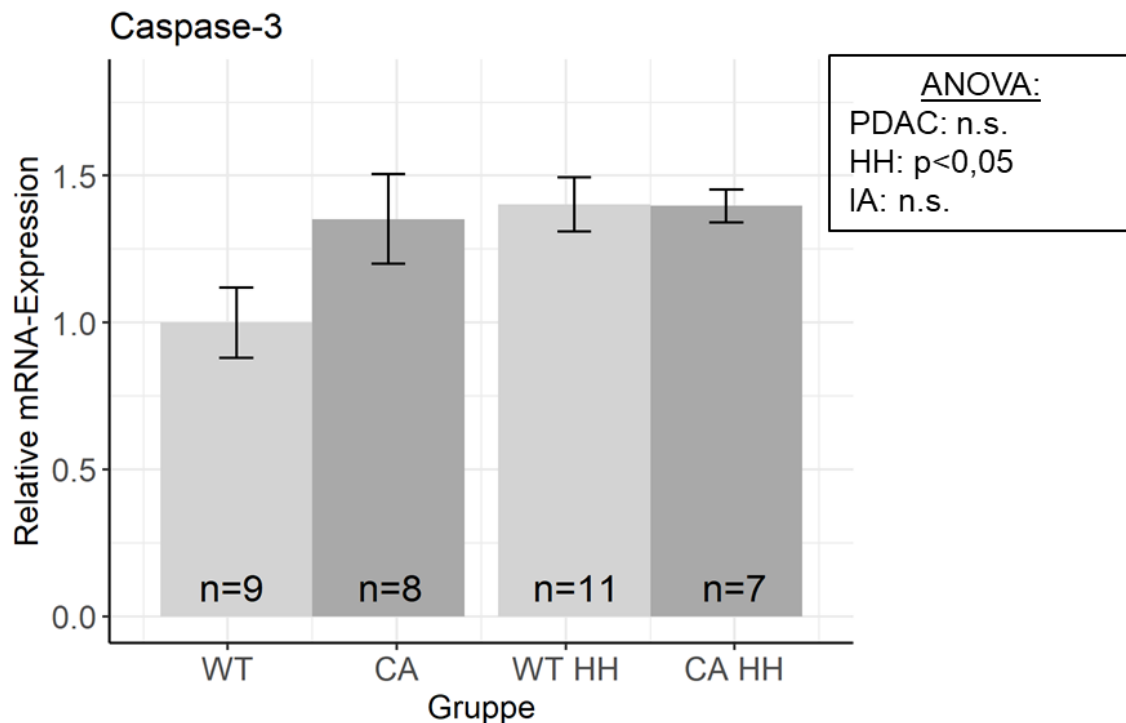


Abbildung 51: Relative mRNA-Expression Caspase-3 (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE



### 3.4.5 Proliferation

#### 3.4.5.1 PCNA

Für die relative mRNA-Expression von PCNA ergab sich in der ANOVA sowohl für PDAC ( $p=0,024$ ) als auch für HH ( $p=0,028$ ) ein signifikanter Effekt, nicht jedoch für die Interaktion. In unbehandelter und HH-behandelter Gruppe zeigte sich bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) eine höhere mRNA-Expression als bei den Wildtypen (WT und WT HH) (Abb. 52). Bei CA war die PCNA-mRNA-Expression gegenüber WT um 9 % gesteigert (n.s.), bei CA HH gegenüber WT HH um 18 % (n.s.). Des Weiteren zeigte sich bei den HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) eine höhere mRNA-Expression als bei den unbehandelten Tieren (WT und CA). Bei CA HH war die relative Genexpression gegenüber CA um 19 % erhöht (n.s), bei WT HH gegenüber WT um 11 % (n.s.).

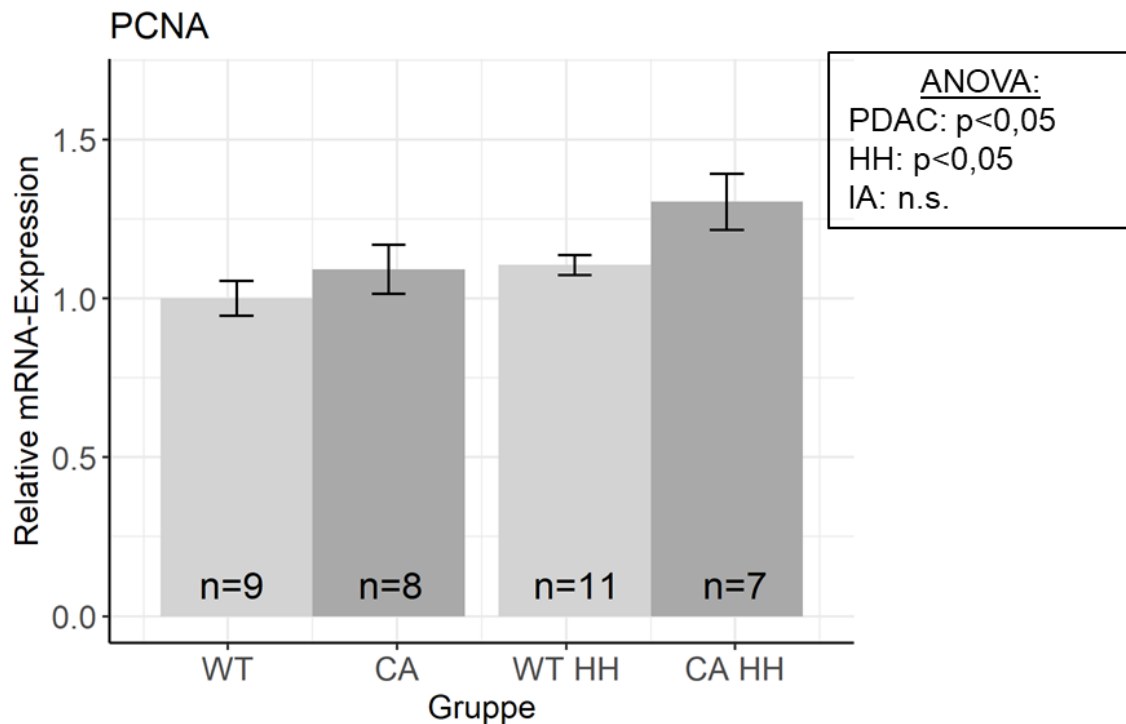


Abbildung 52: Relative mRNA-Expression PCNA (normiert auf WT), Mittelwert  $\pm$  SE

## 4. Diskussion

### 4.1 Das Mausmodell

#### 4.1.1 Studienpopulation

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung von hepatischen Faktoren der Tumorkachexie, insbesondere von Veränderungen des Glutaminstoffwechsels und von inflammatorischen Markern, sowie deren Beeinflussung durch MAO-A-Inhibition. Da das Pankreaskarzinom als der gastrointestinale Tumor mit der schnellsten und ausgeprägtesten Kachexieentwicklung gilt (Tan et al., 2014), wurde ein Tiermodell des Pankreaskarzinoms für diese Arbeit ausgewählt. Hierzu wurde das dreifach transgene LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Mausmodell herangezogen, welches die Tumorprogression des humanen PDAC nachvollzieht und deshalb geeignet erscheint, die Fragestellungen dieser Arbeit zu untersuchen. Bisher wurde dieses Mausmodell jedoch in keiner Arbeit zur Tumorkachexieforschung analysiert. Aus diesem Grund erfolgte in einem Projekt unserer Arbeitsgruppe (Keck, 2019) zunächst eine Validierung des Mausmodells hinsichtlich einer signifikanten, tumor-bedingten Muskelatrophie. Hier konnte eine signifikante Faseratrophie des lokomotorisch wichtigen Musculus triceps surae bei Tieren mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom, nicht jedoch bei den Tumorstadien PanIN 1–3 gezeigt werden (Keck, 2019). Der so nachgewiesene Muskelschwund bei den an PDAC erkrankten Tieren kann als Parameter der Kachexieentstehung angesehen werden (Keck, 2019), sodass die untersuchte Versuchstierpopulation geeignet erscheint, die Fragestellung tumorkachexietypischer Leberveränderungen zu untersuchen. Um klar zwischen tumor- und kachexie-induzierten Effekten zu unterscheiden, wäre die zusätzliche Betrachtung einer dritten Gruppe mit tumorkranken Tieren ohne Kachexie interessant gewesen. Als weiterer, jedoch relativ unpräziser Parameter kann das Körpergewicht bzw. der Körpergewichtsverlust zur Diagnose der Kachexie herangezogen werden. Nach Fearon et al. (2011) ist die

Tumorkachexie beim Menschen durch einen Gewichtsverlust von >5 % in den vorausgegangenen sechs Monaten definiert. Eine Definition von Kachexieentwicklung im Tiermodell existiert bisher nicht. In der vorliegenden Arbeit waren keine Angaben zum Verlust von Körpermasse der Versuchstiere in einem definierten Zeitraum möglich. Es wurde lediglich das Körpergewicht zum Zeitpunkt des Todes erfasst. Hier ergab sich nur bei den männlichen Tieren (Abb. 12) ein niedrigeres Gewicht in der CA-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe (-12 %). Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass ein signifikanter tumorinduzierter Gewichtsverlust aufgrund des höheren Muskelanteils bei den männlichen Tieren früher als bei den weiblichen Tieren nachweisbar ist. Des Weiteren ist anzuführen, dass mögliche Kofaktoren wie Abnahme von Fettgewebe im Vergleich zu Muskelmasse, körperliche Aktivität und Nahrungsaufnahme der Tiere sowie eine sich auf das Körpergewicht auswirkende Aszites-Entwicklung in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Ein Tumorstaging zur Bestimmung des Tumorstadiums und möglicher Metastasierung wurde nicht durchgeführt. Fortgeschrittene Tumorstadien und das Vorliegen von Metastasen sind mit einer erhöhten Kachexierate assoziiert (Shiono et al., 2016). Diese Faktoren sollten in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Eine Limitation dieser Arbeit ergibt sich aus der kleinen Studienpopulation. Diese ist dem Studiendesign als tierexperimentelle Arbeit und insbesondere der Verwendung 3x transgener Tiere geschuldet. Auch entwickelten nicht alle 3x transgenen Tiere ein PDAC, was jedoch Voraussetzung zum Einschluss in die Studie war. Aufgrund der ohnehin kleinen Gruppengröße war eine Auswertung nach Geschlechtern nicht sinnvoll, da sich hierdurch die Gruppengröße nochmals reduziert hätte. Aus diesem Grund erfolgte lediglich bezüglich des Körpergewichts der Versuchstiere eine geschlechtergetrennte Auswertung (s. Abschnitt 3.1), welche als explorativ einzustufen ist. Die ungleiche Verteilung männlicher und weiblicher Tiere in den einzelnen Gruppen stellt einen möglichen Confounder bei der Bewertung der Ergebnisse dar. Des Weiteren konnten insbesondere bei den histologischen Färbungen teilweise nicht alle Tiere untersucht werden, da nicht genügend Material zu Verfügung stand. Dies

ist zum einen darin begründet, dass die Leberproben der unbehandelten Tiere noch für ein zweites Projekt unserer Arbeitsgruppe verwendet wurden, zum anderen waren einige Leberproben aufgrund starker Gefrierartefakte, welche als Nebeneffekt der Kryopräparation bekannt sind, nicht auswertbar. So musste sich teilweise auf eine minimale Gruppengröße von n=5 beschränkt werden.

Einen interventionellen Teil dieser Studie stellt die Untersuchung des Einflusses einer Monoaminoxidase-A-Inhibition auf die Entwicklung der Tumorkachexie dar. MAO-Hemmer sind zurzeit als Antidepressiva sowie zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen (MAO-B-Hemmer bei Morbus Parkinson) zugelassen. Als Nebenwirkungen sind Blutdruckschwankungen, Unruhe, Schwindel, Kopfschmerzen und Übelkeit (Wimbiscus et al., 2010) sowie hypertensive Krisen bekannt (Shulmann et al., 1989). Eine mögliche Beeinflussung von Tumorkachexieentwicklung durch MAO-Inhibitoren ist bisher nicht untersucht. Hintergrund ist die Bedeutung von Monoaminoxidasen als Quelle oxidativen Stresses durch MAO-vermittelte Entstehung von Sauerstoffradikalen. Manoli et al. (2005) zeigten bei steroid-induzierter Muskelatrophie eine massive Hochregulation des MAO-A-Genes im Skelettmuskel mit einhergehender Muskelzellschädigung durch oxidativen Stress. Möglicherweise liegt auch dem Skelettmuskelabbau bei Tumorkachexie eine MAO-A-vermittelte Zellschädigung zugrunde. Sollte diese auch systemisch, d.h. auch in der Leber, vorliegen, wäre eine berechtigte Annahme, dass eine MAO-A-Hochregulation in der Leber über Entstehung von Sauerstoffradikalen Einfluss auf die hepatischen Faktoren der Tumorkachexie hat. Unter dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit eine MAO-A-Inhibition beim Mausmodell der Tumorkachexie untersucht. Die Wirkung von MAO-Inhibitoren bei Tumorkachexie wurde zuvor weder in der Leber noch im Skelettmuskel geprüft. Für diese Studie wurde der reversible MAO-A-Hemmer Harmine-Hydrochlorid ausgewählt, und in einer Dosis von 0,6 mg Harmine-Hydrochlorid (ca. 30 mg/kg KG) ab dem dritten Lebensmonat über einen Zeitraum von zwei Monaten täglich intraperitoneal appliziert. Die Dosierung wurde so gewählt, dass Nebenwirkungen möglichst selten auftreten. In Studien von Wang et al. (2019b) und Ruan et al. (2017) zu neurotoxischen bzw.

antitumorösen Effekten von HH wurden bei Dosierungen zwischen 10 und 45 mg/kg/KG pro Tag keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust oder Verhaltensauffälligkeiten nachgewiesen. Neurotoxische Effekte zeigten sich laut Wang et al. (2019b) ab 150 mg/kg/KG. Bezüglich der Verträglichkeit einer definierten Dosis von HH beim Menschen liegen keine Daten vor. Für Harmine sind halluzinogene (Nakagawa et al., 2010) sowie antidepressive Effekte (Fortunato et al., 2010) beschrieben. In einer Studie mit Mäusen wurden Verhaltensauffälligkeiten, Tremor und vermehrte Aggressivität bei HH-behandelten Tieren ab einer Dosierung von 5 mg/kg KG pro Tag beobachtet (Kawanishi et al., 1981). Des Weiteren konnten Hagiwara et al. (1990) eine geringere Gewichtszunahme bei Mäusen, welche mit dem Harmine-verwandten  $\beta$ -Carbolinalkaloid Harman behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. Chen et al. (2004) wiesen ein geringeres Körpergewicht und eine geringer Muskelausdauer bei MAO-A/B-Knock-out Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren nach. In der vorliegenden Arbeit waren die HH-behandelten Mäuse (WT HH und CA HH) insgesamt tendenziell leichter als die unbehandelten Mäuse (WT und CA). Signifikant war dieser Unterschied jedoch nur bei den männlichen Tieren (Abb. 12). Dies könnte, ebenso wie das signifikant niedrigere Gewicht bei der männlichen CA-Gruppe im Vergleich zur männlichen WT-Gruppe, darin begründet sein, dass ein interventionell bedingter Gewichtsverlust bei männlichen Tieren aufgrund des höheren Muskelanteils früher als bei weiblichen Tieren nachweisbar ist. Der Gewichtsverlust bei HH-behandelten Tieren ist zunächst als unerwünschter Effekt, der nicht der vermuteten anti-kachektischen Wirkung entspricht, einzustufen. Als Limitation ist anzuführen, dass eine Scheinbehandlung (sog. Sham-Injektion) in der unbehandelten Kontrollgruppe nicht durchgeführt wurde. Des Weiteren musste bei einem Tier aus der CA HH-Gruppe die HH-Behandlung aufgrund von Allgemeinzustandsverschlechterung bereits nach einem Monat beendet und das Tier vorzeitig getötet werden. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde auch dieses Tier in die Auswertung einbezogen.

Ob die HH-behandelten Tiere eine vermehrte Kachexieentwicklung im Sinne einer Sarkopenie aufwiesen, was dem Einsatz von HH als mögliches

Antikachexietherapeutikum widersprechen würde, und ob dem HH-vermittelten Gewichtsverlust ein Verlust an Fett-, Muskelmasse oder beidem zugrunde liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Hier sind weitere Untersuchungen insbesondere bezüglich der Veränderung muskulärer Kachexieparameter unter HH-Behandlung notwendig und bereits teilweise erfolgt. So wurden in der eigenen Arbeitsgruppe Muskelproben des Musculus triceps surae der auch in dieser Arbeit untersuchten Mäuse betrachtet (Schmich, 2020). Während sich in der CA-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe eine Reduktion der Querschnittsfläche aller Fasertypen als signifikanter Kachexie-Effekt zeigte, lagen für HH-Behandlung zwiespältige Effekte vor. Einerseits konnte bei den CA HH-Tieren eine Reduktion des Inflammationsmarkers IL-1 $\beta$  sowie eine Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich entgegen des erwünschten anti-atrophischen Effekts von HH eine weitere signifikante Abnahme der TypIIBX Fasern im Musculus gastrocnemius (Schmich, 2020). Auch mögliche Confounder wie verstärkte körperliche Aktivität – z.B. im Rahmen HH-bedingter halluzinogener und antidepressiver Effekte sowie verstärkter Agitiertheit - oder veränderte Nahrungsaufnahme sollten bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden, um das therapeutische Potenzial von HH zu überprüfen. Ebenso wäre die Überlebenszeit der HH-behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Tieren für die Beurteilung des therapeutischen Potentials von HH bei Tumorkachexie von Interesse, konnte in der vorliegenden Studie jedoch leider nicht erhoben werden.

Dabei ist stets kritisch anzuführen, dass in Tiermodellen untersuchte Interventionen immer nur in begrenztem Ausmaß auf humane Pathologien übertragbar sind, was u.a. in einer proportional größeren Tumormasse und tendenziell aggressiveren Tumorbiologie im Tiermodell begründet ist (Bozzetti et al., 1999). Das verwendete PDAC-Mausmodell minimiert diesen Effekt jedoch, da es keine Tumorkultivierung vorsieht, sondern die mutationsbasierte Karzinogenese nachzeichnet.

#### **4.1.2 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse muss kritisch betrachtet werden. Zwar stellen die angewendete ANOVA sowie der als Post-Hoc-Test durchgeführte Tukey-Test etablierte Verfahren für die Auswertung biomedizinischer Daten dar, jedoch werden als Voraussetzungen für beide Tests eine Normalverteilung der Zielvariablen und Varianzhomogenität angenommen (Quinn und Keough, 2002). Dies lag bei den verwendeten Daten nicht in allen Fällen vor (vergl. Anhang Tab. 18 und 27). Da alternative nichtparametrische Test-Verfahren wie der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test für die Auswertung der Daten ungeeignet waren, da sie keine Betrachtung von mehr als zwei Gruppen (Fay und Proschan., 2010) bzw. von zweifaktoriellen Interaktionseffekten (Lantz, 2013) ermöglichen, wurden dennoch die o.e. Analysen angewendet. Hierdurch könnte die Wahrscheinlichkeit statistischer Fehler erhöht sein, jedoch gilt die ANOVA als recht robust gegen Abweichungen von den o.e. Voraussetzungen (Blanca et al., 2017).

