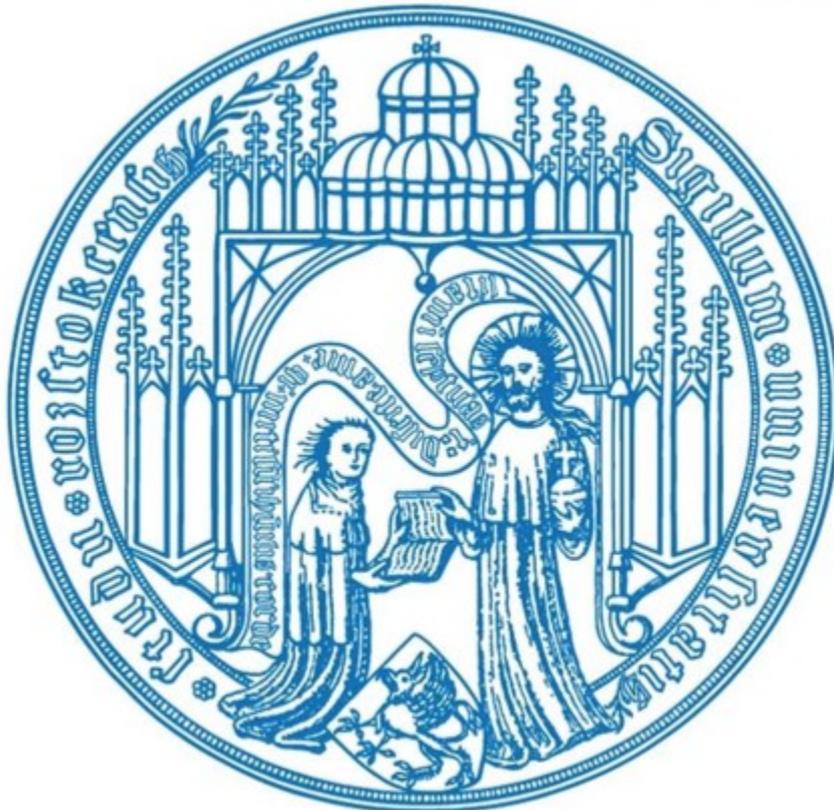


Einfluss von Metformin und Gemcitabin auf die Pathophysiologie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von Florian Bürtin
geboren am 30.10.1987 in Völklingen

Rostock im Oktober 2015

Dekan: Prof. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht
Zentrum für Innere Medizin, Klinik II -Abteilung für Gastroenterologie
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke, MBA
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und
Gefäßchirurgie
Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Einreichung: 14.10.2015

Datum der Verteidigung: 25.05.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

GLOSSAR	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 PANKREAS	1
1.1.1 ANATOMIE UND HISTOLOGIE	1
1.1.2 PHYSIOLOGIE.....	1
1.2 PANKREASKARZINOM	2
1.2.1 PATHOLOGIE.....	2
1.2.2 EPIDEMIOLOGIE.....	3
1.2.3 RISIKOFAKTOREN.....	3
1.2.4 THERAPIE	4
1.2.4.1 Chirurgische Therapie.....	4
1.2.4.2 Neoadjuvante, Adjuvante und Palliative Therapieverfahren.....	5
1.2.5 EINFLUSS VON DIABETES MELLITUS UND ANTIDIABETISCHER THERAPIE AUF DAS PANKREASKARZINOM.....	6
1.3 TIERMODELLE DES PDA.....	8
1.4 VERWENDETE CHEMOTHERAPEUTIKA	11
1.4.1 GEMCITABIN	11
1.4.2 METFORMIN.....	12
1.5 ZIELSTELLUNG.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 <i>IN-VITRO</i> -VERSUCHE.....	14
2.1.1 ZELLINIEN UND ALLGEMEINE ZELLKULTUR	14
2.1.2 WST-1-ASSAY	15
2.1.3 BRDU-ASSAY	16
2.1.4 TRYPANBLAU-ASSAY	17
2.1.5 WESTERN BLOT	17
2.2 <i>IN-VIVO</i> -VERSUCHE.....	22
2.2.1 VERSUCHSTIERE	22
2.2.2 ORTHOTOPE TUMORZELLINJEKTION	22
2.2.3 VERSUCHSAUFBAU.....	24

2.2.4 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSEN	27
2.2.4.1 Aufbereitung der Gewebeproben	27
2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
2.2.4.3 Nachweis der Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase (CAE-Färbung).....	29
2.2.4.4 Bromdesoxyuridin-Immunhistochemie	30
2.2.4.5 Histologische und Immunhistochemische Auswertung	31
2.2.5 ANALYSE DES BLUTPLASMAS	31
2.2.5.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität im Blutplasma	32
2.2.5.2 Messung der Alanin-Aminotransferase-Aktivität im Blutplasma	33
2.2.5.3 Messung der Aspartat-Aminotransferase-Aktivität im Blutplasma.....	33
2.3 STATISTIK	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1 <i>IN VITRO</i> -VERSUCHE	35
3.1.1 GEMCITABIN HEMMT DIE PROLIFERATION VON DREI TUMORZELLINIEN.....	35
3.1.2 INDUKTION DES ZELLTODES DURCH GEMCITABIN	38
3.1.3 KONZENTRATIONSABHÄNGIGER EINFLUSS VON METFORMIN AUF TUMORZELLEN.....	40
3.1.4 METFORMIN ERHÖHT NICHT DEN GEMCITABIN-INDUZIERTEN ZELLTOD.....	42
3.1.5 METFORMIN HEMMT DIE GEMCITABIN-INDUZIERTE APOPTOSE DER ZELLINIE 6606PDA	45
3.1.6 KEINE SYNERGISTISCHE REDUKTION DER PROLIFERATION DURCH METFORMIN & GEMCITABIN	47
3.2 <i>IN VIVO</i> -VERSUCHE	48
3.2.1 VERLAUF VON KÖRPERGEWICHT UND BLUTGLUKOSEKONZENTRATION	48
3.2.2 GEMCITABINAPPLIKATION VERURSACHT EINE REDUKTION DER LEUKOZYTENZAHL ...	48
3.2.3 EINFLUSS DER CHEMOTHERAPIE AUF DAS PANKREASGEWEBE UND DIE LEBER	50
3.2.4 REDUKTION DES TUMORGEWICHTES DURCH ANTINEOPLASTISCHE THERAPIE.....	52
3.2.5 EVALUATION VON PROLIFERATION, NEKROSE UND INFLAMMATION.....	52
4 DISKUSSION	55
4.1 DISKUSSION DER MATERIALEN UND METHODEN	55
4.1.1 <i>IN VITRO</i>	55
4.1.1.1 Auswahl der Tumorzelllinien	55
4.1.1.2 WST-1- und BrdU-Assay zur Evaluation der Zellproliferation.....	55
4.1.1.3 Trypanblau-Assay zur Evaluation des Zelltodes	56
4.1.1.4 PARP und Cleaved Caspase 3 als molekulare Marker der Apoptose	57
4.1.2 <i>IN VIVO</i>	58

4.1.2.1 Orthotopes syngenes Pankreaskarzinommodell	58
4.1.2.2 Antineoplastische Therapie mit Gemcitabin und Metformin	59
4.1.2.3 BrdU-Immunhistologie zur Beurteilung der Proliferation	59
4.1.2.4 Planimetrische Bestimmung nekrotischer Tumoranteile.....	61
4.1.2.5 CAE-Färbung zur Beurteilung der Inflammation.....	61
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	62
4.2.1 ANTINEOPLASTISCHE WIRKUNG VON GEMCITABIN	62
4.2.1.1 Gemcitabin hemmt die Zellproliferation und induziert den Zelltod <i>in vitro</i>	62
4.2.1.2 Einfluss von Gemcitabin auf die Pathophysiologie des PDA.....	62
4.2.2 ANTINEOPLASTISCHE WIRKUNG VON METFORMIN	64
4.2.2.1 Erklärungshypothesen der antineoplastischen Wirkung von Metformin	64
4.2.2.2 Fragliche antineoplastische Wirkung von Metformin <i>in vitro</i>	65
4.2.2.3 Metformin antagonisiert die antineoplastische Wirkung von Gemcitabin <i>in vitro</i>	67
4.2.2.4 Metformin reduziert das Tumorgewicht <i>in vivo</i>	69
4.2.3 RELEVANZ DER ERGEBNISSE.....	73
4.3 AUSBLICK	74
ABBILDUNGS- & TABELLENVERZEICHNIS.....	76
LITERATURVERZEICHNIS.....	77
DANKSAGUNG.....	114
LEBENS LAUF.....	115
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	117
THESEN DER DISSERTATION.....	119
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	120

Glossar

Abkürzung	Bedeutung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Adenosinphosphosulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BOP	N-nitrosobis(2-oxopropyl)-amine
BRCA1	breast cancer 1, early onset
BRCA2	breast cancer 2, early onset
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAE	Chloracetatesterase
CaMKK	Calmodulin-abhängige-Kinasen-Kinasen
CDKN2A	cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CT	Computertomographie
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
DMBA	Dimethylbenzanthracen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
FKHRL1	forkhead in rhabdomyosarcoma L1(Forkhead-Box-Protein O3)
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Floururacil, Irinotecan, Oxaliplatin
GEM	genetically engineered mouse
HE	Hämatoxylin-Eosin
hENT1	human equilibrative nucleosid transporter 1
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
i. p.	intraperitoneal
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
IRS-2	Insulin-Rezeptor-Substrat-2
KG	Körpergewicht
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LKB1	liver kinase B1
LoxP	locus of X-over P1
MHC-I	major histocompatibility complex I

MODY	maturity onset diabetes of the young
mPMS	1-Methoxy-5-methyl-Phenazinmetholsulfat
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycine
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MZN	Muzinös-zystische Neoplasie
nab-Paclitaxel	nanoparticle albumin bound- Paclitaxel
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaN ₃	Natriumazid
OCT-1	siehe SLC22A1
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating-cell-nuclear-antigen
PDA	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	platelet derived growth factor
PDX-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	Pankreatische Sternzellen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RCT	Radio-Chemo-Therapie
REDD1	regulated in development and DNA damage responses 1
s.c.	subcutan
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SLC22A1	solute carrier family 22 member 1= organic cation transporter 1
TGF- β	transforming growth factor β
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TP53	Tumor Protein p53
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC1	tuberous sclerosis 1 (Hamartin)
TSC2	tuberous sclerosis 2 (Tuberin)
TUNEL	TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST-1	water soluble tetrazolium salt-1
5-FU	5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört bis zum heutigen Tage zu den Malignomen mit der fatalsten Prognose. Die einzige kurative Therapie besteht in einer kompletten Resektion des Tumors. Zudem stehen verschiedene Kombinationen aus Zytostatika zur Verfügung, welche zu einem verlängerten Überleben beitragen. Epidemiologische Daten aus den letzten Jahren lassen darauf schließen, dass das Antidiabetikum Metformin einer Pankreaskarzinomerkrankung vorbeugen und das Überleben der Patienten, die bereits an einem solchem Malignom erkrankt sind, verlängern kann. Ziel dieser Studie war es, ein zuverlässiges Tiermodell für das Pankreaskarzinom zu etablieren und die Wirkung von Metformin und dessen potentielle Synergie mit dem klassischen Chemotherapeutikum Gemcitabin, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zu untersuchen.

Methodik: *In vitro* wurden drei neuartige murine Karzinomzelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA mit unterschiedlichen Konzentrationen Metformin, Gemcitabin oder deren Kombination behandelt. Anschließend wurde der Einfluss der Chemotherapeutika auf die Zellproliferation, die Zellvitalität sowie auf die Apoptose evaluiert. Im Tierversuch wurden 6606PDA-Zellen in den Pankreaskopf männlichen C57BL/6J Mäusen injiziert und eine Woche später wurden die Tiere über drei Wochen mit Metformin, Gemcitabin, deren Kombination oder einem Placebo behandelt.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Während Gemcitabin *in vitro* zu einer starken Hemmung der Zellproliferation in allen analysierten Zelllinien führte, reduzierte Metformin die Zellproliferation nur geringfügig. Zudem zeigte Metformin *in vitro* auch antagonistische Effekte zu Gemcitabin. So induzierte Gemcitabin den Zelltod, während Metformin den Gemcitabin-induzierten Zelltod nicht verstärkte, sondern hemmte. Dieser Sachverhalt konnte sowohl mittels Trypanblau-Assay, als auch durch die Darstellung von Cleaved Caspase-3 und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase im Western Blot belegt werden. *In vivo* konnte jedoch ein additiver Effekt von Metformin und Gemcitabin nachgewiesen werden. Sowohl Metformin als auch Gemcitabin führten zu einer Reduktion des Tumorgewichtes. Die Behandlung mit beiden Therapeutika reduzierte das Tumorgewicht jedoch stärker als die jeweilige Einzelbehandlung. Diese Daten zeigen, dass Metformin in Zukunft eine effektive und verträgliche Ergänzung zur klassischen Chemotherapie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas darstellen könnte.

Abstract

Background: Down to the present day the ductal adenocarcinoma of the pancreas remains one of the most fatal malignancies. The only therapeutic option consists in an early and complete resection of the tumor. There are several combinations of cytostatic agents for the adjuvant, neoadjuvant and palliative treatment available, contributing to a prolonged survival. Epidemiological data from the recent years imply that the anti-diabetic treatment with metformin reduces the risk for pancreatic cancer and extends the survival of patients suffering from this malignancy. The aim of this study was to establish a reliable animal model for pancreatic cancer and to investigate the effect of metformin and its potential synergy with the conventional chemotherapeutic agent gemcitabine *in vitro*, as well as *in vivo*.

Methods: Three novel murine carcinoma cell lines 6606PDA, 6606I and 7265PDA were treated with different concentrations of metformin, gemcitabine or their combination *in vitro*. Subsequently the effect of those agents on cell proliferation, cell viability and apoptosis was evaluated. For the animal experiment 6606PDA cells were injected in the head of the pancreas of male C57BL/6J mice. After one week the mice were divided into treatments groups and received either metformin, gemcitabine, the combination of these agents or placebo.

Results and conclusion: Gemcitabine reduced the cell proliferation of all investigated cell lines significantly *in vitro*, whereas metformin lead only to a minor inhibition of cell proliferation. Furthermore metformin showed effects antagonistic to gemcitabine. Gemcitabine induced cell death while metformin did not enhance, but did inhibit gemcitabine-induced cell death, as demonstrated by trypan blue assay as well as western blot detecting cleaved caspase-3 and Poly(ADP-ribose) polymerase. In contrast the combination of metformin and gemcitabine showed an additive effect *in vivo*. Metformin and gemcitabine lead both to a reduction of tumor weight and the combination of both agents increased this anticancerous effect. These data demonstrate that metformin could be used as an effective and well tolerated add-on for the conventional chemotherapy of the ductal adenocarcinoma of the pancreas.

1 Einleitung

1.1 Pankreas

1.1.1 Anatomie und Histologie

Das Pankreas ist ein ca. 16-20 cm langes, parenchymatöses Organ, welches endokrine und exokrine Funktionen besitzt. Es erstreckt sich quer auf Höhe des 2. Lendenwirbelkörpers von der Konkavität der c-förmigen Duodenalschlinge bis hin zum Milzhilus und gliedert sich makroskopisch in die drei Anteile Kopf, Korpus und Schwanz [1]. Der endokrine Anteil macht nur etwa 2 % der Organmasse aus und besteht aus den sog. Langerhans-Inseln. Diese Zellverbände sind weniger als 1 mm groß und finden sich disseminiert vor allem im Pankreaskorpus und -schwanz. Sie setzen sich feingeweblich überwiegend aus β -Zellen, einigen α -Zellen, sowie wenigen δ -Zellen und PP-Zellen. Das exokrine Pankreas stellt den Hauptanteil des Organs dar [2]. Das seröse Sekret der Bauchspeicheldrüse wird über den Ductus pancreaticus, der das Organ auf ganzer Länge durchzieht und gemeinsam mit dem Ductus choledochus in die Papilla duodeni major mündet, in das Lumen des Duodenum drainiert [3]. Aufgrund seiner embryonalen Entwicklung aus einer ventralen und einer dorsalen Pankreasknospe liegt bei einem Teil der Individuen ein zusätzlicher Ausführungsgang, der Ductus pancreaticus accessorius vor [4,5]. Dieser mündet dann meist eigenständig in die Papilla duodeni minor ins Duodenum, seltener anastomosiert er mit dem Ductus pancreaticus im Pankreaskopf. Ausgehend von einer dünnen Lage lockeren Bindegewebes, welche das Pankreas kapselartig umhüllt, gliedern Septen das Organ in Läppchen. Jedes dieser Drüsenläppchen besteht aus mehreren hundert dicht gepackte, beerenförmigen Drüsenendstücken, den Azini, die jeweils aus etwa 70 pyramidenförmigen Azinuszellen aufgebaut sind. Jeweils zwei bis vier Azini drainieren gemeinsam in ein Schaltstück. Mehrere Schaltstücke vereinigen sich zu einem intralobulären Ausführungsgang. In den Bindegewebssepten vereinigen sich zahlreiche intralobuläre zu interlobulären Ausführungsgängen, welche in den Ductus pancreaticus münden [2].

1.1.2 Physiologie

Die Langerhans-Inseln dienen der Regulation der Glukosehomöostase. Eine erhöhte Blutglukosekonzentration führt zur Freisetzung von Insulin aus β -Zellen. Insulin fördert die Glukoseaufnahme der Zellen aus dem Blut und fördert die Glykogensynthese in Muskulatur und Leber. Sein Gegenspieler, Glukagon, wird von α -Zellen gebildet und

schützt durch Stimulation von Glykogenolyse und Glukoneogenese vor hypoglykämischen Zuständen. Somatostatin aus δ -Zellen hemmt parakrin die Sekretion von Insulin und Glukagon, wohingegen das pankreatische Polypeptid der PP-Zellen die Sekretion von Pankreassekret und Galle hemmt [6]. Die Azinuszellen synthetisieren Verdauungsenzyme und speichern diese, überwiegend in Form inaktiver Vorstufen, als apikale Zymogengranula. Die Freisetzung aus den Azinuszellen erfolgt durch Exozytose infolge Stimulation mit Acetylcholin oder Cholezystokinin. Während seines Transports wird dem Enzymgemisch durch die Epithelzellen der intralobulären Ausführungsgänge bicarbonatreiche, alkalische Flüssigkeit hinzugefügt. Über die interlobulären Ausführungsgänge gelangt das Pankreassekret in die Pars descendens des Duodenum und neutralisiert dort den sauren Chymus aus dem Magen. Durch duodenale Enteropeptidasen wird Trypsinogen zu Trypsin gespalten. Dieses aktiviert kaskadenartig die Zymogene zu ihren aktiven Formen Chymotrypsin, Phospholipase A, Carboxypeptidase A und B. Lediglich Nukleasen, weitere Lipasen und die α -Amylase [7] werden in ihrer aktiven Form sezerniert. Auf diese Weise wird zum einen sichergestellt, dass die Verdauungsenzyme am Ort ihrer Bestimmung tätig werden und zum anderen eine Autolyse des Pankreas verhindert [7].

1.2 Pankreaskarzinom

1.2.1 Pathologie

Das duktales Adenokarzinom ist mit ca. 90 % die häufigste Entität unter den Malignomen des exokrinen Pankreas [8,9]. Es entsteht meist aus pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), seltener aus intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) oder muzinös-zystischen Neoplasien (MZN) [9,10]. Die frühesten genetischen Alterationen im Verlauf der Karzinogenese sind die Mutation von onkogenem *KRAS* und die Telomerverkürzung, gefolgt von der Inaktivierung von *CDKN2A*. Schließlich erfolgt der Verlust der Tumorsuppressorgene *TP53*, *SMAD4*, und *BRCA2* [11]. Histologisch spiegeln sich diese genetischen Veränderungen in einer Progression von minimal dysplastischen Epithelzellen (PanIN 1A) über schwerere Dysplasiestufen (PanIN 2 & 3) bis hin zum invasiven Karzinom wider [12]. Etwa 70 % der duktales Adenokarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert, die übrigen im Korpus- und Schwanzbereich [13].

1.2.2 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom (PDA) ist weltweit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache und führt global zu geschätzten 227 000 Todesfällen pro Jahr [14]. In der BRD erkrankten im Jahr 2010 16000 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs, entsprechend einer Inzidenz von 20/100000 pro Jahr, bei einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen. Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland und zeigt eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 8 % für beide Geschlechter [15]. Ursächlich für die schlechte Prognose sind zum einen das Fehlen spezifischer Frühsymptome und somit die Diagnose in fortgeschrittenen Stadien, zum anderen die frühe und aggressive Metastasierung des Pankreaskarzinoms [16,17].

1.2.3 Risikofaktoren

Vererbte Risikofaktoren sind für 5-10 % aller PDA-Fälle verantwortlich [18]. Individuen mit einem Verwandten 1. Grades, die an einem PDA erkrankten, haben ein 18-fach erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens selbst an einem PDA zu erkranken [19]. Obwohl nicht alle Fälle von familiären PDA einer eindeutigen Mutation zugeordnet werden können, geht eine Vielzahl von bekannten genetischen Syndromen mit einem erhöhten Risiko für eine Pankreaskarzinomerkrankung einher. Dazu zählen die Fanconi-Anämie, Ataxia teleangiectatica, FAMMM-Syndrom, familiäre adenomatöse Polyposis, das Lych-Syndrom und das Peutz-Jeghers-Syndrom. Auch Träger von Mutationen der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* sind vermehrt gefährdet: Während bei *BRCA1*-Mutationen das Risiko nur geringfügig erhöht ist, erhöht eine Mutation von *BRCA2* das relative Risiko um 3,5 im Vergleich zur Normalbevölkerung ohne Mutation [20]. Demgegenüber stellt Nikotinabusus einen wesentlichen modifizierbaren Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms dar. Das relative Risiko steigt mit der Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten und der Dauer des Rauchens [21] und bleibt für mindestens 10 Jahre nach Beendigung des Konsums erhöht [22]. So sind etwa 20 % aller Pankreaskarzinomfälle auf das Rauchen zurückzuführen. Auch Übergewicht und Adipositas sind Risikofaktoren für die Entstehung von Pankreaskrebs. Eine Zunahme des BMI um 5 kg/m² führt zu einer Erhöhung des Pankreaskarzinomrisikos um 12 % [23]. Dieser Zusammenhang erscheint plausibel, da hypertrophes Fettgewebe vermehrt Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Plasmino-

gen- Aktivator Inhibitor–1 (PAI-1) freisetzt und somit durch eine Förderung von Zellwachstum, Proliferation und Angiogenese zur Karzinomentstehung beitragen kann [24]. Während ein moderater Alkoholkonsum das Erkrankungsrisiko für Pankreaskarzinome nicht beeinflusst, führt ein Alkoholkonsum von 40 g oder mehr pro Tag zu einer signifikanten Risikoerhöhung. Da es sich beim chronischen Alkoholabusus jedoch um einen der Hauptrisikofaktoren der akuten und chronischen Pankreatitis handelt, lässt sich das attributale Risiko für den Alkoholkonsum alleine nicht sicher ermitteln [25]. Durch Vorliegen einer chronischen Pankreatitis erhöht sich das relative Risiko des Patienten, an einem PDA zu erkranken, auf 13,3. Allerdings entwickeln nur 5 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis im Verlauf eines Erkrankungszeitraums von 20 Jahren ein Pankreaskarzinom. Bei Vorliegen einer hereditären Pankreatitis hingegen steigt das relative Risiko einer Pankreaskarzinomerkrankung stark an [26]. Bis zu 40 % der Patienten mit hereditärer Pankreatitis entwickeln ein Pankreaskarzinom [27]. Durch den anhaltenden Entzündungsreiz kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Sauerstoffradikalen. Diese verursachen DNA-Schäden und führen zu Proliferation und Neovaskularisation im Pankreasgewebe [28].

1.2.4 Therapie

1.2.4.1 Chirurgische Therapie

Die einzige kurative Therapieoption des Adenokarzinoms des Pankreaskopfes besteht in einer frühzeitigen Resektion des Tumors mittels Duodenopankreatektomie nach Whipple [29] oder mittels pyloruserhaltender Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire [30]. Die Wahl des jeweiligen OP-Verfahrens hat dabei keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten [31]. Da die meisten Patienten erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium vorstellig werden, sind nur 15-20 % der Pankreaskarzinomfälle einer chirurgischen Therapie zugänglich [16]. Trotz kurativer Intention wird nach Duodenopankreatektomie nur eine 5-JÜR von maximal 25 % erreicht [32]. Bei Tumoren des Korpus kann eine subtotale Pankreaslinksresektion oder eine totale Pankreatektomie erfolgen [33]. Bei Tumoren des Pankreasschwanzes erfolgt eine Pankreaslinksresektion. Dabei sei erwähnt, dass der Anteil resektabler Tumoren bei Lokalisation im Korpus- oder Kaudabereich mit 10-12 % noch niedriger ist als es bei Tumoren des Pankreaskopfes [34]. Dem entsprechend ist deren Prognose schlechter als die der PDAs des Kopfbereiches [35]. Eine Tumorsektion bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Karzinomen ist onkologisch nicht sinnvoll [36].

1.2.4.2 Neoadjuvante, Adjuvante und Palliative Therapieverfahren

Zurzeit hat die neoadjuvante Therapie, in Form von Bestrahlung, Chemotherapie oder Radiochemotherapie (RCT) in der Behandlung potentieller resektabler Pankreaskarzinome außerhalb klinischer Studien noch keinen Stellenwert [37,38]. In einigen Studien konnte jedoch die Rate an R0-Resektionen erhöht werden [39] und zur Primärresektion vergleichbare Überlebensraten bei zuvor nicht resezierbaren Tumoren erreicht werden [40]. Allerdings fehlen randomisiert-kontrollierte Studien, um den Wert der neoadjuvanten Therapiekonzepte abschließend zu beurteilen.

Nach Resektion des Pankreaskarzinoms verbessert eine adjuvante Chemotherapie die Prognose im Vergleich zum alleinigen operativen Vorgehen [41,42]. Dabei sind die Zytostatika Gemcitabin und die Kombination 5-Fluoruracil (5-FU)+Folinsäure hinsichtlich des Gesamtüberlebens gleichwertig, jedoch zeigte das Gemcitabinregime eine bessere Verträglichkeit [43]. Ein zusätzlicher Nutzen der adjuvanten RCT im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie wird kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten Vorteile erwiesen [44,45], zeigte sich in mehreren Studien keine Überlegenheit der RCT im Vergleich zur Observation oder Standardchemotherapie [41,46–48]. In der ESPAC-1 Studie zeigte sich sogar ein negativer Effekt der Radiotherapie auf das Gesamtüberleben [49]. Diese Arbeit wurde jedoch für ihr Studiendesign kritisiert [50].

In der palliativen Therapie war 5-FU, bis zur Zulassung von Gemcitabin Mitte der 1990er Jahre, lange Zeit das Standardtherapeutikum, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben [51–53]. Burris et al. zeigten, dass die Therapie mit Gemcitabin in der Palliation des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms der damaligen Standardtherapie mit 5-Fluoruracil signifikant überlegen ist. Dabei verlängerte Gemcitabin das mediane Gesamtüberleben nur um 1,24 Monate im Vergleich zu 5-FU, die Einjahresüberlebensrate betrug 18 % bei Patienten in der Gemcitabingruppe und 2 % in der 5-FU-Gruppe [54]. Nach der Etablierung von Gemcitabin als Goldstandard gab es zahlreiche Bemühungen, die Ergebnisse der Chemotherapie durch Kombination von Gemcitabin mit anderen Zytostatika, wie beispielsweise 5-FU [55], Capecitabin [56], Oxaliplatin [57], Cisplatin [58], Irinotecan [59] und Pemetrexed [60], sowie mit zielgerichteten Therapeutika wie Cetuximab [61], Bevacizumab [62], Erlotinib [63] und Afibercept [64] weiter zu verbessern. Dabei zeigten sich jedoch keine oder nur geringe Vorteile im Hinblick auf das Gesamtüberleben. Lediglich Erlotinib erhielt die Zulassung zur Therapie des fortgeschrittenen PDA. Eine wesentliche Verbesserung des Gesamt-

überlebens konnte 2011 durch die Arbeit von Conroy et al. erreicht werden: Die Kombination von 5-FU, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin, dem sogenannten FOLFIRINOX-Schema, führte zu einem medianen Gesamtüberleben von 11,1 Monaten im Vergleich zu 6,8 Monaten mit Standardtherapie. Es zeigte zwar häufiger schwere Nebenwirkungen, wie febrile Neutropenie, Thrombozytopenie, sensorische Neuropathie und Diarrhö [65], führte jedoch zu einer geringeren Einschränkung der Lebensqualität im Vergleich zur Gemcitabintherapie [66]. Seit 2013 steht mit der Kombination aus Gemcitabin und *nab*-(nanoparticle-albumin-bound) Paclitaxel eine weitere Therapieoption zur Verfügung. Diese führt zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens mit durchschnittlich 8,5 Monaten verglichen mit 6,7 Monaten bei Gemcitabinmonotherapie und guter Verträglichkeit [67]. Für den Einsatz der RCT besteht auch bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren des Pankreas kein klarer Konsens. Während sich in einer Phase-III-Studie eine RCT im Vergleich zu Gemcitabin negativ auf die Mortalität auswirkte [68], konnten andere Arbeiten eine signifikante Verbesserung des Überlebens durch RCT belegen [69]. Es profitieren insbesondere die Patienten mit lokal fortgeschrittener Erkrankung von einer sequenziellen RCT, die unter initialer Chemotherapie keinen Progress erleiden [70]. Des Weiteren kann die Radiotherapie bei symptomatischen Metastasen und metastasenbedingten Komplikationen eingesetzt werden [71].

1.2.5 Einfluss von Diabetes mellitus und antidiabetischer Therapie auf das Pankreaskarzinom

Diabetes mellitus Typ 1 ist charakterisiert durch einen absoluten Insulinmangel aufgrund einer immunologischen Schädigung von β -Zellen des Pankreas. Im Vergleich dazu ist Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) eine multifaktorielle Systemerkrankung und entsteht aus dem Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Lebensstilfaktoren und geht mit gestörter Glukosetoleranz, verminderter Insulinsensitivität bei relativem, und im Verlauf auch absolutem Insulinmangel, einher [72]. Im Zuge der demografischen Entwicklung und steigenden Prävalenz des metabolischen Syndroms, bedingt durch „moderne“ Ernährungsgewohnheiten und Bewegungsmangel, hat die Inzidenz des DM2 weltweit zugenommen und wird auch in Zukunft weiter ansteigen. Während im Jahre 1980 noch 153 Mio. Patienten an Diabetes erkrankt waren, stieg die Anzahl der Diabetiker bis zum Jahr 2008 auf 347 Mio. an. Somit betrug die weltweite Prävalenz des Typ-2-Diabetes 9,8 % bei Männern und 9,2 % bei Frauen [73]. In der

BRD betrug die Prävalenz von Diabetes mellitus in der Altersgruppe der 18-79-Jährigen im Jahr 2013 7,2 % entsprechend einer Patientenzahl von 4,6 Mio. Dabei betrug der Anteil der Typ-1-Diabetiker unter den Erkrankten lediglich 1,1 % [74]. Seit Langem sind die Folgeerkrankungen von Diabetes aufgrund mikro- und makroangiopathischer Schädigung bekannt. In den letzten Jahrzehnten mehrten sich zudem Hinweise, dass Diabetiker ein höheres Risiko für Krebserkrankungen tragen. Dazu zählen Malignome der Leber, der Gallenwege, des Magen, des Kolorektums, der Niere, der Blase, der Mamma, des Endometriums sowie des Pankreas [75–77]. Obwohl einige Studien kein signifikant erhöhtes Risiko für Pankreaskarzinomerkrankungen bei Typ-1-Diabetikern finden konnten [78,79], zeigte eine Meta-Analyse von Stevens et al. ein erhöhtes relatives Risiko von 2,0 für Pankreaskarzinome bei Patienten mit Typ-1-Diabetes. Da bei dieser Arbeit jedoch weder die histologische Entität der Pankreasneoplasie, noch die Unterscheidung zwischen Typ-1-Diabetes und *maturity onset diabetes of the young* (MODY) berücksichtigt wurden, bleibt eine Assoziation von Typ1-Diabetes und PDA jedoch fraglich [80]. Für Typ-2-Diabetiker zeigte die Meta-Analyse von Ben und Mitarbeitern eine Erhöhung des relativen Risikos, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken auf 1,94 [76]. Da sich die Zuordnung von DM2 zu den Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms überwiegend auf Daten epidemiologischer Studien stützt, ist die Herstellung eines Kausalzusammenhangs jedoch problematisch. Erschwerend kommt hinzu, dass bei einem Teil der Patienten ein Diabetes mellitus, im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms, der manifesten Tumorerkrankung vorausgeht [81–83]. Dieser Umstand ist konsistent mit der inversen Korrelation zwischen dem Pankreaskarzinomrisiko und der Dauer der Diabeteserkrankung [84]. So zeigte die Arbeit von Pannala et al., dass 74 % der Pankreaskarzinompatienten, die gleichzeitig an DM2 erkrankt waren, eine Krankheitsdauer von weniger als 2 Jahren aufwiesen [85]. Die Zusammenhänge zwischen DM2 und PDA sind also komplex und bidirektional. Daher ist die tatsächliche Erhöhung des PDA-Risikos durch DM2 nicht sicher eingrenzbar.

Auch die Wahl der antidiabetischen Therapie bei Typ-2-Diabetikern scheint Einfluss auf das Krebsrisiko und insbesondere auf das Pankreaskarzinomrisiko zu nehmen.

Die hierfür vorliegenden Daten sind jedoch heterogen und teilweise widersprüchlich. Während einige Autoren den Gebrauch von Insulin und Insulinanaloga mit einem erhöhten Risiko für PDA in Verbindung bringen [86–88], zeigte die Arbeit von Iocara et al. eine Assoziation zwischen Insulin glargin und einem reduzierten Pankreaskarzinomrisiko [89]. Auch für Sulfonylharnstoffe existiert keine klare Datenlage: In einigen

Studien zeigt sich eine Erhöhung des PDA-Risikos durch eine Therapie mit Sulfonylharnstoffen [87,90], in einer Meta-Analyse von Soranna et al. sind diese jedoch ohne Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für PDA [91]. Vor allem aber Metformin scheint aus der Sicht epidemiologischer Daten sowohl eine protektive Wirkung hinsichtlich des Erkrankungsrisikos für PDA bei Diabetikern zu haben [92,93], als auch das Überleben von Pankreaskarzinompatienten zu verbessern [94].

1.3 Tiermodelle des PDA

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um ein naturnahes Pankreaskarzinommodell zu etablieren. Bereits Mitte der 1970er Jahre gelang die Induktion von Pankreaskarzinomen bei syrischen Hamstern durch die subkutane Injektion des Karzinogens N-Nitrosobis(2-oxopropyl)Amine (BOP) [95]. Auch wenn diese Karzinome hinsichtlich Histologie und genetischem Profil starke Ähnlichkeit mit humanen Karzinomen aufweisen, wird dieses Modell dadurch eingeschränkt, dass neben den häufigen Mutationen, wie z.B. *Kras*, eine Vielzahl von unbekanntem Mutationen durch BOP ausgelöst werden und Hamster genetisch nur unzureichend mit dem Menschen vergleichbar sind. Bei Mäusen verursacht BOP hingegen überwiegend Malignome von Lunge und Leber [96]. Auch andere Karzinogene führen bei systemischer Applikation nicht zur pankreasspezifischen Tumorentwicklung in der Maus. Die chemische Induktion von Pankreaskarzinomen bei Mäusen ist daher nur mittels direkter Implantation von 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) als Feststoffpellet in den Pankreaskopf nach Laparotomie möglich. Da bei diesem Modell die perioperative Mortalität der Versuchstiere sehr hoch und die Anzahl der Tiere, die ein PDA entwickeln, mit unter 40 % jedoch sehr gering ist, scheint es in Anbetracht eleganterer Alternativen für eine breite Anwendung wenig geeignet [97].

Mit Hilfe von Gentechnik gelang es transgene Mäuse zu schaffen, s. g. genetisch modifizierte Mäuse (GEM), die im Laufe ihres Lebens Malignome des Pankreas entwickeln. Bereits 1991 entwickelten Sandgren und Kollegen ein transgenes Modell, bei dem die Überexpression des c-myc-Onkogens unter Kontrolle des Promotors des azinuzellspezifischen Elastase 1-Gens zur Tumorentwicklung führte. Die daraus resultierenden Tumoren waren von gemischt azinär-duktalem Histologie und Vorläuferläsionen, wie z.B. PanINs, wurden nicht beobachtet [98]. Des Weiteren ist hierbei anzumerken, dass die Überexpression von *MYC* bei der Pathologie des PDA keine oder nur eine sehr geringe Rolle spielt [11]. Nachdem sich im Laufe der Jahre abzeichnete,

dass die Mutation von *KRAS* einer der ersten und wichtigsten Schritte der Karzinogenese des PDA ist, versuchte man onkogenes *KRAS* mit den Promotoren von Cytokeratin-19 oder Elastase 1 zu koppeln. Dies führte lediglich zu Inflammation oder zu prä-malignen Läsionen von gemischt azinär-duktalem Histologie [99,100]. Erst Hingorani und Mitarbeitern gelang es durch Verwendung eines Cre/loxP-Systems transgene Mäuse zu züchten, die im Laufe ihres Lebens das volle Spektrum an PanINs entwickelten, welche zu duktalem Adenokarzinomen fortschritten. Diese Tiere werden als *PDX-1-Cre; LSL-Kras^{G12D}* bzw. *P48^{+Cre}; LSL-Kras^{G12D}*-Mäuse bezeichnet. Durch Expression einer Rekombinase (Cre) im Lokus eines pankreasspezifischen Transkriptionsfaktors (PDX-1 bzw. P48) wird im Verlauf der pankreatischen Organogenese eine vor onkogenes *Kras^{G12D}* geflochte Stopp-Box exzidiert und *Kras^{G12D}* der Transkription zugänglich gemacht [101]. Auf Basis dieses Modells wurden weitere transgene Mausmodelle etabliert, mit denen sich die Auswirkungen der verschiedenen Onko- und Tumorsuppressorgene auf den Differenzierungsgrad und das Metastasierungsverhalten des PDA untersuchen lassen [102,103]. Besonders hervorzuheben ist dabei die Kombination von onkogenem *Kras^{G12}* und mutiertem *Trp53^{R172H}* in *LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}*; Pdx1-Cre-Mäusen, welche PDAs mit ausgeprägtem Metastasierungsverhalten und Gemcitabinresistenz aufweisen [104,105]. Transgene Mausmodelle dieses Typs bieten zahlreiche Vorteile: naturnahe, schrittweise Progression des PDA über prä-maligne Läsionen, Möglichkeiten zur Untersuchung einzelner Signaltransduktionswege und hohe Ähnlichkeit zur Histologie humaner PDAs. Nachteilig sind, neben den hohen Entwicklungskosten, einige Abweichungen von der humanen Tumorentwicklung. Die genetischen Veränderungen erfolgen in o. g. Tiermodellen gleichzeitig in einer frühen Phase der Embryonalentwicklung und betreffen daher alle Zellen des Pankreas. Beim Menschen hingegen ist das PDA eher eine Erkrankung des höheren Lebensalters und geht aus einigen wenigen Zellen hervor, die schrittweise verschiedene Mutationen akquiriert haben. Durch neue Entwicklungen ist die Expression von Onkogenen bzw. mutierten Tumorsuppressorgenen jedoch auch zeitlich steuerbar. So wurde von Collins und Kollegen ein Mausmodell geschaffen, bei dem die Transkription von *Kras* durch ein Doxycyclin-sensibles „Tet-on-System“ beliebig induzierbar ist [106]. Ebenso ergibt sich durch Fusion des Cre-Rekombinase-Gens mit einem mutierten Tamoxifen-sensiblen Estrogenrezeptor eine Möglichkeit, Gene gezielt zu aktivieren [107].

Ein weiterer Ansatz zur Erforschung des Pankreaskarzinoms besteht in der Transplantation von Tumorgewebe oder Tumorzelllinien in Mäuse. Schon Ende der 1960er Jahre gelang Rygaard und Povlsen Gewebeproben eines humanen Kolonkarzinoms in eine athymische Nacktmaus subkutan zu transplantieren. Damit legten sie den Grundstein für s.g. *patient-derived xenograft*-Modelle [108]. Durch die fehlende T-Zell-vermittelte Immunreaktion lässt sich eine Vielzahl von humanem Gewebe oder Zellen auf athymische Nacktmäuse (nu/nu-Mäuse) und immundefiziente Mäuse (SCID-Mäuse) übertragen. Die Transplantation kann entweder subkutan oder orthotop direkt in das Pankreas erfolgen. Die Vorteile des subkutanen Modells liegen in der einfachen Handhabung, den niedrigen Kosten und der einfachen Kontrolle der Tumorprogression während des Versuchs. Nachteilig sind aufgrund der unphysiologischen Lokalisation die fehlende Beurteilbarkeit der Tumor-Stroma-Interaktion und die veränderte Distribution von Pharmaka. Kommen bei der Xenotransplantation humane Tumorzelllinien zum Einsatz, so dient dies zwar einer besseren Vergleichbarkeit einzelner Experimente, jedoch spiegeln diese Modelle nicht die interindividuelle Heterogenität humaner PDAs wider. Sowohl beim subkutanen, als auch beim orthotopen Modell besteht der Hauptnachteil, unabhängig von der Art des Transplantats, in der fehlenden inflammatorischen Reaktion des umliegenden Gewebes auf den Tumor, welche beim Menschen eine wichtige Komponente der Tumorphysiologie darstellt [109]. Um dies zu umgehen, bietet sich die Verwendung eines syngenen orthotopen Modells an, bei dem murine Tumorzellen in das Pankreas immunkompetenter Mäuse eingebracht werden [110,111]. Die Zelllinie Panc02 ist dabei die am weitesten verbreitete Zelllinie und entstammt einem PDA einer C57BL/6-Maus [112]. Da diese Zelllinie seit mehr als 30 Jahre im Umlauf ist, bleibt es allerdings fraglich, in wie weit die Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen vergleichbar sind, da die Zellen im Laufe der Jahre durch häufige Passagen und Kontamination Veränderungen ihrer genetischen Konstitution erfahren haben dürften [113–115]. Durch die Kultivierung von Zellen aus den Adenokarzinomen von GEM-Mäusen stehen neue murine Tumorzelllinien zur Verfügung, welche histokompatibel zu C57BL/6-Mäusen sind [116,117]. Diese syngenen orthotopen Modelle sind zwar technisch anspruchsvoll, bieten jedoch eine kosteneffektive Möglichkeit zur Untersuchung experimenteller Therapien und des Tumormikromilieus.

1.4 Verwendete Chemotherapeutika

1.4.1 Gemcitabin

Gemcitabin (2',2'-Difluoro 2'-Deoxycytidin) ist ein Pyrimidin-Analogon und wurde 1995 zur Therapie des PDA zugelassen [118]. Es findet Anwendung als Mono- oder Kombinationstherapie bei zahlreichen Malignomen: Pankreas-, Brust-, Urothel- und Ovarialkarzinom, NSCLC, sowie einigen hämatologischen Neoplasien [119]. Gemcitabin wird zur Therapie des PDA in einer Dosierung von 1000 mg/m² als 30-minütige Kurzinfusion einmal wöchentlich über sieben Wochen intravenös verabreicht, gefolgt von einer Woche Pause. Danach erfolgt die Applikation einmal wöchentlich über 3 Wochen, gefolgt von einer Woche Pause. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören, neben der Myelosuppression mit konsekutiver Panzytopenie, Übelkeit, Erhöhung der Transaminasen und der alkalischen Phosphatase, Proteinurie, Hämaturie, Dyspnoe und Exantheme [120]. Dieses Chemotherapeutikum gelangt über verschiedene natriumabhängige und -unabhängige Nukleosidtransporter in die Zelle. Dabei ist vor allem der *human equilibrative nucleosid transporter 1* (hENT1) von zentraler Bedeutung [121]. Gemcitabin wird durch die Deoxycytidinkinase und zu einem geringen Teil auch durch die mitochondriale Thymidinkinase 2 phosphoryliert [122] und weiter durch Nukleotidkinasen zu Gemcitabindiphosphat und –triphosphat umgewandelt. Gemcitabin wird durch die Deoxycytidindesaminase in Difluorodesoxyuridin umgewandelt und somit inaktiviert, besitzt jedoch im Vergleich zum physiologischen Substrat, Desoxycytidin, eine 50 % geringere Affinität zu diesem Enzym [123]. Der Abbau der Reaktionsprodukte erfolgt durch die Desoxycytidylatdesaminase, welche die Umwandlung von Gemcitabinmonophosphat zu Difluorodesoxyuridinmonophosphat bewerkstelligt und die 5'-Nukleotidase, die Gemcitabinmonophosphat zu Gemcitabin katalysiert [119]. Die Hemmung der DNA-Synthese durch Gemcitabin beruht auf verschiedenen Mechanismen und ist nicht auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt. Gemcitabintriphosphat konkurriert mit Desoxycytidintriphosphat an der DNA-Polymerase und wirkt als schwacher Inhibitor dieses Enzyms [124]. Nach Inkorporation von Gemcitabintriphosphat in den DNA-Strang kommt es zum Einbau eines weiteren Nukleotids und anschließend zum Abbruch der DNA-Synthese und Einzelstrangbruch [125,126]. Diese Schäden sind refraktär gegenüber den üblichen Mechanismen der DNA-Reparatur [127]. Gemcitabindiphosphat ist ein potenter Inhibitor der Ribonukleosidreduktase und führt zu einer Verringerung der für die DNA-Synthese benötigten Desoxyribonucleotide, zum anderen zu einer verstärkten Aktivität der Desoxycytidinkinase und

somit zur vermehrten Phosphorylierung von Gemcitabin. Da nun verhältnismäßig weniger Desoxycytidintriphosphat zur Verfügung steht, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Inkorporation von Gemcitabintriphosphat in die DNA [128]. Zusätzlich wird die Desoxycytidindesaminase durch Gemcitabindiphosphat gehemmt und der Abbau von Gemcitabin verzögert. Außerdem verursacht die Inkorporation von Gemcitabin in die DNA eine Stabilisierung des *Topoisomerase-I-Cleavage*-Komplex, welche zu Strangbrüchen bei Kollision mit der fortschreitenden Replikation führt [129,130].

1.4.2 Metformin

Metformin gehört neben Phenformin und Buformin zur Gruppe der Biguanide und ist der einzige Vertreter dieser Stoffgruppe, der in Deutschland auch heute noch klinische Anwendung in der Pharmakotherapie des DM2 findet. Bereits 1929 wurde der antihyperglykämische Effekt der Biguanide entdeckt [131]. Nach klinischer Erprobung erfolgte die Zulassung für Metformin, Buformin und Phenformin in den 1950er Jahren [132]. Nach dem schlechten Abschneiden der Biguanide in den UGDP I & II- Studien ging die Zahl der Biguanidverordnungen in den 1970er Jahren stark zurück [133,134]. Zudem wurden Buformin und Phenformin nach Berichten über das Auftreten schwerer Laktatazidosen in zahlreichen Ländern aus dem Handel genommen [135]. Metformin allerdings, zeigte sich bei Auswertung der UKPDS34-Studie anderen Standardtherapien, im Hinblick auf Gesamt- und Diabetesbezogene-Mortalität, signifikant überlegen [136]. Daraufhin erfolgte die Empfehlung für Metformin als Erstlinientherapie bei übergewichtigen Diabetikern und die Zulassung in den USA 1994. Auch heute noch, 20 Jahre nach der Markteinführung in den Vereinigten Staaten, gilt Metformin als der Goldstandard in der Behandlung übergewichtiger Typ-2-Diabetiker. Die Anwendung erfolgt oral und die Kombination mit oralen Antidiabetika, Inkretinmimetika oder Insulin ist möglich. Im Gegensatz zu anderen Therapeutika, wie beispielsweise Sulfonylharnstoffe oder Glinide, beherbergt die Metformintherapie kaum ein Hypoglykämierisiko [137]. Metformin entfaltet seine blutglukosekonzentrationsenkende Wirkung hauptsächlich über die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese. Der Import in die Hepatozyten erfolgt durch den *organic cation transporter-1* (OCT-1) [138]. Metformin führt zu einer Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und verursacht so eine Verschiebung des intrazellulären AMP:ATP-Verhältnisses zu Gunsten von AMP. Dieses bindet an die γ - Untereinheit der AMP-abhängigen Kinase (AMPK), welche daraufhin an der Aktivierungsschleife der katalytischen α -Untereinheit phosphoryliert wird [139].

Die Aktivierung der AMPK erfolgt entweder über die Leber Kinase B1 (LKB1) oder über Calmodulin-abhängige-Kinasen-Kinasen (CaMKK) [140]. AMPK hemmt den *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) durch Phosphorylierung des Upstream-Regulators Tuberin (TSC2) und mTORC1-Untereinheit Raptor. Dadurch wird die Translation vieler Proteine, die für eine schnelle Zellproliferation benötigt werden, gehemmt [141]. Zudem zeigte Metformin in *in vitro*-Studien antiproliferative Effekte, die AMPK unabhängig sind. Dabei erfolgte die vermehrte Expression von REDD1, einem Transkriptionsziel von p53, mit der Folge einer verstärkten Hemmung von Cyclin D1 [142]. Da für zahlreiche Tumorzelllinien der antiproliferative Effekt von Metformin, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nachgewiesen wurde [143–146], ist der Einsatz einer zusätzlichen Metformintherapie bei Karzinompatienten Gegenstand aktuell andauernder klinischer Studien [147].

1.5 Zielstellung

Da sich, trotz jahrzehntelanger Forschung, die Prognose des Pankreaskarzinoms nur marginal verbessert hat, werden dringend neue, innovative Therapien für diese Erkrankung benötigt. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung neuer muriner Karzinomzelllinien, deren genetisches Profil starke Ähnlichkeit mit humanen PDA aufweist sowie die Etablierung eines naturnahen und kosteneffektiven Mausmodells, um den Einfluss von Metformin und Gemcitabin, alleine oder in Kombination, auf die Pathophysiologie der Karzinomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels eines syngenen orthotopen Pankreastumormodells zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 *In-vitro*-Versuche

2.1.1 Zelllinien und allgemeine Zellkultur

Es wurden drei murine Adenokarzinomzelllinien untersucht: 6606PDA, 6606I und 7265PDA. Die Zelllinien 6606PDA und 6606I wurden ursprünglich aus einem pankreatischen Adenokarzinom bzw. der dazugehörigen Lebermetastase einer genetisch veränderten C57BL/6J Maus isoliert. Diese Karzinome entstanden durch gewebespezifische genetische Manipulation mittels des Cre/loxP-Systems. Nach einer durch den p48-Promotor vermittelten pankreasspezifischen Expression der Cre-Rekombinase entfernt diese eine Stopsequenz vor dem *Kras*^{G12D} Gen und erlaubt somit die Expression dieses Onkogens im Pankreasgewebe. Die Zelllinie 7265PDA wurde aus einem murinen pankreatischen Adenokarzinom isoliert, welches durch eine Pdx1-creER-induzierte Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} und einer *p53*-Mutation (*p53*^{R172H}) entstanden ist. Pdx1-creER bezeichnet hierbei ein mittels des Pdx1-Promotors im Pankreas exprimiertes Fusionsprotein aus der cre Rekombinase und dem modifizierten Estrogenrezeptor. Die nukleäre Lokalisation dieser Rekombinase kann mittels Tamoxifen induziert werden und entfernt eine Stopsequenz vor oben genannten Genen und erlaubt deren pankreasspezifische Expression. Die drei Tumorzelllinien wurden jeweils in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium mit zusätzlich 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland, FG 0435) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, A 2212) auf einer Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem C150-Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert. Die Passagierung der Zellen und das Platieren der Zellen für einzelne Experimente erfolgte in einer NuAire 440- Sicherheitswerkbank (ibs | tecnomara GmbH, Fernwald, Deutschland) unter sterilen Bedingungen. Für die jeweiligen Assays wurde das Medium entfernt und die Petrischalen mit PBS (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, 10010-015, pH 7,4) gespült. 1ml Trypsin EDTA 0,5 g/l (Biochrom GmbH, L 2103-20G) wurde auf die Zellen aufgetragen und diese für zwei Minuten bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde im Umkehrmikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert und der Trypsinierungsvorgang durch Auftragen von 10 ml Medium gestoppt. Danach wurde die so erhaltene Zellsuspension aus der Petrischale in ein 50ml-Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert (Beckman Coulter GmbH,

Krefeld, Deutschland, CS6RF). Der Überstand an Medium wurde entfernt und verworfen und die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert, um die Zellkonzentration mittels Auszählen in einer Neubauerzählkammer zu errechnen.

2.1.2 WST-1-Assay

Das schwach rot gefärbte wasserlösliche Tetrazoliumsalz (WST-1) wird an der Zellmembran unter Verbrauch von NADH aus dem Zellinneren zu dunkelrotem Formazan reduziert. Der Umsatz von WST-1 kann mittels Spektrophotometer quantifiziert werden und korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Da in der Regel Stoffwechselaktivität und Zellviabilität miteinander positiv korrelieren, wird der WST-1-Assay häufig zur Beurteilung von Proliferation und Zelltod herangezogen. Einzelne WST-1-Assays wurden als Triplikate auf 96 well plates durchgeführt. Jedes well wurde mit 100 μ l Zellsuspension (4×10^4 Zellen/ml, entspricht 4000 Zellen pro well) befüllt und bei o. g. Bedingungen 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit Gemcitabin bzw. Metformin. Für die Gemcitabinverdünnungsreihe wurden 10 mg Gemcitabin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland, G6423) durch Injektion von 667,4 μ l PBS aufgelöst, sodass man eine 50 mM Gemcitabinlösung erhielt. Durch die Verdünnung von 2 μ l der 50 mM Gemcitabinlösung mit 10 ml Medium wurde eine 10 μ M Gemcitabin-Stammlösung hergestellt, welche zur Herstellung von Medium mit folgenden Gemcitabinkonzentrationen diente: 0,625 μ M, 0,125 μ M, 0,025 μ M und 0,005 μ M. Für die Metforminverdünnungsreihe wurden 66,25 mg Metformin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D150959) in 0,4 ml PBS aufgelöst, um eine 1 M Metforminstammlösung herzustellen. Diese diente zur Herstellung von Medium mit folgenden Metforminkonzentrationen: 0,8 mM, 4 mM, 20 mM und 100 mM. Für die Kombinationsbehandlung von Metformin mit Gemcitabin wurden die Zellen in 100 μ l frischem Medium bzw. den oben benannten Therapeutika für weitere 48 Stunden im Inkubator belassen. Danach wurde zu jedem well 10 μ l WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Die 96well-Platte wurde auf einem CM-9-Orbitalschüttler (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) über eine Minute bewegt und dann in den VICTOR X3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Baesweiler, Deutschland) eingeschoben. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte nach 0, 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach Zugabe des WST-1-Reagenzes. Von den erhaltenen Absorptionen wurde die durchschnittliche Absorption von wells, die Medium und WST-1-Reagenz, aber keine Zellen enthielten, abgezogen. Aus den so erhaltenen drei Messwerten wurde der Mittelwert berechnet. Im

linearen Bereich des Assays, d. h. aus den 1 h-Werten, wurde eine Dosis-Response-Kurve für den Einfluss der unterschiedlichen Gemcitabinkonzentrationen auf die Absorption erstellt.

2.1.3 BrdU-Assay

Das Pyrimidinanalogon 5-Bromo-2'-Desoxyuridin konkurriert während der Zellproliferation mit Thymidin um die Inkorporation in die DNA. Nach Denaturierung der DNA erfolgt die Bindung eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers an BrdU. Nach Zugabe von Tetramethylbenzidin wird dieses Chromogen durch die Peroxidase oxidiert. Über eine photometrische Messung dieses Stoffumsatzes lässt sich die Menge an inkorporierten BrdU als Maß für die Zellproliferation quantifizieren. In identischer Vorgangsweise wie beim WST-1- Assay wurden 4000 Zellen pro well in wells einer 96 well Platte aufgebracht und die Zellen 24 Stunden später mit Therapeutika behandelt. Anschließend wurden pro well 10 µl BrdU-labeling-reagent (Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I, Roche Diagnostics GmbH) hinzugegeben und die Inkubation 24 Stunden fortgesetzt. Das Medium und die BrdU-Lösung wurde entfernt und durch 200 µl Fixierungslösung ersetzt, welche nach 30 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur durch Ausklopfen der 96well Platte auf einem Zellstofftuch entfernt wurde. Peroxidase-konjugierte Anti-BrdU-Antikörper wurden in 1,1 ml destilliertem Wasser gelöst, um eine Vorratslösung herzustellen. 100 µl dieser Vorratslösung wurden unmittelbar vor Verwendung mit 10 ml einer Antikörperverdünnungslösung zu einer Arbeitslösung 1:100 verdünnt. Von dieser wurden 100 µl pro well aufgetragen und nach neunzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Ausklopfen auf einem Zellstofftuch entfernt. Anschließend wurde jedes well dreimal mit 200 µl PBS (Washingbuffer) gespült und dieses wieder entfernt. Danach wurden pro well 100 µl TMB-Substratlösung aufgetragen, bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und die photometrische Messung mittels VICTOR X3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) bei 450 nm durchgeführt. Aus den einzelnen Absorptionswerten der Gemcitabinkonzentrationen wurde mit Hilfe der SigmaPlot 12.0 Software eine Dosis-Response-Kurve für jede Zelllinie erstellt, anschließend mittels Standard-Kurven-Analyse die einzelnen EC50-Werte ermittelt und aus diesen Mittelwert und Standardabweichung errechnet (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Bei der Behandlung mit Metformin bzw. Gemcitabin+Metformin wurden die entsprechenden Zellen zunächst für eine Stunde mit einer 20 mM Metforminlösung vorbehandelt und anschließend die jeweiligen Medien hinzugefügt.

2.1.4 Trypanblau-Assay

Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff und dient der Vitalfärbung von Zellen. Avitale Zellen mit beschädigter Zellmembran nehmen diesen auf und stellen sich im Durchlichtmikroskop blau dar. Einzelexperimente wurden in Form von Duplikaten mittels 24 well Platten durchgeführt. Jedes well wurde mit 500 μ l Zellsuspension (6×10^4 Zellen/ml entspricht 3×10^4 Zellen pro well) befüllt und bei o.g. Bedingungen 24 Stunden inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 48 Stunden mit Medium ohne Zusatz oder mit Medium mit 0,625 μ M Gemcitabinkonzentration. Um den Zelltod zu evaluieren, wurde das Medium entfernt und für jedes well in einem separaten 1,5 ml- Mikroreaktionsgefäß verwahrt. Direkt im Anschluss wurden 100 μ l PBS pro well aufgetragen, die 24 well Platte leicht geschwenkt und das PBS den entsprechenden Mikroreaktionsgefäßen zugeführt. Anschließend wurden zu jedem well 3 Tropfen EDTA-Trypsin hinzugefügt, das Ablösen der Zelle vom Untergrund mittels Umkehrmikroskop kontrolliert und die Reaktion durch das Zurückführen des Mediums aus den Mikroreaktionsgefäßen in die entsprechenden wells gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen gleichmäßig suspendiert. pro well wurden 50 μ l Zellsuspension mit 50 μ l 0,4 %iger Trypanblaulösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt und anschließend der Prozentsatz trypanblaupositiver Zellen durch Auszählung in der Neubauerzählkammer ermittelt. Analog zum o.g. Versuchsaufbau erfolgte die Behandlung mit Gemcitabin, Metformin und der Kombination aus beiden Therapeutika. Hierzu wurde Medium mit der Gemcitabinkonzentration 0,1 μ M und Medium mit der Metforminkonzentration 20 mM verwendet. Die entsprechenden Zellen wurden vorher jeweils für eine Stunde mit Metformin vorbehandelt.

2.1.5 Western Blot

Der Westernblot dient dem semiquantitativen Nachweis bestimmter Proteine. Nach dem diese elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen wurden, werden sie durch primäre Antikörper gebunden. Anschließend werden sekundäre peroxidase-konjugierte Antikörper aufgetragen, welche ein Substrat umsetzen. Das Reaktionsprodukt wird dann mittels Chemilumineszenz nachgewiesen und ermöglicht die Darstellung der Proteinbanden.

Um die Proteine der Zellen analysieren zu können, wurden pro well einer 6 well Platte 1×10^5 Zellen in 2 ml Medium für 24 h kultiviert und danach für 24 h bzw. 48 h mit Normalmedium, 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin + 20 mM Metformin und 20

mM Metformin behandelt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, mit 200 µl Lysispuffer und mittels eines Schabers von den wells entfernt und jeweils in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. 10 ml des Lysisbuffers enthielt eine Tablette Phosphostop (Roche Diagnostics GmbH) und 100 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Lysispuffers

Substanz	Konzentration	Menge
Tris [µl] pH7,5 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1 M	100
NaCl [µl] (Carl Roth GmbH & Co. KG)S	5 M	20
EDTA [µl] (Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland)	250 mM	4
Triton-X-100 [µl] (Carl Roth GmbH & Co. KG)S	10 %	500
NaN ₃ [µl] (Carl Roth GmbH & Co. KG)S	4 %	50
PMSF [µl] (Carl Roth GmbH & Co. KG)S	100 mM	200
H ₂ O [ml]		9,026

Die Proteinlysate wurden nach dem Auftauen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in einer vorgekühlten 5804R-Zentrifuge (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 15 Minuten lang bei 10000 x g zentrifugiert, um Präzipitate und größere Zellbestandteile zu entfernen. Im abgenommenen Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt, indem man 12,5 µl des Überstandes mit 12,5 µl Aqua bi dest. verdünnte. Da die Proteinbestimmung im Doppelansatz erfolgte, wurden je 12,5 µl der verdünnten Probe auf ein well einer 96 well Platte aufgetragen und 100 µl eines

BCA-Cu²⁺-Gemisches (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) pro well hinzugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation der Proben bei 37 °C auf dem Schüttler (in Dunkelheit) erfolgte die Absorptionsmessung bei 563 nm im Sunrise-ELISA-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) und die Berechnung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve. Entsprechend des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins wurde die Acrylamidkonzentration des Trenngels ausgewählt. Für Cleaved-Caspase-3 wurde ein 14 %iges und für Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ein 6 %iges Trenngel verwendet. Das Trenngel wurde aus den entsprechenden Komponenten zwischen zwei Glasplatten gegossen und das obere Ende mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und an diese Stelle das Sammelgel gegossen (siehe Tab. 2). Um Taschen für die Probenflüssigkeit zu schaffen, wurde ein Probenkamm eingesetzt, welcher nach der Polymerisation des Acrylamides wieder entfernt wurde. Danach wurden die Glasplatten mit dem Gel in die MiniPROTEAN-Elektrophoreseeinheit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) eingebaut und mit Laufpuffer pH 8,3 (Tris 30,3 g, Glycin 144 g, SDS 10 g) aufgefüllt, bis die Taschen ca. 4 mm überschichtet waren. Die Proteinlysate wurden mit entsprechenden Mengen an 6 x Ladebuffer und 1x Ladebuffer versetzt, um 42 µl einer 40 µg/ul Proteinlösung zu erhalten. Nach fünfminütigen Erhitzen auf 95°C und einer dreisekündigen Zentrifugation bei 10.000 g wurden die Proben in die Taschen pipettiert und bei 20 mA im Sammelgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben bei 40 mA im Trenngel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Stromquelle diente ein Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH). Zur visuellen Kontrolle der Elektrophoresefront wurde peqGold-Proteinmarker IV (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) als Längenstandard verwendet.

Für den darauffolgenden Semi-Dry-Blot wurden 3 mmCHR-Blottingpapiere (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in Kathodenpuffer (Tris 25 mM, Glycin 40 mM 0,751 g, Methanol 20 % 200 ml), Anodenpuffer I (Tris 300 mM 34,34 g, Methanol 20 % 200 ml) und Anodenpuffer II (Tris 25 mM 34,34 g, Methanol 20 % 200 ml) getränkt. Die Membran wurde für 15 Sekunden in 100 %igem Methanol eingelegt, anschließend für zwei Minuten in Aqua bidest. gegeben und für mind. 5 Minuten in Anodenpuffer II equilibriert. Der Anordnung der Materialien im Semi-Dry-Blotter (PEQLAB Biotechnologie GmbH) erfolgte von unten nach oben wie folgt: Zwei Blottingpapiere mit Anodenpuffer I, ein Blottingpapier mit Anodenpuffer II, Membran, Gel und drei Blottingpapiere mit Kathodenpuffer. Anschließend wurde eine Spannung von

8V an die Elektroden gelegt und bei einer Stromstärke von 2,8 mA/cm² für zwei Stunden mit Hilfe eines Standard Power Pack P25 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) geblottet. Nach dem Auseinanderbauen der Blotvorrichtung wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und mit 10 ml BSA-Lösung für eine halbe Stunde bei 37°C blockiert. Anschließend wurden die primären Antikörperlösungen in der BSA-Lösung verdünnt und aufgetragen. