

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

TIMP-1 fördert den Katabolismus von Speicherlipiden und induziert die Bildung einer männerspezifischen metastasierungsfördernden Nische in der Leber

Chris Dirk Hermann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Stephan Herzig

Prüfer*innen der Dissertation:

- 1. Prof. Dr. Achim Krüger
- 2. Prof. Dr. Martin Klingenspor
- 3. Prof. Dr. Nadia Harbeck

Die Dissertation wurde am 10.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.12.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung					
ln	haltsv	erzeichnis	II		
Αŀ	okürzu	ıngsverzeichnis	V		
Zι	ısamn	nenfassung	VIII		
		t			
		itung			
••	1.1.	Das Geschlecht als biologische Variable bei Krebs			
	1.1. 1.2.	Das Pankreaskarzinom			
	1.2.	1.2.1. Das genetisch modifizierte KPC-Mausmodell			
		1.2.2. Das Caerulein basierte Mausmodell			
		1.2.3. Epigenetische Veränderungen initiieren die Tumorbildung im Pankreas			
	1.3.	Lebermetastasierung als äußerst tödliche Erscheinungsform von Krebs			
	7.0.	1.3.1. Zelluläre Aspekte der metastasierungsfördernden Nische in der Leber			
		1.3.2. Der Katabolismus von Speicherlipiden als zentraler metabolischer Aspekt bei der Lebermetastasierung			
		1.3.3. Tumorsezernierte Faktoren induzieren die Bildung einer			
		metastasierungsfördernden Lebernische			
	1.4.	TIMP-1 als protumorigener Faktor			
		1.4.1. Aspekte der geschlechtsabhängigen Genexpression von TIMP-1			
	1.5.	Ziel der Arbeit			
2.	Mate	rial und Methoden	. 17		
	2.1.	Material	. 17		
		2.1.1. Chemikalien	. 17		
		2.1.2. Verbrauchsmaterialien	. 18		
		2.1.3. Geräte	. 19		
		2.1.4. Lösungen und Puffer	. 21		
		2.1.5. Primersequenzen	. 23		
		2.1.6. Antikörper	. 24		
		2.1.7. Rekombinante Proteine	. 25		
		2.1.8. Kits	. 25		
		2.1.9. Software			
	2.2.	Material und klinische Daten von Patientinnen und Patienten			
		2.2.1. Die ECIS Kohorte			
		2.2.2. Die München Kohorte			
		2.2.2.1. Gewinnung humaner Plasmaproben			
		2.2.3. Die Toronto Kohorte			
		2.2.4. Die TCGA Kohorten mit PDAC-, CRC- bzw. Melanom-Erkrankten			
		2.2.5. Kombination der PDAC-Kohorten aus München, Toronto und von TCGA			
		2.2.6. Die Bailey Kohorte			
		2.2.7. Die Moffitt Kohorte			
		2.2.8. Die Dhara Kohorte			
	2.3.	Tierexperimente			
		2.3.1. Versuchstiere			
		2.3.2. Das KPC-Mausmodell			
		2.3.3. Das Caerulein basierte Mausmodell			
		2.3.4. Testung der experimentellen Metastasierung			
	2.4	2.3.5. Probennahme von festen und flüssigen Biopsien aus Mäusen			
	2.4.	Histologische Methoden			
		2.4. I. Herstellung und T&E-Farbung von Farannischnillen	. 3/		

Inhaltsverzeichnis

		2.4.2. Evaluierung der Krankheitsprogression in KPC- und Caerulein behandelten Mäusen
		2.4.3. Färbung und Quantifizierung LacZ-markierter Tumorzellen in murinem Lebergewebe
		2.4.4. Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung von TIMP-1 in humanem Pankreasgewebe
		2.4.5. Immunhistochemische Färbung von TIMP-1 in murinem Pankreasgewebe
		2.4.6. BODIPY-Färbung und automatisierte Auswertung40
	2.5.	Methoden der Zellkultur41
		2.5.1. Verwendete Zelllinien
		2.5.2. Kultivierung der Zelllinien
		2.5.3. Stimulation von Zellen mit rekombinantem TIMP-1
		2.5.4. Proteinisolation aus Zellen
		2.5.5. Messung der zellulären Sauerstoffverbrauchsrate
	2.6.	Molekularbiologische Methoden
		2.6.1. RNA-Extraktion aus Gewebestücken
		2.6.2. RNA-Extraktion aus Zellen
		2.6.3. RNA-Konzentrationsbestimmung
		2.6.4. Reverse Transkription von RNA
		2.6.5. Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-Messung
		2.6.6. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit
		2.6.7. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse
		2.6.8. Signaling Array50
		2.6.9. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) zur Quantifizierung von humanem bzw. murinem TIMP-150
		2.6.10.Quantifizierung und Auswertung von Metaboliten in murinen Gewebeproben mittels Targeted Metabolomics
	2.7.	In silico Analysen publizierter Datensätze51
		2.7.1. Evaluierung von Transkriptomdaten (Moffitt et al., 2015) aus dem Lebermetastasengewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten
		2.7.2. Evaluierung von Transkriptomdaten (Bailey et al., 2012) aus dem Pankreastumorgewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten
		2.7.3. Evaluierung von Transkriptom- und ATAC-Sequenzierungsdaten (Dhara et al., 2021) aus humanen Pankreastumorzellen
		2.7.4. Evaluierung von Transkriptom- und ATAC-Sequenzierungsdaten (Alonso-Curbelo et al., 2021) aus murinen Pankreasepithelzellen
	2.8.	Statistische Analysen53
		2.8.1. Allgemeine Statistische Methoden
		2.8.2. Zwei-Schritt Cluster Analyse
		2.8.3. Statistische Evaluierung des Überlebens
	2.9.	Zulassung der klinischen und tierexperimentellen Studien
3.	Ergel	onisse56
	3.1.	Geschlechtsunterschiede beim Überleben und der Lebermetastasierung von Pankreaskrebs
		3.1.1. Verkürztes Gesamtüberleben bei Pankreaskrebs beim männlichen Geschlecht 56
		3.1.2. An Pankreaskrebs erkrankte Männer entwickeln häufiger und schneller Lebermetastasen als Frauen
	3.2.	Männerspezifische Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber
		3.2.1. Erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene in der Leber von Männern mit Pankreaskrebs
		3.2.2. Verstärkte Kolonisierung der Pankreaskrebs-konditionierten Leber durch metastatische Tumorzellen bei männlichen Mäusen
	3.3.	TIMP-1 als männerspezifisch hochregulierter Faktor bei Pankreaskrebs61

Inhaltsverzeichnis

		3.3.1. TIMP-1 ist der sezernierte Faktor mit der stärksten männerspezifisch erhöhten mRNA-Expression im Pankreastumor	61
		3.3.2. Die männerspezifische Hochregulation von TIMP-1 in Pankreastumorzellen ist mit	
		einer erhöhten Zugänglichkeit des Timp-1 Gens assoziiert	. 61
		3.3.3. Bei Pankreaskrebs steigen TIMP-1-Plasmaspiegel nur beim männlichen Geschlecht an	. 62
	3.4.	Die Geschlechtsunterschiede bei der Lebermetastasierung und beim Überleben von Pankreaskrebs sind TIMP-1-abhängig	. 64
		3.4.1. Die männerspezifisch erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene in der	
		Pankreaskrebs-konditionierten Leber ist TIMP-1-abhängig	. 65
		3.4.2. Die erhöhte Lebermetastasierung und das verkürzte Überleben von männlichen Mäusen mit Pankreaskrebs sind TIMP-1-abhängig	. 65
	3.5.	TIMP-1 als männerspezifischer Biomarkerkandidat	. 67
		3.5.1. Eine Untergruppe von Männern mit erhöhter TIMP-1 Expression (T1 ^{HI} Männer) verstirbt früher als alle anderen Pankreaskrebserkrankten	. 67
		3.5.2. T1 ^H Männer entwickeln früher und häufiger Lebermetastasen als alle anderen Pankreaskrebserkrankten	. 69
		3.5.3. T1 ^{HI} Männer entwickeln früher und häufiger Lebermetastasen als alle anderen Kolorektalkrebs- bzw. Melanomerkrankten	
	3.6.	Die TIMP-1-abhängige metastasierungsfördernde Lebernische weist verringerte Triacylglyzeridspiegel auf	
		3.6.1. Die Pankreaskrebs-konditionierte Leber weist eine Reduktion von Triacylglyzeriden auf	
		3.6.2. Die Reduktion der Triacylglyzeride in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber ist TIMP-1-abhängig	
	3.7.	TIMP-1 induziert den Verlust intrazellulärer Lipidspeicher durch Verstärkung der β -	. 70
		Oxidation in Hepatozyten-Zelllinien	. 78
		3.7.1. TIMP-1 reduziert intrazelluläre neutraler Lipide in HepaRG und HepG2 Zellen	. 79
		3.7.2. Die Reduktion intrazellulärer Lipidspeicher in Hepatozyten wird über eine TIMP-1-induzierte oxidative Verstoffwechselung von Fettsäuren vermittelt	. 79
	3.8.	TIMP-1 fördert den Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten durch Aktivierung des AMPK-Signalwegs	. 81
		3.8.1. TIMP-1 verstärkt die aktivierende Phosphorylierung von AMPK in HepaRG Zellen	. 81
		3.8.2. Die TIMP-1-induzierte Reduktion von Lipidspeichern in HepaRG Zellen ist AMPK-abhängig	. 82
		3.8.3. Die metastasierungsfördernde Lebernische in männlichen Mäusen weist eine TIMP-1-abhängige Erhöhung der AMPK-Phosphorylierung auf	. 82
4.	Disku	ussion	. 84
	4.1.	Die Bedeutung des biologischen Geschlechts bei der Progression von	_
	4.0	Krebserkrankungen Die geschlechtsspezifische klinische Relevanz von TIMP-1	
	4.2. 4.3.	Einfluss von TIMP-1 auf den Katabolismus von Speicherlipiden	
	4.3. 4.4.	Ausblick	
5.		dungsverzeichnis	
		llenverzeichnis	
		aturverzeichnis	
		sagung	
		ng	
٠.	9.1.	Lebenslauf	
	9.2.	Publikationsverzeichnis	

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

 α -SMA α -smooth muscle actin

Abb. Abbildung

ADM Azinär-zu-Duktale Metaplasie

AMP Adenosinmonophosphat

AMPK AMP-activated protein kinase

ATAC Assay for transposase-accessible chromatin

ATP Adenosintriphosphat

BCA Bicinchoninsäure

BHKW Benjamini-Hochberg kritischer Wert

Bp Basenpaare

BPTES Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-ethylsulfid

BSA Bovines Serumalbumin

CCK Cholecystokinin

CDKN2A Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

CONSORT Consolidated Standards of Reporting Trials

CRC Kolorektalkarzinom (engl. colorectal carcinoma)

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF Dimethylformamid
DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure dNTP Nukleosidtriphosphat

DDX3Y DEAD-box helicase 3 Y-linked

ECIS European Cancer Information System

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbant Assay

EZM Extrazelluläre Matrix

FCCP Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon

FCS Fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)

FDR False discovery rate

FFA Freie Fettsäure (engl. free fatty acid)
FPLC Fast protein liquid chromatography

g Gramm

G12D Substitution von Aspartat an Stelle 12 durch Glycin

GAP GTPase-aktivierendes Protein

Abkürzungsverzeichnis

GSEA Gene Set Enrichment Analysis

GTP Guanosintriphosphat

h Stunde

H&E Hämatoxylin-Eosin

HRP Horseradish peroxidase

HSC Hepatische Sternzellen (engl. hepatic stellate cells)

IE Insulineinheiten
IL6 Interleukin-6

KPC Kras^{+/LSL-G12D};Trp53^{+/LSL-R172H};Pdx-1^{+/Cre}

KPflC Kras+/LSL-G12D;Trp53+/fl;Ptf1a+/Cre;LSL-rtTA3-IRES-mKate2

KRAS Kirsten rat sarcoma virus

L Liter

LacZ Gen der β -Galactosidase

LSL Lox-STOP-Lox

Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

M Molar (mol/L)

mM Millimolar (mmol/L)
μΜ Mikromolar (μmol/L)

m Meter
mm Millimeter

µm Mikrometer

MDSC immunsuppressive myeloide Zellen (engl. myeloid-derived

suppressor cells)

MIF Macrophage migration inhibitory factor

 $\begin{array}{ccc} \text{min} & & \text{Minute} \\ \text{mL} & & \text{Milliliter} \\ \text{\mu L} & & \text{Mikroliter} \\ \text{\mu m} & & \text{Mikrometer} \end{array}$

MP Metalloproteinase

mRNA messenger-Ribonukleinsäure

ms Millisekunde µs Mikrosekunde

NET Neutrophil extracellular trap

ng Nanogramm
nm Nanometer
NP-40 Nonidet®P-40

PanIN pankreatische intraepitheliale Neoplasie

Abkürzungsverzeichnis

PanNET pankreatischer neuroendokriner Tumor

PBS Phosphate-buffered saline

PCR Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)

PDAC pankreatisches duktales Adenokarzinom (engl. *pancreatic ductal*

adenocarcinoma)

Pdx-1 Pancreatic and duodenal homeobox-1

pH Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PFA Paraformaldehyd

R175H bzw. R172H Substitution von Histidin an Stelle 175 bzw. 172 durch Arginin

s Sekunde

S100A4 S 100 Calcium binding protein A4

SAA Serum Amyloid A

SDF-1 Stromal-derived factor-1
SDS Natriumdodecylsulfat

SEM Standardfehler (engl. standard error of the mean)

SMAD4 SMAD family member 4
SPF Specific pathogen-free

STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3

Tab. Tabelle

TAE Tris-Essigsäure-EDTA

TAG Triacylglyzerid

TBS Tris-buffered saline

TCGA The Cancer Genome Atlas

TDSF tumorsezernierter Faktor (engl. tumor-derived secreted factor)

TEMED Tetramethylethylendiamin

TGF β Transforming growth factor β

TIMP-1 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Trp53 Tumorprotein p53
TSS Transkriptionsstart

UICC Union for International Cancer Control

VEGF Vascular endothelial growth factor

W Watt

X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

XCI X-Chromosomen-Inaktivierung

x g Vielfaches der Erdbeschleunigung

XIST X inactive specific transcript

ZPF Zentrum für präklinische Forschung

Zusammenfassung

Die Grundlagen des erhöhten Risikos von Männern im Vergleich zu Frauen für einen schweren Krankheitsverlauf bei Krebs sind bislang wenig verstanden. Die Metastasierung ist die tödlichste Erscheinungsform von Krebs, wobei die Leber das am häufigsten von Metastasen befallene Organ ist. Die äußerst effiziente Lebermetastasierung des pankreatischen duktalen Adenokarzinoms (PDAC) wird erleichtert durch Bildung einer metastasierungsfördernden hepatischen Nische, die durch tumorsezernierte Faktoren (TDSFs) wie tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) initiiert wird und durch einen verstärkten Katabolismus von Speicherlipiden gekennzeichnet ist. In dieser Arbeit wurden Geschlechtsunterschiede bei der Metastasierung und beim Überleben des PDAC, sowie deren molekulare Ursache untersucht. Hierfür wurde das Überleben und die Metastasenbildung zwischen PDAC-Patientinnen und -Patienten verglichen. Transkriptomdatensätze vom Leber- bzw. Pankreastumorgewebe von wurden Identifikation PDAC-Erkrankten zur geschlechtsabhängig exprimierter metastasierungs-fördernder Gene bzw. TDSFs untersucht. Die geschlechtsabhängige experimentelle Metastasierung in die Leber wurde in KPC-Mäusen bzw. Caerulein behandelten Mäusen analysiert. Metabolische Veränderungen im Lebergewebe gesunder und PDAC-erkrankter männlicher Mäuse wurden mit einer Metabolomics-Analyse untersucht. Der Einfluss von TIMP-1 auf die Signalaktivität bzw. den Katabolismus von Speicherlipiden von Hepatozyten wurde in humanen HepaRG- und HepG2-Zellen mittels Signaling Array bzw. mittels Oxygen Consumption Rate Assay und BODIPY-Färbung analysiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass männliche PDAC-erkrankte Patienten und Mäuse ein verkürztes eine erhöhte Lebermetastasierung und eine verstärkte Expression Überleben, metastasierungsfördernder Gene in der Leber aufweisen. TIMP-1 wurde als TDSF mit der stärksten männerspezifisch erhöhten Expression identifiziert und war für das verkürzte Überleben und die verstärkte Lebermetastasierung bei männlichen PDAC-erkrankten Mäusen verantwortlich. Darauf aufbauend wurde eine Untergruppe männlicher PDAC-, Kolorektalkarzinom- bzw. Melanom-Patienten mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln und einem erhöhten Risiko für die Lebermetastasenentwicklung identifiziert. Die PDAC-konditionierte Lebern männlicher Mäuse wiesen eine TIMP-1-abhängige Reduktion von Triacylglyzeriden assoziiert mit einer TIMP-1-abhängig erhöhten aktivierenden Phosphorylierung der adenosine monophosphateactivated protein kinase (AMPK) auf. In vitro induzierte TIMP-1 die AMPK-Phosphorylierung in Hepatozytenzelllinien, was zur Induktion der β-Oxidation und zur Reduktion intrazellulärer Speicherlipide führte. In dieser Arbeit konnten Geschlechtsunterschiede beim PDAC und mit TIMP-1 ein vielversprechender männerspezifischer Biomarkerkandidat zur Vorhersage der Lebermetastasenentwicklung identifiziert werden. Darüber hinaus eröffnet der TIMP-1/AMPKabhängige Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten neue Perspektiven der pathophysiologischen Relevanz von TIMP-1 im Kontext von Lebererkrankungen.

Abstract

The basis of the increased risk of men as compared to women for a severe course of cancer disease is so far poorly understood. Metastasis is the most fatal manifestation of cancer, whereby the liver is the organ most frequently afflicted by metastases. Exceptionally efficient liver metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is facilitated by the formation of a metastasis-promoting hepatic niche, which is initiated by tumor-derived secreted factors (TDSFs) such as tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and characterized by an increased catabolism of storage lipids. In this study, sex differences in metastasis and survival of PDAC, as well as their molecular bases were investigated. For this, survival and metastasis formation were compared between female and male PDAC patients. Transcriptome datasets from liver and pancreas tumor tissue of PDAC patients were analyzed for identification of sexdependently expressed metastasis-promoting genes and TDSFs, respectively. Sex-dependent experimental metastasis to the liver was analyzed in KPC mice as well as Caerulein-treated mice. Metabolic changes in liver tissue of healthy and PDAC-afflicted male mice were investigated by metabolomics analysis. The impact of TIMP-1 on signaling activity as well as on catabolism of storage lipids of hepatocytes was analyzed in human HepaRG and HepG2 cells by signaling array as well as by oxygen consumption rate assay and BODIPY staining, respectively. This study revealed that male PDAC-afflicted patients and mice show shortened survival, more frequent liver metastasis, and elevated hepatic metastasis-promoting gene expression. TIMP-1 was identified as TDSF with the strongest male-specifically increased expression and was responsible for shortened survival and increased liver metastasis in PDAC-afflicted male mice. Based on these findings, a subpopulation of male PDAC, colorectal carcinoma, and melanoma patients with increased TIMP-1 levels and an increased risk for liver metastasis development was identified. The PDAC-conditioned livers of male mice showed a TIMP-1-dependent reduction of triacylglycerides associated with a TIMP-1-dependently increased activating phosphorylation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK). In vitro, TIMP-1 induced AMPK phosphorylation in hepatocyte cell lines leading to induction of β oxidation and reduction of intracellular storage lipids. In this study, sex differences in PDAC and TIMP-1 as promising male-specific biomarker candidate for prediction of liver metastasis development were identified. In addition, the TIMP-1/AMPK-dependent catabolism of storage lipids in hepatocytes opens new perspectives of the pathophysiological relevance of TIMP-1 in the context of liver diseases.

1. Einleitung

1.1. Das Geschlecht als biologische Variable bei Krebs

In der personalisierten Medizin spielt das biologische Geschlecht (engl. sex), unterschieden anhand der Geschlechtschromosomen, in einigen Disziplinen wie bspw. der Kardiologie bereits heute eine bedeutende Rolle (Wagner et al., 2019). Auch in dieser Studie wird häufig auf das Geschlecht eingegangen, wobei stets das biologische Geschlecht und ausdrücklich nicht das soziale Geschlecht (engl. gender), d.h. die gewählte soziokulturelle Identität, gemeint ist. Paradoxerweise wird das biologische Geschlecht in der onkologischen Medizin und Forschung bislang wenig berücksichtigt (Wagner et al., 2019), obwohl Männer im Vergleich zu Frauen ein deutlich erhöhtes Risiko haben, an Krebs zu erkranken und daran zu versterben (Haupt et al., 2021). Der Geschlechtsunterschied beim Überleben von Krebserkrankten konnte in vielen Studien beobachtet werden (Micheli et al., 2009; Radkiewicz et al., 2017) und wurde lange Zeit nahezu ausschließlich als eine Folge unterschiedlicher Lebensgewohnheiten zwischen Frauen und Männern trivialisiert (Hermann und Krüger, 2022). Tatsächlich weisen Männer im Vergleich zu Frauen einen erhöhten Tabak- (Reitsma et al., 2017) und Alkoholkonsum (Rehm et al., 2009), sowie eine ungesündere Ernährung und damit verbunden häufiger eine Fettleibigkeit (Kelly et al., 2008) auf. Zwar sind diese Lebensgewohnheiten mit einem verkürzten Überleben bei unterschiedlichen Krebserkrankungen assoziiert (Park et al., 2006). Allerdings zeigen epidemiologische Studien, dass die Geschlechtsunterschiede beim Überleben von Krebs nicht ausschließlich durch extrinsische Parameter wie unterschiedliche Lebensgewohnheiten erklärt werden können (Micheli et al., 2009; Radkiewicz et al., 2017). Dieser Befund deutet an, dass es auch geschlechtsspezifisch exprimierte intrinsische Faktoren gibt, die die Progression von Krebs geschlechtsabhängig vorantreiben und letztlich zum schwereren Verlauf der Krebserkrankung bei Männern führen (Haupt et al., 2021).

Eine detaillierte und umfangreiche Charakterisierung der Genexpression humaner Tumoren lieferte die Erkenntnis, dass tatsächlich zahlreiche Gene unterschiedlich zwischen den Geschlechtern exprimiert werden (Yuan et al., 2016). Diese Geschlechtsunterschiede in der Genexpression scheinen auch klinisch relevant zu sein, da eine große Anzahl an Zielstrukturen von zugelassenen Medikamenten (engl. clinically actionable genes) eine geschlechtsabhängige Expression aufweisen (Yuan et al., 2016). Über diese deskriptive Analyse molekularer Geschlechtsunterschiede bei Krebs (Yuan et al., 2016) hinausgehend konnte in einzelnen weiteren Studien bereits ein funktionaler Einfluss geschlechtsspezifisch exprimierter Gene auf die Tumorprogression beschrieben werden (van Kempen et al., 2016; Hurst et al., 2017; Andricovich et al., 2018).

Als molekulare Grundlage für eine geschlechtsabhängig veränderte Genexpression im Speziellen und damit auch für Geschlechtsunterschiede bei Krebs im Allgemeinen werden vor

allem genetische und epigenetische Gegebenheiten auf den Geschlechtschromosomen angesehen (Credendino et al., 2020). Auf genetischer Ebene ist das Vorhandensein von zwei X-Chromosomen in weiblichen Zellen im Vergleich zu einem X-Chromosom in männlichen Zellen ein entscheidender Aspekt. Das Ungleichgewicht der Anzahl an X-chromosomal kodierten Genen wird zwar teilweise, aber nicht vollständig durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Zellen ausgeglichen (Brockdorff und Turner, 2015). Einige Gene können sich der X-Chromosomen-Inaktivierung (XCI) entziehen und werden dadurch sowohl vom aktiven als auch vom vermeintlich inaktiven X-Chromosom transkribiert (Tukiainen et al., 2017). Im Kontext von Krebs ist das Entziehen der XCI vor allem bei X-chromosomal kodierten Tumorsuppressorgenen relevant (Dunford et al., 2017). Auf diese Weise können weibliche Zellen vor transformierenden Auswirkungen einer Loss-Of-Function Mutation geschützt werden, was wiederum im Zusammenhang mit einer verringerten Inzidenz von Krebs bei Frauen im Vergleich zu Männern steht (Dunford et al., 2017). Daneben scheinen auch epigenetische Veränderungen, die erst vor Kurzem (Hanahan, 2022) als eine zentrale "befähigende Charakteristik" (engl. ,enabling characteristic') im Konzept der "Kennzeichen von Krebs" (engl. ,hallmarks of cancer') (Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011) anerkannt wurden, eine zentrale Rolle bei der Regulation Geschlechtsunterschieden bei Krebs zu spielen (Credendino et al., 2020). Beispielsweise deutet starke Korrelation des geschlechtsabhängig veränderten Methylierungsstatuses mit der geschlechtsspezifischen Genexpression einen wichtigen Einfluss der Epigenetik in verschiedensten Tumorarten an (Yuan et al., 2016). Damit konnten zwar bereits erste intrinsische Faktoren und Mechanismen identifiziert werden, die die Krankheitsprogression von Krebs geschlechtsspezifisch regulieren, allerdings blieb eine Translation dieser Erkenntnisse in die Klinik bislang aus.

1.2. Das Pankreaskarzinom

Das äußerst tödliche Pankreaskarzinom ist eine der Krebsarten, bei denen Männer im Vergleich zu Frauen ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf haben (Micheli *et al.*, 2009). Die außergewöhnlich hohe Letalität des Pankreaskrebses wird vor allem aus der Tatsache deutlich, dass dessen 10-Jahres-Überlebensrate in den letzten 40 Jahren durchgängig bei etwa 1 % stagnierte (Quaresma *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu stieg die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate aller Krebsarten im Allgemeinen in diesem Zeitraum von etwa 25 % auf 50 % deutlich an (Quaresma *et al.*, 2015). Aufgrund der begrenzten diagnostischen und therapeutischen Fortschritte (Neoptolemos *et al.*, 2018), sowie einer steigenden Inzidenz wird angenommen, dass Pankreaskrebs bis 2030 die zweithäufigste Todesursache im Zusammenhang mit Krebs darstellen wird (Rahib *et al.*, 2014).

Einleitung

Grundsätzlich wird beim Pankreasgewebe zwischen einem exokrinen und einem endokrinen Teil unterschieden. Der exokrine Teil des Pankreas besteht einerseits aus Azinuszellen, die verdauungsaktive Enzyme produzieren und sezernieren und andererseits aus duktalen Zellen, die diese Enzyme in den Gastrointestinaltrakt transportieren (Kleeff *et al.*, 2016). Demgegenüber produzieren und sezernieren die Zellen der Langerhans'schen Inseln des endokrinen Pankreasgewebes Hormone, die über den Blutstrom auf den gesamten Stoffwechsel des Körpers wirken (Kleeff *et al.*, 2016). Aus der zellulären Diversität des Pankreas gehen verschiedene maligne Erkrankungen hervor (Kleeff *et al.*, 2016). Insgesamt stellt mit etwa 75 % bis 80 % aller Pankreaskarzinome das pankreatische duktale Adenokarzinom (engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) den Großteil und gleichzeitig auch die tödlichste Form des Pankreaskrebses dar (Warshaw und Fernandez-del Castillo, 1992; Kleeff *et al.*, 2016). Daneben sind etwa 15 % bis 20 % der Pankreaskrebsfälle pankreatische neuroendokrine Tumore (PanNETs), die aus transformierten Zellen der Langerhans'schen Inseln hervorgehen und weniger letal sind (Kleeff *et al.*, 2016).

Ein Hauptmerkmal der Aggressivität des PDAC ist dessen hohe metastatische Effizienz, denn mehr als 80 % aller PDAC-Patientinnen und -Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen auf und können daher nur noch palliativ behandelt werden (Tamburrino *et al.*, 2014). Auch die etwa 20 % der an PDAC-Erkrankten, die zum Diagnosezeitpunkt noch keine klinisch detektierbaren Metastasen aufweisen und daher mittels chirurgischer Resektion des pankreatischen Primärtumors behandelt werden können, entwickeln mehrheitlich innerhalb kurzer Zeit Metastasen in entfernten Organen (Van den Broeck *et al.*, 2009; Groot *et al.*, 2018) und versterben daran (Hishinuma *et al.*, 2006). Das mit Abstand am häufigsten betroffene entfernte Zielorgan von PDAC-Metastasen ist die Leber, gefolgt von Peritoneum und Lunge (Van den Broeck *et al.*, 2009).

Auf genetischer Ebene wird die PDAC-Erkrankung durch Mutationen in dem Haupttreibergen Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS) (Abb. 1.1) und in drei assoziierten Kotreibergenen, nämlich Tumor Protein p53 (Trp53), SMAD Family Member 4 (SMAD4) und Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) (Abb. 1.1), dominiert (Bailey et al., 2016; Cancer Genome Atlas Research Network, 2017; Collisson et al., 2019). Eine Mutation im KRAS Protoonkogen ist in etwa 90 % aller humaner PDACs zu finden (Almoguera et al., 1988) und wird als wichtige Voraussetzung für die Initiation der pankreatischen Karzinogenese angesehen (Hingorani et al., 2003) (Abb. 1.1). Das Genprodukt des KRAS Gens ist ein GTP-bindendes Ras-Protein, das durch die Regulation zahlreicher Signaltransduktionswege eine proproliferative, promigratorische Wirkung auf Zellen besitzt (Waters und Der, 2018). Natürlicherweise wird die Aktivität des Kras Proteins durch eine GTPase-aktivierendes Protein (GAP)-vermittelte Hydrolyse von GTP negativ reguliert (Waters und Der, 2018). Durch Punktmutationen im beim PDAC mit Abstand am häufigsten betroffenen Codon 12 oder alternativ in den Codons 13 oder

61 wird das Kras Protein jedoch insensitiv für GAPs und ist somit in einer konstitutiv aktivierten Form vorhanden, was zur Transformation der Zelle führt (Waters und Der, 2018).

Neben dem KRAS Gen ist das TRP53 Gen bei bis zu 80 % der humanen PDACs am zweithäufigsten von genetischen Veränderungen betroffen (Connor et al., 2019). Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der zellulären Stressantwort eine zentrale Rolle spielt (Levine, 2020). Diese Funktion erfüllt p53, indem es die Expression von Genen, die in DNA-Reparaturmechanismen, beim Stopp des Zellzyklus, bei der Apoptose und in weiteren Signalwegen involviert sind, reguliert (Levine, 2020). Im Allgemeinen werden Mutationen im TRP53 Gen in zwei Klassen unterteilt: Kontaktmutationen betreffen Aminosäuren des p53 Proteins, die direkt an die DNA binden, wohingegen Strukturmutationen die globale Struktur der DNA-Bindungsdomäne von p53 betreffen (Olive et al., 2004). Beide Mutationsklassen haben gemeinsam, dass die p53-Bindung an regulatorische DNA-Bereiche von Zielgenen verhindert bzw. verändert wird, was letztlich auf komplexe Weise die Funktion von p53 beeinflusst (Levine, 2020). Im Gegensatz zum kompletten Verlust der p53-Expression durch eine Deletion des gesamten Gens können Punktmutationen auch eine zusätzliche, direkt onkogene Wirkung durch sogenannte "Gain-Of-Function"-Effekte besitzen (Levine, 2020). Ein Beispiel für eine onkogene Strukturmutation im humanen TRP53 Gen ist der Austausch des Arginins an Stelle 175 durch ein Histidin (Olive et al., 2004). Diese R175H-Mutation von TRP53 wurde erstmals in Patienten mit dem Li-Fraumeni Syndrom beschrieben, die eine familiäre Prädisposition für die Entwicklung von Krebs in verschiedensten Organen aufweisen (Hollstein et al., 1996). Mäuse mit einer globalen R172H-Punktmutation im Trp53-Gen (entspricht der humanen R175H-Mutation) weisen deutlich mehr Tumorbildung auf als Mäuse mit einer globalen genetischen Ablation der p53 Expression (Olive et al., 2004). Auch die pankreasspezifische p53R172H-Expression resultiert in einem aggressiveren PDAC-Phänotyp, gekennzeichnet durch eine erhöhte Metastasierung im Vergleich zur pankreasspezifischen Deletion von Trp53 (Weissmueller et al., 2014). Diese Befunde verdeutlichen das erhöhte onkogene Potential von p53-Punktmutationen im Vergleich zum einfachen Verlust der p53-Expression.

1.2.1. Das genetisch modifizierte KPC-Mausmodell

Um zentrale Mechanismen der PDAC-Progression aufklären zu können, wurden genetisch modifizierte Mausmodelle entwickelt, die die humane Erkrankung möglichst genau rekapitulieren (Westphalen und Olive, 2012). Eines der am besten etablierten Modellsysteme für die Entwicklung spontaner PDACs ist das Kras+/LSL-G12D;Trp53+/LSL-R172H;Pdx-1+/Qre (KPC)-Mausmodell (Hingorani *et al.*, 2005). KPC-Mäuse besitzen jeweils nur ein Wildtypallel von *Kras* und *Trp53* (Hingorani *et al.*, 2005). Im endogenen Genlokus des zweiten *Kras-* bzw. *Trp53*-Allels wurde die Punktmutation G12D bzw. R172H eingefügt (Hingorani *et al.*, 2003; Olive *et*

al., 2004). Zusätzlich wurde eine Lox-STOP-Lox (LSL)-Kassette eingebaut, sodass diese Allele global nicht transkribiert werden (Hingorani et al., 2003; Olive et al., 2004). Darüber hinaus weisen KPC-Mäuse die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Pancreatic and Duodenal Homeobox-1 (Pdx-1) Promotors auf (Hingorani et al., 2003). Pdx-1 wird erstmals an Tag 8 der embryonalen Entwicklung und dabei spezifisch in denjenigen Zellen des dorsalen und ventralen Endoderms exprimiert, aus denen später das differenzierte Pankreasgewebe hervorgeht (Duque et al., 2021). Dementsprechend wird während der Embryonalentwicklung von KPC-Mäusen in den Pdx-1-positiven Zellen auch die Cre-Rekombinase exprimiert, was das Herausschneiden der LSL-Kassette aus dem Genom der späteren Pankreaszellen und dadurch eine pankreasspezifische Aktivierung der onkogenen Kras^{G12D}- und Trp53^{R172H}-Allele zur Folge hat (Hingorani et al., 2005). Aufgrund dieser pankreasspezifischen Expression von Kras^{G12D} und p53^{R172H} entwickeln KPC-Mäuse ein spontanes PDAC, das zu einem höheren Maß als andere PDAC-Mausmodelle (Hingorani et al., 2003; Westphalen und Olive, 2012; Weissmueller et al., 2014) typische Kennzeichen der humanen PDAC-Erkrankung wie eine genomische Instabilität oder eine hohe metastatische Effizienz vor allem in die Leber aufweist (Hingorani et al., 2005; Weissmueller et al., 2014).

1.2.2. Das Caerulein basierte Mausmodell

Aus klinischen Daten geht hervor, dass Patientinnen und Patienten mit einer chronischen (Kirkegard et al., 2017) oder akuten (Kirkegard et al., 2018) Pankreasentzündung ein erhöhtes Risiko haben, später an Pankreaskrebs zu erkranken. Aufbauend auf diesen klinischen Befunden konnte durch Verwendung des Caerulein basierten Mausmodells gezeigt werden, dass das Auslösen einer pankreatischen Entzündung in Gegenwart einer Kras^{G12D}-Mutation tatsächlich ausreicht, um die Entwicklung von PDAC zu initiieren (Guerra et al., 2011) (Abb. 1.1). Caerulein ist ein Analogon des endogenen Hormons Cholecystokinin (CCK), das unter physiologischen Konzentrationen ähnlich wie CCK die Sekretion von Verdauungsenzymen in pankreatischen Azinuszellen fördert (Saluja et al., 2007). Die Applikation von supramaximalen Caerulein-Konzentrationen, d.h. Konzentrationen die über diejenigen mit der maximalen sekretorischen Wirkung hinaus gehen, führt jedoch zur Blockade der pankreatischen Sekretion (Saluja et al., 2007). Dies resultiert wiederum in einer Akkumulation der zunächst inaktiven Proformen verdauungsaktiver Enzyme innerhalb pankreatischer Azinuszellen, was zu einer Autoaktivierung dieser Enzyme innerhalb der Zellen und letztlich zum Zelltod der Azinuszellen führt (Saluja et al., 2007). Infolge des Zelltods werden Zytokine und Chemokine freigesetzt, die die Infiltration von Immunzellen ins Pankreasgewebe und schließlich eine Entzündung des Pankreas zur Folge haben (Saluja et al., 2007). Die entzündlichen Prozesse, die im Pankreas repetitive Injektionen supramaximaler Caerulein-Dosen ausgelöst werden, durch rekapitulieren entzündliche Bedingungen der frühen PDAC-Tumorigenese (Hruban et al.,

2008; Guerra et al., 2011). Dementsprechend wird das Caerulein basierte Mausmodell als Modellsystem für pankreatische Erkrankungen verwendet, die der PDAC-Bildung vorausgehen (Guerra et al., 2011; Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021) (**Abb. 1.1**).

1.2.3. Epigenetische Veränderungen initiieren die Tumorbildung im Pankreas

Durch Verwendung des KPC-Mausmodells für die spontane PDAC-Entwicklung und des Caerulein basierten Mausmodells zur akuten Induktion entzündlicher Pankreasläsionen wurden in den letzten Jahren Prozesse aufgeklärt, die bei der Entstehung und frühen Entwicklung des PDAC eine zentrale Rolle spielen (Guerra et al., 2011; Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021). So wurde gefunden, dass durch Schädigungen des Pankreasgewebes innerhalb kürzester Zeit epigenetische Veränderungen in pankreatischen Azinuszellen induziert werden (Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021) (Abb. 1.1). Die Veränderungen der Epigenetik hat eine veränderte zelluläre Transkription und letztlich eine Transdifferenzierung dieser Azinuszellen zur Folge (Abb. 1.1), die durch einen Verlust azinärer Differenzierungsmarker und den Erwerb eines duktalen Phänotyps gekennzeichnet ist (Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021). Dieser "Azinär-zu-Duktale Metaplasie" (ADM)-genannte Prozess wird durch eine spätere Redifferenzierung der Zellen zum azinären Phänotyp und einer damit verbundenen Regeneration des Pankreasgewebes Großteils wieder rückgängig gemacht und die Entzündung somit aufgelöst (Strobel et al., 2007) (Abb. 1.1). Allerdings führt ein einzelnes, transientes entzündliches Ereignis im Pankreas nicht zur vollständigen Regeneration des Gewebes, sondern auch zur Bildung sogenannter "Gedächtnis-Epithelzellen" (Del Poggetto et al., 2021) (Abb. 1.1). Diese Gedächtnis-Epithelzellen weisen noch lange nach der Pankreasentzündung einen veränderten epigenetischen und transkriptionelle Status auf und ermöglichen im Falle einer erneuten Pankreasentzündung eine schnellere Antwort, was wiederum eine verringerte Gewebeschädigung zur Folge hat (Del Poggetto et al., 2021). Weisen Azinuszellen jedoch zum Zeitpunkt der Pankreasschädigung bereits eine Kras-Mutation auf oder mutiert das Kras-Gen in den pankreatischen Gedächtnis-Epithelzellen nach einer Pankreasschädigung, so verändert sich die epigenetische Reprogrammierung in diesen Zellen (Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021) (Abb. 1.1). Dadurch entsteht eine anhaltende Metaplasie, die sich nicht wieder aufgelöst, sondern in die Bildung pankreatischer intraepithelialer Neoplasien (PanINs) übergeht (Kopp et al., 2012) (Abb. 1.1). PanINs sind nicht-invasive Vorläuferläsionen des PDAC (Hruban et al., 2004), die bei etwa 60 % aller Patientinnen und Patienten mit chronischer Pankreatitis und sogar bei rund 16 % aller gesunden Menschen vorkommen (Hruban et al., 2008). Durch Erwerb weiterer Mutationen und einer damit verbundenen malignen Transformation der Pankreaszellen können sich PanlNs schließlich zum letalen invasiven PDAC weiterentwickeln (Hruban et al., 2008) (**Abb. 1.1**).

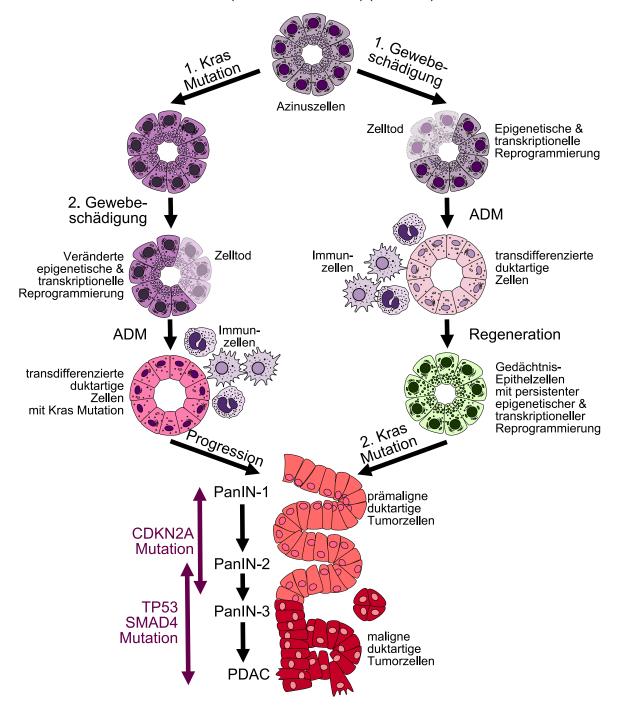


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der PDAC-Entstehung. Zwei Ereignisse werden als hinreichende des PDAC angesehen: Voraussetzungen für die Entstehung eine Kras-Mutation Pankreasgewebeschädigung. Die zeitliche Reihenfolge beider Ereignisse scheint dabei nicht relevant zu sein. Kommt es im Pankreasgewebe mit Kras-mutierten Azinuszellen zur Gewebeschädigung, so transdifferenzieren diese Zellen und es kommt zur Azinär-zu-Duktalen-Metaplasie (ADM). Diese wird jedoch nicht wieder aufgelöst, sondern entwickelt sich weiter zu pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) und nach Ansammlung weiterer Mutationen in den Kotreibergenen CDKN2A, TRP53 oder SMAD4 zum invasiven PDAC (linker Pfad). Im Gegensatz dazu führt eine Schädigung im Pankreasgewebe mit nicht-mutierten Azinuszellen zur ADM-Bildung und anschließend zur Regeneration des Gewebes (rechter Pfad). Dabei entstehen sogenannte Gedächtnis-Epithelzellen, die eine persistente epigenetische und transkriptionelle Reprogrammierung aufweisen und infolge einer späteren Kras-Mutation zur Bildung von PanINs bzw. eines invasiven PDAC führen (rechter Pfad). Die der Abbildung zugrundeliegenden Informationen wurden entnommen aus (Hruban et al., 2008; Guerra et al., 2011; Orth et al., 2019; Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021)

1.3. Lebermetastasierung als äußerst tödliche Erscheinungsform von Krebs

Die Metastasierung ist nicht nur beim PDAC sondern auch bei Krebserkrankungen im Allgemeinen die tödlichste Erscheinungsform (Steeg, 2016). Interessanterweise wird häufig ohne zugrundeliegende Daten berichtet, dass Metastasen sogar bei 90 % aller Krebsassoziierten Todesfälle eine kausale Rolle spielen (Mehlen und Puisieux, 2006). Eine genauere Auswertung klinischer Daten zeigt jedoch, dass die Metastasenbildung bei etwa immer noch beim Großteil aller Krebspatientinnen damit -patienten den Grund für das Versterben darstellt (Dillekas et al., 2019). Über alle Krebsarten hinweg ist die Leber das mit Abstand am häufigsten von Metastasen befallene Organ, gefolgt von Lymphknoten und Lunge (Budczies et al., 2015). Aus klinischer Sicht sind die meisten Lebermetastasen auf gastrointestinale Tumore wie Pankreas- und Kolorektalkrebs (engl. colorectal carcinoma, CRC) zurückzuführen (de Ridder et al., 2016). Aber auch Krebsarten von gänzlich anderem Ursprung, wie etwa das Melanom der Haut, metastasieren häufig in die Leber (de Ridder et al., 2016). Insgesamt weisen etwa die Hälfte aller Krebserkrankten entweder bereits zum Zeitpunkt der Krebsdiagnose Lebermetastasen auf oder sie entwickeln Lebermetastasen im Verlauf der Erkrankung (Tsilimigras et al., 2021).

Im Allgemeinen ist das Auftreten von Lebermetastasen mit einem substantiellen Rückgang der Überlebensrate und einer deutlich reduzierten Lebensqualität assoziiert (Li et al., 2021). Trotz dieser enormen klinischen Relevanz von Lebermetastasen sind die Therapieoptionen und deren Erfolgsaussichten immer noch sehr stark begrenzt (Tsilimigras et al., 2021). Die chirurgische Entfernung stellt die erfolgversprechendste, potentiell heilende Behandlung bei denjenigen Patientinnen und Patienten dar, die resezierbare Lebermetastasen aufweisen (Tsilimigras et al., 2021). Allerdings ist die klinische Indikation für eine Resektion von Lebermetastasen komplex und abhängig vom Tumorkontext (Tsilimigras et al., 2021). So ist die chirurgische Behandlung von Lebermetastasen, die von CRC oder neuroendokrinen Tumoren wie PanNETs abstammen, mit einer verbesserten Prognose assoziiert (Tsilimigras et al., 2021). Demgegenüber ist die Resektion von Lebermetastasen von anderen Primärtumoren, wie PDAC oder Melanom, sogar mit einer verschlechterten Langzeitprognose assoziiert (Tsilimigras et al., 2021). Insgesamt konnten die Behandlungsoptionen von Lebermetastasen durch erste erfolgreiche klinische Studien mit systemischen Therapien, Medikamenten oder neuen biologischen (z.B. Bevacizumab Cetuximab) oder Immuntherapeutika in den letzten Jahren zwar revolutioniert werden (Tsilimigras et al., 2021). Dennoch ist bislang vor allem die frühe Detektion bzw. das Vorhersagen der Entwicklung von Lebermetastasen schwierig. Eine frühzeitige Diagnose würde die Implementierung einer effektiven und gezielten Behandlung ermöglichen, die die Entwicklung von Lebermetastasen von Beginn an verlangsamt oder gänzlich verhindert (Tsilimigras et al., 2021).

Die außerordentlich effiziente Kolonisierung der Leber durch metastatische Tumorzellen ist auf vielfältige Ursachen zurückzuführen. Einerseits spielt dabei die einzigartige anatomische Lage der Leber eine wichtige Rolle (Tsilimigras et al., 2021). Die Leber wird in hohem Maße mit Blut aus dem Gastrointestinaltrakt versorgt. Dadurch erreichen Tumorzellen, die von gastrointestinalen Tumoren wie PDACs oder CRCs ausgehend in die Blutbahn gelangen, auf direktem Wege die Leber (Tsilimigras et al., 2021). Außerdem fördert auch die spezielle endotheliale Mikroarchitektur der Leber die Metastasierung, da Tumorzellen in den engen sinusoidalen Blutgefäßen innerhalb des Lebergewebes mechanisch abgefangen werden und arretieren (Tsilimigras et al., 2021). Darüber hinaus ist die Mikroumgebung der Leber grundsätzlich immunsuppressiv polarisiert (Li et al., 2021). Da das Organ konstant mit Pathogenen und pathogenassoziierten molekularen Strukturen aus dem Darm in Kontakt kommt, wird durch die immunsuppressive Mikroumgebung natürlicherweise eine chronische Entzündung in der Leber verhindert (Li et al., 2021). Im Kontext der Metastasierung ist diese immunsuppressive Umgebung jedoch förderlich für das Auswachsen von Tumorzellen, da eine effiziente Anti-Tumor Immunantwort unterdrückt wird (Li et al., 2021).

1.3.1. Zelluläre Aspekte der metastasierungsfördernden Nische in der Leber

Die anatomische Lage, die endotheliale Mikroarchitektur und die immunsuppressive Umgebung sind einzigartige physiologische Gegebenheiten der Leber, die dieses Organ für eine Kolonisierung durch Tumorzellen natürlicherweise prädisponieren (Li *et al.*, 2021). Zusätzlich dazu begünstigt die Bildung einer sogenannten metastasierungsfördernden Nische die Lebermetastasierung (Li *et al.*, 2021; Tsilimigras *et al.*, 2021). Dabei konditionieren krebsassoziierte Prozesse oder sogar der Krebsentwicklung vorausgehende entzündliche Prozesse die Leber und führen so zu Veränderungen im Lebergewebe, die vorteilhaft für die Metastasenentwicklung sind (Peinado *et al.*, 2017).

Auf zellulärer Ebene spielen dabei die Hepatozyten eine zentrale Rolle, da sie die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber initiieren und orchestrieren (Lee et al., 2019). Bereits in frühen Stadien der PDAC-Entwicklung kommt es in Hepatozyten zur inflammatorischen Antwort, die vor allem durch eine erhöhte Expression von Serum Amyloid A 1 (SAA1) und SAA2 gekennzeichnet ist (Lee et al., 2019) (Abb. 1.2). Im Gegensatz zum Pseudogen SAA3, dem bislang keine biologische Rolle zugeordnet werden konnte und dem konstitutiv und eher ubiquitär exprimierten SAA4, werden SAA1 und SAA2 während der akuten Phase Antwort exprimiert und freigesetzt (Lee und Beatty, 2021). Da SAA1 und SAA2 chemoattraktiv auf Monozyten wirken (Badolato et al., 1994), kommt es infolge der SAA1/2 Hochregulation beim PDAC zur erhöhten Infiltration von Immunzellen in die Leber (Lee et al., 2019).

Tatsächlich ist die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der PDACkonditionierten Leber entscheidend von der Rekrutierung myeloider Zellen abhängig (Costa-Silva et al., 2015; Nielsen et al., 2016) (Abb. 1.2). Auf Genexpressionsebene sind diese myeloiden Zellen, die in der Leber zu CD68-positiven Makrophagen differenzieren, durch Expression des myeloiden Zellmarkers CD11b und des Entzündungsmarkers S100A4 gekennzeichnet (Österreicher et al., 2011; Nielsen et al., 2016). Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte hepatische SAA-Expression zur Mobilisierung und erhöhten Akkumulation immunsuppressiver myeloider Zellen (engl. myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) in der Leber führt (Sander et al., 2010). MDSCs sind gekennzeichnet durch Expression der Marker CD11b und Ly6G bei der Maus (Sander et al., 2010) bzw. CD11b, CD14 und CD33 beim Menschen (Lin et al., 2019) (Abb. 1.2). Tatsächlich sind erhöhte Zahlen von MDSCs in der Leber von CRC-Patienten assoziiert mit einer verringerten T-Zellproliferation, einem verstärkten Wachstum von Lebermetastasen und einer schlechten Prognose (Lin et al., 2019). Diese Befunde deuten an, dass vor allem immunsuppressive myeloide Zellen im Kontext der metastasierungsfördernden Nische in der Leber eine entscheidende Rolle spielen.

Neben der erhöhten Infiltration von Immunzellen kommt es infolge der erhöhten SAA1/2-Expression durch Hepatozyten in der PDAC-konditionierten Leber auch zur Fibrose (Lee et al., 2019). Dies ist im Einklang mit dem Befund, dass SAA Proteine hepatische Sternzellen (engl. hepatic stellate cells, HSCs) aktivieren (Siegmund et al., 2016), die wiederum die fibrotische Antwort in der Leber orchestrieren (Tsilimigras et al., 2021) (Abb. 1.2). Aktivierte HSCs haben einen Myofibroblasten-artigen Phänotyp, sind gekennzeichnet durch die Expression des Markers α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) und produzieren verschiedenste Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) (Tsilimigras et al., 2021). Neben dieser EZMmodulierenden Funktion exprimieren aktivierte HSCs auch Zytokine und Chemokine, die sich auf die Effizienz der Lebermetastasierung auswirken können. Beispielsweise führt die erhöhte Expression von Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) durch HSCs (Grünwald et al., 2016) im Kontext der metastasierungsfördernden Lebernische zur verstärkten Rekrutierung von prometastatischen Neutrophilen Granulozyten (Seubert et al., 2015) (Abb. 1.2). Außerdem können aktivierte HSCs über Sekretion von SDF-1 (Correia et al., 2021) oder von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Lenk et al., 2017) auch direkt die Proliferation von Tumorzellen in der Leber fördern (Abb. 1.2).

Insgesamt führt die Hochregulation der SAA1/2-Expression in Hepatozyten während früher Stadien der PDAC-Entwicklung auf zellulärer Ebene also einerseits zu einer inflammatorischen Reprogrammierung der Leber, die vor allem durch eine verstärkte Rekrutierung von Immunzellen gekennzeichnet ist und andererseits zu fibrotischen Prozessen, die über eine Aktivierung von HSCs vermittelt wird (Lee et al., 2019).

1.3.2. Der Katabolismus von Speicherlipiden als zentraler metabolischer Aspekt bei der Lebermetastasierung

Neben diesen Veränderungen auf zellulärer Ebene bzw. auf Genexpressionsebene wird die Lebermetastasierung auch durch metabolische Veränderungen beeinflusst (Li et al., 2021). Auch hierbei spielen vor allem Hepatozyten, die etwa 60 % der gesamten Zellzahl und 80 % des Gesamtvolumens der Leber ausmachen (Vekemans und Braet, 2005), eine Schlüsselrolle. Im Zusammenhang mit in der Leber angesiedelten Brustkrebs- bzw. Melanom-Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass diese in den umliegende Hepatozyten einen verstärkten Katabolismus von Triacylglyzeriden (TAGs) induzieren (Li et al., 2020). Die dabei entstehenden freien Fettsäuren werden von den Hepatozyten sezerniert (Abb. 1.2) und von den Tumorzellen aufgenommen (Li et al., 2020). Die Tumorzellen metabolisieren diese Fettsäuren anschließend, um daraus Energie für das Tumorwachstum zu generieren (Li et al., 2020) (Abb. 1.2). Tatsächlich ist eine Untergruppe von Krebsstammzellen, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von Lipidmetabolismusgenen und speziell des Fettsäurerezeptors CD36, einzigartig in ihrer Fähigkeit, die Metastasenbildung zu initiieren (Pascual et al., 2017). Neben der Bereitstellung von Energiequellen für Tumorzellen kann ein veränderter Lipidmetabolismus in Wirtszellen die Metastasierung außerdem beeinflussen, indem die Anti-Tumor Immunantwort gestört wird (Martin-Perez et al., 2021). Diese Befunde deuten an, dass vor allem dem Katabolismus von Speicherlipiden eine Schlüsselrolle bei der metastatischen Kolonisierung von entfernten Organen zukommt und Veränderungen in diesen Bereichen des Lipidmetabolismus maßgeblich die Metastasierung beeinflussen können (Li und Kang, 2017). Über welche tumorsezernierten Faktoren bzw. welchen intrazellulären Mechanismus ein verstärkter Abbau von TAGs in Hepatozyten im Kontext der Lebermetastasierung reguliert wird (Li et al., 2020), ist bislang jedoch unbekannt.

Ein zentraler Regulator des Katabolismus von Speicherlipiden ist die *Adenosine Monophosphate (AMP)-Activated Protein Kinase* (AMPK) (Herzig und Shaw, 2018). Im Allgemeinen ist eine Veränderung des zellulären Energiehaushalts gekennzeichnet durch ein verändertes Verhältnis von Adenosintriphosphat (ATP) zu AMP. AMPK wirkt als zellulärer Sensor dieses Energiegleichgewichts, indem AMP, das bei geringer Verfügbarkeit an Energiequellen in der Zelle akkumuliert, direkt an eine AMPK Untereinheit bindet (Herzig und Shaw, 2018). Die Bindung von AMP fördert die aktivierende Phosphorylierung an Threonin 172 von AMPK und führt dadurch direkt zur verstärkten AMPK-Aktivität (Herzig und Shaw, 2018). Die aktivierte AMPK phosphoryliert wiederum spezifische Enzyme des Energiestoffwechsels und führt so zur Reprogrammierung des zellulären Metabolismus vom Anabolismus hin zum Katabolismus (Herzig und Shaw, 2018). Im Speziellen wird infolge der AMPK-Aktivierung beispielsweise die Synthese von Lipiden gehemmt, wohingegen die TAGs aus intrazellulären Fettspeichern durch Lipolyse mobilisiert werden (Herzig und Shaw, 2018).

Die entstehenden freien Fettsäuren werden über eine erhöhte mitochondriale β-Oxidation unter Sauerstoffverbrauch in ATP umgewandelt (Herzig und Shaw, 2018). Im Zusammenhang mit der Leber konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von AMPK in Hepatozyten eine Akkumulation von Lipiden im Lebergewebe durch Hemmung der Lipogenese und simultaner Stimulation der Fettsäureoxidation verhindert (Li *et al.*, 2011; Woods *et al.*, 2017; Boudaba *et al.*, 2018). Daher werden AMPK-Aktivatoren auch als vielversprechende Behandlungsoption zum Schutz vor Fettlebererkrankungen angesehen (Boudaba *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2019). Ob es im Verlauf der Bildung einer PDAC-induzierten metastasierungsfördernden Lebernische zur Veränderung der AMPK-Aktivität und einer damit verbundenen metabolischen Reprogrammierung in Hepatozyten kommt, ist bislang nicht bekannt.

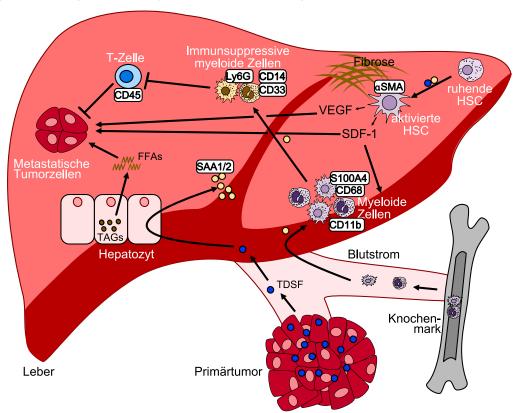


Abbildung 1.2: Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der tumorkonditionierten Leber. Primärtumorsezernierte Faktoren (TDSFs) gelangen über den Blutstrom in die Leber und wirken dort auf verschiedenste Weise, sodass das Lebergewebe empfänglicher für eine Kolonisierung durch metastatische Tumorzellen wird. Als zentrales initiales Ereignis wird die erhöhte Expression der proinflammatorischen Mediatoren SAA1/2 durch Hepatozyten angesehen. SAA1/2, aber auch TDSFs wie bspw. TIMP-1 können ruhende hepatische Sternzellen (HSCs) aktivieren, wodurch diese zu Myofibroblasten-artigen Zellen transdifferenzieren, die durch eine (EZM)-Proteine, weshalb es zur Fibrose in der Leber kommt. Außerdem können aktivierte HSCs Zykokine wie SDF-1 oder VEGF sezernieren, die direkt das Wachstum von Tumorzellen in der Leber fördern. Daneben wirken SDF-1 bzw. SAA1/2 chemoattraktiv auf myeloide Zellen, sodass es zur erhöhten Infiltration dieser aus dem Knochenmark stammenden und durch Expression der Marker S100A4, CD68 bzw. CD11b charakterisierten Zellen in die Leber kommt. Myeloide Zellen können wiederum in Gegenwart von SAA1/2 einen immunsuppressiven und durch Expression des murinen Ly6G-Markers bzw. der humanen CD14/CD33-Marker charakterisierten Phänotyp erwerben. Immunsuppressive myeloide Zellen (MDSCs) hemmen die z.B. durch CD45-positive T-Zellen vermittelte Anti-Tumor-Immunantwort, wodurch die Lebermetastasierung begünstigt wird. Daneben können Hepatozyten über eine verstärkte Hydrolyse von Triacylglyzeriden (TAGs) und Sekretion entstehender freier Fettsäuren (FFAs) wichtige Energiequellen für metastatische Tumorzellen zur Verfügung stellen und somit die Lebermetastasierung auf metabolischer Ebene fördern. Die der Abbildung zugrundeliegenden Informationen wurden entnommen aus (Sander et al., 2010; Costa-Silva et al., 2015; Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016; Nielsen et al., 2016; Siegmund et al., 2016; Lenk et al., 2017; Lee et al., 2019; Lin et al., 2019; Li et al., 2020; Correia et al., 2021)

1.3.3. Tumorsezernierte Faktoren induzieren die Bildung einer metastasierungsfördernden Lebernische

Auf molekularer Ebene induzieren Faktoren, die vom Primärtumor sezerniert werden und über die Blutbahn auf entfernte Organe wirken, die Bildung von metastasierungsfördernden Nischen (Krüger, 2015; Peinado et al., 2017). Diese tumorsezernierten Faktoren (engl. tumorderived secreted factors, TDSFs) können Exosomen oder spezifische Proteine sein und bestimmen durch Wirkung auf definierte Organe maßgeblich den Organotropismus der Metastasierung (Hoshino et al., 2015). Bei tumorsezernierten Exosomen bestimmt das Integrinmuster auf deren Oberfläche die organspezifische Bildung metastasierungsfördernden Nische (Hoshino et al., 2015). So sind die exosomalen Integrine $\alpha_6\beta_4$ bzw. $\alpha_6\beta_1$ mit einer verstärkten Metastasierung in die Lunge assoziiert, wohingegen Exosomen mit den Integrinen α_νβ₅ die Lebermetastasierung fördern können (Hoshino *et al.*, 2015). Neben Exosomen können auch bestimmte durch den Primärtumor sezernierte Proteine organspezifische metastasierungsfördernde Nischen induzieren. Im Kontext von PDAC konnten bislang nur wenige Proteine identifiziert werden, die die Lebermetastasierung durch Bildung einer prometastatischen hepatischen Nische fördern. Eines dieser Proteine ist der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), der in hepatischen Kupfferzellen eine verstärkte Sekretion des *Transforming Growth Factor* β (TGF β) verursacht (Costa-Silva et al., 2015). TGFB führt wiederum zur Aktivierung von HSCs, die eine Fibrose und eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen in die Leber initiieren, was letztlich in einer verstärkten Lebermetastasierung resultiert (Costa-Silva et al., 2015). Neben MIF konnte auch Interleukin-6 (IL6) als vom PDAC sezerniertes Protein identifiziert werden, das die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber induziert (Lee et al., 2019). IL6 wirkt dabei direkt auf Hepatozyten und vermittelt über eine erhöhte intrazelluläre Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)-Signalaktivität die Hochregulation der SAA1- und SAA2-Expression, was wiederum zu fibrotischen Prozessen und einer erhöhten Immunzellrekrutierung in die Leber führt (Lee et al., 2019). Als weiterer TDSF konnte Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) identifiziert werden, das in der Leber HSCs über Interaktion mit dem Rezeptor CD63 aktiviert (Grünwald et al., 2016). Neben einer verstärkten Fibrose hat die TIMP-1/CD63-vermittelte HSC-Aktivierung eine erhöhte SDF-1-Expression (Grünwald et al., 2016) und dadurch eine verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Leber (Seubert et al., 2015) zur Folge, was wiederum in einer metastasierungsfördernden Lebernische resultiert (Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Es ist hervorzuheben, dass TIMP-1 spezifisch die Metastasierung in die Leber, aber beispielsweise nicht in die Lunge fördert (Seubert et al., 2015). Dadurch kann TIMP-1 den metastatischen Organotropismus maßgeblich in Richtung der Lebermetastasierung lenken.

1.4. TIMP-1 als protumorigener Faktor

TIMP-1 ist ein sezerniertes Protein, das einerseits als endogener Hemmer von Metalloproteinasen (MPs) und andererseits als zytokinisches Molekül über Bindung an Rezeptoren wie CD63 (Jung et al., 2006) oder CD74 (Schoeps et al., 2021a) und Aktivierung intrazellulärer Signalwege auf vielfältige Weise auf Zellen wirken kann (Grünwald et al., 2019). Nach der Entdeckung von TIMP-1 aufgrund der namensgebenden antiproteolytischen Funktion als erstes von vier Mitgliedern der TIMP-Familie (Cawston et al., 1981) wurde zunächst vor allem dessen regulatorische Rolle beim MP-modulierten Umbau der EZM (Löffek et al., 2011) untersucht (Brew et al., 2000). Da MPs im Kontext von Krebs die Absiedelung von Tumorzellen durch Abbau von EZM-Proteinen fördern können (Deryugina und Quigley, 2006), wurde zunächst angenommen, dass das MP-hemmende TIMP-1 eine antimetastatische Aktivität besitzen würde (Schultz et al., 1988). Tatsächlich wurde allerdings gefunden, dass TIMP-1 als MP-Inhibitor die Spaltung der Tyrosinrezeptorkinase cMET auf Tumorzellen hemmt (Kopitz et al., 2007; Schelter et al., 2011). Dies führt zur Akkumulation von cMET auf der Zelloberfläche und resultiert in einer Aktivierung der intrazellulären cMET-Signalaktivität, was letztlich invasive und prometastatische phänotypische Veränderungen in den Tumorzellen zur Folge hat (Kopitz et al., 2007; Schelter et al., 2011). Im Laufe der Jahre konnte darauf aufbauend weiter aufgeklärt werden, dass TIMP-1 neben der MP-inhibitorische Funktion auch über rezeptorvermittelte Signalaktivität das Tumorwachstum und die Metastasierung fördern kann. Beispielsweise resultiert die Interaktion von TIMP-1 mit dem Rezeptor CD63 auf der Oberfläche von Tumorzellen in der Aktivierung intrazellulärer Signalwege, welche wiederum deren Überleben, Proliferation und Migration fördern (D'Angelo et al., 2014; Ando et al., 2017; Forte et al., 2017) bzw. die Angiogenese unterstützen (Cui et al., 2015). Über Tumorzellen hinaus kann TIMP-1 durch CD63-vermittelte Signalaktivität auch auf Wirtszellen wie HSCs (Park et al., 2015; Grünwald et al., 2016) und die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber induzieren (Grünwald et al., 2016). Diese protumorigenen und prometastatischen Funktionen von TIMP-1 sind im Einklang mit klinischen Befunden, nach denen erhöhte Spiegel von TIMP-1 im Tumorgewebe oder im Blut in so gut wie jeder Krebserkrankung mit einer schlechteren Prognose der Erkrankten assoziiert sind (Eckfeld et al., 2019). Insgesamt wirkt TIMP-1 also auf pleiotrope Weise auf Tumor- bzw. Wirtszellen und treibt so die Progression von Krebserkrankungen voran, was nicht zuletzt auch von klinischer Relevanz zu sein scheint.

1.4.1. Aspekte der geschlechtsabhängigen Genexpression von TIMP-1

Im Gegensatz zu *TIMP-2*, -3 und -4 ist das *TIMP-1* Gen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf dem Geschlechtschromosom X kodiert (Jackson *et al.*, 2017). Dementsprechend

Einleitung

weisen weiblichen Zellen zwei Allele und männliche Zellen nur ein Allel des TIMP-1 Gens auf. Wie die meisten anderen X-chromosomal kodierten Gene ist auch das TIMP-1 Gen von der XCI betroffen und wird vom inaktivierten X-Chromosom im Allgemeinen nur schwach exprimiert (Brown et al., 1990). Allerdings konnte bereits früh gefunden werden, dass sich das TIMP-1 Gen teilweise der XCI entziehen und dadurch sowohl vom aktiven, als auch vom inaktiven X-Chromosom transkribiert werden kann (Brown et al., 1997; Anderson und Brown, 1999; Anderson und Brown, 2002; Anderson und Brown, 2005). In einer aktuellen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass das TIMP-1 Gen im Vergleich zu allen anderen Xchromosomal kodierten Genen ein einzigartiges Expressionsmuster in weiblichen humanen Zellen aufweist: TIMP-1 wird ausschließlich in einem Teil der weiblichen Zellen gleichzeitig vom aktiven und vom inaktiven X-Chromosom transkribiert, wohingegen alle anderen weiblichen Zellen lediglich eine Transkription vom aktiven X-Chromosom aufweisen (Tukiainen et al., 2017). Diese Variabilität im Entziehen der Inaktivierung des TIMP-1 Gens zwischen einzelnen Zellen trifft auf kein anderes X-chromosomales Gen zu (Tukiainen et al., 2017). Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass die unterschiedliche Anzahl aktiver TIMP-1 Allele zwischen weiblichen und männlichen Zellen eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Expression von TIMP-1 bedingen könnte.

1.5. Ziel der Arbeit

Aufbauend auf den klinischen Befunden, dass Männer im Vergleich zu Frauen ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf bei Krebserkrankungen haben und dass die Metastasierung der Hauptgrund für das Versterben von Krebspatientinnen und -patienten ist, sollten in dieser Arbeit mögliche Geschlechtsunterschiede beim Verlauf der letalen Pankreaskrebserkrankung untersucht und deren molekulare Grundlagen aufgeklärt werden. Zunächst sollten Geschlechtsunterschiede beim Gesamtüberleben und bei der organspezifischen Metastasierung des Pankreaskrebses durch Auswertung von klinischen Patientendaten identifiziert werden. Diese patientenorientierten Untersuchungen sollten komplementiert Verwendung von Mausmodellen werden durch für maligne bzw. prämaligne Pankreaserkrankungen (KPC bzw. Caerulein basiertes Mausmodell), um Lebensgewohnheiten (Tabak-, Alkoholkonsum, Ernährung) als mögliche Grundlage der Geschlechtsunterschiede auszuschließen. Die geschlechtsspezifische Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber sollte einerseits durch Analyse von Genexpressionsunterschieden im Lebergewebe von Pankreaskrebs-Patientinnen -Patienten bzw. von weiblichen und männlichen KPC-Mäusen untersucht werden, sowie andererseits mittels experimenteller Metastasierung in den murinen Modellsystemen weiter bekräftigt werden. Derjenige Lebensstil-unabhängige, intrinsische Faktor, der für die Geschlechtsunterschiede beim Überleben und bei der Metastasierung des Pankreaskrebses verantwortlich ist, sollte durch Auswertung von Transkriptomdaten aus Primärtumoren von Pankreaskrebs-Patientinnen und -Patienten identifiziert und durch Untersuchung der Lebermetastasierung bzw. des Gesamtüberlebens bei KPC-Mäusen in Abhängigkeit einer genetischen Ablation des entsprechenden Zielgens funktional validiert werden. Darauf aufbauend sollten Pankreaskrebs-, Kolorektalkrebs- und Melanom-Patientinnen und -Patienten in Untergruppen mit niedrigen bzw. hohen Spiegeln des Kandidatenfaktors eingeteilt und deren Gesamtüberleben sowie deren Lebermetastasenentwicklung verglichen werden, um eine Translation der Erkenntnisse in die klinische Praxis zu erreichen und die Eignung des Kandidatenfaktors als klinisch relevanter Biomarker zu evaluieren. Metabolische Veränderungen in der männerspezifischen metastasierungsfördernden Lebernische sollten mithilfe einer Metabolomics-Analyse des Lebergewebes von gesunden bzw. Pankreaskrebserkrankten KPC-Männchen untersucht werden. Abschließend sollten die HepaRG und HepG2 Zelllinien als in vitro Modellsysteme für humane Hepatozyten verwendet und mittels BODIPY Färbung, Oxygen Consumption Rate Assays und Signaling Arrays kausale Zusammenhänge zwischen der Aktivierung intrazellulärer Signalwege und dem Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten hergestellt werden.

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz, Land
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Absolve	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
BODIPY [™] 493/503	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
thiadiazol-2-yl)ethylsulfid (BPTES,	
Glutaminaseinhibitor)	
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-b-D	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
galactopyranosid (X-Gal)	
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Caerulein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Compound C (Dorsomorphin, 2HCI)	Selleck Chemicals, München, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix (100mM, 25x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Ethanol abs. (≥ 99,9 %)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (37 % (m/v))	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glutaraldehyd (50 % (m/v))	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin (≥ 99,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin (≥ 99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (III) (K ₃ Fe(CN) ₆)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat $(K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O)$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Magnesiumchlorid (MgCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
N,N,N',N'	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nonidet® P-40 (NP-40)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder (Proteinleiter)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PeqGreen Farbstoff	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V (50x)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Pierce [™] ECL Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Acrylamid-Lösung (40 %, Polyacrylamid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Inhibitorcoktail Plus (Proteaseinhibitor,	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
100x)	
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Roti-Mount FluorCare (Eindeckmedium)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RT Random Primers	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
RT Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
SYBR Green	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SYPRO Ruby Protein-Blot Färbemittel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
UK5099 (MPC Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure (Citrit Acid)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Firmensitz, Land
Alufolie	Fora, Radolfzell, Deutschland
Biosphere Filter Tips (0,5-20 μ L,	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
2-20 μ L, 2-200 μ L, 1250 μ L)	
Deckgläser rund (12mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen,
	Deutschland
Deckgläser (24 x 50mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Entsorgungsbeutel	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Filter (0,22 µm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Sterican Kanülen (20 G, 27 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
Objektträger (Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Adhesion Microscope Slides)	
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Zellkulturplatten (6-well, 24-well,	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
96-well)	
PCR Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2,0	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
mL)	
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen,
	Deutschland
Schraubgefäße	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten (2, 5, 10,	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen,
25, 50 mL)	Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Spritzen (1 mL, 2 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Verschlussfolie für 96-well	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Platten (Highly-Transparent	
Sealing Films)	
Zellschaber (Cell Scraper M)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zirconiumsilicatkügelchen	BioSpec Products, Inc., Bartlesville, USA
(10mm)	

2.1.3. Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Geräte.

Art des Geräts	Exakte Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Blotting System	Trans-Blot® Turbo	Bio-Rad Laboratories, München,
	Transfer System	Deutschland
Durchlichtmikroskop	Olympus SZX12 A	Olympus, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese-	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, München,
Netzgerät		Deutschland
ELISA Waschgerät	MODEL 1575	Bio-Rad Laboratories, München,
	ImmunoWash	Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager M2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,
		Deutschland
Gel/Membran-Doku-	ChemiDoc [™] Imaging	Bio-Rad Laboratories, München,
mentationsgerät	System	Deutschland
Gelkammer mit	Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, München,
Zubehör		Deutschland
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,
		Deutschland
Mikrowelle	HF66020	Siemens, München, Deutschland
Minibeadbeater	Minibeadbeater 1	BioSpec Products, Inc., Bartlesville,
		USA
Nanodrop	NanoDrop One C	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm,
		Deutschland
PCR Cycler	Mastercycler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,
		Deutschland
Real-Time PCR Gerät	StepOnePlus Real-Time	Thermo Fisher Scientific, Inc., Ulm,
	PCR System	Deutschland
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus Sepatech, Düsseldorf,
		Deutschland
Tecan Reader	TECAN Spark 10M Plate	Tecan Trading AG, Männedorf,
	Reader	Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,
		Deutschland
Ultraschall Wasserbad	Sonorex Dogotec	BANDELIN Electronic GmbH & Co.
	MOONELL	KG, Berlin, Deutschland
Vortex	MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen,
		Deutschland

Waage	LSM 2000	PCE Instruments, Meschede,	
		Deutschland	
Wasserbad	WNB 14	Memmert GmbH, Schwabach,	
		Deutschland	
Zellkultur-Inkubator	HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific, Inc., Ulm,	
		Deutschland	
Scanner für	Aperio AT2	Leica Biosystems, Wetzlar,	
Mikroskop-		Deutschland	
Objektträger			
Scanner für Signaling	GenePix 4100 A	Molecular Devices, Sunnyvale,	
Array		Kalifornien, USA	

2.1.4. Lösungen und Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) verdünnt.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer.

Verwendung	Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
BODIPY-Färbung	Paraformaldehyd (PFA)-	3 % (v/v) PFA in PBS	
	Fixierlösung		
	BODIPY/DAPI-	1 μg/mL BODIPY 493/503	
	Arbeitslösung	0,05 mg/mL DAPI	
		in PBS	
Caerulein-Inokulation	Dulbecco's Phosphate-	Sigma-Aldrich, Deisenhofen,	
	Buffered Saline (PBS)	Deutschland	
	Caerulein-Lösung	10 μg/mL (m/v) Caerulein in PBS	
Immunhistochemie	Zitratpuffer	0,01 M Zitrat, pH-Wert auf 6,0	
		eingestellt	
	H ₂ O ₂ -Lösung	3 % (v/v) H ₂ O ₂	
Präparation von	Fixierlösung für Organe	2 % (v/v) Formaldehyd in PBS	
murinem Gewebe			

Proteinaufarbeitung	Protein-Extraktionspuffer (RIPA)	50 mM Tris/HCI (pH 7,4) 150 mM NaCI 0,25 % SDS 1,0 % NP-40 1 mM EDTA Proteaseinhibitor (1x) Phosphataseinhibitor (1x)
RNA-Aufarbeitung	RNA-Ladepuffer	0,5 % (m/v) Bromphenolblau 20 mM H ₂ O ₂ 20 % (v/v) Glyzerin
	TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
SDS-PAGE	SDS-Tenngelpuffer	12,5 % (v/v) Polyacrylamid 0,1 % (v/v) SDS 375 mM Tris 0,0575 % (m/v) APS 0,0015 % (v/v) TEMED pH-Wert auf 8,6 eingestellt
	SDS-Sammelgelpuffer	5 % (v/v) Polyacrylamid 125 mM Tris 0,1 % (m/v) APS 0,001 % TEMED pH-Wert auf 6,8 eingestellt
	Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192mM Glycin 1 % (m/v) SDS
	Laemmli-Puffer (5x)	0,2 M (m/v) Tris 0,03 % (m/v) SDS 0,07 % (m/v) Glyzerin 0,002 % (m/v) Bromphenolblau 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Western Blot	Tris-Buffered Saline (TBS)	500 mM Tris 1,5 M NaCl pH-Wert auf 7,6 eingestellt	
	TBS-Tween (TBS-T)	0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS	
	Blocklösung	5 % (m/v) BSA in TBS-T	
	Blotting-Puffer	80 % (v/v) Elektrophoresepuffer 20 % (v/v) Methanol	
X-Gal Färbung von	GA-Fixierlösung für	2 % (v/v) Formaldehyd	
Lebermetastasen	Lebergewebe	0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS	
	X-Gal-Stammlösung	40 mg/mL (m/v) X-Gal in DMF	
	X-Gal-Färbelösung	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆	
		5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x 3H ₂ O	
		2 mM MgCl ₂	
		0,01 % (m/v) Natriumdeoxy-cholat	
		0,02 % (v/v) NP-40	
		in PBS, pH-Wert auf 7,1 eingestellt	
	X-Gal-Arbeitslösung	X-Gal-Stammlösung 1:40 verdünnt in X-Gal-Färbelösung	
		/ Gai raibolocally	

2.1.5. Primersequenzen

Die DNA-Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten *Primer* sind in Tabelle 5 aufgelistet. Darüber hinaus sind die DNA-Sonden (engl. *probes*) genannt, die zur Quantifizierung der jeweiligen Zielgene verwendet wurden.

Tabelle 5: DNA-Sequenzen der *Primer* und verwendete Sonden.

Zielgen (Organismus)	Primer-Sequenz (5'-3')	Sonde (<i>probe</i>)
18S rRNA	Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control	-
	Primer (Applied Biosystems)	
$\alpha\text{-SMA}$ (alt. Genname	Links: cccacccagagtggagaa	#20
ACTA2, Maus)	Rechts: acatagctggagcagcgtct	

CD11b (alt. Genname	Links: aaggatgctggggaggtc #16	
ITGAM, Maus)	Rechts: gtcataagtgacagtgctctgga	
CD45 (alt. Genname	Links: gctgacaatcccacactcac	#32
PTPRC, Maus)	Rechts: tccccggtacagtcctctc	
CD68 (Maus)	Links: gacacttcgggccatgtt	#34
	Rechts: gaggaggaccaggccaat	
Ly6C (alt. Genname	Links: tcttgtggccctactgtgtg	#3
LY6C1, Maus)	Rechts: gcaatgcagaatccatcaga	
S100A4 (Maus)	Links: ggagctgcctagcttcctg	#56
	Rechts: tcctggaagtcaacttcattgtc	
SAA1 (Mensch)	Links: cagcagggaaggctcagtat	#83
	Rechts: ggaccaaggagcagaaaacc	
SAA1 (Maus)	Links: ggagacaccaggatgaagcta	#64
	Rechts: taggctcgccacatgtcc	
SAA2 (Maus)	Links: actatgatgctgcccaaa	#66
	Rechts: tgaaagctctctcttgca	
TIMP-1 (Maus)	Links: gcaaagagctttctcaaagacc	#76
	Rechts: agggatagataaacagggaaacact	

2.1.6. Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit der jeweils eingesetzten Verdünnung, der Bestellnummer und der Bezugsquelle in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Antikörper.

Antigen	Anwendung	Verwendete	Bestellnr.	Bezugsquelle
		Verdünnung		
Phospho-AMPKa	Western Blot, pr.	1:1000	2535S	Cell Signaling
(Thr172) (Mensch)	Antikörper			Technology
Anti-Kaninchen-IgG,	Western Blot, sek.	1:5000	31464	Thermo Fisher
HRP-gekoppelt	Antikörper			Scientific
Anti-Ziege-IgG	Immunhistochemie,	unverdünnt	5570-0009	Sera Care
	sek. Antikörper			
TIMP-1 (Maus)	Immunhistochemie,	20 μg/mL	AF980-SP	Biotechne
	pr. Antikörper			
TIMP-1 (Mensch)	Immunhistochemie,	1:350	MAB970	Biotechne
	pr. Antikörper			

2.1.7. Rekombinante Proteine

In dieser Arbeit wurde rekombinantes humanes TIMP-1 verwendet, das von M.Sc. Daniel Häußler (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung) in einem HEK293F Zellkultursystem produziert und unter Verwendung eines Äktapure Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Systems gereinigt wurde (Schoeps et al., 2021b). Das rekombinante humane TIMP-1 wurde vor der Verwendung in dieser Arbeit negativ auf mögliche Endotoxinbestandteile (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermo Fisher Scientific) getestet.

2.1.8. Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits sind inklusive der jeweiligen Bezugsquelle in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Kits.

Anwendung	Bezeichnung	Bestellnr.	Bezugsquelle
Chromogenentwicklung	KPL HistoMark RED	5510-0036	Sera Care, Milford, USA
bei Immunhistochemie	Phosphatase		
	Substrate Kit		
	DAB Chromogen/	SCY-	ScyTek Laboratories
	Substrate Kit (High	ACT500	
	Contrast)		
Chromogenentwicklung	Clarity Western ECL	1705061	Bio-Rad Laboratories,
bei Western Blot	Substrate		München, Deutschland
Targeted Metabolomics	MxP Quant 500 Kit	-	Biocrates, Innsbruck,
			Österreich
Proteinkonzentrations-	Pierce [™] BCA Protein	23225	Thermo Fisher Scientific,
bestimmung	Assay Kit		Waltham, USA
TIMP-1 (Mensch)	Human TIMP-1	DY970	R&D Systems, Inc.,
ELISA	DuoSet ELISA		Minneapolis, USA
TIMP-1 (Maus) ELISA	Mouse TIMP-1 DuoSet	DY980	R&D Systems, Inc.,
	ELISA		Minneapolis, USA
RT-qPCR Reverse	High-Capacity	4368814	Applied Biosystems,
Transkription	Reverse Transcription		Darmstadt, Deutschland
	Kit		
Sauerstoffverbrauchs-	Fatty Acid Oxidation	Ab222944	Abcam, Berlin,
messung	Complete Assay Kit		Deutschland

Signalwegsanalyse	Cancer	Signaling	PCS248-	Biocat GmbH, Heidelberg,
	Phospho	Antibody	FM	Deutschland
	Array			

2.1.9. Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Software.

Software, Version	Hersteller	
Affinity Designer, Version 1.10.5	Serif Ltd, Nottingham, UK	
Axio Vision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,	
	Deutschland	
CellProfiler Version 2.2.0	Broad Institute, Inc., Cambridge, USA	
Cytoscape, Version 3.8.1	Cytoscape Team, Institute for Systems	
	Biology, Seattle, USA	
Endnote, Version 20.2	Clarivate, Philadelphia, USA	
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA),	Broad Institute, Inc., Cambridge, USA	
Version v4.1.0		
GenePix Pro 7	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	
GraphPad Prism, Version 9.3.1	Graphpad Software Inc., San Diego, USA	
ImageLab Software, Version 6.1	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland	
Microsoft Office Home & Student (Mac) 2021	Microsoft, Redmond, USA	
SPSS Statistics, Version 25.0	IBM, Ehningen, Deutschland	
StepOne Software, Version v2.3	Applied Biosystems, Darmstadt,	
	Deutschland	

2.2. Material und klinische Daten von Patientinnen und Patienten

In dieser Arbeit wurden klinische Daten und Genexpressionsdaten von Patientinnen und Patienten aus unterschiedlichen Quellen analysiert. Bei diesen Analysen wurde stets darauf geachtet, dass die Kohorte der Erkrankten bezüglich Erkrankungsstatus, Therapie, oder Herkunft der Gewebeprobe möglichst homogen ist, sodass etwaige Störfaktoren (engl. confounder effects) für Auswertungen minimiert wurden. Im Folgenden sind die unterschiedlichen Kohorten der Patientinnen und Patienten beschrieben und es ist im Einzelnen gemäß Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT)-Richtlinien dargestellt, welche Personen in die Analysen in dieser Arbeit eingeschlossen bzw. von den Analysen ausgeschlossen wurden.

2.2.1. Die ECIS Kohorte

In dieser Arbeit wurden relative Überlebensraten von Pankreaskrebserkrankten vom *European Cancer Information System* (ECIS, https://ecis.jrc.ec.europa.eu, abgerufen am 29. Januar 2020) ausgewertet. Dabei wurde die Auswahl "*European Average*" (Population), "*Pancreas*" (Krebsart), "15+" (Alter), "2000-2007" (Jahr) und "*Survival*" (Indikator) getroffen. Untersucht wurden die altersstandardisierten relativen 1-, 3- und 5-Jahresüberlebensraten, d.h. das beobachtete Überleben der Erkrankten wurde normalisiert auf das erwartete Überleben einer Gruppe mit vergleichbarem Wohnort, Alter, Geschlecht und Kalenderjahr. Dementsprechend können die relativen Überlebensraten als Überlebenswahrscheinlichkeiten von Krebserkrankten unter Ausschluss anderer Gründe für deren Versterben interpretiert werden.

2.2.2. Die München Kohorte

Die Studienpopulation der "München Kohorte" umfasste Patientinnen und Patienten mit Pankreaskrebs, die sich zwischen 2009 und 2019 in der chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München einer onkologischen Behandlung unterzogen bzw. Frauen und Männer, die keine entzündliche Erkrankung oder Krebserkrankung aufwiesen und daher als gesunde Kontrollen dienten. Die Diagnose der Pankreaskrebserkrankten wurde verifiziert durch histologische Untersuchungen von chirurgisch entfernten Gewebeproben/-biopsien oder bei Erkrankten, die nicht operativ behandelt wurden, durch zytologische, klinische oder radiologische Informationen. Es ist anzumerken, dass der Großteil der Pankreaskrebserkrankten in dieser Studie mit PDAC diagnostiziert wurde. Allerdings wurden manche Pankreaskrebserkrankte, die bereits Metastasen aufwiesen, ohne Operation behandelt, weshalb man aufgrund des Fehlens von Primärtumorgewebeproben keine endgültige Bestätigung des Subtyps durch histologische Untersuchungen erreichen konnte. Es wurde die 8. Edition der Union for International Cancer Control (UICC) Klassifikation für Tumor (T), Lymphknoten (N), Metastasen (M) sowie das TNM-kombinierte Staging System verwendet (Brierley et al., 2017). Die Präsenz von Metastasen in Leber, Lunge, Peritoneum oder Lymphknoten wurde Computertomographie, Magnetresonanztomographie und/oder operative Untersuchung bewertet. Lymphknotenmetastasen wurden definiert als Lymphknotenstatus N2, d.h. die Präsenz von Metastasen in vier oder mehr regionalen Lymphknoten. Der Einschluss bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten in der München Kohorte wurde gemäß CONSORT-Richtlinien getroffen (Abb. 2.1).

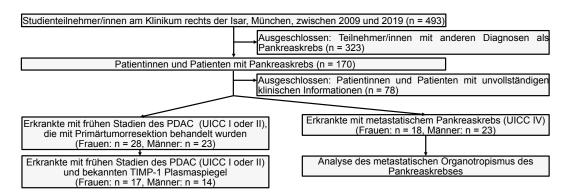


Abbildung 2.1: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der München Kohorte. Von 493 Studienteilnehmenden wurden in dieser Arbeit insgesamt 41 Patientinnen und Patienten mit metastatischem Pankreaskrebs für die Analyse des geschlechtsabhängigen, ortsspezifischen Auftretens synchroner Metastasen bzw. insgesamt 51 Patientinnen und Patienten mit frühen PDAC-Stadien für die Analyse der geschlechtsabhängigen, ortsspezifischen Bildung metachroner Metastasen eingeschlossen. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

2.2.2.1. Gewinnung humaner Plasmaproben

Der Einschluss bzw. Ausschluss von Pankreaskrebserkrankten für die Analyse des Blutplasmas erfolgte gemäß CONSORT Richtlinien (**Abb. 2.1**). Eine Übersicht über klinische relevante Informationen der Erkrankten ist im Folgenden (**Abb. 2.2**) zusammengefasst.

		Alle E	rkrankten	Fra	uen	Má	inner	
Alter, Jahre	Alter, Jahre [Median (Minimum-Maximum)]		73 (50 - 84)		74 (50 - 79)		72 (50 - 84)	
		n	Anteil	n	Anteil	n	Anteil	
	IA	4	12,9%	4	23,5%	0	0,0%	
diagnostiziertes UICC Stadium	IB	1	3,2%	1	5,9%	0	0,0%	
UIČC Stadium	IIA	2	6,5%	2	11,8%	0	0,0%	
	IIB	24	77,4%	10	58,8%	14	100,0%	
	T1	5	16,1%	5	29,4%	0	0,0%	
diagnostiziertes TNM	T2	9	29,0%	5	29,4%	4	28,6%	
Stadium	T3	17	54,8%	7	41,2%	10	71,4%	
	M0	31	100,0%	17	100,0%	14	100,0%	
	Primärtumorresektion	31	100,0%	17	100,0%	14	100,0%	
	Neoadjuvante Chemotherapie	10	32,3%	6	35,3%	4	28,6%	
Therapie	Adjuvante Chemotherapie	16	51,6%	8	47,1%	8	57,1%	
	Ohne adjuvante Chemotherapie	9	29,0%	6	35,3%	3	21,4%	
	Adjuvante Chemotherapie unbekannt	6	19,4%	3	17,6%	3	21,4%	

Abbildung 2.2: Das Alter, das Erkrankungsstadium und die Therapie von PDAC-Patientinnen und -Patienten, die für die Analyse der TIMP-1-Plasmaspiegel eingeschlossen wurden, war vergleichbar. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

Zur Gewinnung des Blutplasmas wurden Blutproben in einem EDTA-beschichteten Röhrchen gesammelt. Das Blut wurde sofort nach der Abnahme durch vorsichtiges Invertieren vermischt. Innerhalb von 30 Minuten nach der Abnahme wurde das Blut für 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die Plasmaproben wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3. Die Toronto Kohorte

Die Toronto Kohorte umfasste 125 Personen mit einer histologisch verifizierten PDAC-Diagnose, die zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasen aufwiesen (M-Status M0) und mit einer Resektion des Primärtumors behandelt wurden. Die Personen wurden im Rahmen des *University Health Network Biospecimen Services Program* rekrutiert. Die humanen Gewebeproben zur Bestimmung der TIMP-1 Proteinexpression im pankreatischen Primärtumor fielen bei der Behandlung der Patientinnen und Patienten am *Princess Margaret Cancer Centre* des *University Health Network* (Toronto, Ontario, Kanada) an und wurden bereits in vorherigen Studien verwendet (Connor *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2020).

2.2.4. Die TCGA Kohorten mit PDAC-, CRC- bzw. Melanom-Erkrankten

TCGA PDAC Kohorte

Die in dieser Studie untersuchte "*The Cancer Genome Atlas* (TCGA) PDAC Kohorte" (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017) umfasste 42 PDAC-Patientinnen und -Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose keine Metastasen aufwiesen (M-Status M0) und mit einer Resektion des Primärtumors und anschließender Chemotherapie behandelt wurden. Die klinischen Daten der Erkrankten und die Genexpressionsdaten des Primärtumorgewebes wurden von der *FireBrowse*-Datenbank (http://firebrowse.org; "*Pancreatic Adenocarcinoma PAAD Cohort*") bezogen. Vom ursprünglich veröffentlichen Datensatz (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017) mit insgesamt 183 Patientinnen und Patienten wurden in dieser Studie gemäß CONSORT-Richtlinien einige Personen von den Analysen ausgeschlossen (Abb. 2.3), da die Erkrankten anders behandelt wurden, bereits Metastasen zum Diagnosezeitpunkt aufwiesen, oder klinische Daten bzw. Genexpressionsdaten nicht verfügbar waren.

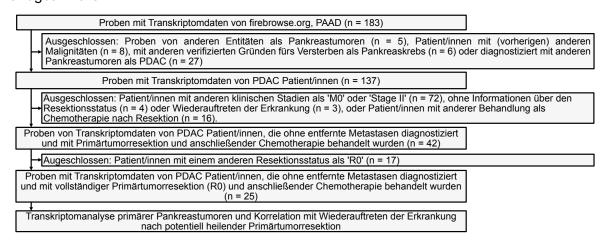


Abbildung 2.3: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der TCGA PDAC Kohorte. Von 183 Proben wurden in dieser Arbeit insgesamt 25 Proben von Patientinnen und Patienten mit frühen, nicht metastatischen PDAC-Stadien (M0), die mit einer histologisch vollständigen Primärtumorresektion (R0) und anschließender Chemotherapie behandelt wurden, für die Analyse von Transkriptomdaten assoziiert mit dem lebermetastasenfreien Überleben nach Primärtumorresektion eingeschlossen. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

TCGA CRC Kohorte

Die in dieser Studie untersuchte "TCGA CRC Kohorte" umfasste 53 CRC-Patientinnen und -Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose denselben Erkrankungsstatus (UICC-Status III) und keine Metastasen aufwiesen (M-Status M0). Die klinischen Daten der Erkrankten und die Genexpressionsdaten des Primärtumorgewebes wurden von der *FireBrowse-*Datenbank

Material und Methoden

(http://firebrowse.org; "Colorectal Adenocarcinoma COADREAD Cohort") bezogen. Vom ursprünglich veröffentlichen Datensatz mit insgesamt 434 Patientinnen und Patienten wurden in dieser Studie gemäß CONSORT-Richtlinien einige Personen von den Analysen ausgeschlossen (Abb. 2.4), da die Erkrankten bereits vor der CRC-Diagnose andere Krebserkrankungen hatten, bereits Metastasen zum Diagnosezeitpunkt aufwiesen, oder klinische Daten bzw. Genexpressionsdaten nicht verfügbar waren.

Proben mit Transkriptomdaten von firebrowse.org, COADREAD (n = 434)

Ausgeschlossen: Patient/innen ohne klinische Daten (n = 74), mit muzinösem Adenokarzinom in Kolon/Rektum (n = 42), mit anderen Malignitäten (n = 29), mit anderem M-Status als 'M0' (n = 60), oder mit anderem UICC-Status als UICC III (n = 176)

Proben mit Transkriptomdaten von CRC Patient/innen mit UICC III (n = 53)

Abbildung 2.4: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der TCGA CRC Kohorte. Von 434 Proben wurden in dieser Arbeit insgesamt 53 Proben von Patientinnen und Patienten mit frühen, nicht metastatischen CRC-Stadien (M0, UICC III) für die Analyse von Transkriptomdaten assoziiert mit dem lebermetastasenfreien Überleben nach Primärtumorresektion eingeschlossen. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

TCGA Melanom Kohorte

Die in dieser Studie untersuchte "TCGA Melanom Kohorte" umfasste 112 Melanom-Patientinnen und -Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose denselben Erkrankungsstatus (UICC-Status III) und keine Metastasen aufwiesen (M-Status M0). Die klinischen Daten der Erkrankten und die Genexpressionsdaten des Primärtumorgewebes wurden von der FireBrowse-Datenbank (http://firebrowse.org; "Skin Cutaneous Melanoma SKCM Cohort") bezogen. Vom ursprünglich veröffentlichen Datensatz mit insgesamt 473 Patientinnen und Patienten wurden in dieser Studie gemäß CONSORT-Richtlinien einige Personen von den Analysen ausgeschlossen (Abb. 2.5), da die Erkrankten bereits Metastasen oder andere Erkrankungsstadien zum Diagnosezeitpunkt aufwiesen, oder da klinische Daten bzw. Genexpressionsdaten nicht verfügbar waren.

Proben mit Transkriptomdaten von firebrowse.org, SKCM (n = 473)

Ausgeschlossen: Proben von anderen Entitäten der/desselben Patient/in (n = 4) oder von Metastasengewebe (n = 14); Patient/innen ohne klinische Information über Wiederauftreten der Erkrankung (n = 48), mit anderem M-Status als 'M0' (n = 49) bzw. anderem UICC-Status als 'UICC III' (n = 246)

Proben mit Transkriptomdaten von Melanomerkrankten mit UICC III (n = 112)

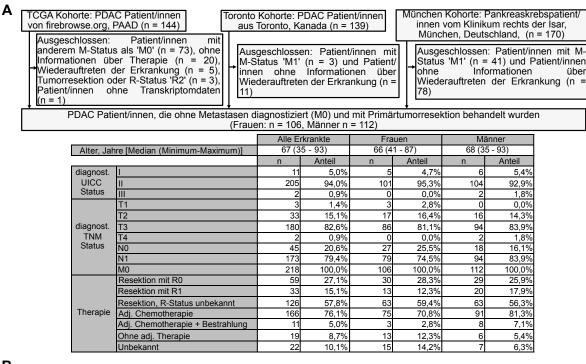
Abbildung 2.5: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der TCGA Melanom Kohorte. Von 473 Proben wurden in dieser Arbeit insgesamt 112 Proben von Patientinnen und Patienten mit frühen, nicht metastatischen Melanom-Stadien (M0, UICC III) für die Analyse von Transkriptomdaten assoziiert mit dem lebermetastasenfreien Überleben eingeschlossen. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

2.2.5. Kombination der PDAC-Kohorten aus München, Toronto und von TCGA

In dieser Arbeit wurden Geschlechtsunterschiede zwischen PDAC-Patientinnen und -Patienten beim Gesamtüberleben und bei der Entwicklung metachroner Metastasen, d.h. von Metastasen, die erst nach der Diagnose des Primärtumors klinisch detektiert werden konnten, untersucht. Um diese Untersuchung in einer möglichst großen Anzahl von Erkrankten

Material und Methoden

durchführen zu können, wurden PDAC-Patientinnen und -Patienten aus der München Kohorte, der Toronto Kohorte und der TCGA PDAC Kohorte in einer kombinierten Kohorte zusammengeführt. Um mögliche Störfaktoren (engl. *confounder effects*) bei den Analysen zu minimieren, wurde darauf geachtet, dass alle Erkrankte beim Zeitpunkt der Diagnose keine synchronen Metastasen aufwiesen (M-Status M0) und mit einer Resektion des Primärtumors behandelt wurden (Abb. 2.6, A). Das rezidivfreie Überleben von Frauen und Männern der drei Kohorten war vergleichbar (Abb. 2.6, B).



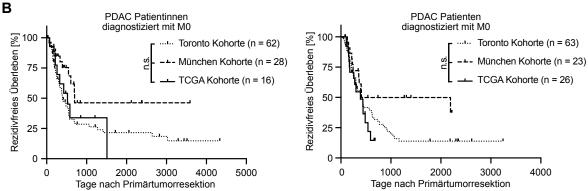


Abbildung 2.6: Kombination der München, TCGA PDAC und Toronto Kohorten für die Analyse der geschlechtsabhängigen, ortsspezifischen Entwicklung metachroner Metastasen. (A) Von 493 Pankreaskrebserkrankten aus drei unterschiedlichen Subkohorten wurden in dieser Arbeit 218 PDAC-Patientinnen und -Patienten mit vergleichbarem Erkrankungsstadium und Therapie in einer gemeinsamen Kohorte kombiniert. (B) PDAC-Patientinnen (n = 106, *links*) und PDAC-Patienten (n = 112, *rechts*) von drei unterschiedlichen Subkohorten (Toronto, München, TCGA PDAC) weisen ein vergleichbares rezidivfreies Überleben nach Primärtumorresektion auf. *Log-Rank Test* wurde verwendet. (A, B) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

2.2.6. Die Bailey Kohorte

In dieser Studie wurde der von Bailey et al. veröffentliche Transkriptomdatensatz von pankreatischem Primärtumorgewebe, das aus PDAC-Patientinnen und -Patienten isoliert wurde, ausgewertet (Bailey et al., 2016). Die klinischen Daten der Erkrankten und die dazugehörigen mRNA-Expressionsdaten wurden über die cBioportal-Datenbank (https://www.cbioportal.org; Zugangsnummer "paad_qcmg_uq_2016") bezogen. Der originale Datensatz umfasste insgesamt 96 Patientinnen und Patienten. Da in dieser Studie nicht nur die Genexpressionsdaten, sondern auch das Gesamtüberleben der Erkrankten evaluiert wurde, wurden einige Patientinnen und Patienten aufgrund fehlender klinischer Daten gemäß CONSORT-Richtlinien von der Analyse ausgeschlossen (Abb. 2.7).

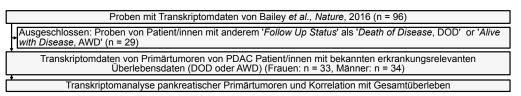


Abbildung 2.7: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der Bailey Kohorte. Von 96 Proben von (Bailey et al., 2016) wurden in dieser Arbeit insgesamt 67 Proben von Patientinnen und Patienten mit bekannten Überlebensdaten für die Analyse der geschlechtsabhängigen mRNA-Expression im pankreatischen Primärtumor und deren Assoziation mit dem Gesamtüberleben eingeschlossen. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

2.2.7. Die Moffitt Kohorte

In dieser Studie wurde der von Moffitt et al. veröffentlichte Transkriptomdatensatz von Lebergewebe, das aus PDAC-Patientinnen und -Patienten isoliert wurde, ausgewertet (Moffitt et al., 2015). Die Genexpressionsdaten wurden über die Gene Expression Omnibus-Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/, Zugangsnummer: "GSE71729") bezogen. Der originale Datensatz umfasste Transkriptomdaten von insgesamt 349 Proben. Da der Datensatz in dieser Arbeit ausschließlich für die Analyse der Genexpression im Lebergewebe verwendet wurde, wurden alle Proben aus anderen Entitäten als der Leber gemäß CONSORT-Richtlinien von der Analyse ausgeschlossen. Die hepatische Genexpression sollte zwischen Frauen und Männern verglichen werden. Da allerdings keine Information über das biologische Geschlecht der Proben vorlag, wurde das Geschlecht mittels Zwei-Schritt Cluster Analyse bestimmt (Abb. 2.8, A). Dafür wurde die Expression des Y-Chromosom-kodierten Gens DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked (DDX3Y) und des X-Chromosom-kodierten X Inactive Specific Transcript (XIST) näher untersucht. Eine Zwei-Schritt Cluster Analyse für jedes der zwei Gene offenbarte zwei Cluster mit jeweils einer hohen bzw. niedrigen Expression von DDX3Y bzw. XIST (Abb. 2.8, A). Durch Kombination beider Analysen konnten drei homogene Populationen identifiziert werden: Population 1 (n = 14) wies eine hohe Expression von DDX3Y und eine niedrige Expression von XIST auf (Abb. 2.8, A), weshalb diese Population als männliches biologisches Geschlecht definiert wurde. Population 2 (n = 9) wies eine niedrige Expression von DDX3Y und eine hohe Expression von XIST auf (**Abb. 2.8, A**), weshalb sie als weibliches biologisches Geschlecht definiert wurde. Da Population 3 (n = 2) eine niedrige Expression von DDX3Y und XIST aufwies (**Abb. 2.8, A**) und man sie daher keinem biologischen Geschlecht eindeutig zuordnen konnte, wurde diese Population von der weiteren Analyse ausgeschlossen (**Abb. 2.8, B**).

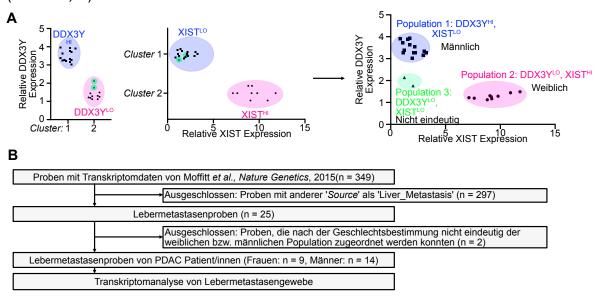


Abbildung 2.8: Geschlechtsbestimmung und CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der Moffitt Kohorte. (A) Mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse basierend auf der relativen DDX3Y (*links*) oder XIST (*Mitte*) Expression in Lebermetastasenproben (n = 25, (Moffitt *et al.*, 2015)) wurden jeweils 2 *Cluster* mit hoher (HI) bzw. niedriger (LO) Expression identifiziert. Die Kombination beider Analysen offenbarte drei Populationen (*rechts*): Population 1 (n = 14) mit hoher Expression von DDX3Y, einem Y-Chromosom-kodierten Gen und niedriger Expression von XIST, einem in der X-Chromosomen-Inaktivierung involvierten X-chromosomalen Gen, wurde als männliche Population definiert. Population 2 (n = 9) mit niedriger DDX3Y und hoher XIST Expression wurde als weibliche Population definiert. Population 3 (n = 2) mit niedriger Expression von DDX3Y und XIST wurde von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da sie keinem Geschlecht zugeordnet werden konnte. (B) Von 349 Proben von (Moffitt *et al.*, 2015) wurden in dieser Arbeit insgesamt 23 Lebermetastasenproben von Patientinnen und Patienten für die Analyse der geschlechtsabhängigen Genexpression in der pankreaskrebskonditionierten Leber eingeschlossen. (A, B) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

2.2.8. Die Dhara Kohorte

In dieser Studie wurde außerdem der von Dhara et al. veröffentlichte RNA- und ATAC-Sequenzierungsdatensatz von Pankreastumorzellen, die aus dem Primärtumor von PDAC-Patientinnen und -Patienten isoliert wurden, ausgewertet (Dhara et al., 2021). Die ATAC-Sequenzierungsdaten (Zugangsnummer: GSE124229) und die RNA-Sequenzierungsdaten (Zugangsnummer: GSE124230) wurden über die Gene Expression Omnibus-Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) bezogen. Die zugehörigen klinischen Daten der PDAC-Erkrankten wurden über die Website des Journals Nature Communications (https://www.nature.com/articles/s41467-021-23237-2, "Supplementary Data 2") bezogen. Der originale Datensatz umfasste ATAC-Sequenzierungsdaten von insgesamt 54 Proben. Da der Datensatz in dieser Arbeit für die Korrelation der ATAC-Sequenzierungsdaten mit RNA-Seguenzierungsdaten und eine anschließende Analyse des rezidivfreien Überlebens der Erkrankten verwendet wurde, wurden einige Proben aufgrund fehlender bzw. fehlerhafter Sequenzierungsdaten oder aufgrund unvollständiger klinischer Daten gemäß CONSORT-Richtlinien von der Analyse ausgeschlossen (Abb. 2.9). Es ist anzumerken, dass von den PDAC-Patientinnen und -Patienten dieser Kohorte lediglich das rezidivfreie Überleben im Allgemeinen bekannt war, d.h. ob in diesen Personen nach einer gewissen Zeit die Erkrankung wieder aufgetreten ist. Es war allerdings unbekannt, in welchen Geweben bzw. Organen die Erkrankung wieder aufgetreten ist, weshalb eine Analyse der Entwicklung von Metastasen spezifisch in der Leber mit diesem Datensatz nicht möglich war.

F	Proben mit ATAC-Seq Daten von humanen Pankreastumorzellen von Dhara et al., Nature Communications, 2021(n = 54)
	Ausgeschlossen: •Proben ohne zugehörige RNA-Sequenzierungsdaten (n = 5) •Proben mit fehlerhafter RNA-Sequenzierung (keine EpCAM Expression in "EpCAM positiven" Tumorzellen, n = 2) •Proben mit fehlerhafter ATAC-Sequenzierung (nicht reproduzierbar, n = 13) •Proben von Patienten mit zusätzlichen anderen Krebsdiagnosen (n = 1) •Proben von Patienten mit unvollständiger Information über die Therapie (n = 15)
	Proben mit ATAC-Seq und RNA-Seq Daten von humanen Pankreastumorzellen aus PDAC Patient/innen, die mit histologisch vollständiger Resektion (R0) des Primärtumors und anschließender adjuvanter Chemotherapie behandelt wurden (Frauen: n = 7, Männer: n = 11)

		Alle Erkrankte		Frauen		Männer	
Alter, Jahre [Median (Minimum-Maximum)]		67 (50 - 82)		63 (50 - 78)		68 (60 - 82)	
		n	Anteil	n	Anteil	n	Anteil
	T2	1	5,6%	0	0,0%	1	9,1%
diagnost.	T3	17	94,4%	7	100,0%	10	90,9%
TNM	N0	2	11,1%	1	14,3%	1	9,1%
Status	N1	16	88,9%	6	85,7%	10	90,1%
	MO	18	100,0%	7	100,0%	11	100.0%
	Resektion mit R0	18	100,0%	7	100,0%	11	100,0%
Therapie	Adj. Chemotherapie	17	94,4%	6	85,7%	11	100,0%
	Adj. Chemotherapie unbekannt	1	5,6%	1	14,3%	0	0,0%

Abbildung 2.9: CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der Dhara Kohorte. Von 54 Proben von (Dhara et al., 2021) wurden in dieser Arbeit insgesamt 18 Proben mit ATAC-und RNA-Sequenzierungsdaten von PDAC-Patientinnen und -Patienten, die mit einer histologisch vollständigen Primärtumorresektion (R0) und anschließender Chemotherapie behandelt wurden, für die Analyse des geschlechtsabhängigen rezidivfreien Überlebens eingeschlossen.

2.3. Tierexperimente

In dieser Arbeit wurden murine Modellsysteme für pankreatische Erkrankungen verwendet, um Geschlechtsunterschiede beim Überleben und bei der Lebermetastasierung des Pankreaskrebses in Abhängigkeit der TIMP-1 Expression zu untersuchen.

2.3.1. Versuchstiere

Alle weiblichen und männlichen Mäuse wurden in der Tierhaltung des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar des Technischen Universität München unter *Specific Pathogen-Free* (SPF) Bedingungen in Käfigen mit Luftfiltern gehalten. Autoklavierte Nahrung und Wasser war jederzeit uneingeschränkt (*ad libitum*) verfügbar. Die tägliche Pflege der Mäuse erfolgte durch speziell geschultes Personal.

2.3.2. Das KPC-Mausmodell

Das genetisch modifizierte Kras+/LSL-G12D; Trp53+/LSL-R172H; Pdx-1+/Cre (KPC) Mausmodell diente als Modellsystem für die spontane Entwicklung von PDAC (Hingorani et al., 2005). KPC-Mäuse wiesen jeweils eine aktivierende Punktmutation im endogenen Lokus des Trp53 Tumorsuppressorgens (Olive et al., 2004) und des Kras Onkogens (Hingorani et al., 2003) auf, die aufgrund der Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Pdx-1 Promotors spezifisch in den pankreatischen Zellen aktiviert wurden (Hingorani et al., 2005). Um die Rolle von TIMP-1 im Kontext von PDAC zu untersuchen, wurden TIMP-1-defiziente KPC-Mäuse generiert, indem der KPC-Mausstamm in den TIMP-1-defizienten Mausstamm C57Bl/6-129S-TIMP-1^{tm1Pds/J} (Jackson Laboratory, Maine, USA) eingekreuzt wurde. Mäuse, die bei der Zucht der KPC-Linien anfielen und entweder negativ für Pdx-1+/Cre und positiv für Kras+/LSL-G12D und/oder Trp53+/LSL-R172H waren oder ausschließlich positiv für Pdx-1+/Cre aber negativ für Kras^{+/LSL-G12D} und Trp53^{+/LSL-R172H} waren, wurden als gesunde Kontrolltiere herangezogen. In dieser Studie wurde das Überleben von KPC-Mäusen untersucht. Als Grundlage dafür wurde die wöchentliche Begutachtung der KPC-Mäuse gemäß den ethischen Richtlinien des Tierversuchsantrags verwendet. KPC-Mäuse, die ein ethisches Abbruchkriterium erreicht hatten, das mit der Tumorerkrankung in Verbindung stand, wurden euthanasiert. Das Alter dieser Mäuse wurde als Überlebenszeit definiert und die KPC-Mäuse wurden für die Kaplan-Meier Analyse als "Ereignis eingetreten", d.h. als tot, klassifiziert. KPC-Mäuse, die aufgrund von Abbruchkriterien erlöst werden mussten, die nicht in Verbindung mit der Tumorerkrankung standen (z.B. blutende Papillome), wurden in der Kaplan-Meier Analyse als "Ereignis nicht eingetreten", d.h. als lebend, klassifiziert und dementsprechend zensiert.

2.3.3. Das Caerulein basierte Mausmodell

Da Prozesse der Schädigung, der entzündlichen Reaktion und der Remodellierung des Pankreasgewebes bereits sehr früh bei der Bildung von Pankreaskarzinomen stattfinden (**Abb. 1.1**), wurde das Caerulein basierte Mausmodell in dieser Arbeit, wie bereits zuvor in anderen Studien (Alonso-Curbelo *et al.*, 2021; Del Poggetto *et al.*, 2021), neben dem KPC-Mausmodell als zweites, experimentell induzierbares und besser kontrollierbares Modellsystem verwendet. Um pankreatische Entzündungen zu induzieren, wurden 50 μg Caerulein pro kg Körpergewicht gelöst in PBS wiederholt intraperitoneal für insgesamt 8 Stunden mit einem Abstand von je einer Stunde zwischen jeder Injektion in Wildtyp C57Bl/6J Mäuse (kommerziell bezogen über Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bzw. in TIMP-1-defiziente C57Bl/6-129S-TIMP-1^{tm1Pds/J} Mäuse (aus eigener Zucht) injiziert.

2.3.4. Testung der experimentellen Metastasierung

In dieser Studie wurde mittels experimenteller Metastasierung die geschlechtsabhängige und TIMP-1-abhängige Empfänglichkeit der Leber für eine metastatische Kolonisierung untersucht. Einerseits wurden dabei KPC-Mäuse im Alter von 10 bis 11 Wochen eingesetzt, da KPC-Mäuse in diesem Alter typischerweise frühe Stadien des PDAC aufweisen (Hingorani et al., 2005). Andererseits wurden auch Mäuse des Caerulein basierten Modellsystems im Alter von 7 bis 9 Wochen eingesetzt, wobei die Tumorzellinokulation 24 Stunden nach der ersten Caerulein- bzw. PBS-Injektion durchgeführt wurde. Für die experimentelle Metastasierung wurde die lacZ-markierte, murine syngene 9801 Pankreaskarzinomzelllinie verwendet, die aus einer Lebermetastase einer KPC-Maus isoliert und etabliert wurde. Vor der Inokulation der Tumorzellen wurde der Schwanz der Mäuse unter Rotlicht für etwa 5 Minuten erwärmt, um die Blutgefäße zu erweitern. Insgesamt wurden 10⁶ syngene 9801 Pankreaskarzinomzellen, gelöst in 100 µL PBS, in die Schwanzvene inokuliert. 14 Tage nach der Tumorzellinokulation wurden die Mäuse erlöst und die Organe entnommen.

2.3.5. Probennahme von festen und flüssigen Biopsien aus Mäusen

Alle Mäuse wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Anschließend erfolgte die Blutentnahme aus der Bauchvene (Vena Cava Inferior) mit einer EDTA-gespülten Spritze. Das Blut wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert. Das Blutplasma wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach der Blutentnahme wurde das Pankreas entnommen und in repräsentative Stück zerteilt. Ein Teil des Pankreasgewebes wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung (z.B. RNA Isolation) bei -80 °C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde ein anderer Teil des Pankreasgewebes für 48 h bei 4 °C in Fixierlösung inkubiert und danach durch das Institut für Pathologie der Technischen Universität München in Paraffin eingebettet. Nach der Entnahme des Pankreas wurde die Leber entnommen, zerteilt und analog zum Pankreasgewebe teilweise in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. in Fixierlösung inkubiert und in Paraffin eingebettet. Bei den Mäusen, bei denen eine experimentelle Metastasierung durchgeführt wurde, wurde für die Färbung der Lebermetastasen außerdem der mediale Leberlappen für 1 h bei 4 °C in GA-Fixierlösung fixiert. Das weitere Protokoll der Färbung ist in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Herstellung und H&E-Färbung von Paraffinschnitten

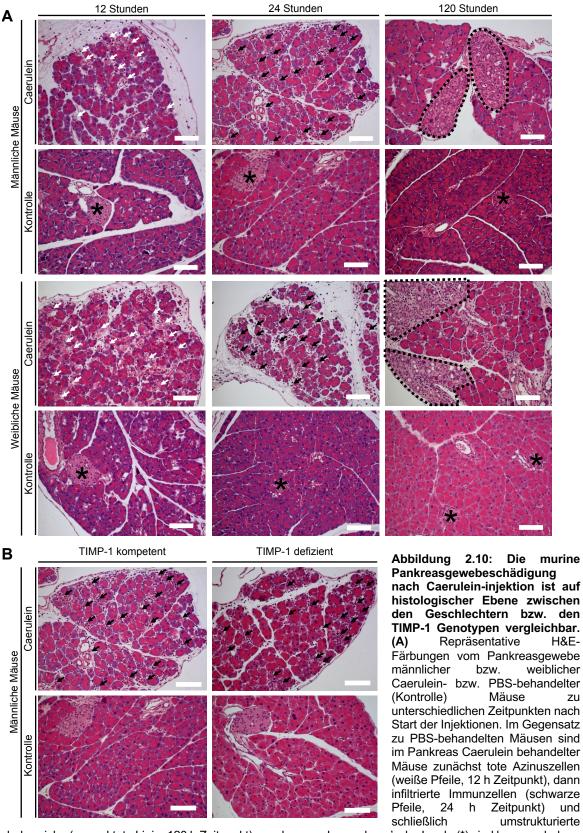
Gewebedünnschnitte wurden unter standardisierten Bedingungen vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München hergestellt. Hierzu wurde das für 48 h in Fixierlösung inkubierte Gewebe in Biopsiekapseln transferiert, in 4 % Formaldehydlösung inkubiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in flüssigem Paraffin imprägniert und mithilfe einer Paraffinanalage aufgeblockt. Es wurden 2 µm dicke Paraffindünnschnitte mittels Mikrotoms hergestellt, zur Streckung in ein warmes Wasserbad überführt und auf Objektträger gezogen. Die Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wurde ebenfalls unter standardisierten Bedingungen vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt. Die Paraffindünnschnitte wurden dafür zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert, in Mayer's Hämalaun-Lösung inkubiert, mit Leitungswasser gespült und gebläut. Nach einer kurzen Inkubation in Eosin-Lösung folgte mehrmaliges Waschen, eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindecken der Färbungen mit Hilfe eines Deckglases. Die H&E-Färbungen wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht.

2.4.2. Evaluierung der Krankheitsprogression in KPC- und Caerulein behandelten Mäusen

Um den Vergleich von PDAC-erkrankten Mäusen mit histologisch identischen Krankheitsstadien zu ermöglichen und zu gewährleisten, wurde ein *Grading* der Pankreastumore von allen in dieser Studie untersuchten KPC-Mäusen anhand von H&E-Färbungen des Pankreasgewebes durch erfahrene Pathologen (Katja Steiger und Nils Wirges, Institut für Pathologie der Technischen Universität München) gemäß der aktuellsten Consensus-Klassifikation (Hruban *et al.*, 2006; Klopfleisch, 2013) durchgeführt. KPC-Mäuse mit einem PDAC Grad G2 und/oder G3 wurden als "fortgeschrittenes PDAC-Stadium" klassifiziert, wohingegen KPC-Mäuse mit Gewebeumbau aber ohne invasive G2/G3 PDAC-Läsionen im Pankreasgewebe als "frühes PDAC-Stadium" klassifiziert wurden.

Beim Caerulein basierten Mausmodell führten die wiederholten intraperitonealen Caerulein-Injektionen zu Schädigungen des Pankreasgewebes ausgelöst durch das Absterben exokriner Azinuszellen (Abb. 2.10, A links), gefolgt von einer Einwanderung von Immunzellen ins Pankreasgewebe und der Bildung eines entzündlichen Milieus (Abb. 2.10, A Mitte), was letztlich in einer Umstrukturierung des geschädigten Gewebes resultierte (Abb. 2.10, A rechts). Auf histologischer Ebene konnte eine vergleichbare Induktion entzündlicher Umbauprozesse im Pankreasgewebe zwischen weiblichen und männlichen Caerulein behandelten Mäusen beobachtet werden (Abb. 2.10, A). PBS-behandelte Mäuse dienten als Kontrolltiere und wiesen keine Anzeichen auf Schädigungen des Pankreas auf (Abb. 2.10, A).

Auch der histologische Phänotyp der Pankreasschädigung zwischen männlichen TIMP-1-kompetenten bzw. TIMP-1-defizienten Mäusen war vergleichbar (**Abb. 2.10, B**).



Gewebebereiche (gepunktete Linie, 120 h Zeitpunkt) zu erkennen. Langerhans'sche Inseln (*) sind hervorgehoben. **(B)** Repräsentative H&E-Färbungen vom Pankreasgewebe männlicher TIMP-1-kompetenter bzw. TIMP-1-defizienter Caerulein- bzw. PBS-behandelter (Kontrolle) Mäuse 24 h nach Start der Injektionen. Bereiche mit infiltrierten Immunzellen sind hervorgehoben (Pfeile). Maßstabsbalken: 100 µm (A, B). (B) wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

2.4.3. Färbung und Quantifizierung *LacZ*-markierter Tumorzellen in murinem Lebergewebe

Um experimentelle Lebermetastasen zu visualisieren, wurde die X-Gal-Färbung, eine sensitive und selektive histochemische Färbemethode zum Nachweis *LacZ*-markierter Tumorzellen (Krüger *et al.*, 1998), durchgeführt. Nach Inkubation des medialen Leberlappens für 1 h bei 4 °C in GA-Fixierlösung wurde dreimal mit PBS gewaschen und das Lebergewebe zunächst für 2 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C in X-Gal-Arbeitslösung inkubiert. Daraufhin wurde das Lebergewebe zweimal mit PBS gewaschen, mit Fixierlösung bedeckt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4 °C gelagert. Die Quantifizierung der Lebermetastasen erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops, wobei alle Metastasen mit einem Durchmesser unter 50 µm als Mikrometastasen und alle Metastasen mit einem Durchmesser über 50 µm als Makrometastasen definiert wurden (**Abb. 2.11**). Die Quantifizierung der Mikround Makrometastasen erfolgte in einer verblindeten (engl. *blinded*) Weise.

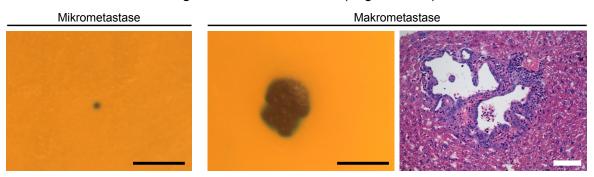


Abbildung 2.11: Unterscheidung zwischen experimentellen Mikro- und Makrometastasen in der Leber. Repräsentative Bilder einer X-Gal-gefärbten (blau) hepatischen Mikro- (*links*) und Makrometastase (*Mitte*), sowie eine repräsentative H&E-Färbung einer hepatischen Makrometastase (*rechts*). Maßstabsbalken: 250 µm (*links* und *Mitte*) bzw. 100 µm (*rechts*). Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

2.4.4. Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung von TIMP-1 in humanem Pankreasgewebe

Die immunhistochemische Färbung von TIMP-1 und anschließende Quantifizierung der TIMP-1-positiven Fläche in humanem Pankreastumorgewebe wurde durch Barbara T. Grünwald und Emily Poulton am *Princess Margaret Cancer Centre* des *University Health Network* in Toronto, Kanada durchgeführt (Hermann *et al.*, 2021). Dafür wurden 4 µm dicke Paraffingewebeschnitte von humanem Pankreastumorgewebe, wie zuvor beschrieben (Grünwald *et al.*, 2016), zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Die Antigen-Demaskierung erfolgte bei geringer Temperatur in 0,01 M Zitratpuffer mit pH 6,0. Durch eine 5-minütige Inkubation in wässriger 3 % H₂O₂-Lösung wurden die endogenen Peroxidasen blockiert. Der Primärantikörper wurde in einer 1:350-Verdünnung auf den Schnitten über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung für 45 min bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten in einer

Feuchtkammer inkubiert. Für die Farbentwicklung wurde eine 50 µg/µL DAB-Lösung gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Zellkerne wurden mittels Hämatoxylin gegengefärbt. Die Färbungen wurden zunächst unter einem Leica Aperio AT2 Mikroskop mit einem 20-fach Objektiv digitalisiert und die TIMP-1-positive Fläche wurde mittels QuPath-Analysesoftware quantifiziert (Bankhead *et al.*, 2017). Dafür wurde die Analyse auf Tumor- und Stromaregionen begrenzt, indem bspw. normales Pankreasgewebe, Blutgefäße oder pankreatische Inseln manuell von der analysierten Fläche ausgeschlossen wurden. Eine einfache Quantifizierung der positiven Pixel wurde durchgeführt, um das normalisierte Verhältnis der TIMP-1-positiven Pixel zu den insgesamt detektierten Pixeln (äquivalent zur Gewebefläche) zu berechnen.

2.4.5. Immunhistochemische Färbung von TIMP-1 in murinem Pankreasgewebe

Die immunhistochemische Färbung von TIMP-1 im Pankreasgewebe von Caerulein behandelten Mäusen wurde durch Dr. Enkhtsetseg Munkhbaatar von der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Technischen Universität München durchgeführt. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffindunnschnitte erfolge gemäß dem Protokoll der H&E-Färbung (siehe Kapitel 2.4.1). Für die Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger insgesamt zweimal für jeweils 7 min bei 680 W in der Mikrowelle in 0,01 M Zitratpuffer mit pH 6,0 gekocht. Nach dem Abkühlen der Objektträger im Zitratpuffer für 20 min bei Raumtemperatur wurden diese in bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend in TBS für 10 min inkubiert. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Danach wurden die Objektträger zweimal in TBS-T gewaschen und für 5 min in TBS-T inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin (Produktnummer 5550-0002 von Sera Care). Danach wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die abschließende Chromogenfärbung erfolgte mit dem KPL HistoMark RED Phosphatase Substrate Kit gemäß den Herstellerangaben. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde gemäß Protokoll der H&E-Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.1).

2.4.6. BODIPY-Färbung und automatisierte Auswertung

Für die Färbung neutraler Lipide mittels BODIPY wurden HepaRG bzw. HepG2 Zellen in 24-Well Platten auf Glasplättchen ausgesät und kultiviert. Nach Ende der Stimulationszeit (siehe Abschnitt 2.5.3) wurde das Medium abgesaugt und es wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation in PFA-Fixierlösung bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen für 15 min in der Färbelösung, bestehend aus DAPI- und BODIPY-Arbeitslösung (**Tab**.

4), lichtgeschützt inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden lichtgeschützt, d.h. ohne direkte Lichteinstrahlung, durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplätten mithilfe von Pinzetten vorsichtig aus der 24-*Well* Platte genommen, auf einem Papiertuch kurz abgetropft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen und mit 4 μL Eindeckmedium auf einem Objektträger eingedeckt. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Glasplättchen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 durch Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München) untersucht. Es wurden hierbei 5 Bilder pro Glasplättchen mit einem 20x Objektiv und einer Belichtungszeit von 600 ms bei HepaRG bzw. 250 ms bei HepG2 Zellen aufgenommen.

Für die automatisierte Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche wurde die Software CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006) verwendet. Die BODIPY-Bilder wurden zunächst in ein binäres Bildformat umgewandelt, wobei für alle Aufnahmen der gleiche Intensitäts-Schwellenwert (HepaRG: 0,09; HepG2: 0,15) angewendet wurde. Es folgte die Bestimmung der BODIPY-positiven Fläche mithilfe der Funktion "*MeasureImageAreaOccupied*". Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von fünf Mikroskopiebildern aus einer biologischen Probe, d.h. von einem Glasplättchen.

2.5. Methoden der Zellkultur

2.5.1. Verwendete Zelllinien

9801 Zellen

Für die experimentelle Metastasierung wurde die murine, *LacZ*-markierte 9801 Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Diese ursprünglich durch Prof. Dr. Jens T. Siveke (Universitätsklinikum Essen) generierte und zur Verfügung gestellte Zelllinie wurde aus einer Lebermetastase einer KPC-Maus isoliert und etabliert. Dementsprechend ist die 9801 Zelllinie syngen zu den in dieser Arbeit verwendeten C57BI/6 Mäusen.

HepaRG Zellen

Als Modellsystem für Hepatozyten diente die humane HepaRG Zelllinie. Die Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Lebertumorgewebe einer Hepatitis-C-Virus positiven Frau etabliert, wobei die Zelllinie letztlich aus nicht-tumorigenen und HCV-negativen Hepatozyten hervorging (Gripon et al., 2002). Undifferenzierte HepaRG Zellen (HPR101) wurden von Biopredic International (Saint Grégoire, Frankreich) bezogen und gemäß Herstellerangaben (siehe Kapitel 2.5.3) differenziert. Differenzierte HepaRG Zellen eigenen sich außerordentlich gut als Modellsystem für Hepatozyten, da sie einerseits, im Gegensatz zu anderen etablierten Zelllinien, einen vergleichbaren Phänotyp wie primäre humane Hepatozyten (PHH) haben und

Material und Methoden

andererseits, im Gegensatz zu PHH, keine donorabhängige Variabilität aufweisen (Klein *et al.*, 2015; Rubin *et al.*, 2015).

HepG2 Zellen

Als zweites Modellsystem für Hepatozyten diente die humane HepG2 Zelllinie. Diese Zelllinie wurde aus einem Hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen etabliert (Aden *et al.*, 1979).

2.5.2. Kultivierung der Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden routinemäßig durch Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München) kultiviert. Die Passage der 9801 und HepG2 Zellen erfolgte dreimal pro Woche. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂. Die für die Kultivierung der Zellen benötigten Lösungen und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Lösungen zur Kultivierung der Zellen.

Lösung	Bezugsquelle
DMSO (Cell Culture Grade)	Merck KgaA, Darmstadt,
	Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	CellSystems, St. Katharinen,
	Deutschland
Hydrocortison	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Insulin (human rekombinant, Zinklösung)	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	USA
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM Lösung aus nicht-essenziellen Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
(100-fach konzentriert)	USA
Dulbecco's PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI-1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach,
	Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung (0,02 % (m/v) EDTA; 0,05 %	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
(m/v) Trypsin, pH 7,4)	
William's E Medium, ohne Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	USA

Folgende Kulturmedium wurden verwendet:

9801: DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und nicht-essentiellen Aminosäuren

(1x verdünnt)

HepG2: DMEM mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin

HepaRG: Standardmedium: William's E Medium mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin,

0,023 IE/mL humanes Insulin, 4,7 µg/mL Hydrocortison

Differenzierungsmedium: Standardmedium mit 1,8 % DMSO

Kultivierung und Differenzierung der HepaRG Zellen

Undifferenzierte HepaRG Zellen wurden amplifiziert, indem sie in einem Verhältnis von 1:5 passagiert wurden, sobald sie eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten. Für die Amplifikation wurden die undifferenzierten HepaRG Zellen in Standardmedium kultiviert, wobei ein Medienwechsel zweimal pro Woche erfolgte.

Für die Differenzierung wurden die HepaRG Zellen in einem Passage-Verhältnis von 1:5 im gewünschten Zellkulturplattenformat (96-Well, 24-Well mit Glasplättchen, 6-Well) in Standardmedium ausgesät. Für zwei Wochen wurde anschließend jeweils zweimal pro Woche ein Medienwechsel mit Standardmedium durchgeführt (**Abb. 2.12, A**). Dann wurden die HepaRG Zellen für zwei Wochen in Differenzierungsmedium kultiviert, wobei auch zweimal pro Woche das Medium gewechselt wurde (**Abb. 2.12, A**). Vier Wochen nach dem Aussäen war die Differenzierung der HepaRG Zellen abgeschlossen (**Abb. 2.12, B**).

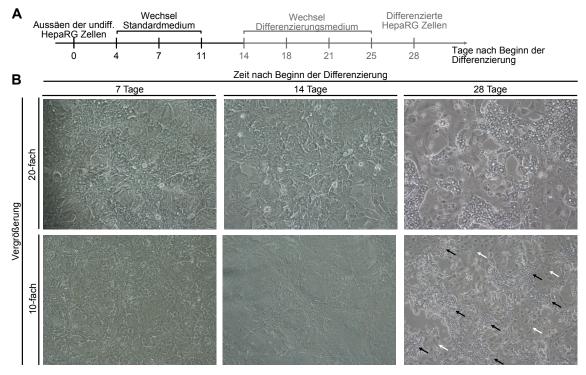


Abbildung 2.12: Differenzierung von HepaRG Zellen zu Hepatozyten- und Cholangiozyten-artigen Zellen. (A) Für die Differenzierung werden undifferenzierte HepaRG Zellen im gewünschten Format ausgesät und zunächst für zwei Wochen in Standardmedium und anschließend für zwei Wochen in Differenzierungsmedium kultiviert. Dabei erfolgt der Mediumwechsel zweimal pro Woche. (B) Repräsentative mikroskopische Bilder von HepaRG Zellen 7 Tage (*links*), 14 Tage (*Mitte*) bzw. 28 Tage (*rechts*) nach Start der Differenzierung. Hepatozyten-artige Zellen (schwarze Pfeile) und Cholangiozyten-artige Zellen (weiße Pfeile) sind hervorgehoben.

2.5.3. Stimulation von Zellen mit rekombinantem TIMP-1

HepG2 Zellen wurden am Vortag des Experiments durch Katja Honert auf das gewünschte Zellkulturplattenformat ausgesät, sodass sie eine Konfluenz von etwa 70 % aufwiesen. HepaRG Zellen wurden nach Ende der Differenzierung für Experimente verwendet. Für das Experiment wurde das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde RPMI-1640 Medium mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dies ermöglichte den HepaRG bzw. HepG2 Zellen eine Anpassung an das FCSfreie Medium vor der gewünschten Behandlung. Am Folgetag wurde das FCS-freie Medium abgesaugt und das auf 37°C vorgewärmte, gewünschte Kulturmedium, d.h. RPMI-1640 Medium mit 0,1 % BSA mit dem gewünschten Zusatz, zugegeben. Eine Stimulation mit TIMP-1 erfolgte mit 500 ng/mL rekombinantem humanen TIMP-1 im Zellkulturmedium. Die Behandlung mit dem Carnitin Palmitoyltransferase-1 Inhibitor Etomoxir erfolgte mit einer Konzentration von 20 µM Etomoxir im Medium. Für die Behandlung mit dem AMPK Inhibitor Compound C wurden die Zellen zunächst für 30 min mit 10 µM Compound C-beinhaltendem Medium inkubiert. Anschließend wurde dann die gewünschte Menge an rekombinantem humanen TIMP-1 zum Medium gegeben, um eine Konzentration von 500 ng/mL TIMP-1 zu erreichen.

2.5.4. Proteinisolation aus Zellen

Proteinaufarbeitung für Western Blot-Analyse

Zur Aufarbeitung von Gesamtprotein für die *Western Blot*-Analyse wurden differenzierte HepaRG Zellen in 6-*Well* Zellkulturschalen für 10 min mit Stimulationsmedium in Präsenz bzw. Absenz von 500 ng/mL TIMP-1 inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden jeweils 40 µL RIPA Protein-Extraktionspuffer pro *Well* zugegeben und die Zellen wurden mittels Zellschaber von der Schale abgelöst. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein mechanischer Aufschluss durch dreimalige Inkubation für jeweils 10 s im Ultraschallbad. Daraufhin wurde das Zelllysat eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Proteinaufarbeitung für Signaling Array:

Die Aufarbeitung von Gesamtprotein für die *Signaling Array* Analyse wurde durch Celina Eckfeld und Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München) durchgeführt. Dafür wurden differenzierte HepaRG Zellen in 6-*Well* Zellkulturschalen für 10 min mit Stimulationsmedium in Präsenz bzw. Absenz von 500 ng/mL TIMP-1 inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden jeweils 50 µL Protein-Lysepuffer (*Cancer Signaling Phospho*

Antibody Array Kit versetzt mit 1x Phosphatase- und 1x Protease-Inhibitor) pro Well zugegeben und die Zellen wurden mittels Zellschaber von der Schale abgelöst. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und nach Herstellerangaben (Cancer Signaling Phospho Antibody Array, Full Moon Biosystems Inc., USA) mit Lyse-Beats versetzt und aufgeschlossen. Die anschließenden Schritte mit Pufferaustausch/Lysatreinigung, Lysatquantifizierung und Qualitätskontrolle, Proteinmarkierung über Biotinylierung, Blocking, Kopplung und Detektion erfolgten gemäß Herstellerangaben (Cancer Signaling Phospho Antibody Array, Full Moon Biosystems Inc., USA).

2.5.5. Messung der zellulären Sauerstoffverbrauchsrate

Für die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate von differenzierten HepaRG und HepG2 Zellen wurde das Fatty Acid Oxidation Complete Assay Kit (Abcam) nach Herstellerangaben verwendet. Die HepaRG bzw. HepG2 Zellen wurden dafür in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät, wobei die äußeren Wells der Platte nur mit PBS befüllt wurden. Vor der Durchführung wurden alle Medien, Medienbestandteile, das PBS, das Mineralöl zum Überschichten der *Wells* und der Tecan Reader auf 37 °C vorgewärmt. Für die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate wurde eine Mediumstammlösung hergestellt, indem dem Base Media des Fatty Acid Oxidation Complete Assay Kits 2,5 mM Glucose, 0,5 mM Carnitin, 5 mM Hepes Pufferlösung und 0,15 mM BSA-konjugierte Ölsäure ("FAO Conjugate" aus dem Fatty Acid Oxidation Complete Assay Kit) zugegeben wurde. Ausgehend von dieser Mediumstammlösung wurde für jede Stimulationsbedingung eine eigene Mastermix-Lösung hergestellt, wobei für jedes Well 90 µL Mediumstammlösung mit 10 µL Sauerstoffreagenz ("Extracellular O₂ Consumption Reagent" aus dem Fatty Acid Oxidation Complete Assay Kit) und ggf. weiteren Zusätzen wie 500 ng/mL TIMP-1, 2 µM Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), 1 µM Antimycin A, 10µM Compound C, 20 µM Etomoxir, 3 µM BPTES oder 2 µM UK5099 verwendet wurden. Für die Durchführung des Assays wurde zunächst das vorhandene Medium der Zellen abgesaugt und die Wells zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well jeweils 100 µL Mastermix-Lösung mit den gewünschten Zusätzen zugegeben. Danach wurde jedes Well vorsichtig mit einem Tropfen vorgewärmtem Mineralöl aus dem Fatty Acid Oxidation Complete Assay Kit überschichtet, wobei darauf geachtet wurde, dass das Medium vollständig luftdicht verschlossen war und keine Blasenbildung stattfand. Die Messung erfolgte im Tecan Reader unter folgenden Einstellungen: TR-Fluorescence Intensity-Modus, 4 h Messzeit mit Messung alle 2 min, Anregung bei 380 nm, Emission bei 650 nm, Integrationszeit 100 µs, Lag-Zeit 30 μs, Settle-Zeit 0 μs, Z-Position 34.358 μm.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. RNA-Extraktion aus Gewebestücken

RNA-Extraktion aus Lebergewebe

Um RNA aus humanem bzw. murinem Lebergewebe zu isolieren, wurde das tiefgefrorene Gewebestück in ein Kryo-Reaktionsgefäß mit Silikondichtring überführt und 1 mL auf 4 °C gekühltes Trizol, sowie wenige Zirconeumsilicatkügelchen zugegeben. Der mechanische Gewebeaufschluss erfolgte durch 10 s Rütteln im Minibeadbeater. Nach dem Aufschluss wurde das Gewebehomogenisat auf Eis gelagert, bis alle Proben aufgeschlossen waren. Dann wurden 200 µL Chloroform zugegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase der zentrifugierten Probe wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µL Isopropanol vorgelegt war. Nach dem Vermischen durch Vortexen wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert. Der Überstand der zentrifugierten Proben wurde verworfen und das Pellet wurde durch Zugabe von 1 mL 80 % Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 8.000 x g wurde der Überstand gründlich abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde für etwa 10 min im geöffneten Reaktionsgefäß unter Luftabzug getrocknet. Anschließend wurden 150 µL nukleasefreies Wasser zugegeben und die Probe wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, um ein vollständiges Lösen der RNA zu ermöglichen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RNA-Extraktion aus Pankreasgewebe

Die Extraktion von RNA aus murinem Pankreasgewebe erfolgte prinzipiell nach demselben Protokoll, allerdings mit folgenden Änderungen: Zunächst wurde darauf geachtet, dass das verwendete Pankreasgewebestück ausreichend klein, d.h. etwa so groß wie ein Stecknadelkopf, war. Die Größe des Pankreasgewebestücks war äußerst kritisch, da ein zu großes Gewebestück zur Degradierung der RNA während dem Gewebeaufschluss führte und ein zu kleines Gewebestück zu wenig RNA lieferte. Um die gewünschte Größe des Gewebestücks zu erhalten, wurde das tiefgefrorene Pankreasgewebe auf Trockeneis in 10 cm Zellkulturschalen mithilfe eines Skalpells geschnitten. Alle dafür benötigten Utensilien wurden zuvor für etwa 1 h bei -80 °C gelagert, sodass ein Antauen des Gewebes verhindert wurde. Anschließend wurde das stecknadelkopfgroße Gewebestück vorsichtig auf die Innenseite des Deckels eines Kryo-Reaktionsgefäßes gelegt, der ebenfalls auf -80 °C vorgekühlt und auf Trockeneis gelagert wurde. Der Deckel wurde dann auf ein Kryo-Reaktionsgefäß geschraubt, das mit 1 mL Trizol und Zirconeumsilicatkügelchen befüllt und auf Eis gelagert war und unmittelbar darauf in den Minibeadbeater eingespannt, sodass das Gewebe sofort durch Rütteln für 10 s mechanisch aufgeschlossen wurde. Anschließend wurde die Probe mit

Trockeneis überschichtet und dadurch eingefroren. Nachdem alle Proben aufgeschlossen und eingefroren waren, wurden sie komplett in Eis versenkt, was ein langsames Auftauen der Gewebehomogenisate ermöglichte. Die auf Eis aufgetauten Proben wurden dann für 5 min bei 4 °C und 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das mit 100 µL Chloroform befüllt war. Die folgenden Schritte wurden analog des Protokolls der RNA Extraktion aus Lebergewebestücke durchgeführt.

2.6.2. RNA-Extraktion aus Zellen

Für die RNA-Extraktion wurden differenzierte HepaRG Zellen in 6-Well Zellkulturschalen verwendet. Nach Ende der Stimulationsdauer wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 500 µL Trizol pro *Well* zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und das Lysat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µL Chloroform zugegeben und durch Vortexen gemischt. Die weiteren Schritte wurden analog des Protokolls der RNA Extraktion aus Lebergewebestücke (siehe Kapitel 2.6.1) durchgeführt.

2.6.3. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die aus Gewebestücken oder Zellen extrahierte RNA wurde für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration mit einem Nanodrop, wurde die RNA durch Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser auf eine Endkonzentration von 100 ng/µL eingestellt.

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde die Apparatur zum Gießen eines Agarosegels zunächst für 30 min in 2 % Absolve inkubiert und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Ein TAE-Agarosegel wurde hergestellt, indem 1 % (m/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde. Nachdem 2,5 µL SYBR Green pro 50 mL Agaroselösung zugegeben wurden, wurde die Lösung in die Apparatur gegossen und für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Anschließend wurden 5 µL der auf 100 ng/µL eingestellten RNA Probe mit 5 µL RNA Ladepuffer gemischt und durch Gelelektrophorese für 30 min bei 100 V im 1 %-Agarosegel aufgetrennt. Die Analyse der Integrität erfolgte durch Belichtung im ChemiDoc Dokumentationssystem.

2.6.4. Reverse Transkription von RNA

Um die RNA durch reverse Transkription in cDNA umzuschreiben, wurden 10 μL der auf 100 ng/μL eingestellten RNA in einem 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 10 μL einer Mastermix-Lösung zugegeben, die sich wie folgt zusammensetzte:

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.

Reagens	Volumen pro Reaktion [µL]
10-fach RT Puffer	2,0
25-fach dNTP Mix (100 mM)	0,8
10-fach RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nukleasefreies Wasser	3,2
Gesamtvolumen pro Reaktion	10,0

Die reverse Transkription erfolgte in der PCR-Maschine mit folgendem Programm: Tabelle 11: Programm der reversen Transkription.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 s	∞

2.6.5. Genexpressions analyse mittels TaqMan-Messung

Um die mRNA-Expression zu untersuchen, wurden die cDNA-Proben zunächst mit nukleasefreiem Wasser 1:100 verdünnt. Von der 1:100 Verdünnung ausgehend wurde zudem eine 1:500 Verdünnung der cDNA hergestellt. Für die Messung der Zielgenexpression (**Tab.** 5) wurden pro Probe in einem Dreifachansatz 10 µL der 1:100 Verdünnung pro *Well* in einer 96-*Well* PCR Platte vorgelegt. Für die 18S-rRNA Referenzgenmessung wurde pro Probe in einem Dreifachansatz 10 µL der 1:500 Verdünnung pro *Well* vorgelegt. Anschließend wurden für die Zielgenmessung und die 18S-rRNA Referenzgenmessung Mastermix-Lösungen gemäß folgendem Pipettierschema (**Tab. 12**) hergestellt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Mastermix-Lösungen für die TaqMan-Messung.

	Reagens	Volumen pro Reaktion [µL]
18S rRNA Mastermix	TaqMan Mastermix	12,50
	18S Primer-Probe-Mix	1,25
	Nukleasefreies Wasser	1,25
	Gesamtvolumen:	15,00
Zielgen Mastermix	TaqMan Mastermix	12,50
	Primer links (100 μM)	0,25
	Primer rechts (100 μM)	0,25
	Probe (10 μM)	0,25
	Nukleasefreies Wasser	1,75
	Gesamtvolumen:	15,00

Mit einer Multipette wurden jeweils 15 µL der entsprechenden Mastermix-Lösung in jedes *Well* der 96-Well PCR-Platte gegeben. Abschließend wurde die 96-*Well* PCR-Platte mit einer Abdeckfolie luftdicht verschlossen und für 10 s bei 800 x g zentrifugiert. Die TaqMan-Messung erfolgte im Real Time PCR-Gerät gemäß folgendem Programm:

Tabelle 13: TaqMan-Programm.

	Schritt 1	Schritt 2	40 Zyklen	
			Schritt 3 a	Schritt 3 b
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Zeit	2 min	10min	15 s	60 s

2.6.6. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit

Die Proteinkonzentration im isolierten Zelllysat (siehe Kapitel 2.5.4) wurde mit Hilfe des *Pierce BCA Protein Assay Reagents* bestimmt. Hierfür wurden die Zelllysate in einem Verhältnis von 1:25 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden 10 μL der verdünnten Zelllysate bzw. 10 μL der BSA-Proteinstandardverdünnungen in Duplikaten auf einer 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Dann wurden 200 μL der BCA-Lösung, die gemäß Herstellerangaben hergestellt wurde, pro *Well* hinzugegeben und die 96-*Well* Zellkulturplatte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der Proben bei 562 nm wurde im Tecan Reader gemessen.

2.6.7. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Für die *Western Blot*-Analyse wurde denaturiertes Proteinlysat verwendet (siehe Kapitel 2.5.4). Zur Denaturierung wurde das Zelllysat mit Laemmli-Puffer und bidestilliertem Wasser gemischt, sodass alle zu analysierenden Proben auf eine Proteinkonzentration von 2 μg/μL eingestellt waren. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurde das denaturierte Zelllysat bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit 10 % SDS-Gelen durchgeführt. Die Zusammensetzung des 10 % Trenn- bzw. Sammelgelpuffers ist Tabelle 4 zu entnehmen. Nach einer gründlichen Reinigung wurde der Trenngelpuffer in die Gießvorrichtung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol abgekippt, der Sammelgelpuffer auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm eingefügt. Das polymerisierte SDS-Gel wurde anschließend in die Gelelektrophoresevorrichtung eingespannt. Nachdem die Vorrichtung mit Elektrophoresepuffer (**Tab. 4**) gefüllt war, wurden 20 μ L Proteinlysat (c = 2 μ g/ μ L) pro Geltasche aufgetragen. Außerdem wurde in eine Geltasche 4 μ L SDS-Längenstandard aufgetragen. In alle noch nicht befüllten Geltaschen wurden 20 μ L 1x Laemmli-Puffer, verdünnt in bidestilliertem Wasser, gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde gestartet, indem zunächst für 10 min eine Spannung von 70 V und anschließend für etwa 2 h eine Spannung von 120 V angelegt wurde.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe einer *Semi-Dry-Blot* Apparatur und unter Verwendung des *Blotting*-Puffers (**Tab. 4**) auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Zur Quantifizierung des Gesamtproteins wurde eine SYPRO Ruby Protein Stain Färbung durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 15 min in einem Puffer aus 10 % Methanol und 7 % Acetat inkubiert. Anschließend wurde viermal mit bidestilliertem Wasser für je 1 min gewaschen und schließlich für 15 min lichtgeschützt mit SYPRO Ruby Protein Stain gefärbt. Zum Entfernen überschüssiger Lösung wurde die Membran viermal für je 1 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Belichtung der Membran erfolgte Geldokumentationsgerät. Anschließend wurde die Membran mittels Skalpells in geeignete Abschnitte geschnitten. Die Membranteile wurden zunächst dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen, um die SYPRO Ruby Färbung zu entfernen. Um die freien Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren, wurden die Membranteile für 1 h in Blocklösung (Tab. 4) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBS-T wurde der Primärantikörper, verdünnt (Tab. 6) in Blocklösung, zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Es folgte die Zugabe des in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörpers (Tab. 6), eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in TBS-T. Die Belichtung der Blots erfolgte unter Verwendung des Clarity Western ECL Substrate Kits (Tab. 7) nach Herstellerangaben im Geldokumentationsgerät.

2.6.8. Signaling Array

Die Signaling Array-Analyse wurde durch Celina Eckfeld und Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München) durchgeführt. Die Array-Objektträger wurden im GenePix 4100 A mithilfe der GenePix Pro 7 Software gescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Excel-Software. Dafür wurde zunächst vom Mittelwert der Fluoreszenzwerte jedes Targets der Mittelwert der Fluoreszenzwerte aller negativen Kontrollen subtrahiert. Anschließend wurde der korrigierte mittlere Fluoreszenzwert jedes Phospho-Targets (z.B. Phospho-AMPK Thr172) auf den korrigierten mittleren Fluoreszenzwert des zugehörigen Gesamtprotein-Targets (z.B. AMPK) normalisiert.

2.6.9. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) zur Quantifizierung von humanem bzw. murinem TIMP-1

Die TIMP-1 Proteinkonzentrationen in Blutplasmaproben von Patientinnen und Patienten bzw. von Mäusen wurden mit Hilfe des *Human* bzw. *Mouse TIMP-1 DuoSet ELISA Kit* (**Tab. 7**) bestimmt. Die Durchführung des ELISA erfolgte gemäß Herstellerangaben, wobei humane

Plasmaproben in einer 1:500 Verdünnung und murine Plasmaproben in einer 1:7 Verdünnung verwendet wurden.

2.6.10. Quantifizierung und Auswertung von Metaboliten in murinen Gewebeproben mittels *Targeted Metabolomics*

Für die *Metabolomics* Analysen wurden Gewebeproben verwendet, die sofort nach dem Tod der Mäuse entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, anschließend bei -80 °C und während des Transports zur Firma Biocrates (Innsbruck, Österreich) auf Trockeneis gelagert wurden. Die untersuchten Gewebeproben wurden von jeweils drei gesunden männlichen Wildtyp bzw. TIMP-1-defizienten Mäusen, sowie von jeweils drei männlichen TIMP-1-kompetenten bzw. TIMP-1-defizienten KPC Mäusen mit histologisch verifiziertem PDAC G2 bzw. G3 isoliert. Die Quantifizierung von über 500 Metaboliten in Leber-, Pankreas- und Plasmaproben von Mäusen erfolgte gemäß standardisierter Protokolle unter Verwendung des *MxP Quant 500 Kit* (**Tab. 7**) durch den Hersteller (Biocrates, Innsbruck, Österreich). Die Lipide und Hexosen wurden nach einer *Electrospray Ionization* (ESI) der Gewebeproben mittels *Flow Injection Analysis-Tandem Mass Spectrometry* (FIA-MS/MS) quantifiziert, wohingegen kleinere Moleküle mittels *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) quantifiziert wurden.

Für die Auswertung der *Metabolomics*-Daten wurde für jeden Metabolit der Median der jeweiligen Gruppe, d.h. TIMP-1-kompetent gesund bzw. TIMP-1-defizient gesund bzw. TIMP-1-kompetent PDAC bzw. TIMP-1-defizient PDAC, berechnet. Um statisch signifikante Unterschiede zu finden, wurden die Mediane aller Metabolite derselben Metabolitklassen zwischen den unterschiedlichen biologischen Gruppen bei normalverteilten Daten mittels *Paired Student's t-Test* bzw. bei nicht normalverteilten Daten mittels *Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank Test* verglichen.

2.7. In silico Analysen publizierter Datensätze

2.7.1. Evaluierung von Transkriptomdaten (Moffitt *et al.*, 2015) aus dem Lebermetastasengewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten

Um Geschlechtsunterschiede im Lebermetastasengewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten zu finden, wurde der Transkriptomdatensatz der Moffitt Kohorte ausgewertet (**Abb. 2.8**). Zunächst wurde mittels *Student's t-Test* für jedes Gen überprüft, ob sich dessen hepatische Expression signifikant (p < 0,05) zwischen den weiblichen bzw. männlichen Populationen (**Abb. 2.8, A**) unterscheidet. Da es sich dabei um die Testung multipler Hypothesen, die insgesamt mehr als 19.000 Gene umfassten, handelte, wurde anschließend

eine Benjamini-Hochberg Prozedur angewendet (siehe Kapitel 2.8.1). Das Ausmaß (engl. *fold change*) des Expressionsunterschieds zwischen Männer und Frauen wurde als Verhältnis der Mediane beider Geschlechtergruppen berechnet.

Die Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) wurde nach dem Protokoll von Reimand et al. (Reimand et al., 2019) unter Verwendung der Software Gene Set Enrichment Analysis (Tab. 8) durchgeführt. Als Ausgangsmatrix wurde eine Liste aller Gene, deren Expression sich nach Benjamini-Hochberg Korrektur signifikant zwischen beiden Geschlechtern unterschied, erstellt. Diese 2836 geschlechtsabhängig exprimierten Gene wurden nach dem medianen Expressionsunterschied der Männer im Verhältnis zu den Frauen (engl. fold change male vs. female) gewichtet. Der Referenzdatensatz (Human GOBP AllPathways no GO iea August 01 2020 symbol.gmt) wurde von der Website Lab des Bader (http://download.baderlab.org/EM Genesets/) bezogen. Die Ergebnisse der GSEA wurden mit der Software Cytoscape (Tab. 8) visualisiert. Dies erfolgte mit Hilfe der Anwendung "Enrichment Map", wobei alle Gene Sets mit einer Falscherkennungsrate (engl. false discovery rate, FDR) < 0,01, einem normalisierten Enrichment Score (NES) > 2,00 bzw. < -2,00 und mindestens zwei Verbindungen (engl. edges) zu anderen Gene Sets in die Visualisierung mit einbezogen wurden.

2.7.2. Evaluierung von Transkriptomdaten (Bailey et al., 2012) aus dem Pankreastumorgewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten

Um Gene zu identifizieren, deren Expression sich im pankreatischen Primärtumor von PDAC-Patientinnen und -Patienten unterschied, wurde der Transkriptomdatensatz der Bailey Kohorte (Abb. 2.7) ausgewertet. Zunächst wurde mittels Mann Whitney Test für jedes Gen überprüft, ob sich dessen Expression signifikant (p < 0,05) zwischen Frauen und Männer unterschied. Da es sich dabei um die Testung multipler Hypothesen handelte, die insgesamt mehr als 16.500 Gene umfassten, wurde anschließend eine Benjamini-Hochberg Prozedur angewendet (siehe Kapitel 2.8.1). Das Ausmaß (engl. *fold change*) des Expressionsunterschieds zwischen Männer und Frauen wurde als Verhältnis der Mediane beider Geschlechtergruppen berechnet. Für die Identifikation männerspezifisch hochregulierter TDSFs wurde alle Gene, die nach Benjamini-Hochberg Korrektur im männlichen Pankreasgewebe signifikant höher exprimiert waren als im weiblichen Pankreasgewebe, in der UniProt Datenbank (https://www.uniprot.org) überprüft. Alle Gene, deren subzelluläre Lokalisierung (engl. *subcellular localization*) als "*secreted*" oder "*secretory vesicle*" annotiert war, wurden als TDSFs definiert.

2.7.3. Evaluierung von Transkriptom- und ATAC-Sequenzierungsdaten (Dhara et al., 2021) aus humanen Pankreastumorzellen

Um die DNA-Zugänglichkeit des *TIMP-1* Gens in Pankreastumorzellen, die aus dem Primärtumor von PDAC-Patientinnen und -Patienten isoliert wurden, mit der RNA-Expression von TIMP-1 und dem rezidivfreien Überleben zu korrelieren, wurde der RNA- und ATAC-Sequenzierungsdatensatz der Dhara Kohorte (**Abb. 2.9**) ausgewertet. Als DNA-Zugänglichkeit des *TIMP-1* Gens wurde dabei der *ATAC-Seq Peak* auf dem X-Chromosom mit Beginn bei 47.441.399 Basenpaaren (bp) und Ende bei 47.441.965 bp definiert, da das *TIMP-1* Gen auf dem humanen Referenzgenom hg19 auf Position chrX:47.441.835 bis chrX:47.446.188 (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP1) annotiert ist. Für die Analysen wurde pro Probe jeweils der Mittelwert der in Duplikaten gemessenen *ATAC-Seq Peaks* von TIMP-1 verwendet.

2.7.4. Evaluierung von Transkriptom- und ATAC-Sequenzierungsdaten (Alonso-Curbelo *et al.*, 2021) aus murinen Pankreasepithelzellen

Für die Analyse der DNA-Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens und der TIMP-1 mRNA-Expression in Pankreasepithelzellen, die aus männlichen gesunden Kontrollmäusen bzw. Caerulein behandelten Mäusen oder PDAC-erkrankten Mäusen (KP^{fl}C-Mausmodell) isoliert wurden, wurde der ATAC- bzw. RNA-Sequenzierungsdatensatz von Alonso-Curbelo *et al.* (Alonso-Curbelo *et al.*, 2021) verwendet. Die Datensätze wurden über die Website des Journals *Nature* (https://www.nature.com/articles/s41586-020-03147-x, "Supplementary Table 2" und "Supplementary Table 5") bezogen. Die Expressionsänderungen (engl. *fold changes*), Standardfehler und bereinigten p-Werte der TIMP-1 mRNA-Expression und der DNA-Zugänglichkeit des Transkriptionsstarts bzw. der Promotorregion des *Timp1* Gens wurden aus diesen öffentlich zugänglichen Datensätzen übernommen (Alonso-Curbelo *et al.*, 2021).

2.8. Statistische Analysen

2.8.1. Allgemeine Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit der Software *IBM SPSS Statistics* oder *GraphPad Prism* (**Tab. 8**) durchgeführt. Es handelte sich ausschließlich um zweiseitige statistische Tests und eine Signifikanz wurde angenommen, sobald der p-Wert unter oder gleich dem Schwellenwert 0,05 war. Normalverteilungen von Gruppen wurden mittels Shapiro-Wilk Test bestimmt. Korrelationen zwischen quantitativen Variablen wurden mit Hilfe der

Spearman Korrelation untersucht, da keine Normalverteilung vorlag. Sofern keine weitere Information genannt ist, wurden zwei Gruppen mittels Student's t-Test im Falle einer Normalverteilung bzw. mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney Test im Falle nicht normalverteilter Daten verglichen. Ein $Paired\ Student$'s t-Test wurde verwendet, um die 5-, 3- und 1-Jahresüberlebensraten von Pankreaskrebspatientinnen und -patienten zu vergleichen. Der nicht-parametrische Wilcoxon Test wurde verwendet, um die Expression der mRNA-Signatur prometastatischer Gene im Lebergewebe von weiblichen und männlichen KPC-Mäusen zu vergleichen, da die Daten nicht normalverteilt waren. Die SAA1 mRNA-Expression in TIMP-1-behandelten HepaRG Zellen wurde mit einem One- $Sample\ t$ -Test gegen den Referenzwert 1 evaluiert. Der Chi- $Square\ (\chi^2)$ Test wurde verwendet, um Unterschiede beim gewebespezifischen Auftreten synchroner Metastasen zwischen Pankreaskrebs-erkrankten Frauen und Männern zu vergleichen.

Bei der Durchführung einer großen Anzahl statistischer Tests ergibt sich die Problematik, dass alleine durch Zufall einige p-Werte geringer als der Schwellenwert 0,05 sind, obwohl möglicherweise alle Nullhypothesen wahr sind (McDonald, 2014). Daher wurde bei der Testung multipler Hypothesen im Zuge der Genexpressionsanalysen zusätzlich die Benjamini-Hochberg Prozedur (Benjamini und Hochberg, 1995) angewendet. Dafür wurde eine Rangliste mit allen Genen, geordnet nach dem p-Wert (siehe Kapitel 2.7.1 und 2.7.2) und beginnend mit dem kleinsten p-Wert, erstellt. Gene, deren p-Wert identisch war, wurden anhand der Expressionsänderung fold change) beginnend (engl. und mit Expressionsänderung untergeordnet. Anschließend wurde für jedes Gen der Benjamini-Hochberg kritische Wert (BHKW) nach der Formel

$$BHKW = \left(\frac{Rang\ des\ jeweiligen\ Gens}{Gesamtzahl\ der\ Gene}\right) \times\ FDR$$

berechnet. Dabei wurde eine FDR von 0,5 angenommen, um keinen übermäßigen Verlust von Information zu haben (McDonald, 2014). Gene wurden als signifikant differenziell exprimiert angenommen, wenn die folgenden beiden Kriterien erfüllt waren: i) der p-Wert der initialen statistischen Analyse war < 0,05 und ii) der p-Wert war kleiner als der BHKW des Gens (p < BHKW) oder der p-Wert des Gens war kleiner als der p-Wert eines anderen Gens, für das p < BHKW galt (McDonald, 2014).

2.8.2. Zwei-Schritt Cluster Analyse

Die Zwei-Schritt *Cluster* Analyse wurde mit der Software *IBM SPSS Statistics* (**Tab. 8**) durchgeführt und angewendet, um eine Population (z.B. PDAC-Patienten) anhand einer kontinuierlichen Variablen in bestimmte natürliche Untergruppen einzuteilen. Dabei wurden die TIMP-1-Spiegel, quantifiziert als mRNA oder Protein im Pankreastumor bzw. als Protein im Blutplasma, als "kontinuierliche Variable" definiert und das Schwarz-Bayes-Informationskriterium wurde als "Clusterkriterium" ausgewählt. Die Anzahl der Untergruppen

bzw. *Cluster* wurde definiert als "automatisch bestimmen", d.h. die Zwei-Schritt *Cluster* Analyse lieferte die optimale Anzahl an Untergruppen einer Population in einer unvoreingenommenen (engl. *unbiased*) Weise. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die Gruppierung von Pankreaskrebspatientinnen und -patienten mit der Zwei-Schritt *Cluster* Analyse ausschließlich abhängig von den jeweiligen TIMP-1-Spiegeln und völlig unabhängig vom Überleben der Erkrankten war. Diese Art der Klassifizierung steht im Gegensatz zu anderen Gruppierungsmethoden, wie bspw. der *maximally selected log-rank* Statistik (Hothorn und Zeileis, 2008), bei der Populationen anhand eines Grenzwerts unterteilt werden, der die Untergruppen optimale bezüglich des Überlebens separiert.

2.8.3. Statistische Evaluierung des Überlebens

Zeitabhängige Überlebenswahrscheinlichkeiten von KPC-Mäusen bzw. von Pankreaskrebserkrankten Frauen und Männern wurden mit der Kaplan-Meier Methode evaluiert. Der Log-Rank Test (auch Mantel-Cox Test) wurde angewendet, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Untergruppen zu identifizieren. Die Cox-Regressionsanalyse wurde angewendet, um das Risikoverhältnis (engl. hazard ratio, HR) inklusive der zugehörigen 95 % Konfidenzintervalle zwischen zwei unabhängigen Untergruppen zu evaluieren.

2.9. Zulassung der klinischen und tierexperimentellen Studien

Die durchgeführten klinischen Analysen wurden vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, München, Deutschland, (#1946/07, #409/16S) bzw. dem *University Health Network Research Ethics Board*, Toronto, Kanada (#03-0049, #15-9596, #17-6106) zugelassen. Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer wurden vor der Aufnahme in die klinische Studie über deren Ablauf informiert und stimmten einer Beteiligung an der Studie schriftlich zu. Alle klinischen Daten wurden in einem pseudonymisierten Datensatz gespeichert und evaluiert, sodass keine Rückschlüsse auf die jeweiligen Personen möglich waren.

Alle Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet 02-17-146) und gemäß dem Tierschutzgesetz des Freistaates Bayern durchgeführt.

3. Ergebnisse

Wesentliche Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits in einem Artikel im *Journal of Experimental Medicine* (Hermann *et al.*, 2021) veröffentlicht. Ein Verweis auf die Veröffentlichung ist der jeweiligen Abbildungslegende zu entnehmen.

3.1. Geschlechtsunterschiede beim Überleben und der Lebermetastasierung von Pankreaskrebs

3.1.1. Verkürztes Gesamtüberleben bei Pankreaskrebs beim männlichen Geschlecht

Um erste Hinweise darauf zu bekommen, ob es Unterschiede zwischen den biologischen Geschlechtern bei der Pankreaskrebserkrankung gibt, wurde zunächst das Gesamtüberleben von Pankreaskrebserkrankten verglichen (Hermann *et al.*, 2021). Die Auswertung eines 101.357 Pankreaskrebspatientinnen und 101.227 -patienten umfassenden Datensatzes des ECIS zeigte ein verkürztes relatives, d.h. das geschlechts- und altersstandardisiertes, Überleben von Männern im Vergleich zu Frauen (**Abb. 3.1, A**). Zusätzlich zu diesem Geschlechtsunterschied bei Pankreaskrebspatientinnen und -patienten konnte auch im KPC-Mausmodell ein verringertes Gesamtüberleben männlicher Mäuse mit PDAC im Vergleich zu weiblichen Mäusen beobachtet werden (**Abb. 3.1, B**).

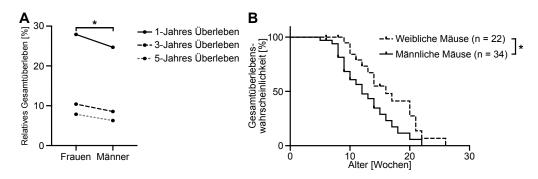


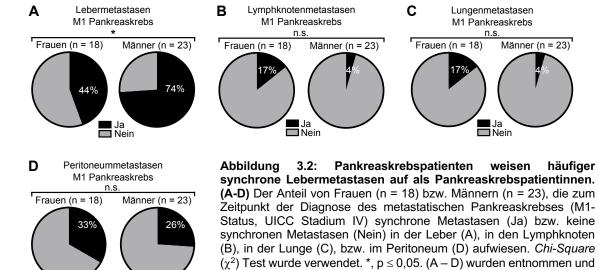
Abbildung 3.1: Pankreaskrebs-erkrankte Männer bzw. männliche Mäuse sterben früher als Frauen bzw. weibliche Mäuse. (A) Relative 1-, 3- und 5-Jahres Überlebensraten von Frauen (n = 101.357) bzw. Männern (n = 101.227) mit Pankreaskrebs. Die Daten wurden von der ECIS-Datenbank bezogen. Ein *Paired Student's t-Test* wurde verwendet. (B) Gesamtüberleben von weiblichen (n = 22) bzw. männlichen (n = 34) PDAC-erkrankten KPC-Mäusen. *Log-Rank Test* wurde verwendet. *, p \leq 0,05 (A, B). (A, B) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

3.1.2. An Pankreaskrebs erkrankte Männer entwickeln häufiger und schneller Lebermetastasen als Frauen

Da die Metastasierung das Überleben von Krebserkrankten maßgeblich bestimmt (Steeg, 2016), wurde im nächsten Schritt die Metastasenentwicklung in Abhängigkeit des biologischen

Ergebnisse

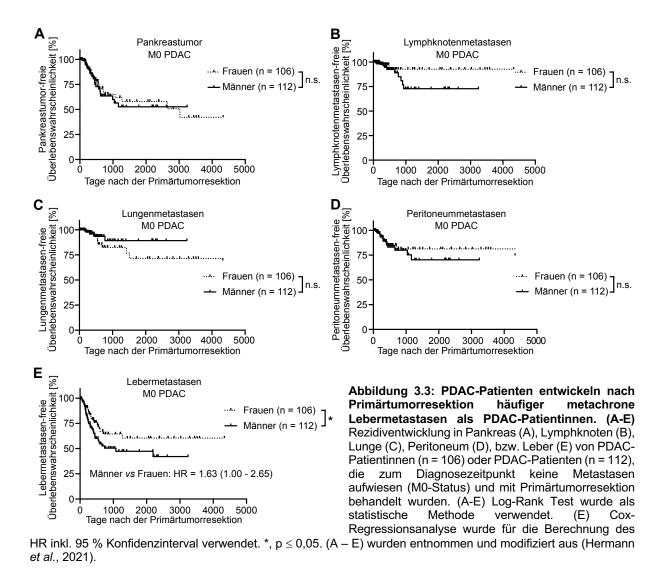
Geschlechts untersucht (Hermann *et al.*, 2021). Männer, die bereits mit einem metastasierten Pankreaskrebs diagnostiziert wurden (M1-Status, **Abb. 2.1**), wiesen häufiger synchrone Metastasen in der Leber im Vergleich zu Frauen mit identischem Erkrankungsstadium auf (**Abb. 3.2**, **A**). Im Gegensatz dazu konnten keine Geschlechtsunterschiede beim Auftreten von synchronen Metastasen in Lymphknoten (**Abb. 3.2**, **B**), Lunge (**Abb. 3.2**, **C**) oder Peritoneum (**Abb. 3.2**, **D**) beobachtet werden.



■Ja ■Nein

Anschließend wurde das ortsspezifische Wiederauftreten der Pankreaskrebserkrankung in denjenigen Patientinnen und Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Diagnose keine Metastasen auswiesen (M0-Status) und mittels potentiell kurativer Resektion des pankreatischen Primärtumors behandelt wurden (Abb. 2.6). In diesen Erkrankten traten nach Entfernen des Primärtumors neue Tumore im Pankreas (Abb. 3.3, A), in Lymphknoten (Abb. 3.3, B), in Lunge (Abb. 3.3, C) bzw. im Peritoneum (Abb. 3.3, D) vergleichbar häufig zwischen Frauen und Männern auf. Demgegenüber entwickelten Männer signifikant häufiger und früher als Frauen metachrone Metastasen in der Leber (Abb. 3.3, E). Insgesamt zeigen diese Daten die Existenz von Geschlechtsunterschieden beim Pankreaskrebs, nämlich, dass das verringerte Überleben des männlichen Geschlechts mit einem häufigeren Auftreten von synchronen und metachronen Metastasen spezifisch in der Leber assoziiert ist (Hermann et al., 2021).

modifiziert aus (Hermann et al., 2021).



3.2. Männerspezifische Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber

3.2.1. Erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene in der Leber von Männern mit Pankreaskrebs

Der Organotropismus der Krebsmetastasierung wird maßgeblich durch die Bildung organspezifischer metastasierungsfördernder Nischen bestimmt (Hoshino *et al.*, 2015). Da die Geschlechtsunterschiede spezifisch bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms in die Leber, aber nicht in andere Organe bzw. Gewebe beobachtet werden konnten (**Abb. 3.2** und **Abb. 3.3**), wurde nun untersucht, ob es molekulare Hinweise auf eine geschlechtsabhängige Bildung einer metastasierungsfördernden Nische speziell in der Leber gibt (Hermann *et al.*, 2021). Dafür wurde ein veröffentlichter Transkriptom-Datensatz (Moffitt *et al.*, 2015) ausgewertet, der RNA Expressionsdaten aus Lebermetastasengewebe von insgesamt 23 Pankreaskrebs-patientinnen und -patienten beinhaltete (**Abb. 2.8**). Es wurden 2.836 Gene

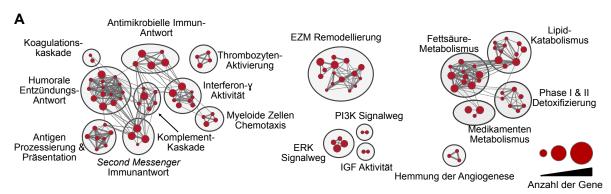
identifiziert, deren Expression sich im Lebergewebe signifikant zwischen den Geschlechtern unterschied (**Abb. 3.4, A, B**). Um eine erste Vorstellung davon zu bekommen, in welchen biologischen Prozessen diese geschlechtsspezifisch exprimierten Gene eine Rolle spielen, wurde eine GSEA durchgeführt (**Abb. 3.4, A**). Die GSEA zeigte, dass vor allem diejenigen Gene im Lebermetastasengewebe von Männern im Vergleich zu Frauen hochreguliert waren, die in Fibrose- (z.B. Umstrukturierung der EZM), Immun- (z.B. Entzündungsantwort, Chemotaxis myeloider Zellen) und Lipidkatabolismus-assoziierten Prozessen involviert sind (**Abb. 3.4, A**). Bei genauer Betrachtung der geschlechtsspezifisch exprimierten Gene wurde eine mRNA-Signatur identifiziert (**Abb. 3.4, B**), die verstärkt im männlichen Lebermetastasengewebe exprimiert wurde und Markergene für prometastatische Hepatozyten, Makrophagen, Myofibroblasten und hämatopoetischen Zellen umfasste (**Abb. 1.2**).

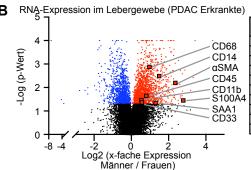
Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich die Expression dieser metastasierungsfördernden Gene im Lebergewebe durch eine Pankreaskrebserkrankung verändert. Tatsächlich wurden alle Gene der metastasierungsfördernden mRNA-Signatur bei männlichen KPC-Mäusen im Zuge der PDAC-Erkrankung in der Leber hochreguliert (**Abb. 3.4**, **C**). Im Gegensatz dazu wurden nur wenige prometastatischen Gene im Lebergewebe weiblicher KPC-Mäuse mit PDAC zu einem geringeren Maße hochreguliert, die Expression anderer Gene blieb bei Weibchen konstant bzw. wurde sogar herunterreguliert (**Abb. 3.4**, **C**). Zusammengefasst deuteten diese Transkriptomdaten an, dass es während der Pankreaskrebserkrankung spezifisch beim männlichen Geschlecht zur Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber kommt (Hermann *et al.*, 2021).

3.2.2. Verstärkte Kolonisierung der Pankreaskrebskonditionierten Leber durch metastatische Tumorzellen bei männlichen Mäusen

Anschließend wurde mittels experimenteller Metastasierung überprüft, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede bei der metastatischen Kolonisierung der Pankreaskrebs-konditionierten Leber gibt. Weder in weiblichen PDAC-erkrankten KPC-Mäusen (Abb. 3.5, A), noch in weiblichen Caerulein behandelten Mäusen (Abb. 3.5, B) konnte eine veränderte Bildung von hepatischen Makrometastasen im Vergleich zu Kontrollweibchen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen männliche PDAC-erkrankte KPC-Mäuse (Abb. 3.5, A) und männliche Caerulein behandelte Mäuse (Abb. 3.5, B) eine stark erhöhte Bildung von Makrometastasen in der Leber sowohl im Vergleich zu männlichen Kontrollmäusen, als auch im Vergleich zu weiblichen PDAC-erkrankten bzw. Caerulein behandelten Mäusen auf. Im Einklang mit den Befunden der Transkriptomanalysen zeigten diese Ergebnisse, dass es beim Pankreaskrebs zur männerspezifischen Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber kommt (Hermann et al., 2021).

Ergebnisse





Pro- metastatisches Gen	Marker für in der prometastatischen Lebemische
SAA1 SAA2 (Maus)	Hepatozyten (Lee et al., 2019)
CD68	Makrophagen (Nielsen et al., 2016)
S100A4	Entzündliche Makrophagen (Österreicher et al., 2011; Nielsen et al., 2016)
CD11b	Myeloide Zellen (Nielsen et al., 2016)
CD14 (Mensch) CD33 (Mensch) Ly6C (Maus)	Immunsuppressive myeloide Zellen (engl. <i>myeloid-derived</i> suppressor cells (Nielsen et al., 2016)
CD45	Hämatopoetische Zellen (Nielsen et al., 2016)
αSMA	Myofibroblasten (Grünwald et al., 2016; Nielsen et al., 2016)

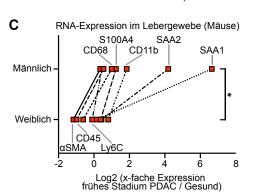


Abbildung 3.4: PDAC-erkrankte Männer weisen eine erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene in der Leber auf als Frauen. (A) Die GSEA offenbarte im Lebergewebe von PDAC-Patienten vs. PDAC-Patientinnen eine männerspezifische Hochregulation von Genen, die in Fibrose-, Immun- bzw. Lipidkatabolismus-assoziierten Prozessen involviert sind. Die biologischen Prozesse ("Knoten") waren signifikant hochreguliert im männlichen Lebergewebe (NES \geq 2,0, FDR q-Wert \leq 0,01), wohingegen keine biologischen Prozesse detektiert wurden, die im männlichen Lebergewebe signifikant herunterreguliert (NES ≤ 2,0, FDR g-Wert ≤ 0,01) waren. Die Größe der Verbindungen korreliert mit der Überlappung der Gene zwischen den jeweiligen Geschlechtsabhängige Knoten. Expression metastasierungsfördernder Gene im Lebergewebe von PDAC-Patientinnen (n = 9) bzw. PDAC-Patienten (n = 14). Student's t-Test und Benjamini-Hochberg-Prozedur wurden angewendet. (C)

Die Veränderung der medianen mRNA-Expression metastasierungsfördernder Gene im Lebergewebe von KPC-Mäusen mit frühen PDAC-Stadien (weiblich: n=3, männlich: n=5) normalisiert zu gesunden Kontrollmäusen (weiblich: n=4). Der nicht-parametrische Wilcoxon-Test wurde angewendet. *, $p \le 0,05$. (A – C) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

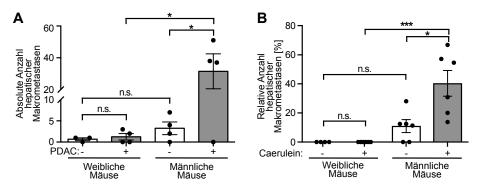


Abbildung 3.5: Die Pankreaskrebs-konditionierte Leber männlicher Mäuse ist empfänglicher für experimentelle Lebermetastasen. (A) Quantifizierung hepatischer Makrometastasen nach intravenöser Inokulation pankreatischer Tumorzellen in Kontrollmäuse (weiblich: n=3, männlich: n=4) bzw. KPC-Mäuse (weiblich: n=4, männlich: n=4). Student's t-Test bzw. Mann Whitney Test wurden angewendet. (B) Quantifizierung hepatischer Makrometastasen im Verhältnis zu Gesamtlebermetastasen (Makro- + Mikrometastasen) nach intravenöser Inokulation pankreatischer Tumorzellen in PBS- (weiblich: n=5, männlich: n=6) bzw. Caerulein behandelte (weiblich: n=6, männlich: n=6) Mäuse. Student's t-Test wurde angewendet. (A, B) Mittelwert \pm SEM. *, $p \le 0,005$; ***, $p \le 0,001$. (A, B) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

3.3. TIMP-1 als männerspezifisch hochregulierter Faktor bei Pankreaskrebs

3.3.1. TIMP-1 ist der sezernierte Faktor mit der stärksten männerspezifisch erhöhten mRNA-Expression im Pankreastumor

Die Bildung metastasierungsfördernder Nischen in entfernten Organen wird durch TDSFs induziert (Peinado *et al.*, 2017). Um denjenigen Faktor zu identifizieren, der ursächlich für die männerspezifische Bildung der prometastatischen Lebernische beim Pankreaskrebs ist, wurde nach Genen gesucht, die verstärkt im Pankreastumorgewebe von Männern exprimiert werden und für sezernierte Proteine kodieren (Hermann *et al.*, 2021). Dafür wurde ein veröffentlichter Transkriptomdatensatz (Bailey *et al.*, 2016) ausgewertet, der RNA-Expressionsdaten aus Pankreastumorgewebe von 33 Patientinnen und 34 Patienten umfasste (**Abb. 2.7**). Insgesamt wurden 470 Gene identifiziert, deren Expression sich im Pankreastumor signifikant zwischen den biologischen Geschlechtern unterschied (**Abb. 3.6, links**). Nur wenige dieser geschlechtsspezifisch exprimierten Gene kodierten für sezernierte Proteine, wobei TIMP-1 als der tumorsezernierte Faktor identifiziert wurde, der am stärksten in Männern im Vergleich zu Frauen hochreguliert war (**Abb. 3.6, rechts**).

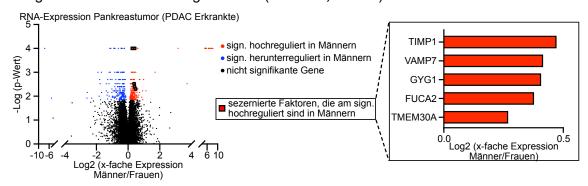


Abbildung 3.6: TIMP-1 ist der am stärksten männerspezifisch erhöht exprimierte tumorsezernierte Faktor in humanen Pankreastumoren. Geschlechtsabhängige Genexpression im Pankreastumorgewebe von Frauen (n = 33) bzw. Männern (n = 34). Der Mann-Whitney Test und die Benjamini-Hochberg-Prozedur wurden angewendet. Die mediane Genexpression bei Frauen bzw. Männern wurde für die Berechnung des x-fachen Expressionsverhältnisses verwendet. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

3.3.2. Die männerspezifische Hochregulation von TIMP-1 in Pankreastumorzellen ist mit einer erhöhten Zugänglichkeit des *Timp-1* Gens assoziiert

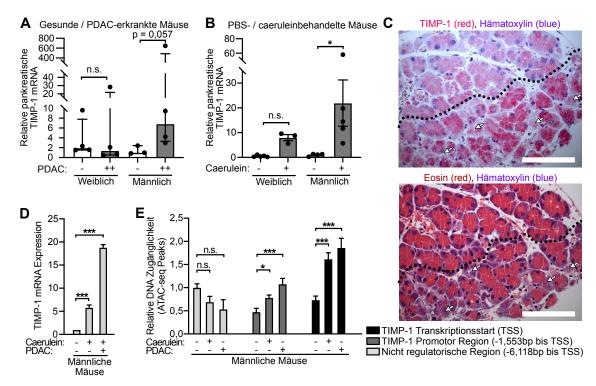
Als nächstes wurde die Expression des Kandidaten TIMP-1 im Verlauf einer Pankreaskrebserkrankung genauer untersucht (Hermann *et al.*, 2021). Während weibliche KPC-Mäuse mit PDAC keine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreasgewebe im Vergleich zu gesunden weiblichen Kontrollmäusen aufwiesen (**Abb. 3.7, A**), zeigten männliche

PDAC-erkrankte Mäuse eine erhöhte pankreatische TIMP-1 mRNA-Expression verglichen zu männlichen Kontrolltieren (**Abb. 3.7, A**). Analog dazu konnte beim Caerulein basierten Mausmodell beobachtet werden, dass es bereits 24 Stunden nach Beginn der Caerulein-Injektionen (**Abb. 2.10, A**) in männlichen Mäusen zu einer deutlichen und signifikanten Hochregulation der pankreatischen TIMP-1 mRNA-Expression verglichen zu PBS-behandelten Kontrolltieren kommt (**Abb. 3.7, B**). Im Gegensatz dazu wiesen weibliche Caerulein behandelte Mäuse nur eine geringe trendweise, aber nicht statistisch signifikante Hochregulation der TIMP-1 Expression im Pankreasgewebe im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollweibchen auf (**Abb. 3.7, B**). Auf zellulärer Ebene wiesen epitheliale Azinuszellen, die in der Nähe von geschädigtem Pankreasgewebe lokalisiert waren, die höchste TIMP-1 Proteinmengen auf (**Abb. 3.7, C**).

Epigenetische Veränderungen in exokrinen pankreatischen Epithelzellen treten bereits früh bei der Bildung des Pankreaskarzinoms auf und tragen maßgeblich zur veränderten Genexpression im erkrankten Pankreasgewebe bei (Abb. 1.1). Daher wurde untersucht, ob eine erhöhte pankreatische Expression von TIMP-1 mit epigenetischen Veränderungen des *Timp-1* Gens assoziiert ist (Hermann *et al.*, 2021). Dafür wurde ein veröffentlichte Datensatz (Alonso-Curbelo *et al.*, 2021) ausgewertet, der sowohl RNA- als auch ATAC-Sequenzierungsdaten von exokrinen Pankreasepithelzellen, die aus männlichen Caerulein behandelten Mäuse, männlichen PDAC-erkrankten KPⁿC-Mäusen bzw. männlichen Kontrolltieren isoliert wurden, beinhaltete. Tatsächlich wiesen sowohl männliche exokrine Pankreasepithelzellen nach Caerulein-Behandlung, als auch männliche Pankreastumorzellen eine signifikant erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression auf (Abb. 3.7, D). Die erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression war assoziiert mit einer erhöhten Zugänglichkeit des Promotors und des Transkriptionsstarts des *Timp-1* Gens in diesen pankreatischen Epithelzellen (Abb. 3.7, E), wohingegen eine nichtregulatorische Genomregion in der Nähe des *Timp-1* Gens keine veränderte DNA-Zugänglichkeit aufwies (Abb. 3.7, E).

3.3.3. Bei Pankreaskrebs steigen TIMP-1-Plasmaspiegel nur beim männlichen Geschlecht an

Da ein tumorsezernierter Faktor über die Blutbahn auf entfernte Organe wirkt, wurden die TIMP-1 Spiegel im Blutplasma in Abhängigkeit pankreatischer Erkrankungen untersucht (Hermann *et al.*, 2021). Sowohl im genetisch modifizierten KPC-Mausmodell (**Abb. 3.8, A**), als auch im induzierbaren Caerulein basierten Mausmodell (**Abb. 3.8, B**) konnte bei männlichen Tieren eine starke dosisabhängige Korrelation zwischen der TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreasgewebe und den TIMP-1-Plasmaspiegeln beobachtet werden. Demgegenüber wiesen weibliche Mäuse keine Korrelation zwischen pankreatischer TIMP-1



Abbilduna 3.7: Die männerspezifische Hochregulation der TIMP-1-Expression während Pankreaskrebsprogression ist assoziiert mit einer verbesserten Zugänglichkeit des Timp-1 Gens in Pankreasepithelzellen. (A, B) TIMP-1 mRNA-Expression normalisiert zur 18S rRNA-Expression im Pankreasgewebe gesunder weiblicher (n = 4) oder männlicher (n = 3), sowie PDAC-erkrankter weiblicher (n = 4) oder männlicher (n = 4) KPC-Mäuse bzw. im Pankreasgewebe PBS-behandelter (-) weiblicher (n = 5) oder männlicher (n = 4) sowie Caerulein behandelter (+) weiblicher (n = 3) oder männlicher (n = 5) Mäuse. Mann-Whitney Test (A) bzw. Student's t-Test (B) wurde angewendet. Median ± Interquartilsabstand (A, B). (C) Repräsentative Bilder einer immunhistochemischen TIMP-1 (rot) Färbung (oben) bzw. einer H&E-Färbung (unten) in Serienschnitten vom Pankreasgewebe einer männlichen Maus, die 24 h nach erster Caerulein-Injektion erlöst wurde. Die TIMP-1-Expression ist in denjenigen exokrinen Pankreaszellen erhöht, die in der Nähe toter Zellen (weiße Pfeile) im geschädigten Pankreasgewebe (unter gepunkteter Linie) lokalisiert sind. Maßstabsbalken, 100 um. Die immunhistochemische Färbung von TIMP-1 erfolgte durch Dr. Enkhtsetseg Munkhbaatar (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München). (D, E) Relative mRNA-Expression von TIMP-1 (D) und relative DNA-Zugänglichkeit des Transkriptionsstarts (TSS), sowie der Promotorregion 1.553 Basenpaare (bp) vor dem TSS des Timp-1 Gens bzw. einer nichtregulatorischen Region 6.118 bp vor dem TSS des Timp-1 Gens in exokrinen Pankreasepithelzellen isoliert aus männlichen Kontrollmäusen, Caerulein behandelten Mäusen bzw. PDAC-erkrankten KPfC Mäusen. Mittelwert + SEM. Statistische Informationen (bereinigter p-Wert) wurden vom veröffentlichten RNA- bzw. ATAC-Sequenzierungsdatensatz übernommen (Alonso-Curbelo et al., 2021). *, p ≤ 0,05; ***, p ≤ 0,001 (A, B, D, E). (A – E) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

mRNA-Expression und TIMP-1-Plasmaspiegeln auf (**Abb. 3.8, A, B**). Darüber hinaus wurde in männlichen KPC-Mäusen mit frühen und fortgeschrittenen Stadien des PDAC erhöhte TIMP-1-Plasmaspiegel im Vergleich zu gesunden Männchen festgestellt (**Abb. 3.8, C**), wohingegen weibliche KPC-Mäuse keine veränderten TIMP-1-Spiegel im Blutplasma in Präsenz von PDAC aufwiesen (**Abb. 3.8, C**). Analog dazu zeigten nur männliche, aber keine weiblichen Caerulein behandelten Mäuse einen Anstieg der Plasma TIMP-1 Spiegel im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrolltieren (**Abb. 3.8, D**). Auch im humanen Kontext konnten nur bei PDAC-Patienten erhöhte TIMP-1-Plasmaspiegel im Vergleich zu Kontrollprobanden beobachtet werden (**Abb. 3.8, E**). PDAC-erkrankte Frauen wiesen keine veränderten Plasma TIMP-1 Spiegel im Vergleich zu Kontrollprobandinnen auf (**Abb. 3.8, E**).

Darüber hinaus ist anzumerken, dass der Basiswert von TIMP-1 im Blutplasma gesunder Frauen im Vergleich zu gesunden Männern erhöht war (**Abb. 3.8, E**).

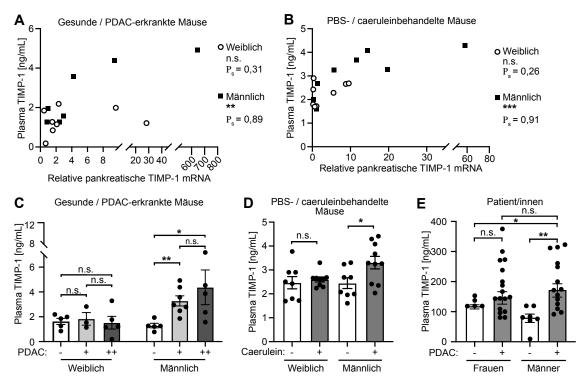


Abbildung 3.8: Die männerspezifische Hochregulation der pankreatischen TIMP-1 mRNA-Expression männerspezifischen Erhöhung TIMP-1-Plasmaspiegel einer der Pankreaskrebsprogression. (A, B) Korrelation der relativen pankreatischen TIMP-1 mRNA-Expression mit den TIMP-1-Plasmaspiegeln in weiblichen (n = 8) bzw. männlichen (n = 7) KPC-Mäusen (A), sowie in weiblichen (n = 8) bzw. männlichen (n = 9) PBS- oder Caerulein behandelten Mäusen (B). Spearman Korrelation wurde angewendet. (C) TIMP-1-Plasmaspiegel in weiblichen (n = 5) bzw. männlichen (n = 5) gesunden Kontrollmäusen, sowie in weiblichen (+: n = 3, ++: n = 5) bzw. männlichen (+: n = 7, ++: n = 5) KPC-Mäusen mit frühen (+) bzw. fortgeschrittenen (++) PDAC-Stadien. (D) TIMP-1-Plasmaspiegel in weiblichen (n = 8) bzw. männlichen (n = 8) PBS-behandelten Mäusen, sowie in weiblichen (n = 9) bzw. männlichen (n = 10) Caerulein behandelten Mäusen, die 24 h nach der ersten Injektion erlöst wurden. (E) TIMP-1-Plasmaspiegel in gesunden Frauen (n = 5) bzw. Männern (n = 7), sowie in Frauen (n = 17) bzw. Männern (n = 14) mit PDAC (UICC-Stadien I und II). Mittelwert ± SEM (C, D) bzw. Median \pm SEM (E). Student's t-Test wurde angewendet (C – E). *, p \leq 0,05; **, \leq 0,01; p ***, p \leq 0,001 (A – E). (A – E) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

3.4. Die Geschlechtsunterschiede bei der Lebermetastasierung und beim Überleben von Pankreaskrebs sind TIMP-1-abhängig

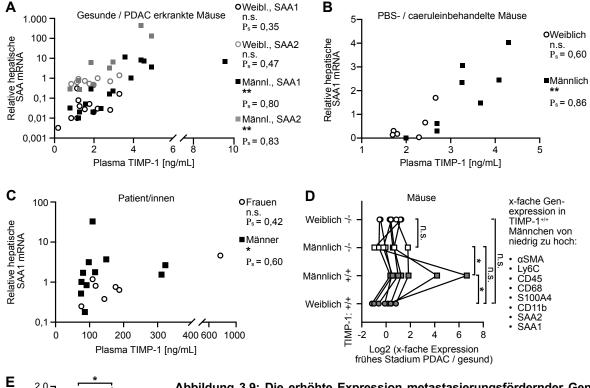
Es konnte beobachtet werden, dass es beim Pankreaskrebs einerseits zur männerspezifischen Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber kommt und andererseits mit TIMP-1 ein TDSF eine männerspezifische Expression aufweist, der in vorherigen Studien als lebermetastasierungsfördernd beschrieben wurde. Daher wurde nun überprüft, ob die verstärkte Lebermetastasierung bei Männern abhängig von der männerspezifischen Hochregulation von TIMP-1 war (Hermann et al., 2021).

3.4.1. Die männerspezifisch erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene in der Pankreaskrebskonditionierten Leber ist TIMP-1-abhängig

Tatsächlich konnte bei männlichen Mäusen eine Korrelation der TIMP-1-Plasmaspiegel mit der hepatischen SAA1 und SAA2 mRNA-Expression, also den am stärksten induzierten metastasierungsfördernden Genen (Abb. 3.4, C), sowohl beim KPC-Mausmodell (Abb. 3.9, A), als auch beim Caerulein basierten Mausmodell (Abb. 3.9, B) beobachtet werden. Demgegenüber wiesen weibliche Mäuse keine Korrelation zwischen TIMP-1-Plasmaspiegeln und hepatischer SAA1/2-Expression auf (Abb. 3.9, A und B). Auch beim Menschen konnte eine Korrelation zwischen Plasma TIMP-1 Spiegeln und SAA1 mRNA-Expression in der Leber ausschließlich bei Männern und nicht bei Frauen beobachtet werden (Abb. 3.9, C). Um einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen TIMP-1-Expression und der Expression metastasierungsfördernder Gene in der Leber zu etablieren, wurden KPC-Mäuse mit einem globalen Knockout des Timp-1 Gens untersucht. Tatsächlich wiesen TIMP-1-defiziente Männchen im Gegensatz zu TIMP-1-kompetenten männlichen Mäusen mit PDAC keine erhöhte hepatische Expression metastasierungsfördernder Gene auf (Abb. 3.9, D). Außerdem konnte eine vergleichbar niedrige, basale Expression metastasierungsfördernder Gene in der Leber bei TIMP-1-defizienten und TIMP-1-kompetenten weiblichen Mäusen mit PDAC beobachtet werden (Abb. 3.9, D). Um zu überprüfen, ob TIMP-1 direkt in der Lage ist, die Expression des zentralen metastasierungsfördernden Faktors SAA1 in Hepatozyten zu induzieren, wurde die HepaRG Zelllinie als Modellsystem verwendet. Eine Stimulation mit rekombinantem humanen TIMP-1 führte zu einer erhöhten Expression von SAA1 auf mRNA Ebene (**Abb. 3,9, E**).

3.4.2. Die erhöhte Lebermetastasierung und das verkürzte Überleben von männlichen Mäusen mit Pankreaskrebs sind TIMP-1-abhängig

Der kausale Zusammenhang zwischen männerspezifisch erhöhter TIMP-1-Expression (**Abb.** 3.8) und der männerspezifischen Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber bei Pankreaskrebs (**Abb.** 3.5) konnte mittels experimenteller Metastasierung weiter bekräftigt werden. TIMP-1-defiziente männliche KPC-Mäuse (**Abb.** 3.10, **A**) und TIMP-1-defiziente männliche Caerulein behandelte Mäuse (**Abb.** 3.10, **B**) wiesen nach intravenöser Inokulation pankreatischer Tumorzellen eine deutlich verringerte Bildung von Makrometastasen in der Leber im Vergleich zu TIMP-1-kompetenten Mäusen auf. Tatsächlich



Relative SAA1 mRNA 1,5 - 1,0 -

Abbildung 3.9: Die erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene im Pankreaskrebs-konditionierten Lebergewebe männlicher Mäuse ist TIMP-1-abhängig. (A – C) Korrelation der TIMP-1-Plasmaspiegel mit der hepatischen SAA mRNA-Expression in weiblichen (SAA1: n = 12, SAA2: n = 9) bzw. männlichen (SAA1: n = 15, SAA2: n = 9) Tieren des KPC-Mausmodells (A), in weiblichen (n = 6) bzw. männlichen (n = 8) Tieren des Caerulein basierten Mausmodells (B), sowie in PDAC-Patientinnen (n = 7) bzw. PDAC-Patienten (n = 11) (C).Spearman Korrelation wurde angewendet. (D) Die Veränderung der medianen mRNA-Expression metastasierungsfördernder Gene im Lebergewebe von TIMP-1 kompetenten (+/+) oder TIMP-1-defizienten (-/-) weiblichen (+/+: n = 3, -/-: n = 4) bzw. männlichen (+/+: n = 5, -/-: n = 4) KPC-Mäusen mit PDAC

normalisiert zu weiblichen (+/+: n = 4, -/-: n = 3) bzw. männlichen (+/+: n = 4, -/-: n = 3) Kontrollmäusen. Der nichtparametrische Wilcoxon-Test wurde angewendet. **(E)** SAA1 mRNA-Expression normalisiert zur 18S rRNA-Expression von unbehandelten (-; n = 3) oder TIMP-1 (+) stimulierten (n = 6) HepaRG Zellen. Ein *One-Sample t-Test* gegen den Referenzwert 1 wurde angewendet. Die Quantifizierung der SAA1 mRNA in HepaRG-Proben erfolgte durch Lukas Kniep (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München). *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01. (A - E) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

war die Lebermetastasierung bei diesen TIMP-1-defizienten Männchen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau wie bei gesunden bzw. PBS-behandelten männlichen Mäusen (Abb. 3.10, A und B) bzw. wie bei Caerulein- oder PBS-behandelten weiblichen Mäusen (Abb. 3.10, B). Des Weiteren resultierte die genetische Ablation der TIMP-1 Expression in PDAC-erkrankten männlichen KPC-Mäusen in einem verlängerten Überleben im Vergleich zu TIMP-1-kompetenten KPC-Männchen (Abb. 3.10, C). Es ist anzumerken, dass eine genetische Ablation der TIMP-1 Expression in weiblichen Mäusen weder die Lebermetastasierung (Abb. 3.10, B) noch das Überleben veränderte (Abb. 3.10, C).

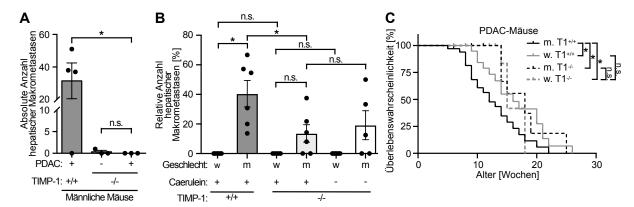


Abbildung 3.10: Die verstärkte Lebermetastasierung und das verkürzte Überleben von PDAC-erkrankten männlichen Mäusen ist TIMP-1-abhängig. (A) Quantifizierung hepatischer Makrometastasen nach intravenöser Inokulation pankreatischer Tumorzellen in männliche TIMP-1-defiziente Kontrollmäuse (n = 3) bzw. männliche TIMP-1-kompetente (n = 4) und TIMP-1-defiziente (n = 3) KPC-Mäuse. Mann-Whitney Test wurde angewendet. (B) Quantifizierung hepatischer Makrometastasen im Verhältnis zu Gesamtlebermetastasen (Makro- + Mikrometastasen) nach intravenöser Inokulation pankreatischer Tumorzellen in TIMP-1-defiziente weibliche (n = 6) bzw. männliche (n = 5) PBS-behandelte Mäuse, sowie in TIMP-1-defiziente (-/-) oder TIMP-1-kompetente (+/+) Caerulein behandelte weibliche (-/- und +/+: n = 6) bzw. männliche (-/- und +/+: n = 6) Mäuse. Student's t-Test wurde angewendet. (C) Gesamtüberleben von TIMP-1-kompetenten (T1*/+) weiblichen (w, n = 22) bzw. männlichen (m, n = 34), sowie TIMP-1-defizienten (T1*/-) weiblichen (n = 11) bzw. männlichen (n = 11) KPC-Mäusen. Log-Rank Test wurde angewendet. Mittelwert \pm SEM (A, B). *, p \leq 0,05. (A - C) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

3.5. TIMP-1 als männerspezifischer Biomarkerkandidat

Erhöhte TIMP-1-Spiegel führten in männlichen PDAC-erkrankten Mäusen zur verstärkten Bildung von Lebermetastasen und zum verkürzten Überleben. Darauf aufbauend sollte der mögliche klinische Wert von TIMP-1 als prognostischer Biomarker in PDAC-Patienten untersucht werden (Hermann *et al.*, 2021).

3.5.1. Eine Untergruppe von Männern mit erhöhter TIMP-1 Expression (T1^{HI} Männer) verstirbt früher als alle anderen Pankreaskrebserkrankten

Zunächst wurde die TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumorgewebe von PDAC-Patienten der Bailey Kohorte (**Abb. 2.7**) näher evaluiert und untersucht, ob PDAC-erkrankte Männer in definierte Untergruppen eingeteilt werden können. Tatsächlich offenbarte die Zwei-Schritt *Cluster* Analyse, dass es eine natürliche Klassifizierung in eine PDAC-Patientenuntergruppe mit hoher TIMP-1-Expression (T1^{HI} Männer) und eine -untergruppe mit niedriger TIMP-1-Expression (T1^{LO} Männer) gibt (**Abb. 3.11, A**). Während das Gesamtüberleben der T1^{LO} Männer und aller PDAC-erkrankter Frauen vergleichbar war (**Abb. 3.11, B**), wiesen T1^{HI} Männer ein verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zu allen anderen PDAC-Erkrankten (T1^{LO} Männer und Frauen) auf (**Abb. 3.11, B**). Eine Einteilung von PDAC-Patientinnen basierend auf deren pankreatischer TIMP-1 mRNA-Expression offenbarte keinen Unterschied im Gesamtüberleben (**Abb. 3.11, C**). Es ist anzumerken, dass PDAC-erkrankte Männern mit erhöhter Expression von VAMP7, GYG1, FUCA2, oder TMEM30A, d.h. einer der neben TIMP-

1 identifizierten sezernierten Faktoren mit männerspezifisch erhöhter Expression im Pankreastumor (**Abb. 3.6**), keinen Unterschied im Gesamtüberleben aufwiesen (**Abb. 3.11**, **D**). Damit scheint die prognostische Relevanz nicht auf alle männerspezifisch erhöht exprimierten TDSFs zuzutreffen, sondern spezifisch für TIMP-1 zu sein (Hermann *et al.*, 2021).

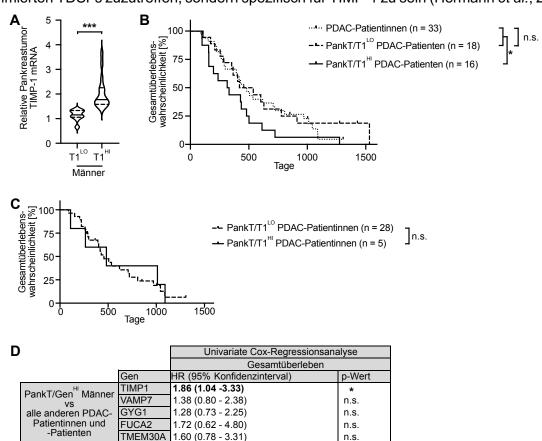


Abbildung 3.11: Identifikation einer Untergruppe männlicher PDAC-Patienten, die eine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreastumor aufweist und für die Geschlechtsunterschiede im PDAC-Überleben verantwortlich ist. (A) Relative TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreastumorgewebe von PDAC-Patienten, die mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse in Männer mit niedriger ($T1^{LO}$, n=18) bzw. hoher ($T1^{HI}$, n=16) TIMP-1-Expression aufgetrennt wurden. *Student's t-Test* wurde angewendet. (B) Gesamtüberleben von PDAC-Patientinnen (n=33) bzw. PDAC-Patienten mit niedriger ($PankT/T1^{LO}$, n=18) oder hoher ($PankT/T1^{HI}$, p=16) TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreastumor. (C) Gesamtüberleben von PDAC-Patientinnen mit niedriger ($PankT/T1^{LO}$, p=28) oder hoher ($PankT/T1^{HI}$, p=5) TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreastumor. (D) HRs inkl. 95 % Konfidenzintervalle des Gesamtüberlebens zwischen Untergruppen von PDAC-Patienten mit erhöhter Expression von TIMP1, VAMP7, GYG1, FUCA1 oder TMEM30A (bestimmt durch Zwei-Schritt Cluster Analyse) und allen anderen PDAC-Patientinnen und -Patienten. Cox-Regressionsanalyse wurde angewendet. *Log-Rank Test* wurde angewendet (B, C). *, $p \le 0.05$, ***, $p \le 0.001$. (A – D) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

Um den prognostischen Wert von TIMP-1 auf verschiedenen Ebenen, d.h. mRNA-Expression im Pankreas, Proteinkonzentration im Pankreas und Proteinkonzentration im Plasma, zu überprüfen und gleichzeitig in einer möglichst großen Anzahl von Erkrankten zu validieren, wurden Pankreaskrebspatientinnen und -patienten von drei unabhängigen Kohorten in die Analyse einbezogen (**Abb. 2.6**). Die PDAC-Erkrankten wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasen in entfernten Organen auf (M0-Status) und wurden mit einer chirurgischen Resektion des Primärtumors behandelt (**Abb. 3.12, A**). Die TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumorgewebe war von insgesamt 42 PDAC-Erkrankten aus der TCGA

PDAC Kohorte bekannt, die TIMP-1 Proteinkonzentration im Primärtumorgewebe war von 92 PDAC-Erkrankten aus der Toronto Kohorte bekannt und von 30 PDAC-Erkrankten aus der München Kohorte waren die TIMP-1-Plasmaspiegel bekannt (**Abb. 3.12, A**). Sowohl anhand der TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor (**Abb. 3.12, B**), als auch anhand der TIMP-1 Proteinkonzentration im Primärtumor (**Abb. 3.12, C**) bzw. im Blutplasma (**Abb. 3.12, D**) konnte mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse jeweils eine Patienten-Untergruppe mit geringen TIMP-1-Spiegeln (T1^{LO} Männer) und eine mit hohen TIMP-1-Spiegeln (T1^{HI} Männer) identifiziert werden. Das Gesamtüberleben von T1^{LO} Männern und PDAC-erkrankter Frauen war vergleichbar (**Abb. 3.12, E**). Dagegen wiesen T1^{HI} Männer ein verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zu allen anderen PDAC-Erkrankten (T1^{LO} Männer und PDAC-erkrankten Frauen) auf (**Abb. 3.12, E**). Eine Einteilung von PDAC-Patientinnen basierend auf deren TIMP-1-Spiegeln offenbarte keinen Unterschied im Gesamtüberleben (**Abb. 3.12, F**).

3.5.2. T1^{HI} Männer entwickeln früher und häufiger Lebermetastasen als alle anderen Pankreaskrebserkrankten

Da die erhöhte TIMP-1 Expression in männlichen Mäusen nicht nur ein verkürztes Gesamtüberleben, sondern auch eine verstärkte Lebermetastasierung zur Folge hatte, wurde der klinische Wert von TIMP-1 zur Vorhersage der Entwicklung von Lebermetastasen in PDAC-Patientinnen und -Patienten überprüft (Hermann et al., 2021). Dafür wurde zunächst die Lebermetastasenentwicklung in der kombinierten Kohorte evaluiert (Abb. 3.12, A). Tatsächlich entwickelten PDAC-erkrankte Männer mit hohen TIMP-1-Spiegeln (T1^{HI} Männer) deutlich früher und häufiger metachrone Lebermetastasen nach einer Primärtumorresektion verglichen mit allen anderen PDAC-Erkrankten (T1^{LO} Männer und Frauen) (Abb. 3.13, A). Das Risiko von T1^{HI} Männern, nach einer Primärtumorresektion metachrone Lebermetastasen zu entwickeln, war über dreifach erhöht im Vergleich zu T1^{LO} Männern und Frauen mit PDAC (Abb. 3.13, A). T1^{LO} Männer und PDAC-erkrankte Frauen wiesen eine vergleichbare Entwicklung metachroner Lebermetastasen auf (Abb. 3.13, A). Das erhöhte Risiko von T1^{HI} Männern, Lebermetastasen nach der Primärtumorresektion zu entwickeln, konnte auch bestätigt werden, wenn man die einzelnen Subkohorten isoliert betrachtete und die Männer nur basierend auf der TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor (Abb. 3.13, B) bzw. basierend auf den TIMP-1 Plasmaspiegeln (Abb. 3.13, C) separierte. Eine erste in silico-Analyse zeigte, dass die erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression in Pankreastumoren männlicher Mäuse mit einer besseren Zugänglichkeit des Timp-1 Gens in Pankreastumorzellen assoziiert war (Abb. 3.7, F). Darauf aufbauend wurde nun anhand der Dhara Kohorte (Abb. 2.9)

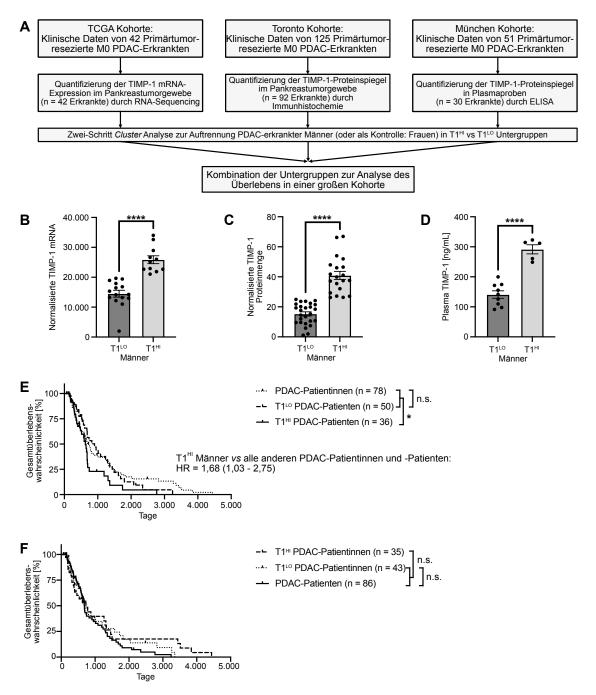


Abbildung 3.12: Validierung des männerspezifischen klinischen Werts von TIMP-1 für die Vorhersage des Gesamtüberlebens in einer kombinierten PDAC Kohorte. (A) Kombination klinischer Daten von Primärtumor resezierten PDAC-Patientinnen und -Patienten aus drei unabhängigen Studien/Krebszentren durch (1) Quantifizierung von TIMP-1 im Pankreastumor auf RNA-Ebene (TCGA PDAC Kohorte) bzw. auf Proteinebene (Toronto Kohorte) oder im Blutplasma (München Kohorte), (2) Gruppierung der Patienten basierend auf den TIMP-1-Spiegeln in jeder Kohorte mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse und (3) Zusammenführen der T1^{LO} bzw. T1^{HI} Patienten aus jeder Kohorte in einer kombinierten Population. **(B, C, D)** TIMP-1 mRNA-Expression (A, TCGA PDAC Kohorte) bzw. TIMP-1 Proteinmenge (B, Toronto Kohorte) im Pankreastumorgewebe bzw. TIMP-1-Plasmaspiegel (C, München Kohorte) von PDAC-Patienten, die mittels Zwei-Schritt Cluster Analyse in Männer mit niedrigen bzw. hohen TIMP-1-Spiegeln aufgetrennt wurden. Student's t-Test wurde angewendet. Die Quantifizierung der TIMP-1 Proteinmenge im Pankreastumorgewebe erfolgte durch Emily Poulton und Dr. Barbara T. Grünwald (Princess Margret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, Kanada). (E) Gesamtüberleben von PDAC-Patientinnen (n = 78), sowie von PDAC-Patienten mit niedrigen (T1^{LO}, n = 50) oder hohen (T1^{HI}, n = 36) TIMP-1-Spiegeln. Cox-Regressionsanalyse wurde angewendet zur Berechnung des HR inkl. 95 % Konfidenzinterval. (F) Gesamtüberleben von PDAC-Patienten (n = 86) bzw. PDAC-Patientinnen mit niedrigen (T1^{LO}, n =43) oder hohen (T1^{HI}, n = 35) TIMP-1-Spiegeln. Log-Rank Test wurde angewendet (E, F). *, p \leq 0,005, ****, p \leq 0,0001. (A) wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

evaluiert, inwiefern eine veränderte Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens in Pankreastumorzellen aus PDAC-Patienten mit einem Wiederauftreten der Erkrankung nach Primärtumorresektion assoziiert ist. Es ist anzumerken, dass alle in dieser Analyse eingeschlossenen PDAC-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasen aufwiesen (M0-Status) und mit einer histologisch vollständigen Entfernung des Primärtumors (R0-Status) und anschließender Chemotherapie behandelt wurden (Abb. 2.9). Tatsächlich konnte in den aus PDAC-Patienten isolierten Pankreastumorzellen mit einer hohen Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens (Abb. 3.13, D) auch eine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 3.13, E). Diejenigen PDAC-Patienten, bei denen die Pankreastumorzellen eine erhöhte Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens aufwiesen (T1^{HI} Männer), zeigten ein deutlich früheres Wiederauftreten der Erkrankung nach Primärtumorresektion (Abb. 3.13, F). Da für diese PDAC-Patienten keine weiteren Informationen über das vom Wiederauftreten der Erkrankung betroffene Organ vorlagen, konnte keine Aussage über die Entwicklung von Lebermetastasen im Speziellen gemacht werden. Es wurde beobachtet, dass TIMP-1 spezifisch die Lebermetastasierung bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Mäusen förderte (Abb. 3.10, B). Im Einklang mit diesem Befund zeigte eine Klassifizierung von PDAC-Patientinnen basierend auf deren TIMP-1-Spiegeln keine veränderte Entwicklung metachroner Lebermetastasen (Abb. 3.14, A). Insgesamt ist hervorzuheben, dass die Einteilung einer gemischten Kohorte aus PDAC-Patientinnen und -Patienten nur anhand der TIMP-1-Spiegel und ohne Berücksichtigung des Geschlechts auch keine Unterschiede bei der Lebermetastasenentwicklung offenbarte (Abb. 3.14, B). Eine anschließende Auftrennung dieser gemischten Gruppen von T1^{LO} und T1^{HI} PDAC-Patientinnen und -Patienten anhand des Geschlechts zeigte, dass spezifisch die T1^{HI} Männer ein deutlich erhöhtes Risiko der Entwicklung von Lebermetastasen aufwiesen im Vergleich zu allen anderen PDAC-Patientinnen (T1^{LO} und T1^{HI} Frauen) und -Patienten (T1^{LO} Männer) (Abb, 3.14, C). Außerdem war der prädiktive Wert von TIMP-1 bei PDAC-erkrankten Männern spezifisch für die Entwicklung von Lebermetastasen, da T1^{HI} Männer kein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten der Erkrankung in anderen Geweben als der Leber (d.h. Pankreas, Lunge, Lymphknoten, Peritoneum) aufwiesen (Abb. 3.14, D).

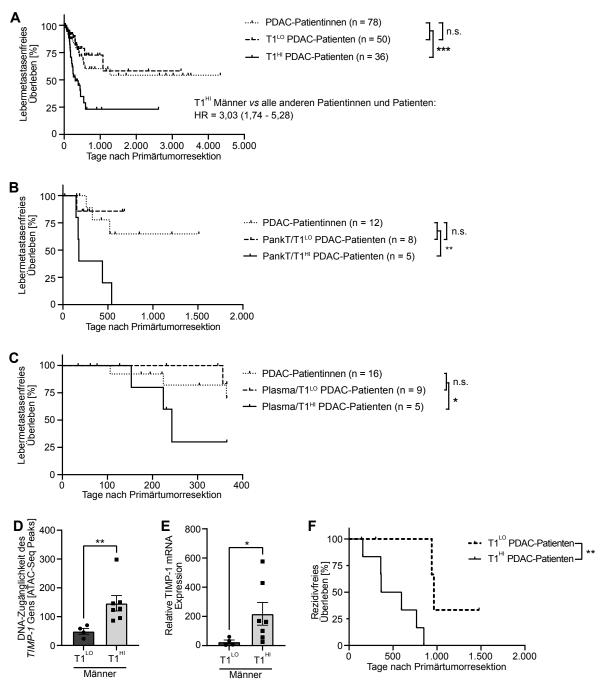


Abbildung 3.13: PDAC-erkrankte Männer mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln haben ein erhöhtes Risiko Lebermetastasen zu entwickeln als alle anderen PDAC-Patientinnen und -Patienten. (A, B, C) Lebermetastasenfreies Überleben von PDAC-Patientinnen bzw. PDAC-Patienten mit niedrigen (T1^{LO}) oder hohen (T1^{HI}) Spiegeln der kombinierten Kohorte (A), der TCGA PDAC Kohorte (B) oder der München Kohorte (C). Cox-Regressionsanalyse wurde angewendet zur Berechnung des HR inkl. 95 % Konfidenzinterval (A). (D, E) DNA-Zugänglichkeit des *TIMP-1* Gens (D) oder TIMP-1 mRNA-Expression (E) in Pankreastumorzellen, die aus Pankreastumoren von PDAC-Patienten mit niedriger (T1^{LO}) bzw. hoher (T1^{HI}) Zugänglichkeit des *TIMP-1* Gens isoliert wurden. Gruppierung in T1^{LO} und T1^{HI} erfolgte mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse. (F) Rezidivfreies Überleben von PDAC-Patienten, die in den Primärtumoren Pankreastumorzellen mit niedriger (T1^{LO}, n = 4) bzw. hoher (T1^{HI}, n = 7) Zugänglichkeit des *TIMP-1* Gens aufwiesen. Log-Rank Test wurde angewendet (A, B, C, F). *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,01. (A - C) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

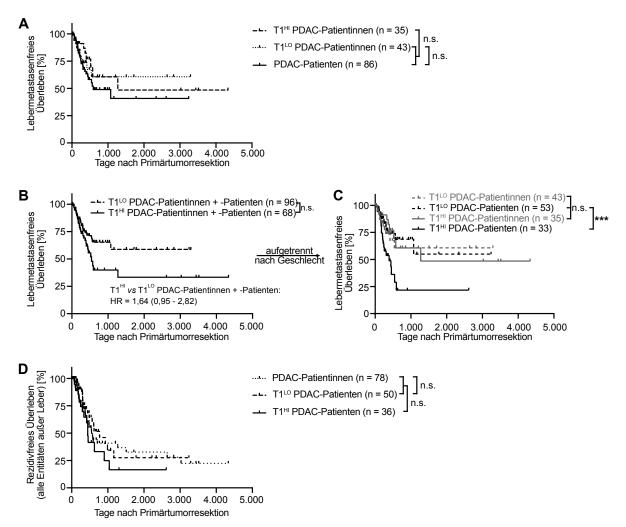


Abbildung 3.14: Der klinische Wert von TIMP-1 ist männerspezifisch und spezifisch für die Vorhersage der Metastasenentwicklung in der Leber. (A) Lebermetastasenfreies Überleben von PDAC-Patienten (n = 86) oder PDAC-Patientinnen mit niedrigen (T1^{LO}, n = 43) bzw. hohen (T1^{HI}, n = 35) TIMP-1-Spiegeln. (B, C) Lebermetastasenfreies Überleben aller PDAC-Patientinnen und -Patienten (Frauen und Männer kombiniert (B) bzw. anschließend aufgetrennt nach Geschlecht (C)), die mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse in Individuen mit niedrigen (T1^{LO}, Frauen: n = 43, Männer: n = 53) bzw. hohen (T1^{HI}, Frauen: n = 35, Männer: n = 33) TIMP-1-Spiegeln eingeteilt wurden. Cox-Regressionsanalyse wurde verwendet für die Berechnung des HRs inkl. 95 % Konfidenzinterval. (D) Rezidivfreies Überleben in allen Entitäten mit Ausnahme der Leber in PDAC-Patientinnen (n = 78) oder PDAC-Patienten mit niedrigen (n = 50) bzw. hohen (n = 36) TIMP-1-Spiegeln. Log-Rank Test wurde angewendet (A – D). *, p ≤ 0,05; ***, p ≤ 0,001. (A – D) wurden entnommen und modifiziert aus (Hermann *et al.*, 2021).

3.5.3. T1^{HI} Männer entwickeln früher und häufiger Lebermetastasen als alle anderen Kolorektalkrebs- bzw. Melanomerkrankten

Die Entwicklung von Lebermetastasen kommt nicht nur beim Pankreaskrebs, sondern auch bei anderen Krebsarten wie dem CRC oder dem Hautkrebs häufig vor (Tsilimigras et al., 2021). Daher wurde der klinische Wert von TIMP-1 für die Vorhersage Lebermetastasenentwicklung auch in CRC- und Hautkrebspatientinnen und -patienten untersucht (Hermann et al., 2021). Mittels Zwei-Schritt Cluster Analyse wurde in CRC-Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Metastasen aufwiesen (M0-Status) und mit einer Resektion des Primärtumors behandelt wurden (Abb. 2.4), eine Untergruppe mit niedriger TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor (T1^{LO} Männer) und eine Untergruppe mit hoher TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor (T1^{HI} Männer) identifiziert (**Abb. 3.15. A**). T1^{LO} Männer und CRC-erkrankte Frauen wiesen ein vergleichbar niedriges Risiko auf, Lebermetastasen nach einer Primärtumorresektion zu entwickeln (**Abb. 3.15**, **B**). T1^H Männer hatten im Vergleich zu allen anderen CRC-Erkrankten dagegen ein 13,5-fach erhöhtes Risiko metachrone Lebermetastasen zu entwickeln (Abb. 3.15, B). Eine Einteilung von CRCerkrankten Frauen anhand der TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor ergab dagegen keinen Unterschied bei der Entwicklung von Lebermetastasen (Abb. 3.15, C). Eine Zwei-Schritt Cluster Analyse lieferte auch bei Melanompatienten (Abb. 2.5) eine Unterscheidung von Männern mit niedriger (T1^{LO} Männer) bzw. hoher (T1^{HI} Männer) TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor (Abb. 3.15, D). T1^{LO} Männer zeigten ein vergleichbar niedriges Risiko Lebermetastasen zu entwickeln wie am Melanom erkrankte Frauen (Abb. 3.15, E). Im Vergleich zu allen anderen Melanompatientinnen und -patienten wiesen T1^H Männer dagegen ein über vierfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von metachronen Lebermetastasen auf (Abb. 3.15, E). Es ist anzumerken, dass Melanompatientinnen, die anhand ihrer TIMP-1 mRNA-Expression im Primärtumor eingeteilt wurden, keine unterschiedliche Entwicklung von Lebermetastasen aufwiesen (Abb. 3.15, F).

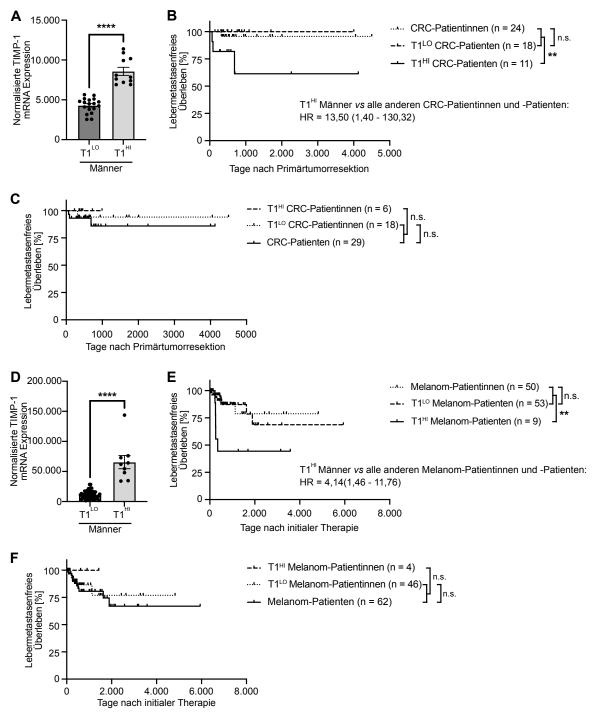


Abbildung 3.15: Eine erhöhte TIMP-1 Expression in Tumoren von CRC- oder Melanom-erkrankten Männern ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Lebermetastasen assoziiert. (A, D) TIMP-1 mRNA-Expression in Primärtumoren von CRC- (A) bzw. Melanom- (D) Patienten, die mittels Zwei-Schritt *Cluster* Analyse in Männer mit niedriger (CRC: $T1^{LO}$, n = 18; Melanom: $T1^{LO}$, n = 53) oder hoher (CRC: $T1^{HI}$, n = 11; Melanom: $T1^{HI}$, n = 9) TIMP-1-Expression eingeteilt wurden. *Student's t-Test* wurde angewendet. Mittelwert \pm SEM. (B, E) Lebermetastasenfreies Überleben von CRC- (B) bzw. Melanom- (E) Patienten mit hoher (CRC: $T1^{HI}$, n = 11; Melanom: $T1^{HI}$, n = 9) TIMP-1-Expression verglichen zu allen anderen Patientinnen und Patienten (CRC: n = 42; Melanom: n = 103). Cox-Regressionsanalyse wurde angewendet zur Berechnung der HRs inkl. 95 % Konfidenzinterval. (C, F) Lebermetastasenfreies Überleben von CRC- (B) bzw. Melanom- (E) Patientinnen mit hoher (CRC: $T1^{HI}$, n = 6; Melanom: $T1^{HI}$, n = 4) TIMP-1-Expression verglichen zu allen anderen Patientinnen und Patienten (CRC: n = 47; Melanom: n = 108). n = 1080. n = 1081. n = 1082. n = 1083. n = 10

3.6. Die TIMP-1-abhängige metastasierungsfördernde Lebernische weist verringerte Triacylglyzeridspiegel auf

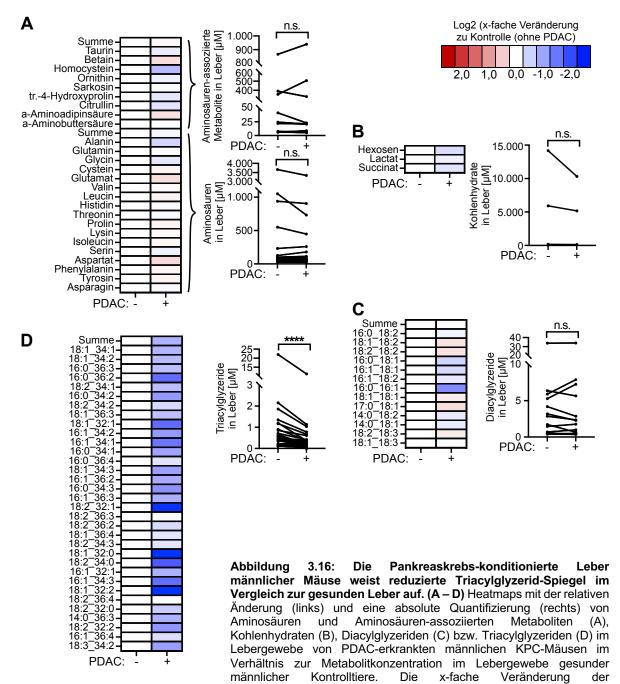
Vor dem Hintergrund, dass der Katabolismus von Speicherlipiden eine zentrale Rolle bei der Lebermetastasierung spielen kann, wurde der metabolische Status der TIMP-1-abhängigen metastasierungsfördernden Nische in der Leber männlicher PDAC-erkrankter Mäuse untersucht.

3.6.1. Die Pankreaskrebs-konditionierte Leber weist eine Reduktion von Triacylglyzeriden auf

Dafür wurde eine gerichtete *Metabolomics* Analyse von Lebergewebe aus männlichen KPC-Mäusen durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen im Lebergewebe von PDAC-erkrankten Männchen im Vergleich zu gesunden Männchen bei Aminosäuren bzw. Aminosäuren-assoziierten Metaboliten (**Abb. 3.16, A**), bei Kohlenhydraten (**Abb. 3.16, B**), oder bei Diacylglyzeriden (**Abb. 3.16, C**) festgestellt werden. Allerdings wies das Lebergewebe von PDAC-erkrankten männlichen Mäusen eine signifikante Reduktion der TAGs, d.h. eines Speicherlipids (Mashek, 2021), im Vergleich zum Lebergewebe gesunder Männchen auf (**Abb. 3.16, D**).

3.6.2. Die Reduktion der Triacylglyzeride in der Pankreaskrebskonditionierten Leber ist TIMP-1-abhängig

Interessanterweise wiesen gesunde TIMP-1-defiziente Männchen und PDAC-erkrankte TIMP-1-defiziente männliche Mäuse dagegen vergleichbare hepatische TAG-Spiegel auf wie TIMP-1-kompetente gesunde Männchen (Abb. 3.17, A). Tatsächlich waren die TAG-Konzentrationen im Lebergewebe TIMP-1-defizienter Männchen mit PDAC höher als bei TIMP-1-kompetenten Männchen mit PDAC (Abb. 3.17, A). Im Gegensatz dazu wiesen sowohl TIMP-1-kompetente als auch TIMP-1-defiziente PDAC-erkrankte Männchen eine Reduktion der TAGs im Pankreasgewebe (Abb. 3.17, B) und im Plasma (Abb. 3.17, C) im Vergleich zu gesunden TIMP-1-kompetenten Männchen auf. Zusammenfassend deuten diese Metabolomics Daten also an, dass spezifisch die Reduktion der TAG-Spiegel im Pankreaskrebs-konditionierten Lebergewebe, nicht deren Reduktion aber im Pankreasgewebe oder im Blut, TIMP-1-abhängig sind.



Metabolitkonzentrationen wurde als Verhältnis der jeweiligen Mediane pro Gruppe (PDAC-erkrankt vs. gesund, jeweils n = 3) berechnet. Die Metabolite sind von oben nach unten entsprechend ihrer absteigenden Konzentration im Lebergewebe gesunder Kontrollmäuse pro Metabolitklasse geordnet. Metabolite mit einer geringeren relativen Häufigkeit als 0,50 % pro Metabolitklasse wurden nicht berücksichtigt. *Paired Student's t-Tests* wurden verwendet. *, p \leq 0,05; *****, p \leq 0,0001.

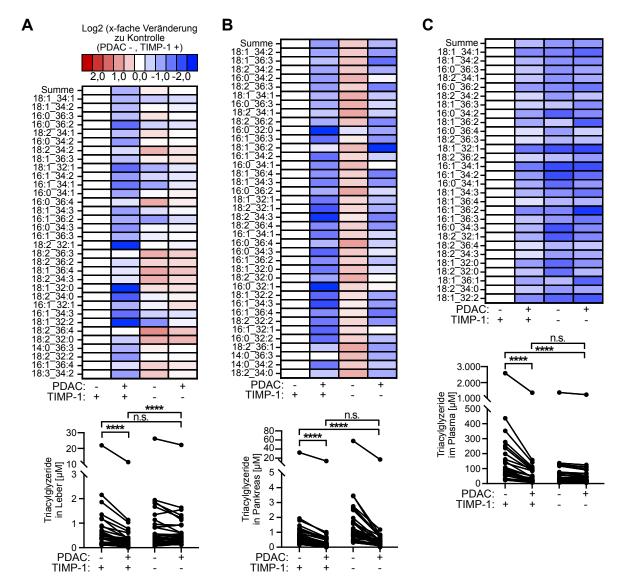


Abbildung 3.17: Die Reduktion der Triacylglyzeride in der Leber, aber nicht im Pankreas oder im Blutplasma von PDAC-erkrankten männlichen Mäusen ist TIMP-1-abhängig. (A – C) Heatmaps mit der relativen Änderung (oben) und eine absolute Quantifizierung (unten) der Triacylglyzerid-konzentrationen im Lebergewebe (A), im Pankreasgewebe (B), oder im Blutplasma (C) von männlichen TIMP-1-kompetenten bzw. TIMP-1-defizienten oder gesunden Kontrollmäusen. Die Veränderung PDAC-erkrankten KPC-Mäusen x-fache Metabolitkonzentrationen wurde als Verhältnis der jeweiligen Mediane pro Gruppe (jeweils n = 3) normalisiert zu TIMP-1-kompetenten gesunden Kontrollmäusen berechnet. Die Metabolite sind von oben nach unten entsprechend ihrer absteigenden Konzentration im Lebergewebe gesunder TIMP-1-kompetenter Kontrollmäuse pro Metabolitklasse geordnet. Metabolite mit einer geringeren relativen Häufigkeit als 0,50 % bezogen auf die Gesamtmenge der Triacylglyzeride wurden nicht berücksichtigt. Paired Student's t-Tests wurden verwendet. *, p ≤ 0.05; ****, $p \le 0.0001$.

3.7. TIMP-1 induziert den Verlust intrazellulärer Lipidspeicher durch Verstärkung der β-Oxidation in Hepatozyten-Zelllinien

Um zu überprüfen, ob TIMP-1 direkt den Stoffwechsel von Leberzellen beeinflussen kann, wurden die Hepatozyten-artigen humanen Zelllinien HepaRG und HepG2 als Modellsysteme verwendet und mit rekombinantem humanen TIMP-1 stimuliert.

3.7.1. TIMP-1 reduziert intrazelluläre neutraler Lipide in HepaRG und HepG2 Zellen

Sowohl in HepaRG (**Abb. 3.18, A**) als auch in HepG2 (**Abb. 3.18, B**) Zellen konnte anhand der BODIPY-Färbung eine Reduktion der intrazellulären neutralen Lipidspeicher nach TIMP-1-Stimulation beobachtet werden.

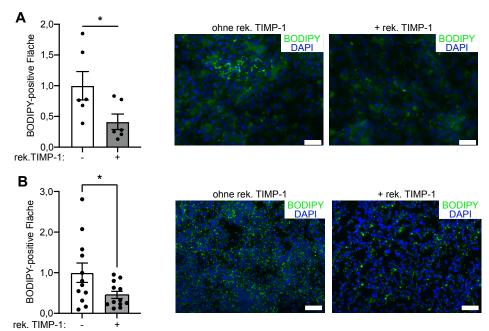


Abbildung 3.18: Die Stimulation humaner Hepatozytenzelllinien mit rekombinantem humanen TIMP-1 führt zur Reduktion intrazellulärer neutraler Lipide. (A, B) Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche und repräsentative Bilder von BODIPY (grün) und DAPI (blau) gefärbten HepaRG (A, n = 6) bzw. HepG2 (B, n = 12) Zellen 72 h nach Zugabe bzw. ohne Zugabe von rek. humanem TIMP-1. Maßstabsbalken, 50 μ m. Mann-Whitney Test wurde angewendet. Die Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche erfolgte durch Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München). *, p ≤ 0,05.

3.7.2. Die Reduktion intrazellulärer Lipidspeicher in Hepatozyten wird über eine TIMP-1-induzierte oxidative Verstoffwechselung von Fettsäuren vermittelt

Eine Abnahme intrazellulärer Fettspeicher kann die Folge einer verstärkten Verstoffwechselung freier Fettsäuren über die mitochondriale β-Oxidation sein. Da eine erhöhte β-Oxidation mit einem verstärkten Verbrauch von Sauerstoff über die Atmungskette einhergeht (Scholz et al., 1984), wurde die Sauerstoffverbrauchsrate von HepaRG und HepG2 Zellen in Abhängigkeit einer TIMP-1-Stimulation untersucht. Als negative Kontrolle wurde hierbei mit Antimycin A ein Hemmer der Atmungskette eingesetzt (Abb. 3.19, A und B), als positive Kontrolle diente das entkoppelnde Agens FCCP (Abb. 3.19, A und B). Tatsächlich konnte sowohl in HepaRG (Abb. 3.19, A), als auch in HepG2 (Abb. 3.19, B) Zellen eine erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate nach TIMP-1-Stimulation beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob der durch TIMP-1-Stimulation erhöhte Sauerstoffverbrauch abhängig von einer verstärkten Verstoffwechselung von freien Fettsäuren, d.h. von der β-Oxidation, ist, wurde die Sauerstoffverbrauchsrate von TIMP-1-behandelten bzw. unbehandelten HepaRG Zellen in Gegenwart von Etomoxir gemessen. Als Hemmer der Carnitin-Palmitoyltransferase-1 verhindert Etomoxir die Bildung von Acylcarnithinen und dementsprechend den Transport von freien Fettsäuren aus dem Cytosol ins Mitochondrium (Kruszynska und Sherratt, 1987). Tatsächlich wurde durch Zugabe von Etomoxir eine Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate in HepaRG Zellen nach TIMP-1-Stimulation verhindert (Abb. 3.19., C). Im Gegensatz dazu konnte ein TIMP-1-induzierter Sauerstoffverbrauch in HepaRG Zellen immer noch beobachtet werden, wenn der Glutamin- bzw. der Glukose-Stoffwechselweg durch Zugabe von BPTES (Abb. 3.19, D) bzw. UK5099 (Abb. 3.19, E) blockiert wurde. Darüber hinaus verhinderte die Blockade der β-Oxidation durch Etomoxir-Zugabe auch die TIMP-1-abhängige Reduktion intrazellulärer Lipidspeicher in HepaRG-Zellen (Abb. 3.19, F). Zusammenfassend deuten diese Daten also an, dass TIMP-1 in Hepatozyten die β-Oxidation von Fettsäuren fördert, was wiederum eine Reduktion intrazellulärer TAG-beinhaltender Fettspeicher zur Folge hat.

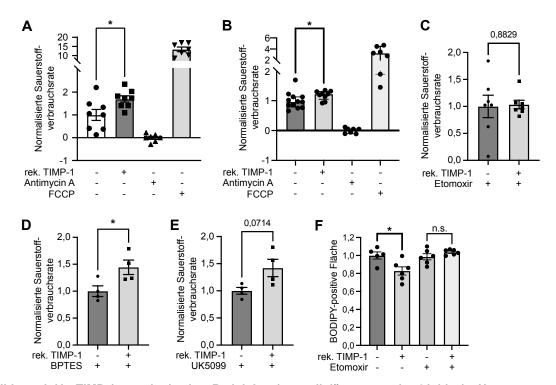


Abbildung 3.19: TIMP-1 vermittelt eine Reduktion intrazellulärer neutraler Lipide in Hepatozyten über Hochregulation der sauerstoffabhängigen Verstoffwechselung von Fettsäuren. (A, B) Normalisierte Sauerstoffverbrauchsrate von HepaRG (A) bzw. HepG2 (B) Zellen 1 h nach Zugabe von rek. humanem TIMP-1 (HepaRG: n=8, HepG2: n=9), Antimycin A (HepaRG: n=7, HepG2: n=7), FCCP (HepaRG: n=7, HepG2: n=7) oder ohne zusätzliche Behandlung (HepaRG: n=8, HepG2: n=12). (C - E) Normalisierte Sauerstoffverbrauchsrate von HepaRG Zellen 1 h nach Zugabe von Etomoxir (C, ohne TIMP-1: n=7, mit TIMP-1: n=7), BPTES (D, ohne TIMP-1: n=4, mit TIMP-1: n=4), oder UK5099 (E, ohne TIMP-1: n=4, mit TIMP-1: n=4). (F) Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche in HepaRG Zellen in Absenz oder Präsenz von rek. humanem TIMP-1 und/oder Etomoxir (jeweils n=6 außer bei unbehandelt: n=5). Die Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche erfolgte durch Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München). Mittelwert \pm SEM. *, $p \le 0,05$.

3.8. TIMP-1 fördert den Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten durch Aktivierung des AMPK-Signalwegs

Abschließend sollte untersucht werden, über welche Aktivität TIMP-1 den Katabolismus von Speicherlipiden in HepaRG Zellen bewirkt.

3.8.1. TIMP-1 verstärkt die aktivierende Phosphorylierung von AMPK in HepaRG Zellen

Zunächst wurde mittels *Signaling Array* untersucht, welche zentralen Regulatoren intrazellulärer Signalwege TIMP-1-abhängig in HepaRG Zellen aktiviert werden. Unter den zehn am stärksten durch TIMP-1-Stimulation induzierten Signalmolekülen war mit AMPK1 einer der zentralsten Regulatoren des Fettstoffwechsels (**Abb. 3.20, A**). Mittels *Western Blot* Analyse konnte durch TIMP-1-Stimulation die signifikante Erhöhung der aktivierenden Phosphorylierung an Threonin 172 von AMPK1 in HepaRG Zellen bestätigt werden (**Abb. 3.20, B**).

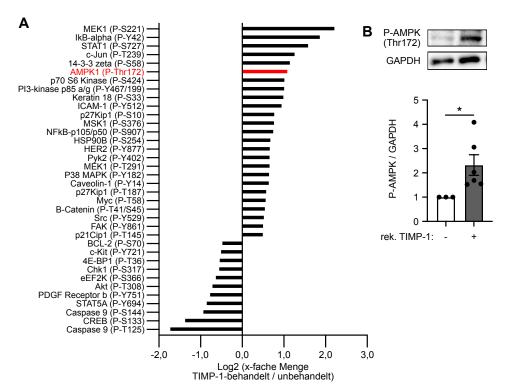


Abbildung 3.20: TIMP-1-Stimulation induziert die aktivierende Phosphorylierung von AMPK in HepaRG Zellen. (A) Relative Menge an phosphorylierten Proteinen im Verhältnis zur GAPDH-Menge in TIMP-1-stimulierten HepaRG Zellen normalisiert auf das Phosphoprotein/GAPDH-Verhältnis in unbehandelten HepaRG Zellen. Bestimmung erfolgte mittels Signaling Array. Dargestellt sind alle Phosphoproteine mit einer relativen Änderung von $Log2 \ge 0,50$ bzw. $Log2 \le -0,50$. Der Signaling Array wurde durchgeführt von Celina Eckfeld und Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München). (B) Repräsentativer Western Blot von Phospho-AMPK (Thr172) bzw. von GAPDH in unstimulierten bzw. TIMP-1-stimulierten HepaRG Zellen. Quantifizierung des Verhältnisses von Phospho-AMPK/GAPDH in HepaRG Zellen mit (n = 6) bzw. ohne (n = 3) TIMP-1 Behandlung. Die Western Blot-Analysen wurden mit Unterstützung von Nicole Schmid (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München) durchgeführt. Mittelwert \pm SEM. *, p \le 0,05.

3.8.2. Die TIMP-1-induzierte Reduktion von Lipidspeichern in HepaRG Zellen ist AMPK-abhängig

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der TIMP-1-induzierten AMPK-Signalaktivität (**Abb. 3.20**) und der TIMP-1-induzierten Abbau von Lipidspeichern (**Abb. 3.19**) zu untersuchen, wurde der AMPK-Hemmer *Compound C* eingesetzt. In Gegenwart von *Compound C* konnte sowohl die TIMP-1-abhängige Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate (**Abb. 3.21, A**), als auch die daraus resultierende (**Abb. 3.19, F**) TIMP-1-abhängige Reduktion intrazellulärer Lipidspeicher (**Abb. 3.21, B**) in HepaRG Zellen komplett verhindert werden. Dies deutet an, dass die Aktivierung des AMPK-Signalwegs durch TIMP-1 den verstärkten Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten vermittelt.

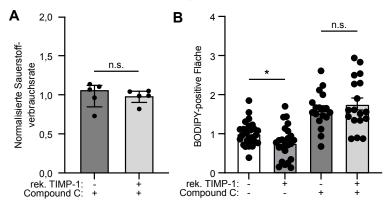


Abbildung 3.21: Die TIMP-1-induzierte AMPK-Signalaktivität vermittelt einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und die Reduktion neutraler Lipide in HepaRG Zellen. (A) Normalisierte Sauerstoffverbrauchsrate in Compound C behandelten HepaRG Zellen in Präsenz bzw. Absenz von rek. humanem TIMP-1 (jeweils n=5). Mittelwert \pm SEM. (B) BODIPY-positive Fläche in unbehandelten bzw. TIMP-1-stimulierten HepaRG Zellen in Absenz (unb. n=27, TIMP-1 n=24) bzw. Präsenz von Compound C (jeweils n=18). Die Quantifizierung der BODIPY-positiven Fläche erfolgte durch Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München). Mittelwert \pm SEM. *, $p \le 0,05$.

3.8.3. Die metastasierungsfördernde Lebernische in männlichen Mäusen weist eine TIMP-1-abhängige Erhöhung der AMPK-Phosphorylierung auf

Die Untersuchungen mit dem HepaRG Zellkulturmodell zeigten, dass TIMP-1 einen verstärkten Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten über Aktivierung des AMPK-Signalwegs induziert. Nun wurde überprüft, ob auch die Reduktion der TAG-Spiegel in der TIMP-1-induzierten metastasierungsfördernden Lebernische (Abb. 3.17, A) mit einer Veränderung des AMPK-Signalwegs *in vivo* assoziiert ist. Im Pankreaskrebs-konditionierten Lebergewebe TIMP-1-kompetenter männlicher Mäuse konnte eine erhöhte Phosphorylierung von AMPK im Vergleich zum gesunden Lebergewebe beobachtet werden (Abb. 3.22, A). Das Lebergewebe TIMP-1-defizienter PDAC-erkrankter Männchen wies dagegen keine veränderte AMPK-Phosphorylierung im Vergleich zum gesunden Lebergewebe bzw. eine verringerte AMPK-Phosphorylierung im Vergleich zum Lebergewebe TIMP-1-kompetenter PDAC-

Ergebnisse

erkrankter Männchen auf (**Abb. 3.22**, **A**). Tatsächlich konnte in TIMP-1-kompetenten Mäusen sogar eine dosisabhängige Korrelation zwischen TIMP-1-Spiegeln im Blutplasma und Phosphorylierung von AMPK im Lebergewebe beobachtet werden (**Abb. 3.22**, **B**).

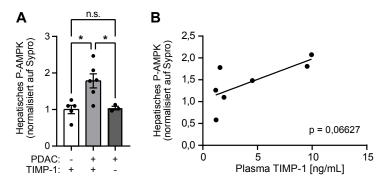


Abbildung 3.22: Die erhöhte Phosphorylierung von AMPK in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber männlicher Mäuse ist TIMP-1-abhängig. (A, B) Quantifizierung der relativen Phospho-AMPK (Thr172) Menge normalisiert zur Gesamtproteinmenge (Sypro) im Lebergewebe TIMP-1-kompetenter gesunder männlicher Mäuse (n = 5) bzw. TIMP-1-kompetenter (n = 6) oder TIMP-1-defizienter (n = 3) männlicher KPC-Mäuse mit PDAC (A), sowie deren Korrelation mit den Plasma TIMP-1-Spiegeln in den TIMP-1-kompetenten Mäusen (B). Die zugrundeliegenden *Western Blot*-Analysen wurden mit Unterstützung von Nicole Schmid (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München) durchgeführt. Mann-Whitney Test (A) bzw. Spearman Korrelation (B) wurden angewendet. *, p \leq 0,05.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnten Geschlechtsunterschiede bei der Lebermetastasierung und beim Überleben von Pankreaskrebs beschrieben werden. die unabhängig Lebensgewohnheiten sind (Abb. 4.1). Auf molekularer Ebene wurde die männerspezifisch erhöhte Expression des intrinsischen Faktors TIMP-1 als Grundlage Geschlechtsunterschiede identifiziert (Abb. 4.1). Hinsichtlich einer klinischen Anwendbarkeit konnte TIMP-1 als möglicher männerspezifischer Biomarkerkandidat für die Vorhersage des Gesamtüberlebens und der Entwicklung metachroner Metastasen spezifisch in der Leber von Krebspatienten vorgeschlagen werden. Die Aufdeckung einer molekularen, intrinsischen Ursache von Lebensstil-unabhängigen Geschlechtsunterschieden bei einer der tödlichsten Erscheinungsformen von Krebserkrankungen, nämlich der Lebermetastasierung (Budczies et al., 2015; Steeg, 2016), hebt die Notwendigkeit der Berücksichtigung des biologischen Geschlechts als eine entscheidende biologische Variable bei Krebs hervor (Hermann et al., 2021).

4.1. Die Bedeutung des biologischen Geschlechts bei der Progression von Krebserkrankungen

Die in dieser Arbeit beschriebene Beobachtung, dass das Gesamtüberleben von Männern mit Pankreaskrebs verkürzt ist im Vergleich zum Gesamtüberleben von Frauen, ist im Einklang mit den Erkenntnissen einer epidemiologischen Studie (Micheli et al., 2009). Da es sich um Auswertung relativer Überlebensdaten handelte, kann die generell höhere Lebenserwartung des weiblichen Geschlechts als Grundlage des unterschiedlichen Gesamtüberlebens zwischen Frauen und Männern mit Pankreaskrebs ausgeschlossen werden. Bislang wurden Geschlechtsunterschiede beim Überleben von Krebserkrankungen häufig als eine Folge von geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Lebensweise trivialisiert (Clocchiatti et al., 2016). Lebensstil-assoziierte Krebsrisikofaktoren wie Rauchen (Reitsma et al., 2017), Alkoholkonsum (Rehm et al., 2009) oder ungesunde Ernährung (Kelly et al., 2008) sind in der männlichen Bevölkerung in der Tat verbreiteter und solche extrinsischen Risikofaktoren korrelieren mit einer schlechteren Prognose bei Krebs (Park et al.. 2006). Auch bei der hier ausgewerteten Kohorte mit über 200.000 Pankreaskrebspatientinnen und -patienten war es nicht möglich, einen etwaigen Einfluss des Lebensstils auf das Überleben gänzlich auszuschließen. Durch Zuhilfenahme des genetisch modifizierten PDAC-Mausmodells KPC konnte die Existenz eines Lebensstil-unabhängigen Geschlechtsunterschieds beim Gesamtüberleben von Pankreaskrebs dennoch nachgewiesen werden (Hermann et al., 2021). Die Zucht und Haltung der PDAC-erkrankten Mäuse war standardisiert und eine Exposition zu extrinsischen Krebsrisikofaktoren wurde komplett ausgeschlossen. Trotz dieser standardisierten Bedingungen konnte ein verkürztes Überleben des männlichen Geschlechts beobachtet werden. Der Fakt, dass selbst der Genotyp der weiblichen und männlichen KPC-Mäuse bis auf die X- und Y-Chromosomen nahezu identisch war, deutet bereits an, dass auf den Geschlechtschromosomen kodierte Gene beim geschlechtsabhängigen Überleben des Pankreaskrebses eine zentrale Rolle spielen (Clocchiatti et al., 2016; Haupt et al., 2021). Tatsächlich konnte mit TIMP-1 ein X-Chromosom kodierter Faktor als molekulare Grundlage des Geschlechtsunterschieds beim Überleben von Pankreaskrebs identifiziert werden (Abb. 4.1). Dies ist im Einklang mit dem Konzept, dass geschlechtsabhängige intrinsische Faktoren eine Schlüsselrolle beim Verlauf von Krebserkrankungen spielen (Clocchiatti et al., 2016; Wagner et al., 2019) und dass Geschlechtsunterschiede im Überleben von Krebs nicht alleine durch unterschiedliche Lebensgewohnheiten zwischen Frauen und Männern erklärt werden können (Micheli et al., 2009).

Ein verkürztes Gesamtüberleben des männlichen Geschlechts im Zusammenhang mit Krebserkrankungen konnte bereits in zahlreichen epidemiologischen Studien beschrieben werden (Micheli et al., 2009; Radkiewicz et al., 2017; Dong et al., 2020). Trotzdem war bislang nahezu unbekannt, ob diese Geschlechtsunterschiede im Gesamtüberleben auch mit geschlechtsspezifischen Unterschieden bei der tödlichsten Erscheinungsform von Krebs, nämlich der Metastasierung (Steeg, 2016; Dillekas et al., 2019), einhergehen. Im Kontext des Pankreaskrebses konnte in zwei präklinischen Mausmodellen für PanNETs, die eine sehr seltene und von PDAC abzugrenzende Form pankreatischer Neoplasien darstellen (Kleeff et al., 2016), eine erhöhte Lebermetastasierung bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren beobachtet werden (Contractor et al., 2016). Allerdings war unbekannt, ob bzw. inwiefern Geschlechtsunterschiede bei der Metastasierung auch im humanen Kontext vorkommen. Durch die Auswertung klinischer Daten von Pankreaskrebspatientinnen und -patienten konnten in dieser Arbeit erstmals spezifische Geschlechtsunterschiede bei der Entwicklung von Metastasen in Kontext des klinisch deutlich bedeutsameren PDAC (Kleeff et al., 2016) beschrieben werden. Unter den vier am häufigsten von PDAC-Metastasen betroffenen Geweben (Budczies et al., 2015) konnte spezifisch in der Leber eine verstärkte Metastasenbildung bei erkrankten Männern beobachtet werden, wohingegen keine Geschlechtsunterschiede bei Lungen-, Peritoneum- oder Lymphknotenmetastasen gefunden wurden. Grundsätzlich ist es unmöglich das verkürzte Gesamtüberleben von Pankreaskrebserkrankten Männern direkt kausal mit einer verstärkten Lebermetastasierung in Verbindung zu bringen, da der letztendliche Grund für das Versterben von Krebserkrankten multifaktoriell und individuell sehr unterschiedlich ist (Inagaki et al., 1974; Ambrus et al., 1975). Pathologische Berichte nennen beispielsweise Infektionen als den häufigsten direkten Grund für den Tod von Krebserkrankten (Inagaki et al., 1974; Ambrus et al., 1975), gefolgt von Organversagen

(Inagaki et al., 1974) und hämorrhagischen Phänomenen (Inagaki et al., 1974; Ambrus et al., 1975) als ebenfalls oft auftretende letale Komplikationen bei Krebserkrankungen. Diese Todesursachen können nicht direkt kausal auf bestimmte Ausprägungen von Krebserkrankungen wie beispielsweise auf die Entwicklung von Metastasen oder auf das Wachstum von Primärtumoren zurückgeführt werden. Dennoch war der in dieser Arbeit beschriebene Geschlechtsunterschied beim Gesamtüberleben von Pankreaskrebs stark gekoppelt an einen leberspezifischen Geschlechtsunterschied bei der Metastasierung. Die Leber ist bei Weitem das am häufigsten von PDAC-Metastasen betroffene Organ in Patienten (Oweira et al., 2017) und Mäusen (Hingorani et al., 2005). Darüber hinaus wird angenommen, dass Lebermetastasen im Zusammenhang mit PDAC eine zentrale Rolle bei der Mehrzahl der Todesfälle spielen (Ryan et al., 2014), da das Auftreten von Metastasen in der Leber mit einem signifikant verkürzten PDAC-Überleben im Vergleich zum Auftreten von Metastasen in anderen Organen assoziiert ist (Oweira et al., 2017). Vor diesem Hintergrund suggeriert die hier beschriebene eindeutige Assoziation zwischen geschlechtsabhängigen Unterschieden beim Gesamtüberleben und bei der Lebermetastasenentwicklung des PDAC einen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Befunden (Abb. 4.1) (Hermann et al., 2021).

Interessanterweise betrafen die Geschlechtsunterschiede bei der Metastasierung spezifisch ein Organ, nämlich die Leber. Dieser Befund deutete an, dass die Grundlage für die geschlechtsspezifische Metastasierung weniger auf Seiten der Tumorzellen selbst, sondern eher auf Seiten des Empfängerorgans, also der Leber, zu finden waren. Wenn beispielsweise die metastatische Kapazität von Tumorzellen im männlichen Geschlecht erhöht wäre, würde man eher eine generell verstärkte Verbreitung von Tumorzellen im ganzen Körper, d.h. in verschiedensten Organen, erwarten. Im Gegensatz dazu wiesen die Unterschiede speziell bei Lebermetastasierung auf eine geschlechtsabhängige der Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber hin (Hermann et al., 2021), da solche organspezifischen Nischen die Metastasierung zielgerichtet in definierte Organe bestimmen können (Hoshino et al., 2015). Eine Transkriptomanalyse des Lebergewebes von PDAC-Patientinnen und -Patienten bzw. von PDAC-erkrankten weiblichen und männlichen Mäusen lieferte die Erkenntnis, dass es eine männerspezifisch erhöhte hepatische Expression von Genen gibt, die in Fibrose-, Immun- und Fettkatabolismus-assoziierten Prozessen eine zentrale Rolle spielen. Tatsächlich ist beispielsweise die Aktivierung von HSCs ein zentrales initiales Ereignis bei der fibrotischen Remodellierung des Lebergewebes, was letztlich in einer verstärkten Rekrutierung von Tumorzellen in die Leber (Grünwald et al., 2016) und in einem besseren Auswachsen dieser Tumorzellen zu hepatischen Makrometastasen (Nielsen et al., 2016; Lenk et al., 2017) resultiert. Auch die verstärkte Rekrutierung von entzündlichen myeloiden Zellen und hämatopoetischen Zellen ins Lebergewebe ist ein Prozess, der essentiell für die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber ist (Nielsen et al., 2016). Vor kurzem konnte außerdem die übergeordnete Wichtigkeit einer entzündlichen Reaktion von Hepatozyten bei Ausbildung einer prometastatischen Lebernische beschrieben werden (Lee et al., 2019; Li et al., 2020). Über die Bildung von SAA1 und SAA2 orchestrieren Hepatozyten sowohl die Akkumulation myeloider Zellen als auch die Initiation fibrotischer Prozesse in der Leber und können somit die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber dirigieren (Lee et al., 2019). Durch einen verstärkten Abbau von TAGs können Hepatozyten außerdem auf metabolischer Ebene direkt den Stoffwechsel von Tumorzellen in der Leber unterstützen und so das Wachstum von Lebermetastasen fördern (Li et al., 2020). Die männerspezifische Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber (Abb. 4.1) konnte schließlich mittels experimenteller Metastasierung in zwei unabhängigen Mausmodellen weiter bekräftigt werden. Durch Verwendung des Caerulein basierten Mausmodells konnte erstmals gezeigt werden, dass bereits eine einfache Entzündung im Pankreas Absenz eines Primärtumors ausreicht, um die Bildung metastasierungsfördernden Nische in der Leber beim männlichen Geschlecht zu induzieren. Bisherige Studien demonstrierten die Bildung einer prometastatischen Nische in der Leber im Kontext des Pankreaskrebses in Gegenwart eines spontanen oder orthotop transplantierten pankreatischen Primärtumors (Grünwald et al., 2016; Nielsen et al., 2016; Lenk et al., 2017; Lee et al., 2019). Es ist bekannt, dass pankreatische Entzündungen, wie sie durch Caerulein-Injektionen ausgelöst werden können, der Bildung eines Pankreastumors vorausgehen (Guerra et al., 2011; Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021). Vor diesem Hintergrund suggerieren die Erkenntnisse aus dieser Arbeit, dass metastasierungsfördernde Nische in der Leber nicht, wie bislang angenommen, während früher Stadien der Pankreastumorprogression gebildet werden (Grünwald et al., 2016; Nielsen et al., 2016; Lee et al., 2019), sondern dass diese Nische bereits vor der Entstehung des pankreatischen Tumors selbst initiiert wird. Kürzlich konnte beschrieben werden, dass eine einmalige, transiente Entzündung im Pankreas zwar eine relativ schnelle Regeneration des Pankreasgewebes zur Folge hat (Del Poggetto et al., 2021). Allerdings kommt es im Zuge der Regeneration auch zur Bildung sogenannter pankreatischer Gedächtnis-Epithelzellen, die eine sehr lange anhaltende transkriptionelle und epigenetische Reprogrammierung aufweisen (Del Poggetto et al., 2021). Somit könnte eine metastasierungsfördernde Nische in der Leber, ausgelöst durch transkriptionelle Veränderungen im Pankreasgewebe, nicht nur sehr schnell nach einer Pankreasentzündung gebildet werden, sondern möglicherweise auch langfristig bestehen. Dies wiederum hieße, dass Männer, die an akuter oder chronischer Pankreatitis erkrankt waren, nicht nur ein erhöhtes Risiko haben Pankreaskrebs zu entwickeln (Kirkegard et al., 2017; Kirkegard et al., 2018), sondern im Fall einer Pankreaskrebserkrankung auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lebermetastasen aufweisen.

4.2. Die geschlechtsspezifische klinische Relevanz von TIMP-1

Primärtumorsezernierte Faktoren, die über die Blutbahn auf entfernte Organe wirken können, lösen die Bildung metastasierungsfördernder, organspezifischer Nischen aus (Peinado *et al.*, 2017). Im Einklang mit diesem Konzept konnte in dieser Arbeit mit TIMP-1 ein im erkrankten Pankreasgewebe exprimierter, sezernierter Faktor als molekulare Grundlage der geschlechtsabhängigen Bildung einer prometastatischen Nische in der Leber identifiziert werden.

Tatsächlich konnte bereits in früheren Studien die fördernde Wirkung von TIMP-1 auf die Ausbildung von Lebermetastasen beschrieben werden (Kopitz et al., 2007; Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Interessanterweise induzieren erhöhte TIMP-1-Spiegel in präklinischen Modellen spezifisch die Bildung von Metastasen in der Leber, aber sie fördern beispielsweise nicht die Metastasenbildung in der Lunge (Kopitz et al., 2007). Dieser Befund ist im Einklang mit der Beobachtung in dieser Arbeit, dass PDAC-Patienten mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lebermetastasen aufweisen, allerdings haben sie kein verändertes Risiko für die Entwicklung von Tumoren in anderen Organen. Auf molekularer Ebene bewirkt TIMP-1 über Interaktion mit dem Rezeptor CD63 die Aktivierung von HSCs in der Leber, was die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische initiiert (Grünwald et al., 2016). Diese aktivierten HSCs produzieren erhöhte Mengen des Chemokins SDF-1 (Grünwald et al., 2016), was eine verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Leber zur Folge hat (Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Auch die Neutrophilen Granulozyten sind ein essentieller Bestandteil der TIMP-1-abhängigen metastasierungsfördernden Nische in der Leber (Seubert et al., 2015). Inwiefern die Fähigkeit von TIMP-1, eine Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) zu induzieren (Schoeps et al., 2021b), eine Rolle bei der Bildung der TIMP-1-abhängigen hepatischen prometastatischen Nische spielt, ist derzeit nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Aufbauend auf diesen Studien (Kopitz et al., 2007; Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016) war also bekannt, über welchen molekularen Mechanismus TIMP-1 prinzipiell die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber von Mäusen induzieren kann. Allerdings war sowohl eine klinische Relevanz, als auch eine Geschlechtsabhängigkeit der durch TIMP-1 geförderten Lebermetastasierung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, bislang unbekannt.

Als Grundlage der verstärkten Lebermetastasierung und des verkürzten Gesamtüberlebens bei Männern konnte die Hochregulation von TIMP-1 im Pankreasgewebe und im Blutplasma, die infolge pankreatischer Erkrankungen ausschließlich beim männlichen und nicht beim weiblichen Geschlecht vorkommt, identifiziert werden (**Abb. 4.1**). Auf zellulärer Ebene wurden pankreatische Epithelzellen, die in der Nähe von geschädigtem Pankreasgewebe lokalisiert waren, als Hauptquelle der erhöhten pankreatischen TIMP-1-Expression bei männlichen

Mäusen identifiziert. Hervorzuheben ist hierbei der Fakt, dass die TIMP-1 mRNA-Expression bei Männchen nicht nur in Pankreastumorzellen von KPC-Mäusen, sondern auch in benignen Pankreaszellen von Caerulein behandelten Mäusen hochreguliert war. Da die Caerulein behandelten Mäuse im Gegensatz zu den KPC-Mäusen (Hingorani et al., 2005) keine genetischen Veränderungen aufwiesen, scheiden DNA-Mutationen als mechanistische Grundlage für eine erhöhte TIMP-1-Expression aus. Vielmehr deuten die Erkenntnisse aus dieser Arbeit darauf hin, dass epigenetische Veränderungen eine zentrale Rolle bei der Hochregulation der TIMP-1-Expression spielen (Abb. 4.1), da die erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression in pankreatischen Epithelzellen aus Mäusen und aus PDAC-Patienten mit einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA-Region des Timp-1 bzw. TIMP-1 Gens assoziiert waren. Tatsächlich wurden DNA-Mutationen schon seit Längerem als eine wichtige Grundlage (Hanahan und Weinberg, 2011) von Krebs anerkannt, wohingegen epigenetische Veränderungen erst vor Kurzem als eine solche zentrale ermöglichende Charakteristik (engl. enabling characteristic') eingestuft wurden (Hanahan, 2022). Vor allem bei Schädigungen des Pankreasgewebes spielen epigenetische Veränderungen in Azinuszellen eine zentrale Rolle, da diese die Transdifferenzierung der Zellen initiieren und dadurch letztlich die Regeneration des Gewebes ermöglichen (Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021). Welche spezifischen epigenetischen Prozesse in diesem Kontext die Hochregulation der TIMP-1 Expression ermöglichen, ist bislang jedoch nicht bekannt.

Ein weiterer Befund in dieser Arbeit war, dass Frauen grundsätzlich höhere basale TIMP-1-Plasmaspiegel aufweisen als Männer. Dieser Geschlechtsunterschied zeigt, dass TIMP-1-Spiegel grundsätzlich unbedingt getrennt zwischen den beiden biologischen Geschlechtern evaluiert werden sollten, ähnlich wie es bereits mit anderen Blutparametern wie Ferritin (World Health Organization, 2011: WHO/NMH/NHD/MNM/11.2) oder Gamma-Glutamyltransferase (Fuggle, 2018) in der klinischen Praxis gemacht wird. Die basal erhöhten TIMP-1-Plasmaspiegel sind im Einklang mit dem Befund, dass sich das X-Chromosom kodierte TIMP-1 Gen teilweise der XCI entziehen kann (Brown et al., 1997; Anderson und Brown, 1999; Anderson und Brown, 2002; Anderson und Brown, 2005) und in manchen weiblichen Zellen sowohl vom aktiven, als auch vom inaktiven X-Chromosom transkribiert wird (Tukiainen et al., 2017). Dieses Expressionsmuster in weiblichen humanen Zellen ist einzigartig für das TIMP-1 Gen, da eine Variabilität im Entziehen der XCI zwischen einzelnen Zellen auf kein anderen Xchromosomales Gen zutrifft (Tukiainen et al., 2017). Die basalen TIMP-1-Konzentrationen im Blutplasma gesunder und PDAC-erkrankter Frauen waren so hoch, dass sie sich nicht von den TIMP-1-Plasmaspiegel von PDAC-erkrankten Männern unterschieden. Trotz dieser hohen TIMP-1-Plasmaspiegeln wiesen Frauen jedoch keine erhöhte Lebermetastasierung auf. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass es bei Frauen einen intrinsischen Schutzmechanismus gibt, der eine dauerhafte Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber durch basal erhöhte TIMP-1-Spiegel verhindert. Eine mögliche protektive Rolle könnte hierbei das weibliche Hormon Östrogen spielen (Della Torre, 2020; Mills *et al.*, 2021). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass beispielsweise ein erhöhter Redox-Stress im Fettgewebe aufgrund einer Punktmutation im *Uncoupling Protein-1* (UCP-1) eine entzündliche Antwort im Lebergewebe bei männlichen, aber nicht bei weiblichen Mäusen auslöst (Mills *et al.*, 2021). Eine Administration von β-Östradiol in männlichen Tieren war ausreichend, um die entzündliche Reaktion zu verhindern (Mills *et al.*, 2021). Da auch die Bildung einer prometastatischen Nische in der Leber durch eine entzündliche Reaktion gekennzeichnet ist (Grünwald *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2016; Lenk *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019), könnte Östrogen ein natürlicher Schutzmechanismus beim weiblichen Geschlecht sein und möglicherweise auch der erhöhten Lebermetastasierung in männlichen PDAC-erkrankten Mäusen entgegenwirken.

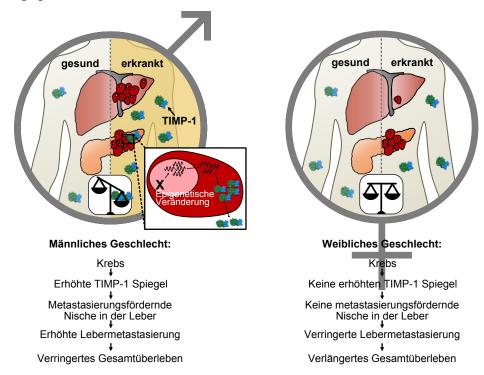


Abbildung 4.1: Die TIMP-1-Expression liegt den Geschlechtsunterschieden bei der Lebermetastasierung und beim Überleben von Pankreaskrebs zugrunde. Beim männlichen Geschlecht (links) kommt es in pankreatischen Epithelzellen infolge der Transdifferenzierung und der Transformation zu Tumorzellen zu epigenetischen Veränderungen, die eine verbesserte Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens und eine verstärkte TIMP-1 mRNA-Expression zur Folge haben. Die erhöhte TIMP-1 Expression ist mit einem Anstieg der TIMP-1-Plasmaspiegel assoziiert, der wiederum in der Leber die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische induziert. Dadurch kommt was beim männlichen Geschlecht mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln zur verstärkten Lebermetastasierung und einem verringerten Gesamtüberleben. Im Gegensatz dazu ist beim weiblichen Geschlecht (rechts) keine verstärkte TIMP-1 Expression bzw. keine Erhöhung der TIMP-1-Plasmaspiegel infolge der Pankreaskrebsprogression zu beobachten, weshalb es nicht zur Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Leber kommt und die Lebermetastasierung weniger häufig auftritt, sowie das Gesamtüberleben verbessert ist. Diese Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus (Hermann et al., 2021).

Die Beobachtung, dass die erhöhte TIMP-1 Expression beim männlichen Geschlecht die Lebermetastasierung fördert und das Gesamtüberleben verringert, führte zur Identifikation einer Untergruppe von Pankreaskrebspatienten, die im Vergleich zu allen anderen Patientinnen und Patienten früher verstirbt und damit die Geschlechtsunterschiede bei der Pankreaskrebserkrankung hervorruft. Diese Untergruppe von Pankreaskrebspatienten hatte erhöhte TIMP-1-Spiegel im Tumor oder im Blutplasma und wies eine deutlich schnellere und frühere Lebermetastasenentwicklung, sowie ein verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zu allen anderen Pankreaskrebspatientinnen und -patienten auf. Durch genetische Ablation der TIMP-1 Expression in PDAC-erkrankten Mäusen konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen TIMP-1 und erhöhter Lebermetastasierung bzw. verringertem Gesamtüberleben beim männlichen Geschlecht hergestellt werden. Dieser entscheidende Einfluss von TIMP-1 auf Geschlechtsunterschiede bei PDAC konnte auch in Patienten festgestellt werden. Die Trennung der T1^{HI} Männer von allen anderen Pankreaskrebspatientinnen und -patienten führte nämlich zur Aufhebung der Geschlechtsunterschiede.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Studie kann TIMP-1 als vielversprechender Biomarkerkandidat für Pankreaskrebs-erkrankte Männer vorgeschlagen werden (Hermann et al., 2021). Die Quantifizierung von TIMP-1 auf Ebene der mRNA- oder Protein-Expression im Primärtumor bzw. auf Proteinebene im Blutplasma scheint auszureichen, um PDAC-Patienten zu identifizieren (T1^H Männer), die nach einer potentiell kurativen (Neoptolemos *et al.*, 2018) und histologische vollständigen (R0-Status) Resektion des Pankreastumors ein über dreifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lebermetastasen aufweisen im Vergleich zu allen anderen PDAC-Patientinnen und -Patienten. Ein möglicher Einfluss von Störfaktoren in diesen klinischen Auswertungen ist unwahrscheinlich, da der Tumor-, Lymphknoten-, Metastasenund UICC-Status sowie auch die Behandlung zwischen den weiblichen und männlichen Populationen der PDAC-Patientenkohorten vergleichbar waren. Die Entwicklung von Lebermetastasen ist nicht nur die früheste und häufigste Art eines Rezidivs (Groot et al., 2018), sondern auch der Hauptgrund für das Versterben (Hishinuma et al., 2006) von PDAC-Patientinnen und -Patienten, die mit einer potentiell kurativen Primärtumorresektion behandelt wurden. Die klinische Problematik der hohen Sterblichkeit von Patienten mit Lebermetastasen ist allerdings nicht nur auf eingeschränkte Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen. Tatsächlich wurden die Therapieoptionen in jüngster Vergangenheit durch Etablierung systemischer Behandlungen und neuer biologischer bzw. immuntherapeutischer Medikamente wie bspw. monoklonale Antikörper revolutioniert (Tsilimigras et al., 2021). Vielmehr ist vor allem die frühe Detektion bzw. die Vorhersage der Entwicklung von Lebermetastasen bislang nicht möglich (Neoptolemos et al., 2018), was jedoch essentiell für die frühe bzw. rechtzeitige Implementierung effektiver und gezielter Therapieansätze wäre (Tsilimigras et al., 2021). Bislang war lediglich das Verhältnis Tumorzell-positiver Lymphknoten zur Gesamtzahl untersuchter Lymphknoten als prädiktiver Parameter bekannt, mithilfe dessen das Wiederauftreten der Erkrankung nach Primärtumorresektion in PDAC-Patientinnen und -Patienten vorhergesagt werden konnte (Groot et al., 2018). Dieses Verhältnis muss allerdings

durch histologische Methoden bestimmt werden und es kann das Wiederauftreten von Tumoren nur unspezifisch, d.h. in einer Organ-unspezifischen Weise, vorhersagen (Groot et al., 2018). Da aber beispielsweise Lebermetastasen grundsätzlich anders therapiert werden als pankreatische Primärtumoren oder Metastasen in anderen Organen (Neoptolemos et al., 2018; Tsilimigras et al., 2021), ist die Organ-unspezifische Vorhersage der Rezidiv-Entwicklung für therapeutische Erwägungen nur wenig hilfreich. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie mit TIMP-1 ein Kandidat vorgeschlagen, der einfach im ohnehin schon resezierten Primärtumorgewebe oder in minimal invasiven Blutproben quantifiziert werden kann und der die Entwicklung von Metastasen spezifisch im Lebergewebe von PDAC-Patienten vorhersagen könnte.

Über alle Tumorarten hinweg ist die Leber das am häufigsten von Metastasen befallene Organ (Budczies *et al.*, 2015). Dementsprechend sind Lebermetastasen nicht nur beim Pankreaskrebs, sondern auch bei anderen Krebsarten von äußerster klinischer Relevanz (Tsilimigras *et al.*, 2021). Analog zum PDAC konnte hier demonstriert werden, dass auch CRC-bzw. Melanom-Patienten mit hoher TIMP-1 Expression ein deutlich erhöhtes Risiko haben, Lebermetastasen zu entwickeln. Dieser Befund deutet an, dass der prädiktive Wert von TIMP-1 nicht nur auf Pankreaskrebs beschränkt ist, sondern möglicherweise auch auf zahlreiche anderen Krebserkrankungen angewendet werden kann. Tatsächlich ist CRC die Krebsart, die für die meisten Lebermetastasen überhaupt verantwortlich ist (de Ridder *et al.*, 2016). Daher könnte ein Biomarkerkandidat, der die Lebermetastasenentwicklung in CRC-Patienten vorhersagen kann, klinisch außerordentlich wertvoll sein.

Es ist wichtig hervorzuhaben, dass TIMP-1 spezifisch beim männlichen Geschlecht ein sehr geeigneter prädiktiver Parameter zu sein scheint. Dass TIMP-1 bei PDAC-, CRC-, oder Melanom-erkrankten Frauen keinen prädiktiven Wert aufwies, ist im Einklang mit dem Befund, dass die genetische Ablation von TIMP-1 in weiblichen Mäusen weder einen Einfluss auf die Lebermetastasenentwicklung noch auf das Gesamtüberleben hatte. Vor dem Hintergrund, dass die TIMP-1-Plasmaspiegel selbst bei gesunden Männern und Frauen unterschiedlich sind, ist es essentiell, das biologische Geschlecht bei der Evaluierung von TIMP-1 als Biomarker strikt zu berücksichtigen. Exemplarisch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Einteilung einer gemischten Kohorte aus PDAC-Patientinnen und -Patienten anhand der TIMP-1-Spiegel erst Unterschiede bei der Entwicklung von Lebermetastasen offenbarte, wenn diese Kohorte zusätzlich auch nach dem biologischen Geschlecht aufgetrennt wurde.

4.3. Einfluss von TIMP-1 auf den Katabolismus von Speicherlipiden

Durch eine gerichtete *Metabolomics*-Analyse konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber beim männlichen Geschlecht mit einem Verlust hepatischer TAGs, d.h.

der Hauptspeicherform von Lipiden (Mashek, 2021), einhergeht. Dieser Befund auf metabolischer Ebene war im Einklang mit den Erkenntnissen der Transkriptomanalysen von Lebergewebe aus Pankreaskrebspatientinnen und -patienten. Im Lebergewebe von PDAC-Patienten, also denjenigen Erkrankten, die auch Hinweise auf die Bildung einer metastasierungsfördernden Nische zeigen, war die Expression zahlreicher Gene hochreguliert, die beim Katabolismus von Lipiden eine Rolle spielen. Tatsächlich konnte, wie bei der Bildung der männerspezifischen prometastatischen Lebernische im Allgemeinen, auch bei der Reduktion der TAG-Spiegel in der Pankreaskrebs-konditionierten Leber im Speziellen eine TIMP-1-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Es ist zwar bereits bekannt, dass TIMP-1 prinzipiell den zellulären Lipidmetabolismus, beispielsweise von Adipozyten, beeinflussen kann (Meissburger et al., 2011). Allerdings unterscheidet sich der Katabolismus von Speicherlipiden in der Leber teilweise deutlich von demjenigen im Fettgewebe (Frayn et al., 2006), weshalb sich die Wirkung von TIMP-1 auf den hepatischen Stoffwechsel deutlich von dessen Wirkung auf das Fettgewebe unterscheiden könnte. Daneben konnte in ersten Studien bereits gezeigt werden, dass einerseits die Metabolisierung von energiereichen Lipiden durch Tumorzellen erheblich deren metastatisches Potenzial erhöht (Pascual et al., 2017; Pascual et al., 2021) und dass andererseits der Abbau von TAGs durch Hepatozyten das Auswachsen von Tumorzellen in der Leber fördert (Li et al., 2020). Darauf aufbauend sollte zukünftig die möglicherweise förderliche Wirkung der TIMP-1-abhängige Reduktion der hepatischen TAGs auf die Lebermetastasierung untersucht werden.

Interessanterweise konnte eine TIMP-1-Abhängigkeit spezifisch bei der Reduktion der TAGs im Lebergewebe, nicht aber bei deren Reduktion im Pankreasgewebe oder im Blutplasma nachgewiesen werden. Dieser Befund deutete an, dass TIMP-1 spezifisch auf den zellulären Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten wirken könnte. Hepatozyten stellen den absoluten Großteil aller Leberzellen dar (Vekemans und Braet, 2005) und vermitteln hauptsächlich den Stoffwechsel des gesamten Organs (Bechmann et al., 2012). Durch Verwendung der Zelllinie HepaRG, die den metabolischen Phänotyp von primären humanen Hepatozyten sehr gut und deutlich besser als viele andere Hepatozyten-artigen Zelllinien widerspiegelt (Klein et al., 2015; Rubin et al., 2015), konnte in dieser Arbeit ein erstes Modell des TIMP-1-Effekts auf den katabolen Stoffwechsel von Lipidspeichern in Hepatozyten entwickelt werden (Abb. 4.2). Eine Stimulation mit rekombinantem TIMP-1 führte bereits nach aktivierenden Phosphorylierung Minuten verstärkten des Lipidmetabolismusregulators AMPK (Herzig und Shaw, 2018). Darüber hinaus resultierte eine TIMP-1-Stimulation in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch von Hepatozyten, der abhängig von der Verstoffwechselung von freien Fettsäuren (Etomoxir, Abb. 4.2) und unabhängig vom Glukose- (UK5099) bzw. Glutaminstoffwechsel (BPTES) war. Infolge der TIMP-1-induzierten sauerstoffabhängigen Verstoffwechselung von Fettsäuren, d.h. der TIMP-1-induzierten βOxidation (Abb. 4.2), konnte außerdem eine Reduktion intrazellulärer Lipidtröpfchen, die hauptsächlich aus TAGs bestehen (Mashek, 2021), beobachtet werden (Abb. 4.2). Eine Hemmung der β-Oxidation durch Etomoxir-Zugabe verhinderte die TIMP-1-abhängige Reduktion der intrazellulären Lipidspeicher. Sowohl die erhöhte β-Oxidation, als auch der Verlust intrazellulärer Lipidtröpfchen scheint direkt kausal mit der TIMP-1-induzierten Aktivierung des AMPK-Signalwegs im Zusammenhang zu stehen, da eine Zugabe des AMPK-Hemmers Compound C diese metabolischen TIMP-1-Effekte verhinderte. Tatsächlich kann AMPK direkt die Lipolyse von TAGs zu freien Fettsäuren und deren Verstoffwechselung über die β-Oxidation fördern (Herzig und Shaw, 2018). Allerdings muss hervorgehoben werden, dass Compound C zwar häufig als spezifischer Hemmer von AMPK bezeichnet wird, aber im ähnlichen Konzentrationsbereich wie AMPK auch zahlreiche andere Kinasen wie SMAD- oder Src-Familienmitglieder inhibieren kann (Dasgupta und Seibel, 2018). Daher sollte zukünftig zusätzlich mit einem AMPK-spezifischen genetischen Knockdown in HepaRG Zellen verifiziert werden, dass die metabolischen Effekte von TIMP-1 über den AMPK-Signalweg vermittelt werden. Tatsächlich konnte auch in vivo ein Zusammenhang zwischen TIMP-1, AMPK und dem Katabolismus von Speicherlipiden in der Leber hergestellt werden, da die TIMP-1abhängige Reduktion der TAGs im Pankreaskrebs-konditionierten Lebergewebe männlicher Mäuse mit einer TIMP-1-abhängig erhöhten Phosphorylierung von AMPK assoziiert war. Somit könnte TIMP-1 ein pathophysiologisch relevanter Aktivator von AMPK sein, der eine Reduktion von gespeicherten Lipiden in der Leber bewirkt.

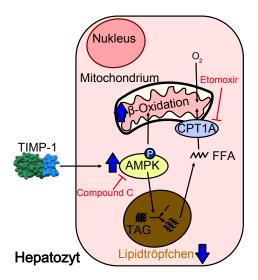


Abbildung 4.2: Der Einfluss von TIMP-1 auf den Katabolismus von Speicherlipiden in Hepatozyten. TIMP-1 induziert die aktivierende Phosphorylierung des zentralen Energiesensors AMPK, sowie einen verstärkten Sauerstoffverbrauch und eine Reduktion intrazellulärer neutraler Lipidspeicher in Hepatozyten. Durch Hemmung des CPT1A-vermittelten Imports freier Fettsäuren (FFA) ins Mitochondrium durch Zugabe von Etomoxir kann sowohl der TIMP-1-induzierte Sauerstoffverbrauch, als auch Reduktion der Triacylglyzerid (TAG)-beinhaltenden Lipidspeicher verhindert werden. Dieser Befund deutet an, dass die Reduktion intrazellulärer TAGs in Hepatozyten durch eine verstärkte Verstoffwechselung von FFAs über die mitochondriale β-Oxidation vermittelt wird. Diese metabolischen Effekte von TIMP-1 scheinen direkt abhängig von der Aktivierung des AMPK-Signalwegs zu sein, da die Zugabe des AMPK-Inhibitor Compound diesen Einfluss von TIMP-1 Lipidstoffwechsel verhindert.

4.4. Ausblick

Eine zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass das biologische Geschlecht als eine wichtige biologische Variable zukünftig sowohl in der präklinischen Forschung, als auch in der klinischen Anwendung im Bereich der Onkologie angemessener berücksichtigt werden sollte (Hermann und Krüger, 2022). Die Relevanz des Geschlechts wurde nicht zuletzt dadurch deutlich, dass TIMP-1-Plasmaspiegel ausschließlich bei männlichen Pankreaskrebspatienten einen sehr guten prognostischen Wert für die Vorhersage metachroner Lebermetastasen hatten, was allerdings in einer gemischten Kohorte aus Frauen und Männern mit Pankreaskrebs nicht der Fall war. Eine striktere Beachtung des biologischen Geschlechts, wie sie mittlerweile von den großen Fördereinrichtungen wie der Deutschen Forschungsgemeinschaft ("Geschlecht und Vielfalt – Bedeutung für Forschungsvorhaben", 2020 Senat der DFG) oder des National Institute of Health ("Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research", NOT-OD-15-102) gefordert wird, könnte dementsprechend auch in anderen Bereichen der Onkologie zu neuen klinisch relevanten Erkenntnissen beitragen.

In Bezug auf eine potentielle klinische Anwendbarkeit konnte in dieser Arbeit durch Analysen retrospektiver Patientenkohorten mit hunderten Patientinnen und Patienten mit TIMP-1 ein vielversprechender Biomarkerkandidat identifiziert und teilweise validiert werden. Darauf aufbauend sollte in zukünftigen prospektiven Untersuchungen der klinische Wert von TIMP-1 weiter charakterisiert und untermauert werden, sodass TIMP-1 als prädiktiver Biomarker möglicherweise in der klinischen Praxis Anwendung finden kann. Auf dem Weg zur möglichen therapeutischen Intervention sollte in Zukunft in präklinischen Modellsystemen außerdem überprüft werden, inwiefern eine Applikation von Antikörpern oder anderen TIMP-1-bindenden Proteinen wie das Large-Extracellular-Loop Fragment des TIMP-1-Rezeptors CD63 (Schoeps et al., 2021b) die TIMP-1-induzierte Bildung einer männerspezifischen metastasierungsfördernden Nische in der Leber verlangsamen, verhindern oder vielleicht sogar rückgängig machen könnte. Grundsätzlich ist im therapeutischen Kontext auch die Aufklärung des molekularen Mechanismus, der zur männerspezifischen Hochregulation der TIMP-1 Expression im erkrankten Pankreasgewebe führt, interessant. Da die erhöhte Expression von TIMP-1 im entzündeten Pankreas bzw. im Pankreastumor mit einer verbesserten Zugänglichkeit des TIMP-1 Gens assoziiert war, könnten hierbei vor allem epigenetische Mechanismen (Alonso-Curbelo et al., 2021; Del Poggetto et al., 2021) eine zentrale Rolle spielen. Epigenetisch wirksame Medikamente gewinnen in der Behandlung von Pankreaskrebs zunehmend an Wichtigkeit (Dhillon et al., 2008; Lin et al., 2012; Hessmann et al., 2017), weshalb sich aus der Aufklärung einer epigenetischen Regulation der TIMP-1 Expression eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention mit der erhöhten Lebermetastasierung beim männlichen Geschlecht ergeben könnte.

Diskussion

Eine zusätzliche und vom Krebskontext unabhängige pathophysiologische Relevanz von TIMP-1 könnte sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit im Bereich des Lipidkatabolismus von Hepatozyten eröffnen. In den vergangenen Jahren führte die erhöhte Kalorieneinnahme und ein bewegungsarmer Lebensstil zu einer globalen Epidemie der Fettleibigkeit und des metabolischen Syndroms, was wiederum häufig eine nichtalkoholische Fettleber zur Folge hat (Anstee et al., 2019; Le et al., 2021). Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Fettleber und deren Folgeerscheinungen wie Leberfibrose, -zirrhose und -krebs spielt die Akkumulation von Lipiden im Lebergewebe selbst (Anstee et al., 2019). Daher könnte die pathophysiologische Relevanz der hier beschriebenen Aktivität von TIMP-1, Lipidakkumulationen in der Leber durch Aktivierung des AMPK-Signalwegs zu modulieren, zukünftig vor dem Hintergrund von Fettlebererkrankungen näher untersucht werden.

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung der PDAC-Entstehung. 7
Abbildung 1.2	Bildung einer metastasierungsfördernden Nische in der 12 tumorkonditionierten Leber.
Abbildung 2.1	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 28 Patientinnen und Patienten der München Kohorte.
Abbildung 2.2	Das Alter, das Erkrankungsstadium und die Therapie von PDAC- Patientinnen und -Patienten, die für die Analyse der TIMP-1- Plasmaspiegel eingeschlossen wurden, war vergleichbar.
Abbildung 2.3	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 29 Patientinnen und Patienten der TCGA PDAC Kohorte.
Abbildung 2.4	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 30 Patientinnen und Patienten der TCGA CRC Kohorte.
Abbildung 2.5	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 30 Patientinnen und Patienten der TCGA Melanom Kohorte.
Abbildung 2.6	Kombination der München, TCGA PDAC und Toronto Kohorten für 31 die Analyse der geschlechtsabhängigen, ortsspezifischen Entwicklung metachroner Metastasen.
Abbildung 2.7	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 32 Patientinnen und Patienten der Bailey Kohorte.
Abbildung 2.8	Geschlechtsbestimmung und CONSORT-Flussdiagramm zum Einbzw. Ausschluss von Patientinnen und Patienten der Moffitt Kohorte.
Abbildung 2.9	CONSORT-Flussdiagramm zum Ein- bzw. Ausschluss von 34 Patientinnen und Patienten der Dhara Kohorte.
Abbildung 2.10	Die murine Pankreasgewebeschädigung nach Caerulein-injektion ist auf histologischer Ebene zwischen den Geschlechtern bzw. den TIMP-1 Genotypen vergleichbar.
Abbildung 2.11	Unterscheidung zwischen experimentellen Mikro- und 39 Makrometastasen in der Leber.
Abbildung 2.12	Differenzierung von HepaRG Zellen zu Hepatozyten- und 43 Cholangiozyten-artigen Zellen.
Abbildung 3.1	Pankreaskrebs-erkrankte Männer bzw. männliche Mäuse sterben 56 früher als Frauen bzw. weibliche Mäuse.
Abbildung 3.2	Pankreaskrebspatienten weisen häufiger synchrone 57 Lebermetastasen auf als Pankreaskrebspatientinnen.
Abbildung 3.3	PDAC-Patienten entwickeln nach Primärtumorresektion häufiger 58 metachrone Lebermetastasen als PDAC-Patientinnen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.4	metastasierungsfördernder Gene in der Leber auf als Frauen.	60
Abbildung 3.5	Die Pankreaskrebs-konditionierte Leber männlicher Mäuse ist empfänglicher für experimentelle Lebermetastasen.	60
Abbildung 3.6	TIMP-1 ist der am stärksten männerspezifisch erhöht exprimierte tumorsezernierte Faktor in humanen Pankreastumoren.	61
Abbildung 3.7	Die männerspezifische Hochregulation der TIMP-1-Expression während der Pankreaskrebsprogression ist assoziiert mit einer verbesserten Zugänglichkeit des <i>Timp-1</i> Gens in Pankreasepithelzellen.	63
Abbildung 3.8	Die männerspezifische Hochregulation der pankreatischen TIMP-1 mRNA-Expression korreliert mit einer männerspezifischen Erhöhung der TIMP-1-Plasmaspiegel bei der Pankreaskrebsprogression.	64
Abbildung 3.9	Die erhöhte Expression metastasierungsfördernder Gene im Pankreaskrebs-konditionierten Lebergewebe männlicher Mäuse ist TIMP-1-abhängig.	66
Abbildung 3.10	Die verstärkte Lebermetastasierung und das verkürzte Überleben von PDAC-erkrankten männlichen Mäusen ist TIMP-1-abhängig.	67
Abbildung 3.11	Identifikation einer Untergruppe männlicher PDAC-Patienten, die eine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression im Pankreastumor aufweist und für die Geschlechtsunterschiede im PDAC-Überleben verantwortlich ist.	68
Abbildung 3.12	Validierung des männerspezifischen klinischen Werts von TIMP-1 für die Vorhersage des Gesamtüberlebens in einer kombinierten PDAC Kohorte.	70
Abbildung 3.13	PDAC-erkrankte Männer mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln haben ein erhöhtes Risiko Lebermetastasen zu entwickeln als alle anderen PDAC-Patientinnen und -Patienten.	72
Abbildung 3.14	Der klinische Wert von TIMP-1 ist männerspezifisch und spezifisch für die Vorhersage der Metastasenentwicklung in der Leber.	73
Abbildung 3.15	Eine erhöhte TIMP-1 Expression in Tumoren von CRC- oder Melanom-erkrankten Männern ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Lebermetastasen assoziiert.	75
Abbildung 3.16	Die Pankreaskrebs-konditionierte Leber männlicher Mäuse weist reduzierte Triacylglyzerid-Spiegel im Vergleich zur gesunden Leber auf.	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.17	Die Reduktion der Triacylglyzeride in der Leber, aber nicht im	78
	Pankreas oder im Blutplasma von PDAC-erkrankten männlichen	
	Mäusen ist TIMP-1-abhängig.	
Abbildung 3.18	Die Stimulation humaner Hepatozytenzelllinien mit rekombinantem	79
	humanen TIMP-1 führt zur Reduktion intrazellulärer neutraler Lipide.	
Abbildung 3.19	TIMP-1 vermittelt eine Reduktion intrazellulärer neutraler Lipide in	80
	Hepatozyten über Hochregulation der sauerstoffabhängigen	
	Verstoffwechselung von Fettsäuren.	
Abbildung 3.20	TIMP-1-Stimulation induziert die aktivierende Phosphorylierung von	81
	AMPK in HepaRG Zellen.	
Abbildung 3.21	Die TIMP-1-induzierte AMPK-Signalaktivität vermittelt einen	82
	erhöhten Sauerstoffverbrauch und die Reduktion neutraler Lipide in	
	HepaRG Zellen.	
Abbildung 3.22	Die erhöhte Phosphorylierung von AMPK in der Pankreaskrebs-	83
	konditionierten Leber männlicher Mäuse ist TIMP-1-abhängig.	
Abbildung 4.1	Die TIMP-1-Expression liegt den Geschlechtsunterschieden bei der	90
	Lebermetastasierung und beim Überleben von Pankreaskrebs	
	zugrunde.	
Abbildung 4.2	Der Einfluss von TIMP-1 auf den Katabolismus von Speicherlipiden	94
	in Hepatozyten.	

Tabellenverzeichnis

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien.	17
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien.	19
Tabelle 3:	Geräte.	20
Tabelle 4:	Lösungen und Puffer.	21
Tabelle 5:	DNA-Sequenzen der <i>Primer</i> und die verwendeten Sonden.	23
Tabelle 6:	Antikörper.	24
Tabelle 7:	Kits.	25
Tabelle 8:	Software.	26
Tabelle 9:	Lösungen zur Kultivierung der Zellen.	42
Tabelle 10:	Reaktionsansatz für die reverse Transkription.	48
Tabelle 11:	Programm der reversen Transkription.	48
Tabelle 12:	Zusammensetzung der Mastermix-Lösungen für die TaqMan-	48
	Messung.	
Tabelle 13:	TaqMan-Programm.	49

7. Literaturverzeichnis

- Aden, D.P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov und B.B. Knowles (1979). Controlled Synthesis of Hbsag in a Differentiated Human Liver Carcinoma-Derived Cell Line. *Nature* 282 (5739), 615-616.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim und M. Perucho (1988). Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant C-K-Ras Genes. *Cell* 53 (4), 549-554.
- Alonso-Curbelo, D., Y.J. Ho, C. Burdziak, J.L.V. Maag, J.P.t. Morris, R. Chandwani, H.A. Chen, K.M. Tsanov, F.M. Barriga, W. Luan, N. Tasdemir, G. Livshits, E. Azizi, J. Chun, J.E. Wilkinson, L. Mazutis, S.D. Leach, R. Koche, D. Pe'er und S.W. Lowe (2021). A Gene-Environment-Induced Epigenetic Program Initiates Tumorigenesis. *Nature* 590 (7847), 642-648.
- Ambrus, J.L., C.M. Ambrus, I.B. Mink und J.W. Pickren (1975). Causes of Death in Cancer Patients. *J Med 6 (1)*, 61-64.
- Anderson, C.L. und C.J. Brown (1999). Polymorphic X-Chromosome Inactivation of the Human TIMP1 Gene. *Am J Hum Genet* 65 (3), 699-708.
- Anderson, C.L. und C.J. Brown (2002). Variability of X Chromosome Inactivation: Effect on Levels of TIMP1 RNA and Role of DNA Methylation. *Hum Genet 110 (3)*, 271-278.
- Anderson, C.L. und C.J. Brown (2005). Epigenetic Predisposition to Expression of TIMP1 from the Human Inactive X Chromosome. *BMC Genet 29 (6)*, 48.
- Ando, T., D. Charindra, M. Shrestha, H. Umehara, I. Ogawa, M. Miyauchi und T. Takata (2017). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes Cell Proliferation through Yap/Taz Activation in Cancer. *Oncogene 37 (3)*, 263-270.
- Andricovich, J., S. Perkail, Y. Kai, N. Casasanta, W. Peng und A. Tzatsos (2018). Loss of Kdm6a Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-Like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to Bet Inhibitors. *Cancer Cell* 33 (3), 512-526.
- Anstee, Q.M., H.L. Reeves, E. Kotsiliti, O. Govaere und M. Heikenwalder (2019). From Nash to Hcc: Current Concepts and Future Challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16 (7), 411-428.
- Badolato, R., J.M. Wang, W.J. Murphy, A.R. Lloyd, D.F. Michiel, L.L. Bausserman, D.J. Kelvin und J.J. Oppenheim (1994). Serum Amyloid a Is a Chemoattractant: Induction of Migration, Adhesion, and Tissue Infiltration of Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes. *J Exp Med 180 (1)*, 203-209.
- Bailey, K.M., J.W. Wojtkowiak, A.I. Hashim und R.J. Gillies (2012). Targeting the Metabolic Microenvironment of Tumors. *Adv Pharmacol* 65, 63-107.
- Bailey, P., D.K. Chang, K. Nones, A.L. Johns, A.M. Patch, M.C. Gingras, D.K. Miller, A.N. Christ, T.J. Bruxner, M.C. Quinn, C. Nourse, L.C. Murtaugh, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, E. Nourbakhsh, S. Wani, L. Fink, O. Holmes, V. Chin, M.J. Anderson, S. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, N. Waddell, S. Wood, Q. Xu, P.J. Wilson, N. Cloonan, K.S. Kassahn, D. Taylor, K. Quek, A. Robertson, L. Pantano, L. Mincarelli, L.N. Sanchez, L. Evers, J. Wu, M. Pinese, M.J. Cowley, M.D. Jones, E.K. Colvin, A.M. Nagrial, E.S. Humphrey, L.A. Chantrill, A. Mawson, J. Humphris, A. Chou, M. Pajic, C.J. Scarlett, A.V. Pinho, M. Giry-Laterriere, I. Rooman, J.S. Samra, J.G. Kench, J.A. Lovell, N.D. Merrett, C.W. Toon, K. Epari, N.Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, K. Moran-Jones, N.B. Jamieson, J.S. Graham, F. Duthie, K. Oien, J. Hair, R. Grutzmann, A. Maitra, C.A. Iacobuzio-Donahue, C.L. Wolfgang, R.A. Morgan, R.T. Lawlor, V. Corbo, C. Bassi, B. Rusev, P. Capelli, R. Salvia, G. Tortora, D. Mukhopadhyay, G.M. Petersen, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, D.M. Munzy, W.E. Fisher, S.A. Karim, J.R. Eshleman, R.H. Hruban, C. Pilarsky, J.P. Morton, O.J. Sansom, A. Scarpa, E.A. Musgrove, U.M. Bailey, O. Hofmann, R.L. Sutherland, D.A. Wheeler, A.J. Gill, R.A. Gibbs, J.V. Pearson, N. Waddell, A.V. Biankin und S.M. Grimmond (2016). Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. Nature 531 (7592), 47-52.
- Bankhead, P., M.B. Loughrey, J.A. Fernandez, Y. Dombrowski, D.G. McArt, P.D. Dunne, S. McQuaid, R.T. Gray, L.J. Murray, H.G. Coleman, J.A. James, M. Salto-Tellez und P.W.

- Hamilton (2017). Qupath: Open Source Software for Digital Pathology Image Analysis. *Sci Rep 7 (1)*, 16878.
- Bechmann, L.P., R.A. Hannivoort, G. Gerken, G.S. Hotamisligil, M. Trauner und A. Canbay (2012). The Interaction of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism in Liver Diseases. *J Hepatol* 56 (4), 952-964.
- Benjamini, Y. und Y. Hochberg (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Pratical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B 57*, 289-300.
- Boudaba, N., A. Marion, C. Huet, R. Pierre, B. Viollet und M. Foretz (2018). AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but Its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development. *EBioMedicine* 28, 194-209.
- Brew, K., D. Dinakarpandian und H. Nagase (2000). Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Evolution, Structure and Function. *Biochim Biophys Acta 1477 (1-2)*, 267-283.
- Brierley, J., M.K. Gospodarowicz und C. Wittekind. (2017). Tnm Classification of Malignant Tumours. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Brockdorff, N. und B.M. Turner (2015). Dosage Compensation in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (3), a019406.
- Brown, C.J., L. Carrel und H.F. Willard (1997). Expression of Genes from the Human Active and Inactive X Chromosomes. *Am J Hum Genet* 60 (6), 1333-1343.
- Brown, C.J., A.M. Flenniken, B.R. Williams und H.F. Willard (1990). X Chromosome Inactivation of the Human TIMP Gene. *Nucleic Acids Res* 18 (14), 4191-4195.
- Budczies, J., M. von Winterfeld, F. Klauschen, M. Bockmayr, J.K. Lennerz, C. Denkert, T. Wolf, A. Warth, M. Dietel, I. Anagnostopoulos, W. Weichert, D. Wittschieber und A. Stenzinger (2015). The Landscape of Metastatic Progression Patterns across Major Human Cancers. *Oncotarget 6 (1)*, 570-583.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32 (2), 185-203 e113.
- Carpenter, A.E., T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, O. Friman, D.A. Guertin, J.H. Chang, R.A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland und D.M. Sabatini (2006). Cellprofiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes. *Genome Biol* 7 (10), R100.
- Cawston, T.E., W.A. Galloway, E. Mercer, G. Murphy und J.J. Reynolds (1981). Purification of Rabbit Bone Inhibitor of Collagenase. *Biochem J* 195 (1), 159-165.
- Clocchiatti, A., E. Cora, Y. Zhang und G.P. Dotto (2016). Sexual Dimorphism in Cancer. *Nat Rev Cancer 16 (5)*, 330-339.
- Collisson, E.A., P. Bailey, D.K. Chang und A.V. Biankin (2019). Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16 (4), 207-220.
- Connor, A.A., R.E. Denroche, G.H. Jang, M. Lemire, A. Zhang, M. Chan-Seng-Yue, G. Wilson, R.C. Grant, D. Merico, I. Lungu, J.M.S. Bartlett, D. Chadwick, S.B. Liang, J. Eagles, F. Mbabaali, J.K. Miller, P. Krzyzanowski, H. Armstrong, X. Luo, L.G.T. Jorgensen, J.M. Romero, P. Bavi, S.E. Fischer, S. Serra, S. Hafezi-Bakhtiari, D. Caglar, M.H.A. Roehrl, S. Cleary, M.A. Hollingsworth, G.M. Petersen, S. Thayer, C.H.L. Law, S. Nanji, T. Golan, A.L. Smith, A. Borgida, A. Dodd, D. Hedley, B.G. Wouters, G.M. O'Kane, J.M. Wilson, G. Zogopoulos, F. Notta, J.J. Knox und S. Gallinger (2019). Integration of Genomic and Transcriptional Features in Pancreatic Cancer Reveals Increased Cell Cycle Progression in Metastases. *Cancer Cell* 35 (2), 267-282.
- Contractor, T., S. Kobayashi, E. da Silva, R. Clausen, C. Chan, E. Vosburgh, L.H. Tang, A.J. Levine und C.R. Harris (2016). Sexual Dimorphism of Liver Metastasis by Murine Pancreatic Neuroendocrine Tumors Is Affected by Expression of Complement C5. *Oncotarget 7 (21)*, 30585-30596.
- Correia, A.L., J.C. Guimaraes, P. Auf der Maur, D. De Silva, M.P. Trefny, R. Okamoto, S. Bruno, A. Schmidt, K. Mertz, K. Volkmann, L. Terracciano, A. Zippelius, M. Vetter, C. Kurzeder, W.P. Weber und M. Bentires-Alj (2021). Hepatic Stellate Cells Suppress Nk Cell-Sustained Breast Cancer Dormancy. *Nature* 594 (7864), 566-571.
- Costa-Silva, B., N.M. Aiello, A.J. Ocean, S. Singh, H. Zhang, B.K. Thakur, A. Becker, A. Hoshino, M.T. Mark, H. Molina, J. Xiang, T. Zhang, T.M. Theilen, G. Garcia-Santos, C. Williams, Y. Ararso, Y. Huang, G. Rodrigues, T.L. Shen, K.J. Labori, I.M. Lothe, E.H. Kure,

- J. Hernandez, A. Doussot, S.H. Ebbesen, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, R.E. Schwartz, I. Matei, H. Peinado, B.Z. Stanger, J. Bromberg und D. Lyden (2015). Pancreatic Cancer Exosomes Initiate Pre-Metastatic Niche Formation in the Liver. *Nat Cell Biol* 17 (6), 816-826.
- Credendino, S.C., C. Neumayer und I. Cantone (2020). Genetics and Epigenetics of Sex Bias: Insights from Human Cancer and Autoimmunity. *Trends Genet 36 (9)*, 650-663.
- Cui, H., B. Seubert, E. Stahl, H. Dietz, U. Reuning, L. Moreno-Leon, M. Ilie, P. Hofman, H. Nagase, B. Mari und A. Krüger (2015). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Induces a Pro-Tumourigenic Increase of Mir-210 in Lung Adenocarcinoma Cells and Their Exosomes. *Oncogene 34 (28)*, 3640-3650.
- D'Angelo, R.C., X.W. Liu, A.J. Najy, Y.S. Jung, J. Won, K.X. Chai, R. Fridman und H.R. Kim (2014). TIMP-1 Via Twist1 Induces Emt Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. *Mol Cancer Res* 12 (9), 1324-1333.
- Dasgupta, B. und W. Seibel (2018). Compound C/Dorsomorphin: Its Use and Misuse as an AMPK Inhibitor. *Methods Mol Biol* 1732, 195-202.
- de Ridder, J., J.H. de Wilt, F. Simmer, L. Overbeek, V. Lemmens und I. Nagtegaal (2016). Incidence and Origin of Histologically Confirmed Liver Metastases: An Explorative Case-Study of 23,154 Patients. *Oncotarget 7 (34)*, 55368-55376.
- Del Poggetto, E., I.L. Ho, C. Balestrieri, E.Y. Yen, S. Zhang, F. Citron, R. Shah, D. Corti, G.R. Diaferia, C.Y. Li, S. Loponte, F. Carbone, Y. Hayakawa, G. Valenti, S. Jiang, L. Sapio, H. Jiang, P. Dey, S. Gao, A.K. Deem, S. Rose-John, W. Yao, H. Ying, A.D. Rhim, G. Genovese, T.P. Heffernan, A. Maitra, T.C. Wang, L. Wang, G.F. Draetta, A. Carugo, G. Natoli und A. Viale (2021). Epithelial Memory of Inflammation Limits Tissue Damage While Promoting Pancreatic Tumorigenesis. Science 373 (6561), eabj0486.
- Della Torre, S. (2020). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease as a Canonical Example of Metabolic Inflammatory-Based Liver Disease Showing a Sex-Specific Prevalence: Relevance of Estrogen Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 572490.
- Deryugina, E.I. und J.P. Quigley (2006). Matrix Metalloproteinases and Tumor Metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25 (1), 9-34.
- Dhara, S., S. Chhangawala, H. Chintalapudi, G. Askan, V. Aveson, A.L. Massa, L. Zhang, D. Torres, A.P. Makohon-Moore, N. Lecomte, J.P. Melchor, J. Bermeo, A. Cardenas, 3rd, S. Sinha, D. Glassman, R. Nicolle, R. Moffitt, K.H. Yu, S. Leppanen, S. Laderman, B. Curry, J. Gui, V.P. Balachandran, C. Iacobuzio-Donahue, R. Chandwani, C.S. Leslie und S.D. Leach (2021). Pancreatic Cancer Prognosis Is Predicted by an Atac-Array Technology for Assessing Chromatin Accessibility. *Nat Commun* 12 (1), 3044.
- Dhillon, N., B.B. Aggarwal, R.A. Newman, R.A. Wolff, A.B. Kunnumakkara, J.L. Abbruzzese, C.S. Ng, V. Badmaev und R. Kurzrock (2008). Phase li Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 14 (14), 4491-4499.
- Dillekas, H., M.S. Rogers und O. Straume (2019). Are 90% of Deaths from Cancer Caused by Metastases? *Cancer Med 8 (12)*, 5574-5576.
- Dong, M., G. Cioffi, J. Wang, K.A. Waite, Q.T. Ostrom, C. Kruchko, J.D. Lathia, J.B. Rubin, M.E. Berens, J. Connor und J.S. Barnholtz-Sloan (2020). Sex Differences in Cancer Incidence and Survival: A Pan-Cancer Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 29 (7), 1389-1397.
- Dunford, A., D.M. Weinstock, V. Savova, S.E. Schumacher, J.P. Cleary, A. Yoda, T.J. Sullivan, J.M. Hess, A.A. Gimelbrant, R. Beroukhim, M.S. Lawrence, G. Getz und A.A. Lane (2017). Tumor-Suppressor Genes That Escape from X-Inactivation Contribute to Cancer Sex Bias. *Nat Genet 49 (1)*, 10-16.
- Duque, M., J.P. Amorim und J. Bessa (2021). Ptf1a Function and Transcriptional Cis-Regulation, a Cornerstone in Vertebrate Pancreas Development. *FEBS J Online ahead of print*.
- Eckfeld, C., D. Häußler, B. Schoeps, C.D. Hermann und A. Krüger (2019). Functional Disparities within the TIMP Family in Cancer: Hints from Molecular Divergence. *Cancer Metastasis Rev* 38 (3), 469-481.
- Forte, D., V. Salvestrini, G. Corradi, L. Rossi, L. Catani, R.M. Lemoli, M. Cavo und A. Curti (2017). The Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) Promotes Survival and

- Migration of Acute Myeloid Leukemia Cells through Cd63/Pi3k/Akt/P21 Signaling. *Oncotarget 8 (2)*, 2261-2274.
- Frayn, K.N., P. Arner und H. Yki-Jarvinen (2006). Fatty Acid Metabolism in Adipose Tissue, Muscle and Liver in Health and Disease. *Essays Biochem 42*, 89-103.
- Fuggle, S. (2018). Clinical Biochemistry Reference Ranges Handbook. Leeds, UK: National Health Service.
- Garcia, D., K. Hellberg, A. Chaix, M. Wallace, S. Herzig, M.G. Badur, T. Lin, M.N. Shokhirev, A.F.M. Pinto, D.S. Ross, A. Saghatelian, S. Panda, L.E. Dow, C.M. Metallo und R.J. Shaw (2019). Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and Nafld. *Cell Rep 26 (1)*, 192-208.
- Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo und C. Guguen-Guillouzo (2002). Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24), 15655-15660.
- Groot, V.P., N. Rezaee, W. Wu, J.L. Cameron, E.K. Fishman, R.H. Hruban, M.J. Weiss, L. Zheng, C.L. Wolfgang und J. He (2018). Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg* 267 (5), 936-945.
- Grünwald, B., V. Harant, S. Schaten, M. Fruhschutz, R. Spallek, B. Höchst, K. Stutzer, S. Berchtold, M. Erkan, O. Prokopchuk, M. Martignoni, I. Esposito, M. Heikenwalder, A. Gupta, J. Siveke, P. Saftig, P. Knolle, D. Wohlleber und A. Krüger (2016). Pancreatic Pre-Malignant Lesions Secrete TIMP1, Which Activates Hepatic Stellate Cells Via Cd63 Signaling to Create a Pre-Metastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology* 151 (5), 1011-1024.
- Grünwald, B., B. Schoeps und A. Krüger (2019). Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol* 29 (1), 6-19.
- Guerra, C., M. Collado, C. Navas, A.J. Schuhmacher, I. Hernandez-Porras, M. Canamero, M. Rodriguez-Justo, M. Serrano und M. Barbacid (2011). Pancreatitis-Induced Inflammation Contributes to Pancreatic Cancer by Inhibiting Oncogene-Induced Senescence. *Cancer Cell* 19 (6), 728-739.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery 12 (1)*, 31-46. Hanahan, D. und R.A. Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell 100 (1)*, 57-70.
- Hanahan, D. und R.A. Weinberg (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5), 646-674.
- Haupt, S., F. Caramia, S.L. Klein, J.B. Rubin und Y. Haupt (2021). Sex Disparities Matter in Cancer Development and Therapy. *Nature Reviews Cancer 21*, 393-407.
- Hermann, C.D. und A. Krüger (2022). Krankheitsverlauf Bei Krebs Das Geschlecht Ist Entscheidend! *Im Fokus Onkologie 25 (1)*, 3.
- Hermann, C.D., B. Schoeps, C. Eckfeld, E. Munkhbaatar, L. Kniep, O. Prokopchuk, N. Wirges, K. Steiger, D. Häußler, P. Knolle, E. Poulton, R. Khokha, B.T. Grünwald, I.E. Demir und A. Krüger (2021). TIMP1 Expression Underlies Sex Disparity in Liver Metastasis and Survival in Pancreatic Cancer. *J Exp Med 218 (11)*, e20210911.
- Herzig, S. und R.J. Shaw (2018). AMPK: Guardian of Metabolism and Mitochondrial Homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19 (2), 121-135.
- Hessmann, E., S.A. Johnsen, J.T. Siveke und V. Ellenrieder (2017). Epigenetic Treatment of Pancreatic Cancer: Is There a Therapeutic Perspective on the Horizon? *Gut 66 (1)*, 168-179.
- Hingorani, S.R., E.F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M.A. Jacobetz, S. Ross, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, B.A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L.A. Liotta, H.C. Crawford, M.E. Putt, T. Jacks, C.V. Wright, R.H. Hruban, A.M. Lowy und D.A. Tuveson (2003). Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and Its Early Detection in the Mouse. *Cancer Cell* 4 (6), 437-450.
- Hingorani, S.R., L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramaudt, R.H. Hruban, A.K. Rustgi, S. Chang und D.A. Tuveson (2005). Trp53r172h and Krasg12d Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Cancer Cell* 7 (5), 469-483.

- Hishinuma, S., Y. Ogata, M. Tomikawa, I. Ozawa, K. Hirabayashi und S. Igarashi (2006). Patterns of Recurrence after Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings. *J Gastrointest Surg 10 (4)*, 511-518.
- Hollstein, M., B. Shomer, M. Greenblatt, T. Soussi, E. Hovig, R. Montesano und C.C. Harris (1996). Somatic Point Mutations in the P53 Gene of Human Tumors and Cell Lines: Updated Compilation. *Nucleic Acids Res* 24 (1), 141-146.
- Hoshino, A., B. Costa-Silva, T.L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplop, K. Uryu, L. Pharmer, T. King, L. Bojmar, A.E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J.M. Weiss, V.D. Dumont-Cole, K. Kramer, L.H. Wexler, A. Narendran, G.K. Schwartz, J.H. Healey, P. Sandstrom, K.J. Labori, E.H. Kure, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. de Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, M.S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A.J. Minn, M.J. Bissell, B.A. Garcia, Y. Kang, V.K. Rajasekhar, C.M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg und D. Lyden (2015). Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis. *Nature 527 (7578)*, 329-335.
- Hothorn, T. und A. Zeileis (2008). Generalized Maximally Selected Statistics. *Biometrics* 64 (4), 1263-1269.
- Hruban, R.H., N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, M.R. Anver, A.V. Biankin, G.P. Boivin, E.E. Furth, T. Furukawa, A. Klein, D.S. Klimstra, G. Kloppel, G.Y. Lauwers, D.S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G.J. Offerhaus, L. Perez-Gallego, M. Redston und D.A. Tuveson (2006). Pathology of Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Exocrine Cancer: Consensus Report and Recommendations. *Cancer Res* 66 (1), 95-106.
- Hruban, R.H., A. Maitra und M. Goggins (2008). Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 1 (4), 306-316.
- Hruban, R.H., K. Takaori, D.S. Klimstra, N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A.V. Biankin, S.A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D.S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G.J. Offerhaus, M. Shimizu und S. Yonezawa (2004). An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28 (8), 977-987.
- Hurst, C.D., O. Alder, F.M. Platt, A. Droop, L.F. Stead, J.E. Burns, G.J. Burghel, S. Jain, L.J. Klimczak, H. Lindsay, J.A. Roulson, C.F. Taylor, H. Thygesen, A.J. Cameron, A.J. Ridley, H.R. Mott, D.A. Gordenin und M.A. Knowles (2017). Genomic Subtypes of Non-Invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in Kdm6a Mutation Frequency. *Cancer Cell* 32 (5), 701-715.
- Inagaki, J., V. Rodriguez und G.P. Bodey (1974). Proceedings: Causes of Death in Cancer Patients. *Cancer* 33 (2), 568-573.
- Jackson, H.W., V. Defamie, P. Waterhouse und R. Khokha (2017). TIMPs: Versatile Extracellular Regulators in Cancer. *Nat Rev Cancer* 17 (1), 38-53.
- Jung, K.K., X.W. Liu, R. Chirco, R. Fridman und H.R. Kim (2006). Identification of Cd63 as a Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Interacting Cell Surface Protein. *EMBO J* 25 (17), 3934-3942.
- Kelly, T., W. Yang, C.S. Chen, K. Reynolds und J. He (2008). Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 32 (9), 1431-1437.
- Kirkegard, J., D. Cronin-Fenton, U. Heide-Jorgensen und F.V. Mortensen (2018). Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. *Gastroenterology* 154 (6), 1729-1736.
- Kirkegard, J., F.V. Mortensen und D. Cronin-Fenton (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 112 (9), 1366-1372.
- Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C.D. Johnson, A.V. Biankin, R.E. Neale, M. Tempero, D.A. Tuveson, R.H. Hruban und J.P. Neoptolemos (2016). Pancreatic Cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16022.
- Klein, M., M. Thomas, U. Hofmann, D. Seehofer, G. Damm und U.M. Zanger (2015). A Systematic Comparison of the Impact of Inflammatory Signaling on Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Gene Expression and Activity in Primary Human Hepatocytes and Heparg Cells. *Drug Metab Dispos 43* (2), 273-283.

- Klopfleisch, R. (2013). Multiparametric and Semiquantitative Scoring Systems for the Evaluation of Mouse Model Histopathology--a Systematic Review. *BMC Vet Res* 9, 123.
- Kopitz, C., M. Gerg, O.R. Bandapalli, D. Ister, C.J. Pennington, S. Hauser, C. Flechsig, H.W. Krell, D. Antolovic, K. Brew, H. Nagase, M. Stangl, C.W. von Weyhern, B.L. Brucher, K. Brand, L.M. Coussens, D.R. Edwards und A. Krüger (2007). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promotes Liver Metastasis by Induction of Hepatocyte Growth Factor Signaling. *Cancer Res* 67 (18), 8615-8623.
- Kopp, J.L., G. von Figura, E. Mayes, F.F. Liu, C.L. Dubois, J.P.t. Morris, F.C. Pan, H. Akiyama, C.V. Wright, K. Jensen, M. Hebrok und M. Sander (2012). Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22 (6), 737-750.
- Krüger, A. (2015). Premetastatic Niche Formation in the Liver: Emerging Mechanisms and Mouse Models. *J Mol Med (Berl)* 93 (11), 1193-1201.
- Krüger, A., V. Schirrmacher und R. Khokha (1998). The Bacterial LacZ Gene: An Important Tool for Metastasis Research and Evaluation of New Cancer Therapies. *Cancer Metastasis Rev* 17 (3), 285-294.
- Kruszynska, Y.T. und H.S. Sherratt (1987). Glucose Kinetics During Acute and Chronic Treatment of Rats with 2[6(4-Chloro-Phenoxy)Hexyl]Oxirane-2-Carboxylate, Etomoxir. *Biochem Pharmacol* 36 (22), 3917-3921.
- Le, M.H., Y.H. Yeo, X. Li, J. Li, B. Zou, Y. Wu, Q. Ye, D.Q. Huang, C. Zhao, J. Zhang, C. Liu, N. Chang, F. Xing, S. Yan, Z.H. Wan, N.S.Y. Tang, M. Mayumi, X. Liu, C. Liu, F. Rui, H. Yang, Y. Yang, R. Jin, R.H.X. Le, Y. Xu, D.M. Le, S. Barnett, C.D. Stave, R. Cheung, Q. Zhu und M.H. Nguyen (2021). 2019 Global Nafld Prevalence: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol S1542-3565 (21)*, 01280-01285.
- Lee, J. und G.L. Beatty (2021). Serum Amyloid a Proteins and Their Impact on Metastasis and Immune Biology in Cancer. *Cancers (Basel)* 13 (13), 3179.
- Lee, J.W., M.L. Stone, P.M. Porrett, S.K. Thomas, C.A. Komar, J.H. Li, D. Delman, K. Graham, W.L. Gladney, X. Hua, T.A. Black, A.L. Chien, K.S. Majmundar, J.C. Thompson, S.S. Yee, M.H. O'Hara, C. Aggarwal, D. Xin, A. Shaked, M. Gao, D. Liu, M.J. Borad, R.K. Ramanathan, E.L. Carpenter, A. Ji, M.C. de Beer, F.C. de Beer, N.R. Webb und G.L. Beatty (2019). Hepatocytes Direct the Formation of a Pro-Metastatic Niche in the Liver. *Nature* 567 (7747), 249-252.
- Lenk, L., M. Pein, O. Will, B. Gomez, F. Viol, C. Hauser, J.H. Egberts, J.P. Gundlach, O. Helm, S. Tiwari, R. Weiskirchen, S. Rose-John, C. Rocken, W. Mikulits, P. Wenzel, G. Schneider, D. Saur, H. Schafer und S. Sebens (2017). The Hepatic Microenvironment Essentially Determines Tumor Cell Dormancy and Metastatic Outgrowth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 7 (1), e1368603.
- Levine, A.J. (2020). P53: 800 Million Years of Evolution and 40 Years of Discovery. *Nat Rev Cancer 20 (8)*, 471-480.
- Li, X., P. Ramadori, D. Pfister, M. Seehawer, L. Zender und M. Heikenwalder (2021). The Immunological and Metabolic Landscape in Primary and Metastatic Liver Cancer. *Nat Rev Cancer 21* (9), 541-557.
- Li, Y., X. Su, N. Rohatgi, Y. Zhang, J.R. Brestoff, K.I. Shoghi, Y. Xu, C.F. Semenkovich, C.A. Harris, L.L. Peterson, K.N. Weilbaecher, S.L. Teitelbaum und W. Zou (2020). Hepatic Lipids Promote Liver Metastasis. *JCI Insight 5 (17)*, e136215.
- Li, Y., S. Xu, M.M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, O. Park, Z. Luo, E. Lefai, J.Y. Shyy, B. Gao, M. Wierzbicki, T.J. Verbeuren, R.J. Shaw, R.A. Cohen und M. Zang (2011). AMPK Phosphorylates and Inhibits Srebp Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab* 13 (4), 376-388.
- Li, Z. und Y. Kang (2017). Lipid Metabolism Fuels Cancer's Spread. *Cell Metab* 25 (2), 228-230.
- Lin, K.T., Y.W. Wang, C.T. Chen, C.M. Ho, W.H. Su und Y.S. Jou (2012). Hdac Inhibitors Augmented Cell Migration and Metastasis through Induction of Pkcs Leading to Identification of Low Toxicity Modalities for Combination Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 18 (17), 4691-4701.

- Lin, Q., L. Ren, M. Jian, P. Xu, J. Li, P. Zheng, Q. Feng, L. Yang, M. Ji, Y. Wei und J. Xu (2019). The Mechanism of the Premetastatic Niche Facilitating Colorectal Cancer Liver Metastasis Generated from Myeloid-Derived Suppressor Cells Induced by the S1pr1-Stat3 Signaling Pathway. *Cell Death Dis* 10 (10), 693.
- Löffek, S., O. Schilling und C.W. Franzke (2011). Series "Matrix Metalloproteinases in Lung Health and Disease": Biological Role of Matrix Metalloproteinases: A Critical Balance. *Eur Respir J 38 (1)*, 191-208.
- Martin-Perez, M., U. Urdiroz-Urricelqui, C. Bigas und S.A. Benitah (2021). Lipid Metabolism in Metastasis and Therapy. *Current Opinion in Systems Biology* 28, 100401.
- Mashek, D.G. (2021). Hepatic Lipid Droplets: A Balancing Act between Energy Storage and Metabolic Dysfunction in Nafld. *Mol Metab 50*, 101115.
- McDonald, J.H. (2014). Handbook of Biological Statistics (3rd Ed.). Baltimore, Maryland: Sparky House Publishing.
- Mehlen, P. und A. Puisieux (2006). Metastasis: A Question of Life or Death. *Nat Rev Cancer* 6 (6), 449-458.
- Meissburger, B., L. Stachorski, E. Roder, G. Rudofsky und C. Wolfrum (2011). Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 (TIMP1) Controls Adipogenesis in Obesity in Mice and in Humans. *Diabetologia* 54 (6), 1468-1479.
- Micheli, A., R. Ciampichini, W. Oberaigner, L. Ciccolallo, E. de Vries, I. Izarzugaza, P. Zambon, G. Gatta, R. De Angelis und E.W. Group (2009). The Advantage of Women in Cancer Survival: An Analysis of Eurocare-4 Data. *Eur J Cancer 45 (6)*, 1017-1027.
- Mills, E.L., C. Harmon, M.P. Jedrychowski, H. Xiao, A.V. Gruszczyk, G.A. Bradshaw, N. Tran, R. Garrity, D. Laznik-Bogoslavski, J. Szpyt, H. Prendeville, L. Lynch, M.P. Murphy, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman und E.T. Chouchani (2021). Cysteine 253 of Ucp1 Regulates Energy Expenditure and Sex-Dependent Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab 34 (1)*, 140-157.
- Moffitt, R.A., R. Marayati, E.L. Flate, K.E. Volmar, S.G. Loeza, K.A. Hoadley, N.U. Rashid, L.A. Williams, S.C. Eaton, A.H. Chung, J.K. Smyla, J.M. Anderson, H.J. Kim, D.J. Bentrem, M.S. Talamonti, C.A. lacobuzio-Donahue, M.A. Hollingsworth und J.J. Yeh (2015). Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nat Genet 47 (10)*, 1168-1178.
- Neoptolemos, J.P., J. Kleeff, P. Michl, E. Costello, W. Greenhalf und D.H. Palmer (2018). Therapeutic Developments in Pancreatic Cancer: Current and Future Perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15 (6), 333-348.
- Nielsen, S.R., V. Quaranta, A. Linford, P. Emeagi, C. Rainer, A. Santos, L. Ireland, T. Sakai, K. Sakai, Y.S. Kim, D. Engle, F. Campbell, D. Palmer, J.H. Ko, D.A. Tuveson, E. Hirsch, A. Mielgo und M.C. Schmid (2016). Macrophage-Secreted Granulin Supports Pancreatic Cancer Metastasis by Inducing Liver Fibrosis. *Nat Cell Biol* 18 (5), 549-560.
- Olive, K.P., D.A. Tuveson, Z.C. Ruhe, B. Yin, N.A. Willis, R.T. Bronson, D. Crowley und T. Jacks (2004). Mutant P53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell* 119 (6), 847-860.
- Orth, M., P. Metzger, S. Gerum, J. Mayerle, G. Schneider, C. Belka, M. Schnurr und K. Lauber (2019). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Hallmarks, Current Status, and Future Perspectives of Combined Modality Treatment Approaches. *Radiat Oncol 14 (1)*, 141.
- Österreicher, C.H., M. Penz-Österreicher, S.I. Grivennikov, M. Guma, E.K. Koltsova, C. Datz, R. Sasik, G. Hardiman, M. Karin und D.A. Brenner (2011). Fibroblast-Specific Protein 1 Identifies an Inflammatory Subpopulation of Macrophages in the Liver. *Proc Natl Acad Sci U S A 108 (1)*, 308-313.
- Oweira, H., U. Petrausch, D. Helbling, J. Schmidt, M. Mannhart, A. Mehrabi, O. Schob, A. Giryes, M. Decker und O. Abdel-Rahman (2017). Prognostic Value of Site-Specific Metastases in Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance Epidemiology and End Results Database Analysis. *World J Gastroenterol* 23 (10), 1872-1880.
- Park, S.A., M.J. Kim, S.Y. Park, J.S. Kim, W. Lim, J.S. Nam und Y. Yhong Sheen (2015). TIMP-1 Mediates Tgf-Beta-Dependent Crosstalk between Hepatic Stellate and Cancer Cells Via Fak Signaling. *Sci Rep* 5, 16492.

- Park, S.M., M.K. Lim, S.A. Shin und Y.H. Yun (2006). Impact of Prediagnosis Smoking, Alcohol, Obesity, and Insulin Resistance on Survival in Male Cancer Patients: National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol* 24 (31), 5017-5024.
- Pascual, G., A. Avgustinova, S. Mejetta, M. Martin, A. Castellanos, C.S. Attolini, A. Berenguer, N. Prats, A. Toll, J.A. Hueto, C. Bescos, L. Di Croce und S.A. Benitah (2017). Targeting Metastasis-Initiating Cells through the Fatty Acid Receptor Cd36. *Nature 541 (7635)*, 41-45.
- Pascual, G., D. Dominguez, M. Elosua-Bayes, F. Beckedorff, C. Laudanna, C. Bigas, D. Douillet, C. Greco, A. Symeonidi, I. Hernandez, S.R. Gil, N. Prats, C. Bescos, R. Shiekhattar, M. Amit, H. Heyn, A. Shilatifard und S.A. Benitah (2021). Dietary Palmitic Acid Promotes a Prometastatic Memory Via Schwann Cells. *Nature* 599 (7885), 485-490.
- Peinado, H., H. Zhang, I.R. Matei, B. Costa-Silva, A. Hoshino, G. Rodrigues, B. Psaila, R.N. Kaplan, J.F. Bromberg, Y. Kang, M.J. Bissell, T.R. Cox, A.J. Giaccia, J.T. Erler, S. Hiratsuka, C.M. Ghajar und D. Lyden (2017). Pre-Metastatic Niches: Organ-Specific Homes for Metastases. *Nat Rev Cancer 17 (5)*, 302-317.
- Quaresma, M., M.P. Coleman und B. Rachet (2015). 40-Year Trends in an Index of Survival for All Cancers Combined and Survival Adjusted for Age and Sex for Each Cancer in England and Wales, 1971–2011: A Population-Based Study. *The Lancet 385 (9974)*, 1206-1218
- Radkiewicz, C., A.L.V. Johansson, P.W. Dickman, M. Lambe und G. Edgren (2017). Sex Differences in Cancer Risk and Survival: A Swedish Cohort Study. *Eur J Cancer 84*, 130-140.
- Rahib, L., B.D. Smith, R. Aizenberg, A.B. Rosenzweig, J.M. Fleshman und L.M. Matrisian (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res* 74 (11), 2913-2921.
- Rehm, J., C. Mathers, S. Popova, M. Thavorncharoensap, Y. Teerawattananon und J. Patra (2009). Global Burden of Disease and Injury and Economic Cost Attributable to Alcohol Use and Alcohol-Use Disorders. *Lancet 373 (9682)*, 2223-2233.
- Reimand, J., R. Isserlin, V. Voisin, M. Kucera, C. Tannus-Lopes, A. Rostamianfar, L. Wadi, M. Meyer, J. Wong, C. Xu, D. Merico und G.D. Bader (2019). Pathway Enrichment Analysis and Visualization of Omics Data Using G:Profiler, Gsea, Cytoscape and Enrichmentmap. *Nat Protoc* 14 (2), 482-517.
- Reitsma, M.B., N. Fullman, M. Ng, J.S. Salama, A. Abajobir, K.H. Abate, C. Abbafati, S.F. Abera, B. Abraham, G.Y. Abyu, A.O. Adebiyi, Z. Al-Aly, A.V. Aleman, R. Ali, A.a. Al Alkerwi, P. Allebeck, R.M. Al-Raddadi, A.T. Amare, A. Amberbir, W. Ammar, S.M. Amrock, C.A.T. Antonio, H. Asayesh, N.T. Atnafu, P. Azzopardi, A. Banerjee, A. Barac, T. Barrientos-Gutierrez, A.C. Basto-Abreu, S. Bazargan-Hejazi, N. Bedi, B. Bell, A.K. Bello, I.M. Bensenor, A.S. Beyene, N. Bhala, S. Biryukov, K. Bolt, H. Brenner, Z. Butt, F. Cavalleri, K. Cercy, H. Chen, D.J. Christopher, L.G. Ciobanu, V. Colistro, M. Colomar, L. Cornaby, X. Dai, S.A. Damtew, L. Dandona, R. Dandona, E. Dansereau, K. Davletov, A. Dayama, T.T. Degfie, A. Deribew, S.D. Dharmaratne, B.D. Dimtsu, K.E. Doyle, A.Y. Endries, S.P. Ermakov, K. Estep, E.J.A. Faraon, F. Farzadfar, V.L. Feigin, A.B. Feigl, F. Fischer, J. Friedman, T.T. G/hiwot, S.L. Gall, W. Gao, R.F. Gillum, A.L. Gold, S.V. Gopalani, C.C. Gotay, R. Gupta, R. Gupta, V. Gupta, R.R. Hamadeh, G. Hankey, H.L. Harb, S.I. Hay, M. Horino, N. Horita, H.D. Hosqood, A. Husseini, B.V. Ileanu, F. Islami, G. Jiang, Y. Jiang, J.B. Jonas, Z. Kabir, R. Kamal, A. Kasaeian, C.N. Kesavachandran, Y.S. Khader, I. Khalil, Y.-H. Khang, S. Khera, J. Khubchandani, D. Kim, Y.J. Kim, R.W. Kimokoti, Y. Kinfu, L.D. Knibbs, Y. Kokubo, D. Kolte, J. Kopec, S. Kosen, G.A. Kotsakis, P.A. Koul, A. Koyanagi, K.J. Krohn, H. Krueger, B.K. Defo, B.K. Bicer, C. Kulkarni, G.A. Kumar, J.L. Leasher, A. Lee, M. Leinsalu, T. Li, S. Linn, P. Liu, S. Liu, L.-T. Lo, A.D. Lopez, S. Ma, H.M.A. El Razek, A. Majeed, R. Malekzadeh, D.C. Malta, W.A. Manamo, J. Martinez-Raga, A.B. Mekonnen, W. Mendoza, T.R. Miller, K.A. Mohammad, L. Morawska, K.I. Musa, G. Nagel, S.P. Neupane, Q. Nguyen, G. Nguyen, I.-H. Oh, A.S. Oyekale, M. Pa, A. Pana, E.-K. Park, S.T. Patil, G.C. Patton, J. Pedro, M. Qorbani, A. Rafay, M. Rahman, R.K. Rai, U. Ram, C.L. Ranabhat, A.H. Refaat, N. Reinig, H.S. Roba, A. Rodriguez, Y. Roman, G. Roth, A. Roy, R. Sagar, J.A. Salomon, J. Sanabria, I. de Souza Santos, B. Sartorius, M. Satpathy, M. Sawhney, S.

- Sawyer, M. Saylan, M.P. Schaub, N. Schluger, A.E. Schutte, S.G. Sepanlou, B. Serdar, M.A. Shaikh, J. She, M.-J. Shin, R. Shiri, K. Shishani, I. Shiue, I.D. Sigfusdottir, J.I. Silverberg, J. Singh, V. Singh, E.L. Slepak, S. Soneji, J.B. Soriano, S. Soshnikov, C.T. Sreeramareddy, D.J. Stein, S. Stranges, M.L. Subart, S. Swaminathan, C.E.I. Szoeke, W.M. Tefera, R. Topor-Madry, B. Tran, N. Tsilimparis, H. Tymeson, K.N. Ukwaja, R. Updike, O.A. Uthman, F.S. Violante, S.K. Vladimirov, V. Vlassov, S.E. Vollset, T. Vos, E. Weiderpass, C.-P. Wen, A. Werdecker, S. Wilson, M. Wubshet, L. Xiao, B. Yakob, Y. Yano, P. Ye, N. Yonemoto, S.-J. Yoon, M.Z. Younis, C. Yu, Z. Zaidi, M. El Sayed Zaki, A.L. Zhang, B. Zipkin, C.J.L. Murray, M.H. Forouzanfar und E. Gakidou (2017). Smoking Prevalence and Attributable Disease Burden in 195 Countries and Territories, 1990–2015: A Systematic Analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet 389 (10082)*, 1885-1906.
- Romero, J.M., B. Grünwald, G.H. Jang, P.P. Bavi, A. Jhaveri, M. Masoomian, S.E. Fischer, A. Zhang, R.E. Denroche, I.M. Lungu, A. De Luca, J.M.S. Bartlett, J. Xu, N. Li, S. Dhaliwal, S.B. Liang, D. Chadwick, F. Vyas, P. Bronsert, R. Khokha, T.L. McGaha, F. Notta, P.S. Ohashi, S.J. Done, G.M. O'Kane, J.M. Wilson, J.J. Knox, A. Connor, Y. Wang, G. Zogopoulos und S. Gallinger (2020). A Four-Chemokine Signature Is Associated with a T-Cell-Inflamed Phenotype in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 26 (8), 1997-2010.
- Rubin, K., A. Janefeldt, L. Andersson, Z. Berke, K. Grime und T.B. Andersson (2015). Heparg Cells as Human-Relevant in Vitro Model to Study the Effects of Inflammatory Stimuli on Cytochrome P450 Isoenzymes. *Drug Metab Dispos 43 (1)*, 119-125.
- Ryan, D.P., T.S. Hong und N. Bardeesy (2014). Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med* 371 (11), 1039-1049.
- Saluja, A.K., M.M. Lerch, P.A. Phillips und V. Dudeja (2007). Why Does Pancreatic Overstimulation Cause Pancreatitis? *Annu Rev Physiol* 69, 249-269.
- Sander, L.E., S.D. Sackett, U. Dierssen, N. Beraza, R.P. Linke, M. Muller, J.M. Blander, F. Tacke und C. Trautwein (2010). Hepatic Acute-Phase Proteins Control Innate Immune Responses During Infection by Promoting Myeloid-Derived Suppressor Cell Function. *J Exp Med 207 (7)*, 1453-1464.
- Schelter, F., M. Grandl, B. Seubert, S. Schaten, S. Hauser, M. Gerg, C. Boccaccio, P. Comoglio und A. Krüger (2011). Tumor Cell-Derived TIMP-1 Is Necessary for Maintaining Metastasis-Promoting Met-Signaling Via Inhibition of Adam-10. *Clin Exp Metastasis 28 (8)*, 793-802.
- Schoeps, B., C. Eckfeld, L. Flüter, S. Keppler, R. Mishra, P. Knolle, F. Bayerl, J. Böttcher, C.D. Hermann, D. Häußler und A. Krüger (2021a). Identification of Invariant Chain Cd74 as a Functional Receptor of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J Biol Chem* 297 (3), 101072.
- Schoeps, B., C. Eckfeld, O. Prokopchuk, J.P. Böttcher, D. Häußler, K. Steiger, I.E. Demir, P. Knolle, O. Soehnlein, D.E. Jenne, C.D. Hermann und A. Krüger (2021b). TIMP-1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 81 (13), 3568-3579
- Scholz, R., U. Schwabe und S. Soboll (1984). Influence of Fatty Acids on Energy Metabolism. 1. Stimulation of Oxygen Consumption, Ketogenesis and Co2 Production Following Addition of Octanoate and Oleate in Perfused Rat Liver. *Eur J Biochem 141 (1)*, 223-230.
- Schultz, R.M., S. Silberman, B. Persky, A.S. Bajkowski und D.F. Carmichael (1988). Inhibition by Human Recombinant Tissue Inhibitor of Metalloproteinases of Human Amnion Invasion and Lung Colonization by Murine B16-F10 Melanoma Cells. *Cancer Res 48 (19)*, 5539-5545
- Seubert, B., B. Grünwald, J. Kobuch, H. Cui, F. Schelter, S. Schaten, J.T. Siveke, N.H. Lim, H. Nagase, N. Simonavicius, M. Heikenwalder, T. Reinheckel, J.P. Sleeman, K.P. Janssen, P.A. Knolle und A. Krüger (2015). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-1 Creates a Premetastatic Niche in the Liver through Sdf-1/Cxcr4-Dependent Neutrophil Recruitment in Mice. *Hepatology 61 (1)*, 238-248.
- Siegmund, S.V., M. Schlosser, F.A. Schildberg, E. Seki, S. De Minicis, H. Uchinami, C. Kuntzen, P.A. Knolle, C.P. Strassburg und R.F. Schwabe (2016). Serum Amyloid a Induces

- Inflammation, Proliferation and Cell Death in Activated Hepatic Stellate Cells. *PLoS One 11* (3), e0150893.
- Steeg, P.S. (2016). Targeting Metastasis. Nat Rev Cancer 16 (4), 201-218.
- Strobel, O., Y. Dor, J. Alsina, A. Stirman, G. Lauwers, A. Trainor, C.F. Castillo, A.L. Warshaw und S.P. Thayer (2007). In Vivo Lineage Tracing Defines the Role of Acinar-to-Ductal Transdifferentiation in Inflammatory Ductal Metaplasia. *Gastroenterology* 133 (6), 1999-2009.
- Tamburrino, D., S. Partelli, S. Crippa, A. Manzoni, A. Maurizi und M. Falconi (2014). Selection Criteria in Resectable Pancreatic Cancer: A Biological and Morphological Approach. *World J Gastroenterol* 20 (32), 11210-11215.
- Tsilimigras, D.I., P. Brodt, P.A. Clavien, R.J. Muschel, M.I. D'Angelica, I. Endo, R.W. Parks, M. Doyle, E. de Santibanes und T.M. Pawlik (2021). Liver Metastases. *Nat Rev Dis Primers* 7 (1), 27.
- Tukiainen, T., A.C. Villani, A. Yen, M.A. Rivas, J.L. Marshall, R. Satija, M. Aguirre, L. Gauthier, M. Fleharty, A. Kirby, B.B. Cummings, S.E. Castel, K.J. Karczewski, F. Aguet, A. Byrnes, G. Consortium, T. Lappalainen, A. Regev, K.G. Ardlie, N. Hacohen und D.G. MacArthur (2017). Landscape of X Chromosome Inactivation across Human Tissues. *Nature* 550 (7675), 244-248.
- Van den Broeck, A., G. Sergeant, N. Ectors, W. Van Steenbergen, R. Aerts und B. Topal (2009). Patterns of Recurrence after Curative Resection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 35 (6), 600-604.
- van Kempen, L.C., M. Redpath, M. Elchebly, K.O. Klein, A.I. Papadakis, J.S. Wilmott, R.A. Scolyer, P.H. Edqvist, F. Ponten, D. Schadendorf, A.F. van Rijk, S. Michiels, A. Dumay, A. Helbling-Leclerc, P. Dessen, J. Wouters, M. Stass, C.M. Greenwood, G.E. Ghanem, J. van den Oord, J. Feunteun und A. Spatz (2016). The Protein Phosphatase 2a Regulatory Subunit Pr70 Is a Gonosomal Melanoma Tumor Suppressor Gene. *Sci Transl Med 8 (369)*, 369ra177.
- Vekemans, K. und F. Braet (2005). Structural and Functional Aspects of the Liver and Liver Sinusoidal Cells in Relation to Colon Carcinoma Metastasis. *World J Gastroenterol* 11 (33), 5095-5102.
- Wagner, A.D., S. Oertelt-Prigione, A. Adjei, T. Buclin, V. Cristina, C. Csajka, G. Coukos, U. Dafni, G.P. Dotto, M. Ducreux, J. Fellay, J. Haanen, A. Hocquelet, I. Klinge, V. Lemmens, A. Letsch, M. Mauer, M. Moehler, S. Peters und B.C. Ozdemir (2019). Gender Medicine and Oncology: Report and Consensus of an Esmo Workshop. *Ann Oncol* 30 (12), 1914-1924.
- Warshaw, A.L. und C. Fernandez-del Castillo (1992). Pancreatic Carcinoma. *N Engl J Med* 326 (7), 455-465.
- Waters, A.M. und C.J. Der (2018). Kras: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med 8 (9)*,
- Weissmueller, S., E. Manchado, M. Saborowski, J.P.t. Morris, E. Wagenblast, C.A. Davis, S.H. Moon, N.T. Pfister, D.F. Tschaharganeh, T. Kitzing, D. Aust, E.K. Markert, J. Wu, S.M. Grimmond, C. Pilarsky, C. Prives, A.V. Biankin und S.W. Lowe (2014). Mutant P53 Drives Pancreatic Cancer Metastasis through Cell-Autonomous Pdgf Receptor Beta Signaling. *Cell* 157 (2), 382-394.
- Westphalen, C.B. und K.P. Olive (2012). Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Cancer. *Cancer J 18 (6)*, 502-510.
- Woods, A., J.R. Williams, P.J. Muckett, F.V. Mayer, M. Liljevald, Y.M. Bohlooly und D. Carling (2017). Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet. *Cell Rep 18 (13)*, 3043-3051.
- Yuan, Y., L. Liu, H. Chen, Y. Wang, Y. Xu, H. Mao, J. Li, G.B. Mills, Y. Shu, L. Li und H. Liang (2016). Comprehensive Characterization of Molecular Differences in Cancer between Male and Female Patients. *Cancer Cell* 29 (5), 711-722.

8. Danksagung

Zuallererst gilt mein herzlichster Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Achim Krüger für die hervorragende Unterstützung, die ich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit erfahren durfte. Die Möglichkeit und Chance, eigenverantwortlich und selbständig arbeiten zu dürfen, war sehr lehrreich und keine Selbstverständlichkeit. Ich bedanke mich für die sehr aufmerksamen, kritischen und konstruktiven Ratschläge und Diskussionen, die maßgeblich zur Konzeption, zur Weiterentwicklung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch für den unermüdlichen, spontanen und kurzfristigen Einsatz, wissenschaftliche Manuskripte und Präsentationen kritisch zu überarbeiten und dabei selbst kleinste Details zu optimieren, bin ich sehr dankbar. Ich bedanke mich außerdem für die fortwährende Sicherstellung der Förderung dieses Projekt nicht zuletzt auch während der schwierigen Pandemiezeiten, für die Einarbeitung in verschiedenste tierexperimentelle Methoden und für die Unterstützung bei Planung und Durchführung von Tierversuchen. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit, zahlreiche Studierende während meiner Doktorarbeit betreuen zu dürfen und für die wertvollen Erfahrungen, die ich bei der Teilnahme an verschiedenen Konferenzen oder auch beim Verfassen von Anträgen sammeln und erfahren durfte. Insgesamt möchte ich mich für all' die Unterstützung, die Chancen, die Zusammenarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen herzlichst bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den weiteren Mitgliedern meines Thesis-Komitees, *Frau PD. Dr. rer. physiol. Melanie Laschinger* und *Herrn Prof. Dr. Martin Klingenspor* für die hilfreichen und konstruktiven Ratschläge, sowie für Ihre Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kollegen Benjamin Schoeps, Celina Eckfeld, Daniel Häußler, Julian Frädrich, Katja Honert und Dr. Susanne Schaten, die allesamt einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Die jahrelange enge und hilfsbereite Zusammenarbeit, sowie die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bildeten eine wichtige Grundlage für die erfolgreiche Durchführung von Experimenten und das konstruktive Weiterentwickeln wissenschaftlicher Fragestellungen.

Im Speziellen möchte ich mich bei *Benjamin Schoeps* für die Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente und bei der Aufarbeitung muriner Gewebeproben, sowie für die Unterstützung bei den Stimulationsexperimenten mit den Hepatozytenzelllinien und für die automatisierte Auswertung der BODIPY-Färbungen (Abb. 3.18, 3.19 F, 3.21 B) herzlich bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei *Benjamin Schoeps* und *Celina Eckfeld* für die Durchführung des *Signaling Arrays* (Abb. 3.20 A). Danke außerdem an *Daniel Häußler* für die Produktion, Reinigung und Charakterisierung des in dieser Arbeit für Zellkulturexperimente verwendeten rekombinanten humanen TIMP-1. *Katja Honert* möchte ich herzlich für ihre stets zuverlässige Hilfe bei der Durchführung aller Experimente und speziell für die Unterstützung bei der Probenvorbereitung für die

Danksagung

Tierversuche bzw. bei der Kultivierung von Zellen, sowie für die Genotypisierung der Mäuse danken. *Dr. Susanne Schaten* danke ich für die Ausarbeitung der für diese Arbeit notwendigen Tierversuchsanträge, sowie für die Organisation der Zucht bzw. des Ankaufs aller verwendeten Versuchstiere und die hilfreichen Ratschläge bei der Planung und der Durchführung aller tierexperimentellen Methoden.

Allen Kooperationspartnern möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Dr. Olga Prokopchuk und Hanna Kuzi danke ich herzlich für die Bereitstellung von klinischen Daten und Gewebeproben von Patientinnen und Patienten, sowie für die Diskussion klinisch-orientierter Fragestellungen. Ferner gilt mein Dank PD Dr. Katja Steiger und Nils Wirges für das Grading der Pankreastumorproben von KPC-Mäusen, sowie der gesamten Comparative experimental Pathology (CeP)-Einheit für die Aufarbeitung von Gewebeproben und für das Herstellen bzw. Färben von Gewebedünnschnitten von Versuchstieren. Herrn Prof. Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir danke ich für die hilfreichen Diskussionen und die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge. Dr. Enkhtsetseg Munkhbaatar möchte ich für die Durchführung der immunhistochemischen TIMP-1 Färbung im murinen Pankreasgewebe (Abb. 3.7 C) danken. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Dr. Barbara T. Grünwald für die Diskussion der Ergebnisse und das Weiterentwickeln der Studie bedanken. Ihr, sowie Emily Poulton und Prof. Dr. Rama Khokha gilt außerdem mein Dank für das Bereitstellen klinischer Daten, sowie für die Färbung und Quantifizierung der TIMP-1 Proteinmengen im Pankreastumorgewebe von PDAC-Patientinnen und -Patienten. Lukas Kniep möchte ich danken für die Unterstützung bei der Messung der SAA1 mRNA-Expression in HepaRG Zellen (Abb. 3.9 E) und Nicole Schmid danke ich für die Hilfe bei den Western Blot-Analysen mit Proteinlysaten von HepaRG Zellen bzw. murinem Lebergewebe (Abb. 3.20 B, 3.22).

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Molekulare Immunologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken und speziell Herrn Prof. Dr. Percy Knolle danke ich für die hilfreichen Anregungen und Ratschläge während der Forschungsseminare. Sandra Kimmerle, Savvoula Michailidou und Josef Straßmair danke ich außerdem für die technische und administrative Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Biopredic International danke ich für die Bereitstellung der HepaRG Zellen.

Von Herzen möchte ich mich außerdem bei meiner liebevollen Familie und meinen lieben Freunden für die stetige Unterstützung im Beruflichen und im Privaten bedanken. *Julia Hermann* danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer auf meinem bisherigen Weg gefördert haben und mir stets mit Ratschlägen und Hilfe zur Seite gestanden sind. Meiner Partnerin *Vanessa* bin ich zutiefst dankbar für die bedingungslose Unterstützung, den Rückhalt und die Rücksichtnahme, sowie für die Kraft, die sie mir jeden Tag schenkt. Von ganzem Herzen möchte ich sagen: Danke für alles.

9.2. Publikationsverzeichnis

Projektbezogene Publikation:

Hermann, C.D., Schoeps, B., Eckfeld, C., Munkhbaatar, E., Kniep, L., Prokopchuk, O., Wirges, N., Steiger, K., Häußler, D., Knolle, P., Poulton, E., Khokha, R., Grünwald, B.T., Demir, I.E. und Krüger, A. 2021. TIMP1 Expression Underlies Sex Disparity in Liver Metastasis and Survival in Pancreatic Cancer. *J. Exp. Med. 218 (11)*, e20210911.

Hermann, C.D.*, Schoeps, B.*, Eckfeld, C., Prokopchuk, O., Görgülü, K., Algül, H. und Krüger.

A. 2022. TIMP-1 Induces Lipolysis in Hepatocytes *via* AMPK Signaling. Manuskript in Fertigstellung.

* gleichberechtige Autoren

Weitere Publikationen:

Eckfeld, C., Häußler, D., Schoeps, B., **Hermann, C.D.** und Krüger A. 2019. Functional Disparities Within the TIMP Family in Cancer: Hints from Molecular Divergence. *Cancer Metastasis Rev* 38 (3), 469-481.

Prokopchuk, O.*, **Hermann, C.D.***, Schoeps, B.*, Nitsche, U., Prokopchuk, O.L., Knolle, P., Friess, H., Martignoni, M.E. und Krüger, A. 2021. A Novel Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1/Liver/Cachexia Score Predicts Prognosis of Gastrointestinal Cancer Patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle 12* (2), 378-392. * gleichberechtige Autoren

Schoeps, B., Eckfeld, C., Prokopchuk, O., Böttcher, J., Häußler, D., Steiger, K., Demir, I.E., Knolle, P., Soehnlein, O., Jenner, D.E., **Hermann, C.D.** und Krüger, A. 2021. TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res 81 (13)*, 3568-79.

Schoeps, B., Eckfeld, C., Flüter, L., Keppler, S., Mishra, R., Knolle, P., Bayerl, F., Böttcher, J., **Hermann, C.D.,** Häußler, D. und Krüger, A. 2021. Identification of Invariant Chain CD74 as a Functional Receptor of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J. Biol. Chem.* 297 (3), 101072.

Anhang

Morigny, P., Kaltenecker, D., Zuber, J., Machado, J., Mehr, L., Tsokanos, F.F., Kuzi, H., **Hermann, C.D.,** Voelkl, M., Monogarov, G., Springfeld, C., Laurent, V., Engelmann, B., Friess, H., Zörnig, I., Krüger, A., Krijgsveld, J., Prokopchuk, O., Schmidt, S.F., Rohm, M., Herzig, S. und Berriel Diaz, M. 2021. Association of Circulating PLA2G7 Levels with Cancer Cachexia and Assessment of Darapladib as a Therapy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle 12 (5)*, 1333-1351.