#### **4.2 Glutaminstoffwechsel**

##### **4.2.1 Glutaminsynthetase**

In der immunhistochemischen GS-Färbung konnte die in der Literatur beschriebene, streng perivenöse Lokalisation der GS (Gebhardt und Mecke, 1983) in der Leber bestätigt werden (Abb. 14 und 15). Im Vergleich zur WT-Gruppe zeigte sich in der CA-Gruppe eine um 56 % signifikant reduzierte GS-positive Fläche (Abb. 13). Nach Lie-Venema (1997) korreliert die Anzahl GS-positiver Zellen (repräsentiert durch die GS-positive Fläche) mit der Aktivität der GS. Somit ist davon auszugehen, dass die reduzierte GS-positive Fläche bei den CA-Mäusen mit reduzierter GS-Aktivität einhergeht. Durch HH-Behandlung war dieser Effekt bei den CA HH-Mäusen fast vollständig reversibel, sie zeigten im Vergleich zu den CA-Mäusen eine um das zweifache signifikant gesteigerte GS-positive Fläche und damit nahezu so viel GS-positive Fläche wie die WT-Mäuse. Veränderungen der hepatischen GS bei Tumorkachexie sind bisher praktisch nicht untersucht. Bei Kachexiepatienten beobachtete Stoffwechselveränderungen wie verminderte Glutamin- und erhöhte

Glutamatspiegel (Holm et al., 2007) sowie Hyperammonämie (Chance et al., 1991) legen jedoch nahe, dass die hepatische GS eine wichtige Rolle bei den frühen Leberstoffwechseleränderungen bei Kachexie spielt (Leij-Halfwerk et al., 2000). Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Bruns (2019) bei PDAC-Patienten mit Tumorkachexie eine signifikant erniedrigte GS-Immunreaktivität in der Leber im Vergleich zu PDAC-Patienten ohne Kachexie nachgewiesen werden. Dabei bestand eine negative Korrelation der GS-Aktivität mit dem Gewichtsverlust (Bruns, 2019). Da die GS-Aktivität nach Lie-Venema (1997) über die Anzahl der perivenösen GS-positiven Hepatozyten reguliert wird, ist die erniedrigte GS-Proteinexpression am ehesten durch einen Verlust perivenöser Hepatozyten zu erklären. Die perivenöse Zone wurde bereits in zahlreichen Arbeiten als vulnerable Zone der Leber identifiziert. So konnten Desjardins et al. (1999) eine stark verminderte GS-Aktivität durch Verlust perivenöser Hepatozyten in der Leber von Ratten nach Anlage einer portocavalen Anastomose und damit verschlechterten Perfusionsbedingungen nachweisen. Auch Häussinger et al. (1985) konnten bei Ratten mit perivenös-induzierter Leberzellnekrose einen Funktionsverlust der GS bei intakter periportal Harnstoffsynthese zeigen. Da die perivenöse Zone im Leberazinus die am schlechtesten mit Sauerstoff versorgte Zone darstellt (Jungermann und Kietzmann, 2000), kann vermutet werden, dass es im Rahmen des bei Tumorkachexie periportal akzelerierten Leberstoffwechsels mit gesteigerter Synthese von Akute-Phase-Proteinen (Schmitt et al., 2007), Harnstoff (Gross et al., 1996) sowie gesteigerter Glykolyse und Glukoneogenese (Tayek, 1992) zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch mit nachfolgender hypoxischer Schädigung der perivenösen Hepatozyten kommt. Möglicherweise trägt auch ein erhöhter periportal Stickstoffverbrauch im Rahmen der gesteigerten Harnstoffsynthese zu einem perivenösen Substratmangel für die GS bei. Auch eine perivenöse MAO-A-Hochregulation bei Tumorkachexie könnte durch vermehrte Bildung von Wasserstoffperoxid als prooxidativer Faktor zum Verlust an GS-Aktivität bzw. GS-exprimierenden Zellen beitragen. Diese Hypothese wird gestützt durch die normalisierende Wirkung einer MAO-A-Inhibition auf die PDAC-induzierten GS-Reduktion bei den CA HH-Mäusen



(Abb. 13). Einschränkend muss jedoch angeführt werden, dass in dieser Arbeit die MAO-A-positive Fläche bei den CA-Mäusen nicht erhöht war (Abb. 16). Theoretisch könnte jedoch eine erhöhte MAO-A-Aktivität bei unveränderter MAO-A-Expression (repräsentiert durch die MAO-A-positive Fläche) vorhanden sein. Eine verminderte GS-Aktivität ist bei Leberatrophy als Folge von Energie- und Proteinrestriktion nachgewiesen (Watford, 2000). Auch Spindler et al. (2001) zeigten eine Verminderung der GS-Aktivität sowie der GS-mRNA in der Leber bei kalorienrestriktiver Ernährung im Mausmodell. Dass diese Anorexiebedingten Effekte auch bei Tumorkachexie vorliegen könnten, erscheint aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten verminderten GS-Aktivität bei den CA-Mäusen durchaus möglich.

Eine Elimination der hepatischen GS-Expression führt im Mausmodell zu einer Reduktion von Muskelmasse (Hakvoort et al., 2017). Da Glutamin die wichtigste Stickstoffquelle für den Skelettmuskel darstellt, könnte ein erniedrigter Glutaminspiegel bei verminderter hepatischer GS-Aktivität und gleichzeitig gesteigertem Glutaminbedarf von Zellen des Immunsystems (Argilés et al., 2001) und des Tumors (Medina et al., 1992) zu Stickstoffmangel im Skelettmuskel führen, woraus Proteinkatabolismus und Skelettmuskelabbau resultieren würden. Zugleich entfielen die Glutamin-vermittelte Hemmung des proteinkatabolen Myostatins (Bonetto et al., 2007), was die Kachexie weiter verstärken könnte. Aus der Relevanz der hepatischen GS bei Tumorkachexie ergibt sich die Frage, ob sich aus der Verhinderung der GS-Reduktion bei Karzinom-Tieren, wie in dieser Arbeit durch HH-Behandlung gezeigt, ein therapeutischer Benefit ergibt. So ist beispielsweise GS-Überexpression als therapeutisches Target bei Hyperammonämie beschrieben (Soria et al., 2019), welche ja eine zentrale Stoffwechselveränderung bei Tumorkachexie darstellt. Ob sich hierdurch jedoch auch positive Auswirkungen auf Gewichtsentwicklung, Muskelmasse, Lebensqualität und Überleben ableiten könnten, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Vorläufige Daten im Rahmen einer Dissertation zur HH-Behandlung bei dem hier untersuchten Mausmodell (Schmich 2020) zeigten zwar muskeltypabhängig verminderte Inflammation,

jedoch unveränderte oder sogar abnehmende Muskelfaserquerschnitte noch unklarer Ursache.

Interessanterweise zeigten sich in der qRT-PCR bezüglich der relativen mRNA-Expression der GS von der IHC abweichende Ergebnisse (Abb. 34). In der ANOVA waren ein signifikanter PDAC- und ein signifikanter HH-Effekt für die relative GS-mRNA-Expression nachweisbar. Jedoch zeigte sich im Gegensatz zur IHC eine signifikant erhöhte relative GS-mRNA-Expression bei CA vs. WT sowie bei CA HH vs. WT HH. Ebenfalls gegensätzlich zur durch HH-Behandlung gesteigerten GS-Aktivität in der IHC, zeigte sich eine signifikant verringerte relative GS-mRNA-Expression durch HH-Behandlung. Es zeigte sich somit, dass eine verringerte perivenöse GS-Proteinexpression (IHC) nicht mit einer Verringerung der GS-mRNA assoziiert sein muss. Dies ist damit vereinbar, dass die Verminderung der GS auf Proteinebene nicht auf einer transkriptionellen Downregulation beruhen muss. Für die Regulation der GS sind zahlreiche weitere, insbesondere posttranskriptionelle Mechanismen und Faktoren des GS-Proteinturnovers relevant (Labow et al., 2001). Hierzu zählen u.a. die intrazelluläre Glutaminkonzentration (Lie-Venema et al., 1998; Wang und Watford, 2007), Insulin (Miller et al., 1983) und das Vorhandensein eines Diabetes (Feng et al., 1990). Auch Glukokortikoide und Wachstumshormone können die Transkription der GS-mRNA beeinflussen (Lie-Venema et al., 1998). Von Labow et al. (2001) wurde vorbeschrieben, dass GS-Proteinlevel nicht unbedingt mit GS-mRNA-Leveln korrelieren. Dabei ist z.B. denkbar, dass ein Apoptose-induzierter Verlust der perivenösen Zelllagen eine Rolle spielt. Möglicherweise beruhen die abweichenden Ergebnisse für Protein- und Genexpression auch auf einer kompensatorischen Gegenregulation auf mRNA-Ebene bei erniedrigter GS-Aktivität auf Proteinebene und damit einhergehenden erniedrigten intrazellulären Glutaminspiegeln. Einschränkend muss hier auch beachtet werden, dass für die qRT-PCR Leberhomogenat verwendet wurde. Möglicherweise können auf die perivenöse Zone beschränkten Veränderungen aufgrund des geringen Prozentanteils dieser Zellen im Homogenat nicht ausreichend abgebildet werden.

In weiteren Untersuchungen sollten insbesondere die Faktoren (pankreopriv) Diabetes, Anorexie und auch nutritives Glutaminangebot als mögliche Einflussgrößen für die Differenzen zwischen GS-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene einbezogen werden. Auch eine Bestimmung der intrazellulären Glutaminspiegel wäre interessant.

Im Folgenden werden im Rahmen dieser Arbeit untersuchte hepatische Faktoren des Glutamintransports und des Substratangebotes für die hepatische Glutaminsynthetase auf RNA-Ebene genauer betrachtet. Auch hier ist anzuführen, dass die Untersuchungen an Leberhomogenat durchgeführt wurden und somit nur unzureichende Rückschlüsse auf die perivenöse mRNA-Expression zulassen.

### **4.2.2 FXR**

Für die relative mRNA-Expression von FXR ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 35). FXR erfüllt wichtige Funktionen bei der Regulation von Transport und Verstoffwechslung von Glutamin und Glutamat (Renga et al., 2011). So führt FXR-Hochregulierung in der Leber zu gesteigerter Ammoniakproduktion, Senkung der Harnstoffproduktion über Downregulation der N-Acetylglutamatsynthetase sowie zu Downregulation der Glutaminase (Renga et al. (2011). Auch eine Downregulation des Glutamintransporters SLC1A5 ist beschrieben (Renga et al., 2011). Hierzu passt der Trend der relativen mRNA-Expression von SLC1A5 (Abb. 39) mit jeweils tendenziell entgegengesetzter Entwicklung im Vergleich zu FXR in den einzelnen Gruppen, also erhöhter relativer mRNA-Expression von SLC1A5 bei den Karzinom-Mäusen (CA und CA HH), bei welchen die FXR-mRNA-Expression eher erniedrigt war. Die Expression der Glutaminsynthetase sowie der Glutamattransporter SLC1A2 und SLC1A4 wurde durch FXR-Knockout bei Renga et al. (2011) offenbar nicht beeinflusst. Zusammenfassend bleibt die Interpretation der relativen mRNA-Expression von FXR somit uneindeutig. Eine Beeinflussung des hepatischen Glutaminmetabolismus durch FXR bei Tumorkachexie ist aufgrund der relevanten Funktion von FXR für Glutamin- und Glutamat-Stoffwechsel und -Transport wahrscheinlich. Neben

den in dieser Arbeit untersuchten Glutamin- und Glutamattransportern wären ergänzende Untersuchungen zu weiteren Enzymen des Glutamat- und Harnstoffmetabolismus auf RNA- und Proteinebene sowie die Bestimmung von Glutamin-, Glutamat- und Harnstoffspiegeln, insbesondere auch mit zonaler Analyse, notwendig, um eine genauere Einordnung zu ermöglichen.

### 4.2.3 RhBG

Für die relative mRNA-Expression von RhBG zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression bei den HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (WT und CA), wohingegen sich Karzinom- und Wildtypiere (CA vs. WT bzw. CA HH vs. WT HH) nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 36). Aufgrund der von Weiner et al. (2003) beschriebenen Kolokalisation von RhBG und GS in der Leber wären unter der Hypothese einer perivenösen Zellschädigung bei Tumorkachexie ähnliche Veränderungen der RhBG- und GS-mRNA-Expression zu erwarten. In dieser Arbeit zeigten sich zumindest ähnliche Tendenzen mit höherer mRNA-Expression bei CA im Vergleich zu WT und niedrigerer mRNA-Expression bei HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) im Vergleich zu unbehandelten Tieren (WT und CA) (Abb. 34 und 36). Eine Downregulation von RhBG führte im Mausmodell zu einer Limitation der Glutaminsynthese mit resultierender Hyperammonämie (Qvartskhava et al., 2019). In den eigenen Daten zeigte sich im Gegensatz dazu bei erniedrigter RhBG-mRNA-Expression bei den HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) gegenüber den unbehandelten Tieren (WT und CA) eine gesteigerte Proteinexpression der GS bei den HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) gegenüber den unbehandelten Tieren (WT und CA) in der IHC (Abb. 36 und 13). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede könnte sein, dass die Verwendung von Leberhomogenat für die qRT-PCR den Effekt eines perivenösen Zellverlustes im verbleibenden Gewebe nicht ausreichend berücksichtigt. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob bei den HH-behandelten Tieren eine Hyperammonämie, wie durch die Downregulation von RhBG zu erwarten wäre, vorliegt.

#### **4.2.4 Glutamattransporter: SLC1A2**

Die relative mRNA-Expression des Glutamattransporters SLC1A2 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 37). Tendenziell war die SLC1A2-mRNA-Expression bei HH-behandelten Tieren (WT HH und CA HH) höher als bei den unbehandelten Tieren (WT und CA). Aufgrund der Lokalisation von SLC1A2 in der Plasmamembran GS-positiver Zellen (Hu et al., 2018), wäre unter der Hypothese einer, möglicherweise hypoxischen, Schädigung der perivenösen Zelllage als Ursache der signifikant erniedrigten GS-Proteinexpression bei den CA-Mäusen (Abb. 13), durch Untergang dieser Zellen auch eine verminderte mRNA-Expression des kolokalisierten SLC1A2 zu erwarten, welche in den vorliegenden Daten jedoch nicht bestätigt werden konnte. Da für die qRT-PCR Leberhomogenat verwendet wurde, ist eine Aussage über die zonale SLC1A2-Expression in den untersuchten Proben nicht möglich. In astroglialen Zellen wurde im Tiermodell eine Steigerung der Genexpression von SLC1A2 durch HH-Behandlung nachgewiesen (Li et al., 2011; Sun et al., 2014). Dies steht im Einklang mit der durch HH-Behandlung tendenziell erhöhten mRNA-Expression von SLC1A2 in den untersuchten Leberproben.

#### **4.2.5 Glutamattransporter: SLC1A4**

Für den Glutamattransporter SLC1A4 zeigten sich in der ANOVA PDAC und HH als signifikante Einflussfaktoren. In der CA-Gruppe war die relative mRNA-Expression gegenüber WT signifikant gesteigert und bei CA HH gegenüber CA signifikant erniedrigt (Abb. 38). Braeuning et al. (2006) wiesen eine perivenöse Immunreaktivität von SLC1A4 in der Leber nach, womit eine Kolokalisation mit der GS besteht. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit signifikant erniedrigten GS-Proteinexpression (Abb. 13) bei den CA-Tieren ist wie bereits erwähnt eine Schädigung der perivenösen Hepatozyten zu vermuten. Dies ließe entgegen den in dieser Arbeit erhobenen Daten eine Verminderung der relativen SLC1A4-mRNA-Expression bei CA vs. WT erwarten. Möglicherweise spielt hier jedoch eine Gegenregulation auf RNA-Ebene mit einhergehender Steigerung der SLC1A4-Genexpression bei den CA-Tieren eine Rolle. Hierzu passen die

bezüglich der relativen GS-mRNA-Expression beschriebenen Veränderungen (Abb. 34): Bei der GS zeigte sich ähnlich wie bei SLC1A4 eine gesteigerte relative mRNA-Expression bei CA im Vergleich zu WT, sowie erniedrigte mRNA-Expression durch HH-Behandlung insbesondere bei den Karzinom-Mäusen (CA HH vs. CA). Dies wäre mit einem möglichen positiven Effekt von HH für die Funktion der GS bzw. der perivenösen Zellsagen vereinbar. Möglicherweise ist jedoch auch ein erhöhter Glutamatspiegel bei Tumorkachexie (Holm et al., 2007), also ein erhöhtes Substratangebot, für die gesteigerte mRNA-Expression des Glutamattransporters SLC1A4 bei den Karzinom-Mäusen mitverantwortlich.

#### **4.2.6 Glutamintransporter: SLC1A5**

Für den Glutamintransporter SLC1A5 konnte auf RNA-Ebene unabhängig von HH eine signifikante PDAC-bedingte Hochregulation bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) gezeigt werden (Abb. 39). Bode et al. (2002) konnten in gesunden humanen Hepatozyten keine SLC1A5-mRNA-Expression nachweisen, jedoch in Proben von Lebertumoren und bei Leberzirrhose. In der vorliegenden Arbeit war in der Mausleber mRNA-Expression von SLC1A5 bei allen Tieren nachweisbar. Die in dieser Arbeit gesteigerte mRNA-Expression von SLC1A5 bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) ist somit möglicherweise ein Anhaltspunkt für eine tumorbedingte hepatozelluläre Schädigung. Die Expression von SLC1A5 scheint abhängig vom Glutaminbedarf zu sein, was die verstärkte Expression in stark proliferierenden Zellen wie Immunzellen (Scalise et al., 2018) sowie verschiedenen Tumorzellen nahelegt (Kasai et al., 2017). Da für die qRT-PCR Leberhomogenat verwendet wurde, könnte die erhöhte SLC1A5-mRNA-Expression bei CA vs. WT auch durch eine vermehrte Infiltration der Leber mit Immunzellen bei Tumorerkrankung mitbedingt sein. Hierfür spricht auch die in der CA-Gruppe erhöhte Anzahl CD68-positiver Zellen in der durchgeführten IHC als Zeichen der vermehrten hepatischen Infiltration mit Immunzellen (Abb. 28).

### 4.3 Monoaminoxidasen

HH-Behandlung reduzierte die MAO-A-positive Fläche (IHC) sowohl bei Karzinom-Tieren (CA HH) als auch bei Wildtyp-Tieren (WT HH) signifikant gegenüber unbehandelten Tieren (CA bzw. WT) (Abb. 16). Dies ist vereinbar mit einer Reduktion der Gesamtaktivität der MAO-A pro Fläche Lebergewebe. Strenggenommen ist die Bestimmung der MAO-A-positive Fläche jedoch kein geeignetes Maß, um eine Hemmung der MAO-A-Enzymaktivität durch HH (Kim et al., 1997; Santillo et al., 2014) abzubilden. PDAC hatte entgegen der These einer gesteigerten MAO-A-Aktivität bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) keinen hochregulierenden Einfluss gegenüber Wildtyp-Tieren (WT und WT HH). Allerdings muss angeführt werden, dass eine gesteigerte MAO-A-Enzymaktivität möglicherweise nicht allein durch eine vermehrte MAO-A-Proteinexpression, wie durch die MAO-A-positive Fläche in der IHC repräsentiert, nachgewiesen werden kann. Hier könnten Aktivitätsmessungen der MAO-A, z.B. mittels fluometrischer Assays (Suzuki et al., 1976) ergänzend hilfreich sein.

In der qRT-PCR zeigte sich eine signifikante Steigerung der relativen MAO-A-mRNA-Expression durch HH-Behandlung in der CA HH-Gruppe gegenüber der unbehandelten CA-Gruppe (Abb. 40). Die höhere relative MAO-A-mRNA-Expression im Gegensatz zur erniedrigten MAO-A-Expression auf Proteinebene (IHC) bei den HH-behandelten Tieren ist möglicherweise durch einen Angriffspunkt des MAO-A-Hemmers HH auf Proteinebene zurückzuführen, was konsekutiv zu einer erhöhten Genexpression durch kompensatorische Gegenregulation auf RNA-Ebene führen könnte, auch wenn schon perivenöse Zellen teilweise - wie vermutet - zugrunde gegangen sein sollten.

Für die relative MAO-B-mRNA-Expression zeigten sich ein signifikanter herunterregulierender PDAC-Effekt sowie ein signifikanter hochregulierender HH-Effekt (Abb. 41). Der signifikante HH-Effekt, welcher ebenso wie bei MAO-A zu gesteigerter mRNA-Expression der MAO-B führte, ist insofern interessant, dass eine Beeinflussung der MAO-B-mRNA-Expression durch den selektiven MAO-A-Hemmer HH nicht zu erwarten war.

Eine Expression von MAO-A und MAO-B in der Leber von Ratten wurde von Lenzen et al. (1983) beschrieben. Auch für die Monoaminoxidasen ist eine zonale Verteilung in der Leber zu berücksichtigen: Für MAO-B wurde von Huang et al. (2008) immunhistochemisch an Ratten-Lebern eine verstärkte MAO-B-Proteinexpression in der gut mit Sauerstoff versorgten Periportalzone beschrieben. Eine zonale Verteilung der MAO-A-Expression in der Leber ist unseres Wissens in der Literatur bisher nicht beschrieben. Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit am PDAC-Mausmodell für die MAO-A-Proteinexpression eine bevorzugt perivenöse Lokalisation (Abb. 17-19), vergleichbar mit der GS. Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob MAO-A als Vermittler einer Leberzellschädigung bei Tumorkachexie fungiert. Hintergrund dieser Annahme ist u.a. die von Nocito et al. (2007) beschriebene vermehrte MAO-A-Expression bei inflammatorischen Lebererkrankungen im Mausmodell sowie die Senkung der Leberzellschädigung durch MAO-A-Inhibition. Auch im Skelettmuskel konnte MAO-A bei Glukokortikoid-induzierter Muskelatrophie, einem Kachexie-Modell, als Vermittler von Zellschädigung identifiziert werden (Manoli et al., 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurde von Bruns (2019) im Rahmen einer Dissertation die MAO-A-Proteinexpression in der Leber von PDAC-Patienten untersucht. Auch hier war die Fragestellung eine hepatische MAO-A-Hochregulation bei Tumorkachexie. Tatsächlich zeigte sich eine gesteigerte MAO-A-Expression in der Leber bei Patienten mit Tumorkachexie im Vergleich zu den nicht kachektischen Tumorpatienten, wobei der Unterschied bei geringer Fallzahl statistisch nicht signifikant war (Bruns, 2019). In der vorliegenden Arbeit war die Hypothese einer vermehrten MAO-A-Expression bei den Karzinom-Tieren jedoch weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene zu bestätigen. Möglicherweise tritt die vermutete MAO-A-Hochregulation erst in fortgeschritteneren Stadien der Kachexie mit ausgeprägterem Gewichtsverlust als bei den untersuchten Tieren zu Tage. Wie bereits erwähnt, ist außerdem zu beachten, dass die Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR an Leberhomogenat keine Aussage über die zonale Verteilung zulässt. Auch die durchgeführte Auswertung der IHC an Leberschnitten ermöglicht keine Aussage über die genauen zonalen



Veränderungen, wie beispielsweise Zu- oder Abnahme von MAO-A-Proteinexpression perivenös, da die MAO-A-positive Fläche über den gesamten Schnitt bestimmt wurde und keine selektive Betrachtung perivenöser bzw. periportal Ausschnitte erfolgte. Letztlich könnte wie bereits erwähnt auch eine gesteigerte MAO-A-Enzymaktivität trotz nicht gesteigerter MAO-A-Proteinexpression vorliegen, Erstere wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass eine MAO-A-Hemmung durch HH auf Proteinebene nicht mit einer Hemmung auf mRNA-Ebene einherzugehen scheint.

Muriana et al. (1993) beobachteten in Leberproben von Ratten eine Inaktivierung der GS durch Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid entsteht u.a. beim Abbau biogener Amine durch Monoaminoxidasen (Graham und Karnovsky, 1965), sodass eine Schädigung der GS durch verstärkte MAO-Aktivität denkbar ist. Gestützt wird diese These in der vorliegenden Arbeit durch die Beobachtung, dass durch MAO-A-Inhibition mit HH die Verminderung der GS-Proteinexpression bei CA-Mäusen nahezu aufgehoben werden konnte (CA HH vs. CA) (Abb. 13). Positive Einflüsse auf die Tumorkachexie im Sinne einer Zunahme an Körpergewicht konnten jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 12). Ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von MAO-A und GS ist aufgrund der anscheinend ähnlichen Lokalisation sowie des Einflusses von MAO-A-Inhibition auf die GS-Proteinexpression denkbar. Zum besseren Verständnis sind zusätzliche Untersuchungen, z.B. immunhistochemische Doppelfärbungen notwendig.

## **4.4 Inflammation**

### **4.4.1 Interleukin-1 $\beta$**

Immunhistochemisch zeigte sich ein signifikant höherer Anteil IL-1 $\beta$ -positiver Zellen bei CA als bei WT, während HH-Behandlung bei den CA HH-Tieren gegenüber CA zu einer signifikanten Senkung des Anteils IL-1 $\beta$ -positiver Zellen führte (Abb. 20). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  fungiert über Freisetzung von IL-6 als Initiator der Akute-Phase-Reaktion (Dinarello, 2005)

und ist als Stimulator des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges ein möglicher Mediator der Kachexieentstehung (Melstrom et al., 2007). Metzger et al. (2004) zeigten eine Gewichtsabnahme bei Mäusen mit IL-1 $\beta$ -produzierenden Tumoren. Baicus et al. (2012) beschrieben erhöhte IL-1 $\beta$ -Spiegel bei Patienten mit Tumorerkrankungen und Camargo et al. (2015) konnten erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Fettgewebe von Kachexiepatienten nachweisen. Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Zahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen in der Leber von Mäusen der CA-Gruppe stützt die in der Literatur beschriebene Bedeutung von IL-1 $\beta$  für Kachexieentstehung und für eine Kachexie-unterhaltende Inflammationsreaktion. Im Sinne eines möglichen Therapieansatzes konnten Cannon et al. (2007) zeigen, dass erniedrigte IL-1 $\beta$ -Spiegel im Mausmodell mit einer verminderten Kachexieentwicklung einhergehen. In den vorliegenden Daten konnte immunhistochemisch unter HH-Behandlung eine niedrigere Expression IL-1 $\beta$ -positiver Zellen in der Leber bei Karzinom-Tieren (CA HH vs. CA) nachgewiesen werden, was zumindest bezüglich dieses Faktors für einen Therapieeffekt von HH sprechen könnte. Dies wiederum passt zu Daten von Liu et al. (2017), welche eine Reduktion des Serum-IL-1 $\beta$ -Spiegels durch Harmine-Behandlung belegen.

Für die relative mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  zeigte sich PDAC als Haupteffekt mit signifikant gesteigerter IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression sowohl bei CA gegenüber WT als auch bei CA HH gegenüber WT HH (Abb. 42). Hier besteht eine gewisse Diskrepanz zur IHC, die eine PDAC-bedingte Zunahme bei unbehandelten, nicht aber bei behandelten Tieren zeigte. Diese Unterschiede zwischen Protein- und RNA-Ebene könnten möglicherweise regulativ bzw. zellfunktionsbedingt zu erklären sein. Zusammenfassend deuten die erhobenen Daten aufgrund der signifikant niedrigeren IL-1 $\beta$ -Proteinexpression in der IHC insgesamt auf eine anti-inflammatorische Wirkung von HH im Bezug auf die hepatische Inflammationskomponente hin.

#### **4.4.2 Interleukin-6**

Für die relative IL-6-mRNA-Expression lag unabhängig von HH-Behandlung ein signifikant hochregulierender PDAC-Effekt vor (Abb. 43). Dies passt zur

Beobachtung erhöhter IL-6-Serumlevel bei PDAC (Barber et al., 1999a; Martignoni et al., 2005). Die von Liu et al. (2017) beschriebene Reduktion von IL-6 durch Harmine konnte anhand der eigenen Daten nicht bestätigt werden. Das Zytokin IL-6 ist ein wesentlicher Initiator der Akute-Phase-Reaktion in der Leber (Castell et al., 1990). Induziert wird die IL-6-Ausschüttung u.a. durch TNF- $\alpha$  (Tan et al., 2014). Auch in den eigenen Daten konnten ähnliche Veränderungen der relativen mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 in allen Gruppen gezeigt werden (Abb. 43 und 44). In verschiedenen Studien konnte eine Korrelation von erhöhten IL-6-Serumspiegeln und Kachexieentstehung aufgezeigt werden (Strassmann et al., 1992; Chen et al., 2016). Auch in der Leber konnte eine erhöhte IL-6-Proteinexpression bei Tumorkachexie sowohl im Tiermodell (Catalano et al., 2003) als auch bei PDAC-Patienten (Martignoni et al., 2009) nachgewiesen werden. Diese Überproduktion von IL-6 ist assoziiert mit einer verringerten Überlebenszeit von PDAC-Patienten (Moses et al., 2009). Neben ihrer Rolle im Rahmen der Inflammationsreaktion scheint erhöhte intrahepatische IL-6-Expression zu Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel wie vermehrter Harnstoffsynthese, Anstieg des intrahepatischen Glutamats und Abfalls des intrahepatischen Glutamins zu führen (Hack et al., 1996). Hohe Glutamat- und niedrige Glutaminserumspiegel wiederum stellen kachexietypische Stoffwechseleränderungen dar (Kinscherf et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte auf Proteinebene (IHC) eine deutlich geringere GS-Aktivität in der Leber bei CA-Mäusen im Vergleich zu WT gezeigt werden (Abb. 13). Erniedrigte GS-Aktivität führt zu erniedrigtem Glutamin und erhöhtem Glutamat intrahepatisch und im Plasma, den typischen Stoffwechseleränderungen bei Tumorkachexie. Bei den CA-Mäusen war die relative IL-6-mRNA-Expression signifikant erhöht. Möglicherweise trägt also die hepatische IL-6-Erhöhung bei Tumorkachexie über Störung der hepatischen GS-Aktivität zur Progression der Kachexie bei. HH-Behandlung zeigte in der vorliegenden Arbeit im Bezug auf die IL-6-mRNA-Expression keinen signifikanten antiinflammatorischen Effekt.

#### **4.4.3 TNF- $\alpha$**

Für die relative TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression zeigte sich ein signifikant hochregulierender PDAC-Effekt (Abb. 44), ähnlich wie für die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 (Abb. 42 und 43). Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  ist durch Induktion der Ausschüttung weiterer Zytokine wie IL-6 an der Inflammationsreaktion beteiligt. Im Tiermodell konnten Oliff et al. (1987) zeigen, dass TNF-Sekretion durch Tumorzellen Kachexie auslöst. TNF- $\alpha$  gilt bei Kachexie als wichtiger Verursacher von Skelettmuskelatrophie und Lipolyse (Tisdale, 2010b) sowie gleichzeitig als Hemmer von Myogenese und Liposynthese (Schcolnik-Cabrera et al., 2017). Catalano et al. (2003) wiesen in der Leber von Ratten mit Tumorkachexie eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  nach. Diese Beobachtung wird durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt. Während Li et al. (2018) in Gehirnzellen von Mäusen eine Suppression von TNF- $\alpha$  durch Harmine-Behandlung und Liu et al. (2017) erniedrigte TNF- $\alpha$ -Serumlevel unter Harmine-Behandlung beobachteten, war in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss einer HH-Behandlung auf die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  im Lebergewebe nachweisbar.

#### **4.4.4 COX-1 und COX-2**

Entsprechend der Beobachtung einer verstärkten hepatischen Inflammation bei Tumorkachexie zeigten sich immunhistochemisch mehr COX-2-positive Zellen bei Karzinom-Tieren (CA und CA HH) als bei Wildtyp-Tieren (WT und WT HH), entsprechend einem signifikanten hochregulierenden PDAC-Effekt in der ANOVA (Abb. 24). Auffällig war ein höherer Prozentanteil COX-2-positiver Zellen in den perivenösen im Vergleich zu den periportalen Ausschnitten (Abb. 25). Dies könnte die These stützen, dass eine vermehrte perivenöse Inflammationsreaktion zu verminderter perivenöser Glutaminsynthese und vermindertem Glutamatscavenging führt und dadurch die Tumorkachexie vorantreibt. Eine qRT-PCR zur Bestimmung der COX-2-mRNA-Expression wurde für die vorliegende Arbeit ebenfalls durchgeführt, war jedoch aufgrund nicht nachweisbarer ct-Werte in mehreren Proben nicht auswertbar.

Stattdessen wurde die relative mRNA-Expression der COX-1, eines konstitutiv exprimierten Isoenzym der COX-2, untersucht (Abb. 45). Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter PDAC-Effekt mit gesteigerter COX-1-mRNA-Expression bei Karzinom-Mäusen (CA und CA HH) gegenüber Wildtyp-Mäusen (WT und WT HH) unabhängig von HH-Behandlung. Eine COX-vermittelte vermehrte Prostaglandinsynthese bei Mäusen mit Tumoren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren konnten Wang et al. (2005) zeigen. Durch COX-Hemmung mit dem NSAR Indometacin konnten die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Spiegel sowie die Expression von Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Leber in der Arbeit von Wang et al. (2005) signifikant gesenkt werden. Prostaglandine haben proteolytische Effekte im Skelettmuskel (Fisher et al, 1991). Hussey und Tishdale (2000) konnten im Mausmodell unter COX-2-Inhibition eine Reduktion der PIF-induzierten Proteolyse nachweisen. Ob durch COX-2-Inhibition die Tumorkachexie therapierelevant beeinflusst werden kann, ist gegenwärtig in der Diskussion (Mantovani und Madeddu, 2008). Lundholm et al. (2004) konnten bei Patienten mit Tumorkachexie einen Erhalt des Körperfettanteils durch NSAR-Einnahme zeigen, den gleichen Effekt konnten Celik et al. (2009) im Mausmodell reproduzieren. Gridelli et al. (2007) wiesen eine Verminderung des Gewichtsverlusts von Tumorpatienten durch COX-Hemmer nach. Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten mit gesteigerter COX-1-mRNA- und COX-2-Protein-Expression bei tumortragenden Mäusen stützen die Erkenntnisse einer Bedeutung der Cyclooxygenasen bei Tumorkachexie. Insbesondere angesichts ihres günstigen Nebenwirkungsprofils mit guter Patientencompliance (Mantovani et al., 2010) erscheinen COX-Hemmer als vielversprechende Optionen in der Behandlung der Tumorkachexie. Zhang et al. (2014) und Yu et al. (2016) beschrieben zudem eine Downregulation der COX-2-Genexpression von Magenkarzinomzellen durch Harmine-Behandlung. In den eigenen Daten zeigte HH-Behandlung jedoch weder bei der COX-2-Proteinexpression in der Leber in der IHC noch bei der COX-1-mRNA-Expression im Leberhomogenat einen signifikanten Einfluss, was diesbezüglich kein therapeutisches Potential von HH erkennen lässt.

#### 4.4.5 CD68

Es bestand eine signifikante PDAC-bedingte Hochregulation der Anzahl CD68-positiver Zellen in der IHC in den Leberproben von Karzinom-Mäusen (CA und CA HH) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT und WT HH) (Abb. 28). Da CD68 als Marker der Kupffer-Zellen, der gewebeständigen Makrophagen der Leber, dient, ist somit von einer verstärkten Infiltration der Leber mit Immunzellen im Rahmen der Tumorerkrankung auszugehen. Interessanterweise zeigte sich hier eine signifikante Reduktion der Infiltration mit CD68-positiven Zellen durch HH-Behandlung. Dies könnte einen möglichen Therapieeffekt von HH im Hinblick auf eine Reduktion der hepatischen Inflammationsreaktion bei Tumorkachexie darstellen. Dem in der qRT-PCR ebenfalls signifikanten, hochregulierenden PDAC-Effekt auf die relative CD68-mRNA-Expression, konnte degegenüber durch HH-Behandlung nicht signifikant entgegengewirkt werden, d.h. auf RNA-Ebene zeigte sich kein signifikanter antiinflammatorischer Therapieeffekt der HH-Behandlung (Abb. 46). Kupffer-Zellen sind die Initiatoren der Inflammationsreaktion in der Leber (Babu et al., 2007) und spielen als Produzenten von Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion in der Leber eine wichtige Rolle (Martignoni et al., 2005). Diese Zytokine wiederum werden bei Tumorkachexie als prokachektische Faktoren angesehen (Tuca et al., 2013). Eine Aktivierung der Kupffer-Zellen kann auch direkt durch den Tumor-induzierten prokachektischen Faktor PIF erfolgen (Watchorn et al., 2005). Bei Patienten mit Tumorkachexie konnten Martignoni et al. (2009) in Leberproben immunhistochemisch signifikant mehr CD68-positive Makrophagen nachweisen als bei Tumorpatienten ohne Kachexie. Im Gegensatz zu Martignoni et al. (2009), welche PDAC-Patienten mit und ohne Kachexie verglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit tumorkranke Tiere und gesunden Wildtyp-Tieren verglichen. Zwischen perivenösen und periportalen Ausschnitten zeigte sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der Infiltration mit CD68-positiven Zellen. Dies steht der These einer inflammationsbedingten Schädigung der perivenösen Zone bei Tumorkachexie nicht entgegen, da die perivenöse Zone aufgrund der schlechteren O<sub>2</sub>-Versorgung als vulnerabler als die periportale

Zone angesehen wird. Der signifikant geringere Anteil CD68-positiver Zellen in der IHC bei HH-behandelten Mäusen (WT HH und CA HH) gegenüber unbehandelten Mäusen (WT und CA) ist möglicherweise im Rahmen der von Liu et al. (2014) demonstrierten antiinflammatorischen Wirkung von HH durch Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges bedingt.

#### **4.4.6 SOCS-3**

Einem hochsignifikant hochregulierenden PDAC-Effekt auf die relative SOCS-3-mRNA-Expression konnte durch HH-Behandlung auf mRNA-Ebene signifikant entgegengewirkt werden (Abb. 47), wobei Daten zur SOCS-3-Proteinexpression (IHC) nicht erhoben wurden. SOCS-3 ist ein negativer Regulator von Zytokinsignalwegen, die Expression des Proteins wird durch Zytokine induziert (Senn et al., 2003). Die stark erhöhte relative SOCS-3-mRNA-Expression bei den CA-Mäusen könnte u.a. durch die bei den CA-Mäusen ebenfalls erhöhten Zytokine (siehe Abschnitte zu IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) zu erklären sein. Auch die von Umaña et al. (2003) beschriebene vermehrte SOCS-3-Expression in der Leber unter proteinrestriktiver Diät ist gut mit der erhöhten SOCS-3-mRNA-Expression in der Gruppe der tumorkranken und somit von den metabolischen Veränderungen der Kachexie betroffenen Tieren zu vereinbaren. Der herunterregulierende HH-Effekt auf die SOCS-3-mRNA-Expression bei den CA HH-Mäusen ist möglicherweise in einer von Liu et al. (2017) beschriebenen, antiinflammatorischen Wirkkomponente von Harmine, also einer verminderten Zytokinausschüttung und somit einer verminderten sekundären Induktion der SOCS-3-Expression, begründet. Insgesamt könnte die erniedrigte relative SOCS-3-mRNA-Expression unter HH-Behandlung als positiver Therapieeffekt durch Hemmung der hepatischen Inflamationsreaktion bei Tumorkachexie gewertet werden, wobei die Proteinebene zu untersuchen bleibt.

#### **4.4.7 MIF**

Für die relative MIF-mRNA-Expression zeigte sich ein signifikant herunterregulierender HH-Effekt, während PDAC bei tendenziell geringerer MIF-Expression bei CA gegenüber WT keinen signifikanten Einfluss hatte (Abb. 48). Das Zytokin MIF ist an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt und wird

in der Leber sowohl von Hepatozyten als auch von Kupffer-Zellen produziert (Marin et al. 2017). Im Rahmen chronischer Entzündungen, wozu man auch die Tumorkachexie zählen kann, werden MIF katabole Effekte zugeschrieben (Benigni et al., 2000). An einem Mausmodell der Tumorkachexie konnten Batista et al. (2012) eine Zunahme der MIF-Expression im Fettgewebe bei Fortschreiten der Kachexie nachweisen. Ein solcher Effekt war in dieser Arbeit im untersuchten Lebergewebe nicht nachweisbar: Im Gegenteil zeigte sich eine tendenzielle Herunterregulation der MIF-mRNA-Expression bei CA gegenüber WT, trotz des vermehrten Nachweises der möglicherweise MIF-produzierenden Kupffer-Zellen in der IHC (Abb. 28). Die verminderte relative MIF-mRNA-Expression bei HH-Behandlung passt zu der These einer antiinflammatorischen Wirkung von Harmine (Liu et al., 2017), auch wenn der genaue Mechanismus unklar bleibt.

### **4.5 Apoptose: BAX, Caspase-3 und BCL-2**

Die dieser Arbeit zugrunde liegende These einer zumindest zonalen Leberschädigung im Rahmen einer hepatischer Inflammationsreaktion bei Tumorkachexie, würde dadurch gestützt werden, dass es zu einer Zunahme apoptotischer Prozesse in der Leber im Rahmen der Tumorkachexie käme. Aus diesem Grund erfolgte eine Untersuchung der relativen mRNA-Expression der Proteine BAX, Caspase-3 und BCL-2. Bei der relativen mRNA-Expression des proapoptotischen Proteins BAX lagen für PDAC, HH und Interaktion keine signifikanten Effekte vor (Abb. 49). In der WT HH-Gruppe zeigte sich eine ca. 16 % niedrigere mRNA-Expression als in den drei anderen Gruppen, ohne dass signifikante Unterschiede nachweisbar waren. Die von Fukuda et al. (2009) beschriebene erhöhte Genexpression von BAX u.a. in der Leber bei tumortragenden Tieren konnte somit in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die These einer vermehrten Expression proapoptotischer Faktoren in der Leber im Rahmen der Tumorkachexie kann anhand der relativen mRNA-Expression von BAX nicht gestützt werden. Ebenso konnte die von Zhang et al. (2014) und Yu et al. (2016) für das humane Magenkarzinom beschriebene Steigerung der BAX-Expression durch Harmine-Behandlung anhand der eigenen Untersuchungen für die Leber nicht bestätigt werden. Cao et al. (2001)



fanden in vitro bei HepG2-Zellen eine vermehrte Apoptose durch Harmine-Behandlung, wobei dies nicht mit Veränderungen der BAX-Expression einherging. Auch in den eigenen Daten konnte keine signifikante Veränderung der BAX-mRNA-Expression durch HH-Behandlung gezeigt werden.

Für die ebenfalls proapoptotisch wirkende Caspase-3 (McIlwain et al., 2013) wurde von Belizário et al. (2001) im Mausmodell bei Tumorkachexie eine gesteigerte Aktivität im Skelettmuskel gezeigt. Da für die Leber eine inflammationsbedingte Leberzellschädigung mit gesteigerter Apoptose im Rahmen der Tumorkachexie vermutet wird, könnte auch hepatisch eine verstärkte Caspase-3-Aktivität vorliegen. In dieser Arbeit konnte mittels qRT-PCR eine um 35 % gesteigerte relative mRNA-Expression von Caspase-3 bei CA im Vergleich zu WT gezeigt werden, wobei dieser PDAC-Effekt in der ANOVA nicht signifikant war und auch im Gruppenvergleich der unbehandelten Mäuse keine Signifikanz vorlag (Abb. 51). HH-Behandlung hingegen hatte einen signifikant hochregulierenden Effekt für die Caspase-3-mRNA-Expression, was möglicherweise für einen proapoptotischen Effekt durch HH-Behandlung, wie bereits in vitro an humanen Magenkarzinom-Zellen (Li et al., 2017) sowie HepG2-Zellen (Cao et al., 2011) durch Hochregulation von Caspase-3 unter Harmine-Behandlung beschrieben, sprechen könnte.

Für die mRNA-Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 bestand ein signifikanter PDAC-Effekt im Zusammenhang mit HH-Behandlung, sodass bei CA HH die relative BCL-2-mRNA-Expression gegenüber WT HH signifikant gesteigert war (Abb. 50). Die erhöhte relative BCL-2-mRNA-Expression bei den Karzinom-Mäusen kann möglicherweise im Rahmen der für BCL-2 beschriebenen Überexpression bei Tumorentstehung (Delbridge und Strasser, 2015) interpretiert werden. Zhang et al. (2014) und Yu et al. (2016) beschreiben eine Herunterregulation von BCL-2 an humanen Magenkarzinomzellen durch Harmine. Gleiches beschreiben Cao et al. (2001) für HepG2-Zellen. In den eigenen Daten konnte hingegen keine verminderte BCL-2-mRNA-Expression bei den HH-behandelten Tieren gezeigt werden.

Zusammenfassend kann eine gesteigerte hepatozelluläre Apoptoserate bei Tumorkachexie anhand der erhobenen Daten zur mRNA-Expression von BAX, Caspase-3 und BCL-2 nicht belegt werden. Hierzu muss jedoch angeführt werden, dass vermutlich vor allem die am schlechtesten mit Sauerstoff versorgte perivenöse Zone der Leber von Zellschädigung betroffen ist, worauf die verringerte Anzahl GS-positiver Zellen bei den CA-Tieren hindeutet (Abb. 13). Da für die qRT-PCR Leberhomogenat verwendet wurde, kann über die zonale Verteilung der Apoptosemarker anhand der vorliegenden Daten leider keine Aussage getroffen werden. Eine mögliche Senkung der Apoptosemarker durch MAO-A-Inhibition mittels HH im Sinne eines protektiven Effektes der HH-Behandlung für die perivenöse Zone, wie die Steigerung des GS-Proteinexpression durch HH-Behandlung bei den CA HH-Tieren (Abb. 13) nahelegt, war nicht nachweisbar. Hingegen zeigte sich durch HH eine signifikant gesteigerte Caspase-3-mRNA-Expression, was für eine proapoptotische Wirkung von HH selbst spricht. Zu beachten ist dabei jedoch generell die Limitation, dass es in der vorliegenden Studie keine Sham-Kontrolle gab.

### **4.6 Proliferation: PCNA**

Die relative mRNA-Expression von PCNA war sowohl durch PDAC als auch durch HH-Behandlung signifikant gesteigert (Abb. 52). PCNA hat eine wichtige Funktion für DNA-Replikation und –Reparatur (Boehm et al., 2016) und findet wissenschaftlich als Proliferationsmarker Verwendung (Hall et al., 1994). Die verstärkte hepatische PCNA-mRNA-Expression in der CA-Gruppe ist möglicherweise mit dem akzelerierten Leberstoffwechsel bei Tumorkachexie assoziiert. Des Weiteren ist bei Tumorkachexie eine Zunahme des Lebervolumens beschrieben (Lieffers et al., 2009), was mit gesteigerter Proliferation einhergehen könnte. Auch eine gesteigerte hepatische Inflammationsreaktion mit vermehrter Infiltration durch Immunzellen, wie die durchgeführte CD68-IHC nahelegt (Abb. 28), könnte die erhöhte PCNA-mRNA-Expression bei den tumorkranken Mäusen erklären.

Durch Harmine-Behandlung konnten Zhang et al. (2014) an Tumorzellen eine Reduktion der PCNA-Expression und damit einhergehende Hemmung der Zellproliferation nachweisen. In dieser Arbeit zeigte sich hingegen eine gesteigerte PCNA-mRNA-Expression durch HH-Behandlung, jedoch wurden im Gegensatz zu Zhang et al. (2014) keine Tumorzellen, sondern Lebergewebe untersucht. Vorstellbar wäre auch, dass die verstärkte PCNA-mRNA-Expression durch HH-Behandlung im Rahmen hepatischer DNA-Reparaturprozesse zu interpretieren ist, wobei die vorliegenden Daten hierüber keine ausreichende Information geben.

### **4.7 Glykogengehalt der Leber (PAS-Reaktion)**

Die PAS-Reaktion weist Glykoproteine, Muzine und Polysaccharide nach und kann zur Bestimmung des Leberglykogengehaltes herangezogen werden (Kudryavtseva et al., 1992). Bezüglich der PAS-positiven Fläche zeigte sich eine signifikante Steigerung sowohl durch PDAC als auch durch HH (Abb. 32). Bei Tumorpatienten sowie bei Tumorkachexie ist eine erhöhte Glykolyseaktivität in der Leber (Lawson et al., 1982; Tayek, 1992), ebenso wie im Skelettmuskel (Kinscherf et al., 1996) beschrieben. Eine erhöhte Glykolyserate entspricht dem insgesamt akzelerierten Lebermetabolismus bei Tumorkachexie. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch am Tiermodell des PDAC ein signifikant erhöhter Glykogengehalt bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH). In der Arbeit von Bruns (2019) aus unserer Arbeitsgruppe konnten keine signifikanten Veränderungen der PAS-positiven Fläche in der Leber von PDAC-Patienten mit Tumorkachexie im Vergleich zu PDAC-Patienten ohne Tumorkachexie nachweisen werden. Narsale et al. (2015) wiesen bei Mäusen mit Tumorkachexie sogar eine Abnahme des Leberglykogengehaltes nach, wohingegen bei Mäusen mit Tumorerkrankung ohne Kachexieentwicklung keine Veränderung des Leber-Glykogengehaltes nachweisbar war. Dass in den eigenen Daten eine signifikante Zunahme des Leberglykogengehaltes bei den hier untersuchten Karzinom-Tieren (CA und CA HH) gegenüber den Wildtypen (WT und WT HH) bestand, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei den Karzinom-Mäusen (CA und CA HH) noch kein signifikanter Gewichtsverlust gegenüber den Wildtyp-Tieren (WT und WT HH) vorlagen. Möglich wäre, dass

die von Narsale et al. (2015) beschriebene Abnahme des Leberglykogengehaltes erst in fortgeschrittenen Stadien der Tumorkachexie auftritt. Möglicherweise ist der erhöhte Leberglykogengehalt bei den Karzinom-Tieren (CA und CA HH) auch durch einen Diabetes mellitus (sog. pankreopriver Diabetes) im Rahmen der PDAC-Erkrankung (Messeri et al., 2012; Chevalier und Farsijani, 2014) mitbedingt. Informationen zum Blutzuckerspiegel der untersuchten Tiere bzw. dem Vorliegen eines Diabetes mellitus lagen nicht vor. Des Weiteren unterliegt der Leberglykogengehalt tageszeitlichen Schwankungen in Abhängigkeit von Nahrungsaufnahme, Schlaf und Aktivität (Kudryavtseva et al., 1992), welche hier nicht quantifiziert wurden. Der erhöhte Glykogengehalt bei den HH-behandelten Tieren ist aufgrund fehlender Literatur zu diesem Thema unklar.

Interessanterweise zeigte sich bei der Auswertung der Färbung eine vor allem perivenöse Lokalisation der PAS-positiven Zellen, während periportal keine bzw. nur geringe PAS-positive Bereiche nachweisbar waren (Abb. 33). In der Literatur ist eine ebenfalls verstärkt perivenöse PAS-Reaktion bei vermehrtem perivenösen Glykogengehalt in humanen Leberproben bei chronischer Alkohol-induzierter Hepatitis beschrieben, wohingegen in Leberbiopsien von Gesunden ein vermehrter Glykogengehalt periportal bestand (Kudryavtseva et al., 1996). Im Rahmen akuter Leberzellschädigung ist eine rapide Abnahme des gespeicherten Glykogens in der Leber beschrieben, wohingegen bei chronischer Leberzellschädigung die Glykogenspeicher wieder aufgefüllt werden (Kudryavtseva et al., 1996). Möglicherweise ist der erhöhte Leberglykogengehalt bei den Karzinom-Mäusen (CA und CA HH) also im Rahmen einer chronischen Leberschädigung bei Tumorkachexie zu verstehen. In diesem Fall könnte auch die vermehrt perivenös nachweisbare PAS-Reaktivität ein Hinweis auf eine Schädigung vorwiegend der perivenösen Zone sein. Eine andere mögliche Interpretation der verringerten periportal PAS-Reaktivität wäre, dass bei periportal akzeleriertem Leberstoffwechsel bei Tumorkachexie dort verstärkt Glykogenolyse abläuft und somit der Glykogengehalt sinkt.

#### 4.8 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war, die bisher weitgehend unverstandenen Veränderungen des Lebermetabolismus und seiner zonalen Organisation bei Tumorkachexie näher zu charakterisieren, um im Sinne einer Hypothesen-Generierung als Ausgangspunkt für weiterführende Forschung zu dienen. Die in dieser Arbeit nicht vorgenommene klare Unterscheidung von Kachexie- und Tumor-induzierten Effekten sollte in Folgearbeiten anhand einer zusätzlichen Gruppe tumorkrankter Mäuse ohne Kachexie berücksichtigt, bzw. die in dieser Arbeit erhobenen Befunde genauer etwaigen Kachexiestadien zugeordnet werden. Hierzu wäre jedoch eine weit größere Anzahl Versuchstiere notwendig, als in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung standen.

Ergänzend wäre eine Aminosäureanalyse bzgl. Glutamin, Glutamat und Harnstoff sowohl intrahepatisch als auch im Serum der untersuchten Tiere weiterführend. Zum besseren Verständnis der veränderten zonalen Expression der untersuchten Aminosäuretransporter könnten immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt werden, insbesondere für die mit der GS-kolokalisierten Transporter, woraus sich weitere Anhaltspunkte für die vermutete Schädigung der perivenösen Zone ergeben könnten. Gleichzeitig wäre auch eine zonale Betrachtung der Apoptosemarker aufschlussreich, um Anhaltspunkte für eine gesteigerte Apoptose perivenöser Zellen bei Kachexie zu erhalten. Ergänzend zu den untersuchten perivenös lokalisierten Leberenzymen wäre eine Untersuchung der periportal exprimierten Enzyme Glutaminase (Watford, 2000), Carbamoyl-Phosphatsynthetase als Schlüsselenzym der Harnstoffsynthese (Poyck et al., 2008) und den Enzymen der Glukoneogenese (Matsumura et al., 1984) sinnvoll, insbesondere im Hinblick auf eine möglicherweise inverse Korrelation mit der GS-Expression.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene, bevorzugt perivenöse Lokalisation der MAO-A sollte in weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen an Lebergewebe von Mäusen und beim Menschen bestätigt werden, auch hier wären Doppelfärbungen mit der GS interessant, um eine mögliche Kolokalisation nachzuweisen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine

gesteigerte MAO-A-Expression in der CA-Gruppe weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene nachweisbar war, wäre dennoch eine Steigerung auf Ebene der Enzymaktivität der MAO-A mit resultierender oxidativer Zellschädigung in dieser Gruppe denkbar. Um dies herauszufinden, könnten Aktivitätsmessungen der Monoaminoxidasen mittels fluometrischer Assays durchgeführt werden (Suzuki et al., 1976).

Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass die Wirkweise von HH noch nicht vollständig verstanden und nicht auf eine MAO-A-Inhibition beschränkt ist, was die Interpretation der Befunde erschwert. So wirkt HH nicht nur antiinflammatorisch (Liu et al., 2017), antiproliferativ (Zhang et al., 2014) und proapoptotisch (Cao et al., 2011), es scheint auch zu DNA-Schäden führen zu können (Cao et al., 2013). Hier wäre interessant zu untersuchen, ob andere MAO-A-Inhibitoren, wie das im klinischen Alltag als Antidepressivum eingesetzt Moclobemid (Bonnet, 2003) ähnliche Effekte wie HH auf die GS haben, und wie sich diese auf das Körpergewicht und assoziierte Kachexie-Parameter wie Skelettmuskelabbau und Inflammation auswirken. Ob andere Substanzen, für welche eine Steigerung der hepatischen GS-Proteinexpression bei Wirbeltieren beschrieben wurde, wie Somatotropin (growth hormone) (Nolan et al., 1990) oder 17 $\beta$ -Estradiol (Miles et al., 2015) sich positiv bei Tumorkachexie auswirken, könnte ebenfalls Fragestellung für Folgeprojekten sein. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob aus der Verhinderung der kachexiebedingten Senkung der GS-Proteinexpression ein therapeutischer Benefit für Kachexieentwicklung, Lebensqualität und Überleben resultiert.

### 5. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Tumorkachexie stellt eine Multisystemerkrankung dar, die über 50 % der Tumorpatienten betrifft und mit einer Verschlechterung von Prognose und Lebensqualität einhergeht. Gekennzeichnet ist die Tumorkachexie durch einen Symptomkomplex aus Gewichtsabnahme, Muskelschwund und Inflammation. Da die genauen Mechanismen nicht vollständig geklärt sind, frühe Kachexiemarker fehlen und keine wirkungsvolle Therapie zur Verfügung steht, wird Tumorkachexie häufig nicht früh genug diagnostiziert und effektiv behandelt. Insbesondere der früh veränderte Leberstoffwechsel mit negativer Stickstoffbilanz ist wenig verstanden. In dieser Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass es zu einer Tumorkachexie-induzierten, möglicherweise inflammatorisch bedingten, Schädigung der perivenösen Glutaminsynthetase (GS)-exprimierenden Zelllagen der Leber kommt, was durch Einschränkung des perivenösen Ammoniak-Scavengings zu der negativen Stickstoffbilanz bei Tumorkachexie beitragen könnte. Auch das mitochondriale Enzym Monoaminoxidase-A (MAO-A) könnte durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Leberschädigung beitragen und somit ein potentielles therapeutisches Target bei Tumorkachexie darstellen.

**Methodik:** Es wurden unbehandelte Mäuse mit Pankreaskarzinom (CA n=11) des 3x transgenen LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre-Mausmodells des Pankreaskarzinoms (PDAC) zunächst mit Wildtyp-Kontrolltieren (WT n=13) verglichen. Zusätzlich wurde der Effekt einer MAO-A-Inhibition an 3x transgenen Mäusen mit Pankreaskarzinom (CA HH n=7) und Wildtyp-Kontrolltieren (WT HH n=11) untersucht, welchen ab dem dritten Lebensmonat über einen Zeitraum von zwei Monaten täglich 0,6 mg Harmine-Hydrochlorid (HH) intraperitoneal appliziert wurde. In diesen vier Gruppen wurde die Leber anhand von 6 µm-Kryoschnitten mittels Immunhistochemie bzgl. der Proteinexpression und zonale Verteilung von GS, MAO-A und Inflammationsmarkern (IL-1β, COX-2, CD68) sowie der Leberglykogengehalt (PAS-Reaktion) untersucht. Des Weiteren wurde mittels qRT-PCR an Leberhomogenat die relative Genexpression von GS, Faktoren des hepatischen Aminosäuretransportes (FXR, RhBG, SLC1A2, SLC1A4, SLC1A5),

Inflammations- (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-1, CD68, SOCS-3, MIF), Apoptose- (BAX, BCL-2, Caspase-3) und Proliferationsmarkern (PCNA) sowie MAO-A und MAO-B analysiert.

**Ergebnisse:** In der CA-Gruppe konnte im Vergleich zu WT als wichtiger Tumorkachexieeffekt eine signifikante Reduktion der streng perivenösen GS-Proteinexpression gezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich entgegengesetzt eine Steigerung der GS-mRNA in der CA-Gruppe, was einen posttranskriptionellen Effekt durch PDAC vermuten lässt. Die untersuchten Inflammationsmarker waren sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in der CA-Gruppe gegenüber WT signifikant erhöht. Entgegen der These einer Tumorkachexie-bedingten MAO-A-Hochregulation, war diese weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene nachweisbar, was jedoch keine Aussage über eine evtl. gesteigerte MAO-A-Enzymaktivität erlaubt. Durch MAO-A-Inhibition mit HH war die Reduktion der GS-Proteinexpression in der CA-Gruppe reversibel. Ebenso konnte die Proteinexpression der Inflammationsmarker IL-1 $\beta$  und CD68 in der CA-Gruppe durch HH-Behandlung gesenkt werden. Ein positiver Gewichtseffekt durch HH war jedoch nicht nachweisbar.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Arbeit bestätigt bisherige und liefert neue Befunde zur Bedeutung früher spezifischer Veränderungen des Leberstoffwechsels bei Tumorkachexie. Die signifikant verringerte GS-Proteinexpression spricht für eine Schädigung der perivenösen Zone. Durch Verringerung der Glutaminsynthese und des Ammoniak-Scavengings sind Kachexie-typische Stoffwechseleränderungen wie erniedrigte Glutamin- und erhöhte Glutamatspiegel sowie Hyperammonämie möglicherweise zu erklären. Die gesteigerte Expression von Inflammationsmarkern bei CA-Tieren stützt die These einer inflammationsbedingten Leberschädigung als Kachexie-begünstigende Veränderung. Bezüglich des antikachektischen Therapiepotentials des MAO-A-Hemmers HH ergibt sich ein zwiespältiges Bild. Zwar scheint HH der GS-Reduktion und damit der Schädigung der perivenösen Zone sowie teilweise der hepatischen Inflammationsreaktion effektiv entgegen zu wirken, jedoch war dies nicht mit einem positiven Einfluss auf das Körpergewicht verbunden. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.



## 6. Summary

**Background:** Cancer cachexia represents a multisystem disease affecting more than 50 % of cancer patients and is associated with a worsened prognosis and quality of life. Cancer cachexia is characterized by a symptom complex of weight loss, muscle wasting and inflammation. As the exact mechanisms are not completely understood, early cachexia markers are missing, and no effective therapy is available, cancer cachexia is often diagnosed too late and not treated effectively. In particular, the altered liver metabolism associated with negative nitrogen balance is poorly understood. This work explores the hypothesis that there is tumor cachexia-induced, possibly inflammatory, damage to the perivenous glutamine synthetase (GS)-expressing cell layers of the liver. This may contribute to the negative nitrogen balance in cancer cachexia by limiting perivenous ammonia scavenging. Also, the mitochondrial enzyme monoamine oxidase A (MAO-A) might contribute to liver injury through formation of reactive oxygen species, thus representing a potential therapeutic target in cancer cachexia.

**Methods:** Untreated mice with pancreatic cancer (CA n=11) of the 3x transgenic LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+; Pdx-1-Cre murine model of pancreatic cancer (PDAC) were first compared with wild-type control animals (WT n=13). In addition, the effect of MAO-A inhibition was studied in 3x transgenic mice with pancreatic cancer (CA HH n=7) and wild-type control animals (WT HH n=11). To this end, these mice were intraperitoneally administered 0.6 mg harmine hydrochloride (HH) daily for a period of two months starting from the third month of life. In these four groups, the liver was examined by immunohistochemistry using 6 µm cryosections for protein expression and zonal distribution of GS, MAO-A and inflammation markers (IL-1 $\beta$ , COX-2, CD68) as well as liver glycogen content (PAS reaction). Furthermore, relative gene expression of GS, factors of hepatic amino acid transport (FXR, RhBG, SLC1A2, SLC1A4, SLCA1A5), inflammation (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-1, CD68, SOCS-3, MIF), apoptosis (BAX, BCL-2, Caspase-3) and proliferation (PCNA) markers, as well as MAO-A and MAO-B were analyzed by qRT-PCR on liver homogenate.

**Results:** In the CA group, a significant reduction in strictly perivenous GS protein expression was shown as an important cancer cachexia effect compared to WT. In contrast to that, an increase in GS mRNA was shown in the CA group, suggesting a posttranscriptional effect by PDAC. The examined inflammation markers were significantly increased at both the protein and mRNA levels in the CA group compared to WT. Contrary to the hypothesis of cancer cachexia-induced MAO-A upregulation, this was not detectable at either the protein or mRNA level. This, however, does not allow conclusions about a possible increased MAO-A enzyme activity. MAO-A inhibition with HH reversed the reduction of GS protein expression in the CA group. Similarly, protein expression of the inflammatory markers IL-1 $\beta$  and CD68 in the CA group was decreased by HH treatment. However, a positive effect on body weight by HH treatment was not detectable.

**Conclusion:** The present work confirms previous findings and provides new evidence for the importance of early changes in liver metabolism in cancer cachexia. Significantly decreased GS protein expression suggests damage to the perivenous zone. Reduction of glutamine synthesis and ammonia scavenging may explain cachexia-typical metabolic changes such as decreased glutamine and increased glutamate levels and hyperammonemia. The increased expression of inflammatory markers in CA animals supports the hypothesis of inflammation-related liver injury as a cachexia-promoting alteration. Regarding the anticachectic therapeutic potential of the MAO-A inhibitor HH, a conflicting picture emerges. Although HH seems to effectively counteract GS reduction, perivenous zone damage, and hepatic inflammatory response, this was not associated with a positive effect on body weight. Further research on this subject is necessary.

## 7. Literaturverzeichnis

**Aarnio M., Sankila R., Pukkala E., Salovaara R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A., Peltomäki P., Mecklin J.P., Järvinen H.J. (1999):** Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer* 81: S. 214-218

**Alsamarrai A., Das S.L., Windsor J.A., Petrov M.S. (2014):** Factors that affect risk for pancreatic disease in the general population: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (10/2014): S. 1635-1644

**Andersen C.L., Ledet-Jensen J., Ørntoft T. (2004):** Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* 64: S. 5245-5250

**Anderson K.E., Sinha R., Kulldorff M., Gross M., Lang N.P., Barber C., Harnack L., DiMugno E., Bliss R., Kadlubar F.F. (2002):** Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. *Mutation Research* 506-507: S. 225-231

**Andreyev H.J.N., Norman A.R., Oates J., Cunningham D. (1998):** Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies?. *European Journal of Cancer* 34: S. 503–509

**Argilés J.; Busquets S.; López-Soriano F. (2001):** Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. *Life Sciences* 69: S. 1345–1361

**Argilés J.M., López-Soriano F.J., Toledo M., Betancourt A., Serpe R., Busquets S. (2011):** The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2: S. 87-93

**Argilés J.M., Busquets S., Stemmler B., López-Soriano F.L. (2014):** Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nature reviews cancer* 14: S. 754-762

**Babu A.N., Damle S.S., Moore E.E., Ao L., Song Y., Johnson J.L., Weyant M., Banerjee A., Meng X., Fullerton D.A. (2007):** Hemoglobin-based oxygen carrier induces hepatic heme oxygenase 1 expression in Kupffer cells. *Surgery* 142: S. 289-294

**Bachmann J., Heiligensetzer M., Krakowski-Roosen H., Büchler M.W., Friess H., Martignoni M.E. (2008):** Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 12: S. 1193–1201

**Baicus C., Caraiola S., Rimbasi M., Patrascu R., Baicus A. (2012):** Serum cytokines and cancer in involuntary weight loss. *Journal of Investigative Medicine* 60: S. 827-829

**Barber M.D., Fearon K.C., Ross J.A. (1999a):** Relationship of serum levels of interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and tumour necrosis factor receptors to the acute-phase protein response in advanced pancreatic cancer. *Clinical Science* 96: S. 83-87

**Barber M.D., Ross J.A., Voss A.C., Tisdale M.J., Fearon K.C. (1999b):** The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 81: S. 80-86

**Batabyal P., Vander Hoorn S., Christophi C., Nikfarjam M. (2014):** Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. *Annals of Surgical Oncology* (7/2014): S. 2453-2462

**Batista M.L.Jr., Neves R.X., Peres S.B., Yamashita A.S., Shida C.S., Farmer S.R., Seelaender M. (2012):** Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia. *The Journal of Endocrinology* 215: S. 363-373

**Batista M.L.Jr., Henriques F.S., Neves R.X., Olivan M.R., Matos-Neto E.M., Alcântara P.S., Maximiano L.F., Otoch J.P., Alves M.J., Seelaender M. (2016):** Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 7: S. 37-47

**Bayliss T.J., Smith J.T., Schuster M., Dragnev K.H., Rigas J.R. (2011):** A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opinion in Biological Therapy* 11: S. 1663-1668

**Belizário J.E., Lorite M.J., Tisdale M.J. (2001):** Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *British Journal of Cancer* 84: S. 1135-1140

**Benigni F., Atsumi T., Calandra T., Metz C., Echtenacher B., Peng T., Bucala R. (2000):** The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *Journal of Clinical Investigation* 106: S. 1291-1300

**Berger U.V., Hediger M.A. (2006):** Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anatomy and Embryology* 211: S. 595-606

**Blanca M.J., Alarcón R., Arnau J., Bono R., Bendayan R. (2017):** Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*. 29: S. 552-557

**Blum D., Stene G.B., Solheim T.S., Fayers P., Hjermland M.J., Baracos V.E., Fearon K., Strasser F., Kaasa S.; Euro-Impact. (2014):** Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model--a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA). *Annals of Oncology* 25: S. 1635-1642

**Blumberg D., Hochwald S., Burt M., Donner D., Brennan M.F. (1995):** Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine in vivo. *Journal of Surgical Oncology* 59: S. 220-224

**Bode B.P., Fuchs B.C., Hurley B.P., Conroy J.L., Suetterlin J.E., Tanabe K.K., Rhoads D.B., Abcouwer S.F., Souba W.W. (2002):** Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 283: S. 1062-1073

**Boehm E.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. (2016):** The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes* 39: S. 231-254

**Böhm M., Hallek M. und Schmiegel W. (Hrsgg.) (2009):** Innere Medizin 6. Auflage. München: Elsevier. Urban & Fischer: S. 1034-1038

**Bonetto A., Penna F., Minero V.G., Reffo P., Costamagna D., Bonelli G., Baccino F.M., Costelli P. (2011):** Glutamine prevents myostatin hyperexpression and protein hypercatabolism induced in C2C12 myotubes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Amino Acids* 40: S. 585-594

**Bonnet U. (2003):** Moclobemide: evolution, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties. *CNS Drug Reviews* 8: S. 283-308

**Bozzetti F., Gavazzi C., Mariani L., Crippa F. (1999):** Artificial nutrition in cancer patients: which route, what composition? *World Journal of Surgery* 23: S. 577-583

**Braeuning A., Ittrich C., Köhle C., Hailfinger S., Bonin M., Buchmann A., Schwarz M. (2006):** Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS Journal* 273: S. 5051-5061

**Brunner H.G., Nelen M.R., van Zandvoort P., Abeling N.G., van Gennip A.H., Wolters E.C., Kuiper M.A., Ropers H.H., van Oost B.A. (1993):** X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *American Journal of Human Genetics* 52: S. 1032-1039

**Bruns B. (2019):** Inflammatorische und metabolische Leberveränderungen in der perivenösen und der periportalen Leberzone bei kachektischen Patienten mit Pankreaskarzinom. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

**Bungard C.I., McGivan J.D. (2004):** Glutamin availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promotor. *Biochemical Journal* 382: S. 27-32

**Burris H.A. 3rd, Moore M.J., Andersen J., Green M.R., Rothenberg M.L., Modiano M.R., Cripps M.C., Portenoy R.K., Storniolo A.M., Tarassoff P., Nelson R., Dorr F.A., Stephens C.D., Von Hoff D.D. (1997):** Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 15: S. 2403-2413

**Camargo R.G., Riccardi D.M., Ribeiro H.Q., Carnevali L.C. Jr., de Matos-Neto E.M., Enju L., Neves R.X., Lima J.D., Figuerêdo R.G., de Alcântara P.S., Maximiano L., Otoch J., Batista M. Jr., Püschel G., Seelaender M. (2015):** NF- $\kappa$ Bp65 and Expression of Its Pro-Inflammatory Target Genes Are Upregulated in the Subcutaneous Adipose Tissue of Cachectic Cancer Patients. *Nutrients* 7: S. 4465-4479

**Cannon T.Y., Guttridge D., Dahlman J., George J.R., Lai V., Shores C., Buzková P., Couch M.E. (2007):** The effect of altered Toll-like receptor 4 signaling on cancer cachexia. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery* 133: S. 1263-1269

**Cao M.R., Li Q., Liu Z.L., Liu H.H., Wang W., Liao X.L., Pan Y.L., Jiang J.W. (2011):** Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* 10: S. 599-604

**Cao R., Fan W., Guo L., Ma Q., Zhang G., Li J., Chen X., Ren Z., Qiu L. (2013):** Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 60: S. 135-143

**Castell J.V., Gómez-Lechón M.J., David M., Andus T., Geiger T., Trullenque R., Fabra R., Heinrich P.C. (1989):** Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters* 242: S. 237-339

**Castell J.V., Gómez-Lechón M.J., David M., Fabra R., Trullenque R., Heinrich P.C. (1990):** Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 12: S. 1179-1186

**Catalano M.G., Fortunati N., Arena K., Costelli P., Aragno M., Danni O., Boccuzzi G. (2003):** Selective up-regulation of tumor necrosis factor receptor I in tumor-bearing rats with cancer-related cachexia. *International Journal of Oncology* 23: S. 429-436

**Cathcart M.K., Bhattacharjee A. (2014):** Monoamine oxidase A (MAO-A): a signature marker of alternatively activated monocytes/macrophages. *Inflammation and Cell Signaling*. DOI: 10.14800/ics.161

**Celik A., Kano Y., Tsujinaka S., Okada S., Takao K., Takagi M., Chohnan S., Soda K., Kawakami M., Konishi F. (2009):** Decrease in malonyl-CoA and its background metabolic alterations in murine model of cancer cachexia. *Oncology Reports* 21: S. 1105-1111

**Chance W.T., Zhang F.H., Foley-Nelson T., Fischer J.E. (1991):** Hyperammonemia and anorexia in Morris hepatoma-bearing rats. *Physiology and Behavior* 50: S. 397-401

**Chen K., Holschneider D.P., Wu W., Rebrin I., Shih J.C. (2004):** A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *Journal of Biological Chemistry* 279: S. 39645-39652

**Chen J.L., Walton K.L., Qian H., Colgan T.D., Hagg A., Watt M.J., Harrison C.A., Gregorevic P. (2016):** Effects of IL6 and Activin A in the Development of Cancer-Associated Cachexia. *Cancer Research* 76: S. 5372-5382



**Chevalier S., Farsijani S. (2014):** Cancer cachexia and diabetes: similarities in metabolic alterations and possible treatment. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 39: S. 643-653

**Chiorean E.G. und Coveler A.L. (2015):** Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. *Drug Design, Development and Therapy* 9: S. 3529-3545

**Conroy T., Desseigne F., Ychou M., Bouché O., Guimbaud R., Bécouarn Y., Adenis A., Raoul J.L., Gourgou-Bourgade S., de la Fouchardière C., Bennouna J., Bachet J.B., Khemissa-Akouz F., Péré-Vergé D., Delbaldo C., Assenat E., Chauffert B., Michel P., Montoto-Grillot C., Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup (2011):** FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine* 364: S. 1817-1825

**Couch F.J., Johnson M.R., Rabe K., Boardman L., McWilliams R., de Andrade M., Petersen G. (2005):** Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer. *Cancer Research* 65: S. 383-386

**Culig Z. (2013):** Suppressors of cytokine signalling-3 and -1 in human carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 5: S. 277-283

**Curthoys N.P., Watford M. (1995):** Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 15: S. 133-159

**Dasarathy S., Merli M. (2016):** Sarcopenia from mechanism to diagnosis and treatment in liver disease. *Journal of Hepatology* 65: S. 1232-1244

**Deans C. und Wigmore S.J. (2005):** Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 8: S. 265–269

**Delbridge A.R., Strasser A. (2015):** The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* 22: S. 1071-1080

- Desjardins P., Rao K.V., Michalak A., Rose C., Butterworth R.F. (1999):** Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metabolic Brain Disease* 14: S. 273-280
- Dessein A.F., Stechly L., Jonckheere N., Dumont P., Monté D., Leteurtre E., Truant S., Pruvot F.R., Figeac M., Hebbar M., Lecellier C.H., Lesuffleur T., Dessein R., Grard G., Dejonghe M.J., de Launoit Y., Furuichi Y., Prévost G., Porchet N., Gespach C., Huet G. (2010):** Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Research* 70: S. 4644-4654
- Dewys W.D., Begg C., Lavin P.T., Band P.R., Bennett J.M., Bertino J.R., Cohen M.H., Douglass H.O., Engstrom P.F., Ezzdinli, E.-Z., Horton J., Johnson G.J., Moertel C.G., Oken M.M, Perlia C., Rosenbaum C., Silverstein M.N., Skeel R.T., Sponzo R.T., Tormey G.C., (1980):** Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Medicine* 69: S. 491–497
- Dinarello C.A. (2005):** Blocking IL-1 in systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 201: S. 1355-1359
- Dumas J.F., Goupille C., Julienne C.M., Pinault M., Chevalier S., Bougnoux P., Servais S., Couet C. (2011):** Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *Journal of Hepatology* 54: S. 320–327
- El Gendy M.A., El-Kadi A.O. (2009):** *Peganum harmala* L. differentially modulates cytochrome P450 gene expression in human hepatoma HepG2 cells. *Drug Metabolism Letters* 3: S. 212-216
- Evans W.J., Morley J.E., Argilés J., Bales C., Baracos V., Guttridge D., Jatoi A., Kalantar-Zadeh K., Lochs H., Mantovani G., Marks D., Mitch W.E., Muscaritoli M., Najand A., Ponikowski P., Rossi Fanelli F., Schambelan M.,**

**Schols A., Schuster M., Thomas D., Wolfe R., Anker S. (2008):** Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition* 27: S. 793-799

**Farouk L., Laroubi A., Aboufatima R., Benharref A , Chait A. (2008):** Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology* 115: S. 449-454

**Fay M.P., Proschan M.A. (2010):** Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys* 4: S. 1-39

**Fearon K., Strasser F., Anker S.D., Bosaeus I., Bruera E., Fainsinger R.L., Jatoi A., Loprinzi C., MacDonald N., Mantovani G., Davis M., Muscaritoli M., Ottery F., Radbruch L., Ravasco P., Walsh D., Wilcock A., Kaasa S., Baracos V.E. (2011):** Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology* 12: S. 489-495

**Fearon K., Glass D., Guttridge D. (2012):** Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metabolism* 16: S. 153–166

**Feng B., Banner C., Max S.R. (1990):** Effect of diabetes on glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. *American Journal of Physiology* 258: S. 762-766

**Fisher B.D., Baracos V.E., Reid D.C. (1991):** Effect of systemic inhibition of prostaglandin synthesis on muscle protein balance after trauma in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69: S. 831-836

**Fortunato J.J., Réus G.Z., Kirsch T.R., Stringari R.B., Fries G.R., Kapczinski F., Hallak J.E., Zuardi A.W., Crippa J.A., Quevedo J. (2010):** Effects of beta-carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: further evidence of antidepressant properties. *Brain Research Bulletin* 81: S. 491-496

**Fuchs B.C., Perez J.C., Suetterlin J.E., Chaudhry S.B., Bode B.P. (2004):** Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits

apoptosis in human hepatoma cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286: S. 467-478

**Fukuda T., Sumi T., Nobeyama H., Yoshida H., Matsumoto Y., Yasui T., Honda K., Ishiko O. (2009):** Multiple organ failure of tumor-bearing rabbits in cancer cachexia is caused by apoptosis of normal organ cells. *International Journal of Oncology* 34: S. 61-67

**Gallmeier E., Gress T.M. (2018):** Duktales Adenokarzinom des Pankreas. *Der Internist* 59: S. 805-822

**GBD 2017 Pancreatic Cancer Collaborators (2019):** The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 4: S. 934-947

**Gebhardt R., Mecke D. (1983):** Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO Journal* 2: S. 567-570

**Giardiello F.M., Offerhaus G.J., Lee D.H., Krush A.J., Tersmette A.C., Booker S.V., Kelley N.C., Hamilton S.R. (1993):** Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut* 34: S. 1394-1396

**Giardiello F.M., Brensinger J.D., Tersmette A.C., Goodman S.N., Petersen G.M., Booker S.V., Cruz-Correa M., Offerhaus J.A. (2000):** Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119: S. 1447-1453

**Gordon J.N., Trebble T.M., Ellis R.D., Duncan H.D., Johns T., Goggin P.M. (2005):** Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomized placebo controlled trial. *Gut*. 54: S. 540-545

**Graham R.C. Jr., Karnovsky M.J. (1965):** The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* 13: S. 604-605

**Gridelli C., Gallo C., Ceribelli A., Gebbia V., Gamucci T., Ciardiello F., Carozza F., Favaretto A., Daniele B., Galetta D., Barbera S., Rosetti F., Rossi A., Maione P., Cognetti F., Testa A., Di Maio M., Morabito A., Perrone F.; GECO investigators (2007):** Factorial phase III randomized trial of rofecoxib and prolonged constant infusion of gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the GEmcitabine-COxib in NSCLC (GECO) study. *Lancet Oncology* 8: S. 500-512

**Gross A., Hack V., Stahl-Hennig C., Dröge W. (1996):** Elevated hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase activity and abnormal sulfate levels in liver and muscle tissue may explain abnormal cysteine and glutathione levels in SIV-infected rhesus macaques. *AIDS Research and Human Retroviruses* 12: S. 1639-1641

**Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999):** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 13: S. 1899-1911

**Grossberg A.J., Scarlett J.M., Marks D.L. (2010):** Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiology and Behavior* 100: S. 478–489

**Guo F., Xu Z., Zhang Y., Jiang P., Huang G., Chen S., Lyu X., Zheng P., Zhao X., Zeng Y., Wang S., He F. (2015):** FXR induces SOCS3 and suppresses hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6: S. 34606-34616

**Hack V., Gross A., Kinscherf R., Bockstette M., Fiers W., Berke G., Dröge W. (1996):** Abnormal glutathione and sulfate levels after interleukin 6 treatment and in tumor-induced cachexia. *FASEB Journal* 10: S. 1219-1226

**v. Haehling S. und Anker S.D. (2010):** Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 1: S. 1-5

**v. Haehling S., Anker M.S., Anker S.D. (2016):** Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 7: S. 507–509

**Häussinger D., Sies H., Gerok W. (1985):** Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. *Journal of Hepatology* 1: S. 3-14

**Häussinger D. (1990):** Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *The Biochemical Journal* 267: S. 281-290

**Hagiwara A., Tanaka H., Kurata Y., Kato T., Tsuda H., Ito N. (1990):** Lack of hepatotoxicity or promotion of enzyme-altered liver foci development in rats treated with harman or norharman. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 29: S. 211-218

**Hahn S.A., Greenhalf B., Ellis I., Sina-Frey M., Rieder H., Korte B., Gerdes B., Kress R., Ziegler A., Raeburn J.A., Campra D., Grützmann R., Rehder H., Rothmund M., Schmiegel W., Neoptolemos J.P., Bartsch D.K. (2003):** BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 95: S. 214-221

**Hakvoort T.B., He Y., Kulik W., Vermeulen J.L., Duijst S., Ruijter J.M., Runge J.H., Deutz N.E., Koehler S.E., Lamers W.H. (2017):** Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification. *Hepatology* 65: S. 281-293

**Hall P.A., Coates P.J., Goodlad R.A., Hart I.R., Lane D.P. (1994):** Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors in vivo. *British Journal of Cancer* 70: S. 244-247

**Han J., Meng Q., Shen L., Wu G. (2018):** Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids in Health and Disease* 17: 14

**Harrison M.F. (1952):** Effect of starvation on the composition of the liver cell. *The Biochemical Journal* 55: S. 204-211

**Hashimoto Y., Sadamoto Y., Konno A., Kon Y., Iwanaga T. (2004):** Distribution of neutral amino acid transporter ASCT 1 in the non-neuronal tissues of mice. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 52: S. 113-124

**Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996):** Genome Methods: Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* (10/1996): S. 986-994

**Hehlgans T., Pfeffer K. (2005):** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: S. 1-20

**Hezel A.F., Kimmelman A.C., Stanger B.Z., Bardeesy N., Depinho R.A. (2006):** Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 20: S. 1218-1249

**Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993):** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (Nature publishing company)* 11: S. 1026-1030

**Hill P.J. und Stewart G.S.A.B. (1992):** The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Micro-biology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 10: S. 343-377

**Hingorani S.R., Petricoin E.F., Maitra A., Rajapakse V., King C., Jacobetz M.A., Ross S., Conrads T.P., Veenstra T.D., Hitt B.A., Kawaguchi Y., Johann D., Liotta L.A., Crawford H.C., Putt M.E., Jacks T., Wright C.V., Hruban R.H., Lowy A.M., Tuveson D.A. (2003):** Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: S. 437-450

**Hingorani S.R., Wang L., Multani A.S., Combs C., Deramaudt T.B., Hruban R.H., Rustgi A.K., Chang S., Tuveson D.A. (2005):** Trp53<sup>R172H</sup> and Kras<sup>G12D</sup> cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: S. 469-483

**Hishinuma S., Ogata Y., Tomikawa M., Ozawa I., Hirabayashi K., Igarashi S. (2006):** Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 10: S. 511-518

**Hoesel B., Schmid J.A. (2013):** The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 12: S. 86.

**Holm E., Hildebrandt W., Kinscherf R., Dröge W. (2007):** Low postabsorptive net protein degradation in male cancer patients: lack of sensitivity to regulatory amino acids? *Oncology Reports* 17: S. 695-700

**Hopkinson J.B. (2014):** Psychosocial impact of cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 5: S. 89-94

**Hotchkiss R.D. (1948):** A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 16: S. 131-141

**Hruban R.H., van Mansfeld A.D., Offerhaus G.J., van Weering D.H., Allison D.C., Goodman S.N., Kensler T.W., Bose K.K., Cameron J.L., Bos J.L. (1993):** K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas: a study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *American Journal of Pathology* 143: S. 545-554

**Hu Q.X., Ottestad-Hansen S., Holmseth S., Hassel B., Danbolt N.C., Zhou Y. (2018):** Expression of Glutamate Transporters in Mouse Liver, Kidney, and Intestine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 66: S. 189-202

**Huang Y.H., Jiang M., Fu B.Y. (2008):** Immunocytochemical localization of monoamine oxidase type B in rat liver. *European Journal of Histochemistry* 52: S. 11-18

**Hussey H.J., Tisdale M.J. (2000):** Effect of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on tumour growth and cachexia in a murine model. *International Journal of Cancer* 87: S. 95-100



**Huxley R., Ansary-Moghaddam A., Berrington de González A., Barzi F., Woodward M. (2005):** Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer* 92: S. 2076-2083

**Iacobuzio-Donahue C.A., Song J., Parmiagiani G., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E. (2004):** Missense mutations of MADH4: characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors. *Clinical Cancer Research* 10: S. 1597-1604

**Jatoi A., Ritter H.L., Dueck A., Nguyen P.L., Nikceovich D.A., Luyun R.F., Mattar B.I., Loprinzi C.L. (2010):** A placebo-controlled, double-blind trial of infliximab for cancer-associated weight loss in elderly and/or poor performance non-small cell lung cancer patients (N01C9). *Lung Cancer* 68: S. 234-239

**Ji B.T., Silverman D.T., Stewart P.A., Blair A., Swanson G.M., Baris D., Greenberg R.S., Hayes R.B., Brown L.M., Lillemoe K.D., Schoenberg J.B., Pottern L.M., Schwartz A.G., Hoover R.N. (2001):** Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine* 39: S. 92-99

**Jungermann K., Kietzmann T. (2000):** Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 31: S. 255-260

**Kaira K., Sunose Y., Arakawa K., Sunaga N., Shimizu K., Tominaga H., Oriuchi N., Nagamori S., Kanai Y., Oyama T., Takeyoshi I. (2015):** Clinicopathological significance of ASC amino acid transporter-2 expression in pancreatic ductal carcinoma. *Histopathology* 66: S. 234-243

**Kalgutkar A.S., Dalvie D.K., Castagnoli N. Jr., Taylor T.J. (2001):** Interactions of nitrogen-containing xenobiotics with monoamine oxidase (MAO) isoenzymes A und B: SAR studies on MAO substrates and inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* 14: S. 1139-1162

**Kanai Y., Hediger M.A. (2004):** The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Archiv* 447: S. 469-479

**Kasai N., Sasakawa A., Hosomi K., Poh T.W., Chua B.L., Yong W.P., So J., Chan S.L., Soong R., Kono K., Ishii T., Yamano K. (2017):** Anti-tumor efficacy evaluation of a novel monoclonal antibody targeting neutral amino acid transporter ASCT2 using patient-derived xenograft mouse models of gastric cancer. *American Journal of Translational Research* 9: S. 3399-3410

**Kawanishi K., Hashimoto Y., Fujiwara M., Kataoka Y., Ueki S. (1981):** Pharmacological characteristics of abnormal behavior induced by harmine with special reference to tremor in mice. *Journal of Pharmacobio-dynamics* 4: S. 520-527

**Keck J. (2019):** Kachexiebedingte Veränderungen der skelettmuskulären Morphologie und Genexpression im transgenen Mausmodell des Pankreaskarzinoms. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

**Kern K.A., Norton J.A. (1988):** Cancer cachexia. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 12: S. 286-298

**Kim H., Sablin S.O., Ramsay R.R. (1997):** Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337: S. 137-142

**Kim I., Morimura K., Shah Y., Yang Q., Ward J.M., Gonzalez F.J. (2007):** Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28: S. 940-946

**Kinscherf R., Hack V., Fischbach T., Friedmann B., Weiss C., Edler L., Bärtsch P., Dröge W. (1996):** Low plasma glutamine in combination with high glutamate levels indicate risk for loss of body cell mass in healthy individuals: the effect of N-acetyl-cysteine. *Journal of Molecular Medicine* 74: S. 393-400

**Klein A.P., Brune K.A., Petersen G.M., Goggins M., Tersmette A.C., Offerhaus G.J., Griffin C., Cameron J.L., Yeo C.J., Kern S., Hruban R.H. (2004):** Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Research* 64: S. 2634-2638

**Koolmann J., Röhm K.-H. (2009):** Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag: S. 128-131 und S. 314-315

**Koorstra J.B., Feldmann G., Habbe N., Maitra A. (2008):** Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). Langenbeck's Archives of Surgery 393: S. 561-570

**Koutsounas I., Giaginis C., Theocharis S. (2012):** Farnesoid X Receptor (FXR) from normal to malignant state. Histology and Histopathology 27: S. 835-853

**Kraft M., Kraft K., Gärtner S., Mayerle J., Simon P., Weber E., Schütte K., Stieler J., Koula-Jenik H., Holzhauser P., Gröber U., Engel G., Müller C., Feng Y.S., Aghdassi A., Nitsche C., Malfertheiner P., Patrzyk M., Kohlmann T., Lerch M.M. (2012):** L-Carnitine-supplementation in advanced pancreatic cancer (CARPAN) – a randomized multicentre trial. Nutrition Journal 11: 52

**Kudryavtseva M.V., Sakuta G.A., Stein G.I., Kudryavtsev B.N. (1992):** The metabolic zonation of glycogen synthesis in rat liver after fasting and refeeding. Tissue & Cell 24:S. 31-35

**Kudryavtseva M.V., Sakuta G.A., Skorina A.D., Stein G.I., Emelyanov A.V., Kudryavtsev B.N. (1996):** Quantitative analysis of glycogen content in hepatocytes of portal and central lobule zones of normal human liver and in patients with chronic hepatitis of different etiology. Tissue & Cell 28: S. 279-285

**Labow B.I., Souba W.W., Abcouwer S.F. (2001):** Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – glutaminase and glutamine synthetase. Journal of Nutrition 131: S. 2467S-2474

**Lang G. (2006):** Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Wien: Springer Verlag: S. 258-259

**Lantz B. (2013):** The impact of sample non-normality on ANOVA and alternative methods. British Journal of mathematical and statistical psychology 66: 224-244

**Laviano A., Koverech A., Seelaender M. (2017):** Assessing pathophysiology of cancer anorexia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 20: S. 340-345

**Lawson D.H., Richmond A., Nixon D.W., Rudman D. (1982):** Metabolic approaches to cancer cachexia. *Annual Review of Nutrition* 2: S. 277-301

**Leij-Halfwerk S., van den Berg J.W., Sijens P.E., Wilson J.H., Oudkerk M, Dagnelie P.C. (2000):** Altered hepatic gluconeogenesis during L-alanine infusion in weight-losing lung cancer patients as observed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy and turnover measurements. *Cancer Research* 60: S. 618-623

**Lenzen S., Nahrstedt H., Panten U. (1983):** Monoamine oxidase in pancreatic islets, exocrine pancreas, and liver from rats. Characterization with clorgyline, deprenyl, pargyline, tranlycypromine, and amezinium. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 324: S. 190-195

**Li Y., Sattler R., Yang E.J., Nunes A., Ayukawa Y., Akhtar S., Ji G., Zhang P.W., Rothstein J.D. (2011):** Harmine, a natural beta-carboline alkaloid, upregulates astroglial glutamate transporter expression. *Neuropharmacology* 60: S. 1168-1175

**Li C., Wang Y., Wang C., Yi X., Li M., He X. (2017):** Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells. *Phytomedicine* 28: S. 10-18

**Lie-Venema, H. (1997):** Spatio-Temporal Regulation of the Expression of the Glutamine Synthetase Gene. *Doktorthesis, Universität von Amsterdam, Niederlande.*

**Lie-Venema H., Hakvoort T.B., van Hemert F.J., Moorman A.F., Lamers W.H. (1998):** Regulation of the spatiotemporal pattern of expression of the glutamine synthetase gene. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 61: S. 243-308

**Lieffers J.R., Mourtzakis M., Hall K.D., McCargar L.J., Prado C.M., Baracos V.E. (2009):** A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *American Journal of Clinical Nutrition* 89: S. 1173-1179

**Lilley M., Gilchrist D. (2004):** The hereditary spectrum of pancreatic cancer: the Edmonton experience. *Canadian Journal of Gastroenterology* 18: S. 17-21

**Lippert H. (2003):** Lehrbuch Anatomie. 6. Auflage. München: Elsevier. Urban & Fischer: S. 320-333 und S. 344-350

**Liu Z., Peng J., Mo R., Hui C., Huang C.H. (2001):** Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 276: S. 1424-1433

**Liu X., Li M., Tan S., Wang C., Fan S., Huang C. (2017):** Harmine is an inflammatory inhibitor through the suppression of NF- $\kappa$ B signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 489: S. 332-338

**Liu Y., Zhao T., Li Z., Wang L., Yuan S., Sun L. (2018):** The role of ASCT2 in cancer: A review. *European Journal of Pharmacology* 837: S. 81-87

**Lowenfels A.B., Maisonneuve P., DiMagno E.P., Elitsur Y., Gates L.K. Jr., Perrault J., Whitcomb D.C. (1997):** Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (6): S. 442-446

**Lowenfels A.B. und Maisonneuve P. (2004):** Epidemiology and Prevention of Pancreatic. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 34: S. 238–244

**Lüllmann-Rauch R. (2012):** Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 4. Auflage. Stuttgart:Georg Thieme Verlag: S. 416-419

**Lundholm K., Edström S., Ekman L., Karlberg I., Bylund A., Scherstén T. (1978):** A comparative study of the influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man: evaluation of an experimental model. *Cancer* 42: S. 453–461

**Lundholm K., Ekman L., Edström S., Karlberg I., Jagenburg R., Scherstén T. (1979):** Protein Synthesis in Liver Tissue under the Influence of a Methylcholanthrene-induced Sarcoma in Mice. *Cancer Research* 39: S. 4657–4661

**Lundholm K., Ekman L., Karlberg I., Edström S., Scherstén T. (1980):** Comparison of Hepatic Cathepsin D Activity in Response to Tumor Growth and to Caloric Restriction in Mice. *Cancer Research* 40: S. 1680-1685

**Lundholm K., Gelin J., Hyltander A., Lönnroth C., Sandström R., Svaninger G., Körner U., Gülich M., Kärrefors I., Norli B. (1994):** Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Research* 54: 5602-5606

**Lundholm K., Daneryd P., Körner U., Hyltander A., Bosaeus I. (2004):** Evidence that long-term COX-treatment improves energy homeostasis and body composition in cancer patients with progressive cachexia. *International Journal of Oncology* 24: S. 505-512

**Maggiorani D., Manzella N., Edmondson D.E., Mattevi A., Parini A., Binda C., Mialet-Perez J. (2017):** Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2017/3017947. Epub 2017 May 4

**Manoli I., Le H., Alesci S., McFann K.K., Su Y.A., Kino T., Chrousos G.P., Blackman M.R. (2005):** Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB Journal* 19. S. 1359-1361

**Mantovani G., Madeddu C. (2008):** Cyclooxygenase-2 inhibitors and antioxidants in the treatment of cachexia. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 2: S. 275-281

**Mantovani G., Macciò A., Madeddu C., Serpe R., Antoni G., Massa E., Dessì M., Panzone F. (2010):** Phase II nonrandomized study of the efficacy

and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. *Journal of Molecular Medicine* 88: S. 85-92

**Marin V., Poulsen K., Odena G., McMullen M.R., Altamirano J., Sancho-Bru P., Tiribelli C., Caballeria J., Rosso N., Bataller R., Nagy L.E. (2017):** Hepatocyte-derived macrophage migration inhibitory factor mediates alcohol-induced liver injury in mice and patients. *Journal of Hepatology* 67: S. 1018-1025

**Martignoni M.E., Kunze P., Hildebrandt W., Künzli B., Berberat P., Giese T., Klöters O., Hammer J., Büchler M.W., Giese N.A., Friess H. (2005):** Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia. *Clinical Cancer Research* 11: S. 5802–5808

**Martignoni M.E., Dimitriu C., Bachmann J., Krakowski-Rosen H., Ketterer K., Kinscherf R., Friess H. (2009):** Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia. *Oncology Reports*. 21: S. 363-369

**Matsumura T., Kashiwagi T., Meren H., Thurman R.G. (1984):** Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. *European Journal of Biochemistry* 144: S. 409-415

**McIlwain D.R., Berger T., Mak T. W. (2013):** Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, doi:10.1101/cshperspect.a008656 (2013)

**Medina M.A., Sánchez-Jiménez F., Márquez J., Rodríguez Quesada A., Núñez de Castro I. (1992):** Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Molecular and Cellular Biochemistry* 113: S. 1-15

**Meeker K.D., Meabon J.S., Cook D.G. (2015):** Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease* 45: S. 509-520

**Melstrom L.G., Melstrom K.A. Jr., Ding X.Z., Adrian T.E. (2007):** Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. *Histology and Histopathology* 22: S. 805-814

**Messeri S., Messerini L., Vizzutti F., Laffi G., Marra F. (2012):** Glycogenic hepatopathy associated with type 1 diabetes mellitus as a cause of recurrent liver damage. *Annals of Hepatology* 11: S. 554-558

**Metzger S., Nusair S., Planer D., Barash V., Pappo O., Shilyansky J., Chajek-Shaul T. (2004):** Inhibition of hepatic gluconeogenesis and enhanced glucose uptake contribute to the development of hypoglycemia in mice bearing interleukin-1beta-secreting tumor. *Endocrinology* 145: S. 5150-5156

**Miles E.D., McBride B.W., Jia Y., Liao S.F., Boling J.A., Bridges P.J., Matthews J.C. (2015):** Glutamine synthetase and alanine transaminase expression are decreased in livers of aged vs. young beef cows and GS can be upregulated by 17 $\beta$ -estradiol implants. *Journal of Animal Science* 93: S. 4500-4509

**Miller R.E., Pope S.R., DeWille J.W., Burns D.M. (1983):** Insulin decreases and hydrocortisone increases the synthesis of glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 258: S. 5405-5413

**Miller A., McLeod L., Alhayyani S., Szczepny A., Watkins D.N., Chen W., Enriori P., Ferlin W., Ruwanpura S., Jenkins B.J. (2017):** Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. *Oncogene* 36: S. 3059-3066

**Moore M.J., Goldstein D., Hamm J., Figer A., Hecht J.R., Gallinger S., Au H.J., Murawa P., Walde D., Wolff R.A., Campos D., Lim R., Ding K., Clark G., Voskoglou-Nomikos T., Ptasynski M., Parulekar W.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2007):** Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 25: S. 1960-1966



**Moses A.G., Maingay J., Sangster K., Fearon K.C., Ross J.A. (2009):** Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. *Oncology Reports* 21: S. 1091-1095

**Müller M. (Hrsg.) (2011):** Chirurgie für Studium und Praxis: Unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs und der mündlichen Examina der Ärztlichen Prüfungen. 11. Auflage. Jahrgang 2012/2013. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste: S. 264-276

**Muriana F.J., Ruiz-Gutierrez V., Relimpio A.M. (1993):** Is hydrogen peroxide involved in the benzyl viologen-mediated in-vivo inactivation of rat liver glutamine synthetase? *International Journal of Experimental Pathology* 74: S. 219-224

**Nakagawa Y., Suzuki T., Ishii H., Ogata A., Nakae D. (2010):** Mitochondrial dysfunction and biotransformation of  $\beta$ -carboline alkaloids, harmine and harmaline, on isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological Interactions* 188: S. 393-403

**Nakhoul N.L., Lee Hamm L. (2013):** Characteristics of mammalian Rh glycoproteins (SLC42 transporters) and their role in acid-base transport. *Molecular Aspects of Medicine* 34: S. 629-637

**Naoi M., Maruyama W., Inaba-Hasegawa K. (2012):** Type A and B monoamine oxidase in age-related neurodegenerative disorders: their distinct roles in neuronal death and survival. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12: S. 2177-2188

**Narsale A.A., Enos R.T., Puppa M.J., Chatterjee S., Murphy E.A., Fayad R, Pena M.O., Durstine J.L., Carson J.A. (2015):** Liver inflammation and metabolic signaling in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice: the role of cachexia progression. *PLoS One*. 2015 Mar 19;10(3):e0119888. doi: 10.1371/journal.pone.0119888. eCollection 2015

**Neoptolemos J.P., Stocken D.D., Bassi C., Ghaneh P., Cunningham D., Goldstein D., Padbury R., Moore M.J., Gallinger S., Mariette C., Wente M.N., Izbicki J.R., Friess H., Lerch M.M., Dervenis C., Oláh A., Butturini G., Doi R., Lind P.A., Smith D., Valle J.W., Palmer D.H., Buckels J.A., Thompson J., McKay C.J., Rawcliffe C.L., Büchler M.W.; European Study Group for Pancreatic Cancer (2010):** Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 304: S. 1073-1081

**Nocito A., Dahm F., Jochum W., Jang J.H., Georgiev P., Bader M., Renner E.L., Clavien P.A. (2007):** Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 133: S. 608-618

**Noguchi Y., Yoshikawa T., Marat D., Makino T., Nomura K., Tsuburaya A., Ito T., Matsumoto A. (1999):** Tumor-associated metabolic alterations in patients with gastric and esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 46: S. 555-560

**Nolan E.M., Masters J.N., Dunn A. (1990):** Growth hormone regulation of hepatic glutamine synthetase mRNA levels in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 69: S. 101-110

**Oettle H., Post S., Neuhaus P., Gellert K., Langrehr J., Ridwelski K., Schramm H., Fahlke J., Zuelke C., Burkart C., Gutterlet K., Kettner E., Schmalenberg H., Weigang-Koehler K., Bechstein W.O., Niedergethmann M., Schmidt-Wolf I., Roll L., Doerken B., Riess H. (2007):** Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 297: S. 267-277

**Oldenburg H.S., Rogy M.A., Lazarus D.D., Van Zee K.J., Keeler B.P., Chizzonite R.A., Lowry S.F., Moldawer L.L. (1993):** Cachexia and the acute-

phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6.  
European Journal of Immunology 23: S. 1889-1894

**Oliff A., Defeo-Jones D., Boyer M., Martinez D., Kiefer D., Vuocolo G., Wolfe A., Socher S.H. (1987):** Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. Cell 50: S. 555–563

**Olive K.P., Tuveson D.A., Ruhe Z.C., Yin B., Willis N.A., Bronson R.T., Crowley D., Jacks T. (2004):** Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. Cell 119: S. 847-860

**Ott C., Heinmöller E., Gaumann A., Schölmerich J., Klebl F. (2007):** Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms. Medizinische Klinik 102: S. 127-135

**Pausch T., Hartwig W., Hinz U., Swolana T., Bundy B.D., Hackert T., Grenacher L., Büchler M.W., Werner J. (2012):** Cachexia but not obesity worsens the postoperative outcome after pancreatoduodenectomy in pancreatic cancer. Surgery 152: S. 81-88

**Pelzer U., Schwaner I., Stieler J., Adler M., Seraphin J., Dörken B., Riess H., Oettle H. (2011):** Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group. European Journal of Cancer 47: S. 1676-1681

**Petruzzelli M., Schweiger M., Schreiber R., Campos-Olivas R., Tsoli M., Allen J., Swarbrick M., Rose John S., Rincon M., Robertson G., Zechner R., Wagner Erwin F. (2014):** A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. Cell Metabolism 20: S. 433– 447

**Philchenkov A., Zavelevich M., Krocak T.J., Los M. (2004):** Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. Experimental Oncology 26: S. 82-97

**Pilkington G.J., Lantos P.L. (1982):** The role of glutamine synthetase in the diagnosis of cerebral tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 8: S. 227-236

**Plata-Salamán C.R. (1991):** Dexamethasone inhibits food intake suppression induced by low doses of interleukin-1 beta administered intracerebroventricularly. *Brain Research Bulletin* 27: S. 737-738

**Poyck P.P., Hoekstra R., Vermeulen J.L., van Wijk A.C., Chamuleau R.A., Hakvoort T.B., van Gulik T.M., Lamers W.H. (2008):** Expression of glutamine synthetase and carbamoylphosphate synthetase I in a bioartificial liver: markers for the development of zonation in vitro. *Cells Tissues Organs* 188: S. 259-269

**Prado B.L., Qian Y. (2019):** Anti-cytokines in the treatment of cancer cachexia. *Annals of Palliative Medicine* 8: S. 67-79. DOI: 10.21037/apm.2018.07.06

**Quinn G.P., Keough M.J. (2002):** *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. 1. Auflage. Cambridge: Cambridge University Press: S. 269

**Qvartskhava N., Jin C.J., Buschmann T., Albrecht U., Bode J.G., Monhasery N., Oenarto J., Bidmon H.J., Görg B., Häussinger D. (2019):** Taurine transporter (TauT) deficiency impairs ammonia detoxification in mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 116: S. 6313-6318

**Ravasco P., Monteiro-Grillo I., Marques Vidal P., Camilo M.E. (2004):** Cancer: disease and nutrition are key determinants of patients' quality of life. *Supportive Care in Cancer* 12: S. 246–252

**Rémésy C., Moundras C., Morand C., Demigné C. (1997):** Glutamine or glutamate release by the liver constitutes a major mechanism for nitrogen salvage. *American Journal of Physiology* 272: S. 257-264

**Renga B., Mencarelli A., Cipriani S., D'Amore C., Zampella A., Monti M.C., Distrutti E., Fiorucci S. (2011):** The nuclear receptor FXR regulates hepatic

transport and metabolism of glutamine and glutamate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: S. 1522-31

**Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S.A., Panzer S., Zahurak M., Goodman S.N., Sohn T.A., Hruban R.H., Yeo C.J., Kern S.E. (1997):** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 57: S. 1731-1734

**Ruan S., Jia F., Li J. (2017):** Potential Antitumor Effect of Harmine in the Treatment of Thyroid Cancer. *Evidence-based complementary and alternative Medicine: eCAM* 2017: doi: 10.1155/2017/9402615.

**Rulyak S.J., Brentnall T.A., Lynch H.T., Austin M.A. (2003):** Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 98: S. 798-804

**Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988):** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: S. 487-491

**Santillo M.F., Liu Y., Ferguson M., Vohra S.N., Wiesenfeld P.L. (2014):** Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by  $\beta$ -carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicology in Vitro* 28: S. 403-410

**Scalise M., Pochini L., Console L., Losso M.A., Indiveri C. (2018):** The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology. *Front Cell and Developmental Biology* 6: Article 96. doi: 10.3389/fcell.2018.00096. eCollection 2018

**Scholnik-Cabrera A., Chávez-Blanco A., Domínguez-Gómez G., Dueñas-González A. (2017):** Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia. *American Journal of Cancer Research* 7: S. 1107-1135

**Schmich S. K. P. (2020):** Effekt einer Monoaminoxidase-A Inhibition auf tumorbedingte Skelettmuskelveränderungen: Untersuchungen am transgenen Mausmodell des Pankreaskarzinoms. Dissertation, Philipps-Universität Marburg

**Schmitt T., Martignoni M., Bachmann J., Fechtner K., Friess H., Kinscherf R., Hildebrandt W. (2007):** Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. *Journal of molecular medicine* 85: S. 647–654

**Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. (2006):** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7: 3

**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. (1997):** Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research* 57: S. 3126-3130

**Senn J.J., Klover P.J., Nowak I.A., Zimmers T.A., Koniaris L.G., Furlanetto R.W., Mooney R.A. (2003):** Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulinresistance in hepatocytes. *Journal of the Biological Chemistry* 278: S. 13740-13746

**Shih J.C. (2018):** Monoamine oxidase isoenzymes: genes, functions and targets for behavior and cancer therapy. doi: 10.1007/s00702-018-1927-8. Epub 2018 Sep 27

**Shiono M., Huang K., Downey R.J., Consul N., Villanueva N., Beck K., Fenn K., Dietz D., Yamaguchi T., Kato S., Divgi C., Kalinsky K., Wei Y., Zhang Y., Borczuk A.C., Inoue A., Halmos B., Acharyya S. (2016):** An analysis of the relationship between metastases and cachexia in lung cancer patients. *Cancer Medicine* 5: S. 2641-2648

**Shulman.K.I., Walker S.E., MacKenzie S., Knowles S. (1989):** Dietary restriction, tyramine, and the use of monoamine oxidase inhibitors. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 9: S. 397-402

**Silva K.A., Dong J., Dong Y., Dong Y., Schor N., Tweardy D.J., Zhang L., Mitch W.E. (2015):** Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia. *Journal of Biological Chemistry* 290: S. 11177-11187

**Smit V.T.H.B.M., Boot A.J.M., Smits A.M.M., Fleuren G.J., Cornelisse C.J., Bos J.L. (1988):** K-ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Research* 16: S. 7773–7782

**Song S., Wang B., Zhang X., Hao L., Hu X., Li Z., Sun S. (2015):** Long-Term Diabetes Mellitus Is associated with an increased risk of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 10: e0134321. doi: 10.1371/journal.pone.0134321. eCollection 2015

**Soria L.R., Nitzahn M., De Angelis A., Khoja S., Attanasio S., Annunziata P., Palmer D.J., Ng P., Lipshutz G.S., Brunetti-Pierri N. (2019):** Hepatic glutamine synthetase augmentation enhances ammonia detoxification. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 42: S. 1128-1135

**Spindler S.R. (2001):** Caloric restriction enhances the expression of key metabolic enzymes associated with protein renewal during aging. *Annals of the New York Academy of Science* 928: S. 296-304

**Spotten L.E., Corish C.A., Lorton C.M., Ui Dhuibhir P.M., O'Donoghue N.C., O'Connor B., Walsh T.D. (2017):** Subjective and objective taste and smell changes in cancer. *Annals of Oncology* 28: S. 969–984

**Stevens R.J., Roddam A.W., Beral V. (2007):** Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer* 97: S. 507-509

**Stoll S., Hafner U., Kränzlin B., Müller W.E. (1997):** Chronic treatment of Syrian hamsters with low-dose selegiline increases life span in females but not males. *Neurobiology of Aging* 18: S. 205-211

**v.Straaten H.W., He Y., van Duist M.M., Labruyère W.T., Vermeulen J.L., van Dijk P.J., Ruijter J.M., Lamers W.H., Hakvoort T.B. (2006):** Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. *Biochemistry and Cell Biology* 84: S. 215-231

**Strassmann G., Fong M., Kenney J.S., Jacob C.O. (1992):** Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *Journal of Clinical Investigation* 89: S. 1681–1684

**Sultana A., Smith C.T., Cunningham D., Starling N., Neoptolemos J.P., Ghaneh P. (2007):** Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25: S. 2607-2615

**Sun Y., Li Y., Luo D., Liao D.J. (2012):** Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gadph) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS One* 7: e41659. doi: 10.1371/journal.pone.0041659. Epub 2012 Aug 22

**Sun P., Zhang S., Li Y., Wang L. (2014):** Harmine mediated neuroprotection via evaluation of glutamate transporter 1 in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 583: S. 32-36

**Sun H.W., Yu X.J., Wu W.C., Chen J., Shi M., Zheng L., Xu J. (2016):** GLUT1 and ASCT2 as Predictors for Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 11: e0168907. doi: 10.1371/journal.pone.0168907. eCollection 2016

**Suzuki O., Noguchi E., Yagi K. (1976):** A simple fluorometric assay for type B monoamine oxidase activity in rat tissues. *Journal of Biochemistry* 79: S. 1297-1299



**Suzuki H., Asakawa A., Amitani H., Nakamura N., Inui A. (2013):** Cancer cachexia – pathophysiology and management. *Journal of Gastroenterology* 48: S. 574-594

**Szafranska A.E., Davison T.S., John J., Cannon T., Sipos B., Maghnouj A., Labourier E., Hahn S.A. (2007):** MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26: S. 4442-4452

**Taketo M.M. (1998):** Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *Journal of the National Cancer Institute* 90: S. 1609-1620

**Tan C.R., Yaffee P.M., Jamil L.H., Lo S.K, Nissen N., Pandol S.J., Tuli R., Hendifar A.E. (2014):** Pancreatic cancer cachexia: a review of mechanisms and therapeutics. *Frontier in Physiology* 5/2014: Article 88

**Tang S.C. und Chen Y.C. (2014):** Novel therapeutic targets for pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20: S. 10825-10844

**Tatsumi K., Ohashi K., Taminishi S., Okano T., Yoshioka A., Shima M. (2008):** Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374: S. 106-110

**Tayek J.A. (1992):** A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *Journal of the American College of Nutrition* 11: S. 445–456

**Teli M.R., James O.F., Burt A.D., Bennett M.K., Day C.P. (1995):** The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 22: S. 1714–1719

**Tersmette A.C., Petersen G.M., Offerhaus G.J., Falatko F.C., Brune K.A., Goggins M., Rozenblum E., Wilentz R.E., Yeo C.J., Cameron J.L., Kern S.E., Hruban R.H. (2001):** Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 7: S. 738-744

**Thiemann F., Cullen P.M., Klein H.-G. (Hrsgg.) (2015):** Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH: S. 74

**Thun M.J., Henley S.J., Patrono C. (2002):** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute* 94: S. 252-266

**Timischl, W. (2013):** Angewandte Statistik. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. 3. Auflage. Wien: Springer Verlag: S. 359-410

**Tisdale M.J. (2009):** Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiological Reviews* 89: S. 381–410

**Tisdale M.J. (2010a):** Reversing Cachexia. *Cell* 142: S. 511-512

**Tisdale M.J. (2010b):** Cancer cachexia. *Current Opinion in Gastroenterology* 26: S. 146-151

**Torelli G.F., Meguid M.M., Moldawer L.L., Edwards C.K. 3rd, Kim H.J., Carter J.L., Laviano A., Rossi Fanelli F. (1999):** Use of recombinant human soluble TNF receptor in anorectic tumor-bearing rats. *American Journal of Physiology* 277: S. 850-855

**Toso C., Emamaullee J.A., Merani S., Shapiro A.M. (2008):** The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia* 51: S. 1937-1946

**Trikha M., Corringham R., Klein B., Rossi J.F. (2003):** Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clinical Cancer Research* 9: S. 4653-4665

**Tuca A., Jimenez-Fonseca P., Gascón P. (2013):** Clinical evaluation and optimal management of cancer cachexia. *Critical reviews oncology/hematology* 88: S. 625–636

**Ueki K., Kondo T., Tseng Y.H., Kahn C.R. (2004):** Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the

metabolic syndrome in the mouse. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 101: S. 10422-10427

**Umaña A., Carrasco S., Sánchez M. (2003):** Role of the cytokine-3 signaling suppressor protein (SOCS 3) in growth hormone resistance induced by malnutrition. Biomedica 23: S. 301-308

**Valadan R., Hedayatizadeh-Omran A., Alhosseini-Abyazani M.N., Amjadi O., Rafiei A., Tehrani M., Alizadeh-Navaei R. (2015):** Data supporting the design and evaluation of a universal primer pair for pseudogene-free amplification of HPRT1 in real-time PCR. Data in Brief 2015/4: S. 384-389

**Versteijne E., Suker M., Groothuis K., Akkermans-Vogelaar J.M., Besselink M.G., Bonsing B.A., Buijsen J., Busch O.R., Creemers G.M., van Dam R.M., Eskens F.A.L.M., Festen S., de Groot J.W.B., Groot Koerkamp B., de Hingh I.H., Homs M.Y.V., van Hooft J.E., Kerver E.D., Luelmo S.A.C., Neelis K.J., Nuyttens J., Paardekooper G.M.R.M., Patijn G.A., van der Sangen M.J.C., de Vos-Geelen J., Wilmink J.W., Zwinderman A.H., Punt C.J., van Eijck C.H., van Tienhoven G.; Dutch Pancreatic Cancer Group (2020):** Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. Journal of Clinical Oncology 38: S. 1763-1773

**Vosberg, H.-P. (1989):** The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. Human Genetics 83: S. 1-15

**Wang Y., Watford M. (2007):** Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatoma cells and 3T3 L1 adipocytes. Biochimica et Biophysica Acta 1770: S. 594-600

**Wang Y.D., Chen W.D., Wang M., Yu D., Forman B.M., Huang W. (2008):** Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. Hepatology 48: S. 1632-1643

**Wang X., Pickrell A.M., Zimmers T.A., Moraes C.T. (2012):** Increase in muscle mitochondrial biogenesis does not prevent muscle loss but increased tumor size in a mouse model of acute cancer-induced cachexia. *PLoS One* 7: e33426. doi: 10.1371/journal.pone.0033426. Epub 2012 Mar 12

**Wang, H., Ye J. (2015):** Regulation of energy balance by inflammation: Common theme in physiology and pathology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16: S. 47–54

**Wang V.M., Ferreira R.M.M., Almagro J., Evan T., Legrave N., Zaw Thin M., Frith D., Carvalho J., Barry D.J., Snijders A.P., Herbert E., Nye E.L., MacRae J.I., Behrens A. (2019):** CD9 identifies pancreatic cancer stem cells and modulates glutamine metabolism to fuel tumour growth. *Nature Cell Biology* 21: S. 1425-1435

**Wang Y., Wang H., Zhang L., Zhang Y., Sheng Y., Deng G., Li S., Cao N., Guan H., Cheng X., Wang C. (2019):** Subchronic toxicity and concomitant toxicokinetics of long-term oral administration of total alkaloid extracts from seeds of *Peganum harmala* Linn: A 28-day study in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 238: Article 111866. doi: 10.1016/j.jep.2019.111866

**Watchorn T.M., Dowidar N., Dejong C.H., Waddell I.D., Garden O.J., Ross J.A. (2005):** The cachectic mediator proteolysis inducing factor activates NF-kappaB and STAT3 in human Kupffer cells and monocytes. *International Journal of Oncology* 27: S. 1105-1111

**Watford M. (2000):** Glutamine and Glutamate Metabolism across the Liver Sinusoid. *The Journal of Nutrition* 130: S. 983-987

**Weiner I.D., Verlander J.W. (2003):** Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein. *Acta Physiologica Scandinavica* 179: S. 331-338

**Weiner I.D., Miller R.T., Verlander J.W. (2003):** Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein, in the mouse liver. *Gastroenterology* 124: S. 1432-1440

**Westman G., Bergman B., Albertsson M., Kadar L., Gustavsson G., Thaning L., Andersson M., Straumits A., Jeppson B., Lindén C.J., Ewers S.B., Andersson H., Mercke C., Hafström L., Birck O., Orgum P. (1999):** .Megestrol acetate in advanced, progressive, hormone-insensitive cancer. Effects on the quality of life: a placebo-controlled, randomised, multicentre trial. *European Journal of Cancer* 35: S. 586-595

**Whitcomb D.C., Pogue-Geile K. (2002):** Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* (2/2002): S 663-678

**Wiedemann C., Schulz H.L., Weber B.H.F. (2004):** Quantitative Real-Time PCR – eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* (1/2004): S. 99-102

**Wimbiscus M., Kostenko O., Malone D. (2010):** MAO inhibitors: risks, benefits, and lore. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 77: S. 859-882

**Wigmore S. J., Falconer J.S., Plester C.E., Ross J.A., Maingay J.P., Carter D.C., Fearon K.C. (1995):** Ibuprofen reduces energy expenditure and acute-phase protein production compared with placebo in pancreatic cancer patients. *British Journal of Cancer* 72: S. 185-188

**Wigmore S.J., Ross J.A., Falconer J.S., Plester C.E., Tisdale M.J., Carter D.C., Fearon K.C. (1996):** The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition* 12: S. 27-30

**Wood L.D., Hruban R.H. (2015):** Genomic Landscapes of Pancreatic Neoplasia. *Journal of Pathology and Translational Medicine* 49: S. 13-22

**Woodford, N. und Johnson, A.P. (Hrsgg.) (2004):** Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews. *Methods in Molecular Biology* (266). New York: Humana Press, 2004: S. 196

**Ye J. (2013):** Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine* 71: S. 14–24

**Younis S., Rosner I., Rimar D., Boulman N., Rozenbaum M., Odeh M., Slobodin G. (2013):** Weight change during pharmacological blockade of

interleukin-6 or tumor necrosis factor-alpha in patients with inflammatory rheumatic disorders: a 16-week comparative study. *Cytokine* 61: S. 353–355

**Yu X.J., Sun K., Tang X.H., Zhou C.J., Sun H., Yan Z., Fang L., Wu H.W., Xie Y.K., Gu B. (2016):** Harmine combined with paclitaxel inhibits tumor proliferation and induces apoptosis through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *Oncology Letters* 12: S. 983-988

**Zhang H., Sun K., Ding J., Xu H., Zhu L., Zhang K., Li X., Sun W. (2014):** Harmine induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation, migration and invasion through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *Phytomedicine* 21: S. 348-355

**Zhen D.B., Rabe K.G., Gallinger S., Syngal S., Schwartz A.G., Goggins M.G., Hruban R.H., Cote M.L., McWilliams R.R., Roberts N.J., Cannon-Albright L.A., Li D., Moyes K., Wenstrup R.J., Hartman A.R., Seminara D., Klein A.P., Petersen G.M. (2015):** BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study. *Genetics in Medicine* 17: S. 569-577

**Zhou Y., Danbolt N.C. (2013):** GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Frontiers in Endocrinology* 4: Article 165. doi: 10.3389/fendo.2013.00165

**Zhou M., Liu X., Li Z., Huang Q., Li F., Li C.Y. (2018):** Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer* 143: S. 921-930

**Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004):** Investigation on DNA intercalation and surface binding SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32

### **Internetquellen**

**Choi J., (2012):** Georgia Tech Biology Module 5: Integrative Health 01: Recombinant DNA (URL: <http://bio1510.biology.gatech.edu/module-5-integrative-health/01-recombinant-dna/>, abgerufen am 27.6.2015, 11:00)

**Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (Hrsgg.) (1997):** Retroviruses. Overview of Reverse Transcription. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19424/>, abgerufen am 26.07.2015, 19:00)

**Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2013):** S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.htm>

**Robert-Koch-Institut (RKI) (2021):** Zentrum für Krebsregisterdaten: Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom). Stand: 29.11.2021 (URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html), abgerufen am 28.12.2021, 16:53 Uhr)

**www.pcr.at, zitiert nach Schultz, J. (2005):** Rolle von Interleukin-1 in der Scrapie-Pathogenese. Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin. S. 35

**Wikibooks (2011):** Topographische Anatomie: Peritonealhöhle: Leber und Gallenblase.

(URL:[https://de.wikibooks.org/wiki/Topographische\\_Anatomie:\\_Peritonealh%C3%B6hle:\\_Leber\\_und\\_Gallenblase](https://de.wikibooks.org/wiki/Topographische_Anatomie:_Peritonealh%C3%B6hle:_Leber_und_Gallenblase), aufgerufen am 23.01.2020, 11:27 Uhr)

## 8. Anhang

### 8.1 Tabellen

Tabelle 18: Gewicht und Färbungen: Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test (p-Werte)

Parameter	WT Verteilung	CA Verteilung	WT HH Verteilung	CA HH Verteilung	Varianz
Gewicht ges.	0,1	0,115	0,24	0,689	0,255
Gewicht m	0,648	0,589	0,423	0,59	0,08
Gewicht w	0,592	0,799	0,107	0,051	0,782
GS-pos. Fläche	0,984	0,385	0,423	0,457	0,853
MAO-A-pos. Fläche	0,502	0,835	<b>0,041</b>	0,102	0,11
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ges.	0,19	0,421	0,468	0,914	0,374
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ZV	0,251	0,258	0,655	0,598	0,828
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen GT	0,706	0,798	0,426	0,562	0,363
COX-2-pos. Zellen ges.	0,564	0,34	0,136	0,83	0,34
COX-2-pos. Zellen ZV	0,519	0,494	<b>0,049</b>	0,861	0,269
COX-2-pos. Zellen GT	0,511	0,667	0,659	0,697	0,295
CD68-pos. Zellen ges.	0,593	0,108	0,111	0,698	0,106
CD68-pos. Zellen ZV	0,754	0,162	0,506	0,52	<b>0,044</b>
CD68-pos. Zellen GT	0,765	0,663	0,433	0,534	0,362
PAS-pos. Fläche	0,893	0,17	0,515	0,634	0,131



**Tabelle 19: Gewicht und Alter der Mäuse: Mittelwert  $\pm$  SE und ANOVA (p-Werte)**

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	13 (6/7)	11 (7/4)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
Gewicht ges. (g)	27,970 $\pm 1,723$	27,727 $\pm 1,025$	27,173 $\pm 1,362$	24,029 $\pm 1,194$	p=0,329	p=0,202	p=0,337
Gewicht m (g)	33,683 $\pm 1,687$	29,786 $\pm 0,435$	28,675 $\pm 1,533$	24,025 $\pm 2,098$	<b>p=0,01</b>	<b>p=0,006</b>	p=0,805
Gewicht w (g)	23,071 $\pm 0,571$	24,125 $\pm 1,474$	23,167 $\pm 1,035$	24,033 $\pm 1,084$	p=0,328	p=0,885	p=0,93
Alter (Wochen)	16,945 $\pm 0,597$	23,545 $\pm 1,011$	20,039 $\pm 0,149$	19,612 $\pm 0,592$	-	-	-

**Tabelle 20: IHC GS-positive Fläche (%): Mittelwert  $\pm$  SE und ANOVA (p-Werte)**

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	12 (5/7)	10 (7/3)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
GS-positive Fläche (%)	3,341 $\pm 0,337$	1,471 $\pm 0,322$	3,704 $\pm 0,285$	3,165 $\pm 0,348$	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,004</b>	p=0,053

**Tabelle 21: IHC MAO-A-positive Fläche (%): Mittelwert  $\pm$  SE und ANOVA (p-Werte)**

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	9 (3/6)	7 (6/1)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
MAO-A-positive Fläche (%)	4,858 $\pm 0,883$	4,629 $\pm 0,598$	1,811 $\pm 0,393$	2,176 $\pm 0,422$	p=0,898	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,637

Tabelle 22: IHC IL-1 $\beta$ -positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA (p-Werte)

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	5 (1/4)	5 (4/1)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ges. (%)	41.81 $\pm$ 2.33	58.463 $\pm$ 1.652	43.657 $\pm$ 1.946	42.508 $\pm$ 3.204	<b>p=0,04</b>	<b>p=0,012</b>	<b>p=0,002</b>
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ZV (%)	41.418 $\pm$ 2.604	60.395 $\pm$ 2.599	44.473 $\pm$ 2.023	43.137 $\pm$ 3.127	<b>p=0,028</b>	<b>p=0,017</b>	<b>p=0,001</b>
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen GT (%)	42.33 $\pm$ 2.396	56.184 $\pm$ 2.535	42.617 $\pm$ 2.318	41.669 $\pm$ 3.596	p=0,134	<b>p=0,026</b>	<b>p=0,022</b>

Tabelle 23: IHC COX-2-positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA (p-Werte)

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	5 (0/5)	5 (4/1)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
COX-2-pos. Zellen ges. (%)	16.532 $\pm$ 0.818	24.594 $\pm$ 3.435	17.811 $\pm$ 1.468	24.601 $\pm$ 2.564	<b>p=0,002</b>	p=0,960	p=0,779
COX-2-pos. Zellen ZV (%)	17.733 $\pm$ 0.749	26.98 $\pm$ 3.954	19.955 $\pm$ 1.716	26.478 $\pm$ 2.564	<b>p=0,004</b>	p=0,957	p=0,585
COX-2-pos. Zellen GT (%)	14.93 $\pm$ 0.993	20.34 $\pm$ 3.077	14.952 $\pm$ 1.311	22.099 $\pm$ 2.638	<b>p=0,004</b>	p=0,965	p=0,688

**Tabelle 24: IHC CD68-positive Zellen: Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA (p-Werte)**

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	5 (0/5)	5 (4/1)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
CD68-pos. Zellen ges. (%)	8.798 $\pm$ 2.579	22.68 $\pm$ 1.192	8.952 $\pm$ 0.739	15.361 $\pm$ 2.749	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,031</b>	p=0,059
CD68-pos. Zellen ZV (%)	8.462 $\pm$ 2.687	23.85 $\pm$ 1.791	9.058 $\pm$ 0.913	17.067 $\pm$ 3.395	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,09	p=0,118
CD68-pos. Zellen GT (%)	9.247 $\pm$ 2.557	21.125 $\pm$ 1.755	8.827 $\pm$ 0.741	13.153 $\pm$ 2.144	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,011</b>	<b>p=0,038</b>

**Tabelle 25: PAS-positive Fläche (%): Mittelwert $\pm$ SE und ANOVA (p-Werte)**

Parameter	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	5 (0/5)	5 (4/1)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
PAS-pos. Fläche (%)	4.125 $\pm$ 0.945	13.955 $\pm$ 1.639	16.633 $\pm$ 2.942	23.701 $\pm$ 4.253	<b>p=0,022</b>	<b>p=0,006</b>	p=0,690

Tabelle 26: Gewicht und Färbungen: Tukey-Test (p-Werte)

Werte	CA vs. WT	CA HH vs. WT HH	CA HH vs. CA	WT HH vs. WT	CA HH vs. WT	WT HH vs. CA
Gewicht m	0,247	0,189	0,084	0,081	<b>0,003</b>	0,934
GS-pos. Fläche	<b>&lt;0,001</b>	0,703	<b>0,011</b>	0,833	0,984	<b>&lt;0,001</b>
MAO-A-pos. Fläche	0,994	0,974	0,069	<b>0,004</b>	<b>0,027</b>	<b>0,012</b>
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ges.	<b>0,002</b>	0,983	<b>0,002</b>	0,952	0,998	<b>0,002</b>
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen ZV	<b>0,001</b>	0,977	<b>0,001</b>	0,842	0,973	<b>0,001</b>
IL-1 $\beta$ -pos. Zellen GT	<b>0,038</b>	0,994	<b>0,016</b>	0,999	0,999	<b>0,014</b>
COX-2-pos. Zellen ges.	0,136	0,087	1,0	0,974	0,095	0,143
COX-2-pos. Zellen ZV	0,113	0,159	0,999	0,906	0,103	0,181
COX-2-pos. Zellen GT	0,4	0,051	0,943	1,0	0,131	0,27
CD68-pos. Zellen ges.	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,046</b>	0,064	1,0	0,111	<b>&lt;0,001</b>
CD68-pos. Zellen ZV	<b>0,001</b>	<b>0,037</b>	0,206	0,997	0,074	<b>&lt;0,001</b>
CD68-pos. Zellen GT	0,001	0,19	<b>0,021</b>	0,998	0,426	<b>&lt;0,001</b>
PAS-pos. Fläche	0,297	0,348	0,242	0,058	<b>0,004</b>	0,938

Tabelle 27: qRT-PCR: Shapiro-Wilk-Test und Levene-Test (p-Werte)

Parameter	WT Verteilung	CA Verteilung	WT HH Verteilung	CA HH Verteilung	Varianz
GS	0,853	0,291	0,938	0,139	0,123
FXR	0,734	0,765	0,082	0,793	0,662
RhBG	<b>0,045</b>	<b>0,038</b>	<b>0,006</b>	0,342	0,574
SLC1A2	0,166	<b>0,044</b>	0,994	0,342	0,461
SLC1A4	0,758	0,283	0,489	0,872	<b>0,001</b>
SLC1A5	0,507	0,105	0,191	0,866	0,719
MAO-A	0,992	0,524	0,99	0,743	0,605
MAO-B	0,842	0,093	<b>0,015</b>	0,116	0,738
IL-1 $\beta$	0,928	0,914	0,123	0,218	<b>0,002</b>
IL-6	0,595	0,684	0,13	0,545	<b>&lt;0,001</b>
TNF- $\alpha$	0,441	<b>&lt;0,001</b>	0,154	0,703	0,254
COX-1	0,406	0,487	0,704	0,183	<b>0,008</b>
CD68	<b>0,046</b>	0,743	<b>&lt;0,001</b>	0,078	<b>0,005</b>
SOCS-3	0,264	<b>0,033</b>	<b>0,022</b>	<b>0,022</b>	0,067
MIF	0,977	0,625	0,52	0,395	0,355
BCL-2	0,989	0,071	0,235	0,281	0,226
BAX	0,527	0,64	<b>0,002</b>	<b>0,014</b>	0,983
Caspase-3	0,122	0,946	0,154	0,438	0,4
PCNA	0,429	0,232	0,156	0,565	0,274

Tabelle 28: qRT-PCR: Mittelwert±SE und ANOVA (p-Werte)

qRT-PCR	WT	CA	WT HH	CA HH	PDAC	ANOVA HH	IA
n (m/w)	9 (4/5)	8 (6/2)	11 (8/3)	7 (4/3)	-	-	-
GS	1 ±0.119	1.274 ±0.098	0.846 ±0.0445	1.017 ±0.109	<b>p=0,023</b>	<b>p=0,025</b>	p=0,581
FXR	1 ±0.055	0.843 ±0.074	1.128 ±0.079	1.002 ±0.091	p=0,075	p=0,052	p=0,839
RhBG	1 ±0.097	1.123 ±0.162	0.6227 ±0.066	0.614 ±0.078	p=0,585	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,535
SLC1A2	1 ±0.101	1.082 ±0.13	1.138 ±0.082	1.168 ±0.181	p=0,646	p=0,356	p=0,826
SL C1A4	1 ±0.141	2.202 ±0.464	0.813 ±0.059	1.154 ±0.123	<b>p=0,003</b>	<b>p=0,012</b>	p=0,075
SLC1A5	1 ±0.169	1.627 ±0.265	0.92 ±0.134	1.776 ±0.229	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,911	p=0,557
MAO-A	1 ±0.094	0.9 ±0.1	1.361 ±0.122	1.765 ±0.149	p=0,209	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,043</b>
MAO-B	1 ±0.078	0.642 ±0.097	1.158 ±0.109	1.033 ±0.157	<b>p=0,039</b>	<b>p=0,017</b>	p=0,305
IL-1β	1 ±0.178	2.628 ±0.357	0.522 ±0.055	3.082 ±0.925	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,549	p=0,271
IL-6	1 ±0.093	2.678 ±0.44	0.559 ±0.072	3.936 ±0.926	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,846	p=0,056
TNF-α	1 ±0.12	2.057 ±0.664	0.838 ±0.098	1.939 ±0.395	<b>p=0,005</b>	p=0,515	p=0,951
COX-1	1 ±0.113	1.608 ±0.251	0.841 ±0.041	2.479 ±0.552	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,454	p=0,054
CD68	1 ±0.095	1.667 ±0.274	0.911 ±0.095	2.831 ±0.789	<b>p&lt;0,001</b>	p=0,326	p=0,082
SOCS-3	1 ±0.126	9.262 ±1.657	1.456 ±0.263	3.301 ±0.988	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p=0,005</b>	<b>p=0,001</b>
MIF	1 ±0.029	0.811 ±0.069	0.753 ±0.044	0.771 ±0.077	p=0,129	<b>p=0,009</b>	p=0,067
BCL-2	1 ±0.09	1.113 ±0.124	0.781 ±0.066	1.446 ±0.196	<b>p=0,002</b>	p=0,909	<b>p=0,023</b>
BAX	1 ±0.065	0.99 ±0.062	0.814 ±0.064	0.989 ±0.094	p=0,251	p=0,117	p=0,204
Caspase-3	1 ±0.12	1.352 ±0.152	1.402 ±0.093	1.397 ±0.057	p=0,139	<b>p=0,045</b>	p=0,126
PCNA	1 ±0.055	1.092 ±0.078	1.105 ±0.032	1.304 ±0.088	<b>p=0,024</b>	<b>p=0,028</b>	p=0,391

Tabelle 29: qRT-PCR: Tukey-Test (p-Werte)

qRT-PCR	CA vs. WT	CA HH vs. WT HH	CA HH vs. CA	WT HH vs. WT	CA HH vs. WT	WT HH vs. CA
GS	0,181	0,569	0,275	0,593	0,999	<b>0,02</b>
RhBG	0,838	1,0	<b>0,015</b>	<b>0,044</b>	0,077	<b>0,007</b>
SLC1A4	<b>0,005</b>	0,733	<b>0,028</b>	0,93	0,97	<b>&lt;0,001</b>
SLC1A5	0,133	<b>0,016</b>	0,957	0,988	<b>0,043</b>	0,059
MAO-A	0,934	0,099	<b>&lt;0,001</b>	0,118	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,037</b>
MAO-B	0,131	0,858	0,11	0,708	0,997	<b>0,01</b>
IL-1 $\beta$	<b>0,045</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,888	0,817	<b>0,01</b>	<b>0,004</b>
IL-6	<b>0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,228	0,859	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>
TNF- $\alpha$	0,176	0,147	0,996	0,985	0,294	0,075
COX-1	0,357	<b>&lt;0,001</b>	0,137	0,965	<b>0,002</b>	0,146
CD68	0,538	<b>0,003</b>	0,142	0,997	<b>0,006</b>	0,392
SOCS-3	<b>&lt;0,001</b>	0,484	<b>&lt;0,001</b>	0,981	0,312	<b>&lt;0,001</b>
MIF	0,09	0,995	0,964	<b>0,009</b>	0,037	0,865
BCL-2	0,901	<b>0,002</b>	0,246	0,485	<b>0,061</b>	0,171
Caspase-3	0,15	1,0	0,994	0,052	0,104	0,988
PCNA		0,122	0,123	0,566	<b>0,01</b>	0,998

## **8.2 Curriculum vitae**

Die Seite 214 (Curriculum vitae) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.



### **8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen**

Meine akademischen Lehrenden waren:

**In Marburg:** Adamkiewicz, Al Fakhri, Albert, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Becker, Becker, Bender, Berger, Bette, Bien, Bohlander, Bonaterra, Bösner, Braun, Brehm, Busch, Cetin, Czubayko, Dannlowski, Daut, Decher, del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Dornow, Duda, Eberhart, Efe, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Görg, Görg, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hadji, Henke, Hertl, Heverhagen, Heyse, Hildebrandt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jerrentrup, Kalder, Kampmann, Kann, Kern Kerwat, Kill, Kinscherf, Kirchner, Klose, Knöppel, Köhler, Kohlmann, König, Konrad, Krones, Kruse, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüers, Lüsebrink, Mahnke, Maier, Maisch, Maisner, Meissner, Milani, Mittag, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Oberthür, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pantazis, Pfützner, Plant, Pook, Preisig-Müller, Quint, Ramaswamy, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schoner, Schütz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Stief, Stiewe, Strik, Suske, Tackenberg, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zoremba, Zwioerek

**In Gießen:** Knipper, Riße, Roelke, Schneider

**In Fulda:** Hellinger, Hessmann, Kälble

**In Kloster Grafschaft (Schmallenberg):** Dellweg

## **8.4 Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut durchzuführen. Auch die regelmäßige Vorstellung und Diskussion der Zwischenergebnisse im Rahmen der Work-in-Progress-Seminare haben diese Arbeit vorangebracht. Hierfür ein großes Dankeschön an die gesamte AG Medizinische Zellbiologie.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Wulf Hildebrandt für die engagierte Betreuung und Begleitung dieser Arbeit, sowohl vor Ort in Marburg, als auch aus der Ferne in Form von 1000 E-Mails.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung des Laborteams. Herrn Michael Dreher und Frau Claudia Keppler möchte ich hier ganz besonders danken für die Anleitung bei der Anfertigung der Kryoschnitte bzw. bei der Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen.

Darüber hinaus möchte ich sehr herzlich Herrn Hans Schwarzbach für die Entwicklung und Durchführung der automatisierten Segmentierung danken.

Für ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre grenzenlose Geduld und Liebe danke ich meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Großmutter. Und vor allem danke ich Yves Klinger, der alle Phasen dieser Arbeit begleitet hat, unverzichtbar bei Statistik- und Formatierungsproblemen und allen weiteren Schwierigkeiten war, und auch sonst unverzichtbar ist.

### **8.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Molekularbiologische und immunhistologische Leberveränderungen beim Mausmodell eines Kachexie-induzierenden Pankreas-Karzinoms: Effekte einer Monoaminoxidase-A-Inhibition“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Ralf Kinscherf mit Unterstützung von Prof. Dr. Wulf Hildebrandt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtliche oder sinngemäße Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem weiteren Publikationsorgan veröffentlicht.

---

### **Ort, Datum, Unterschrift der Doktorandin**

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

---

### **Ort, Datum, Unterschrift des Referenten**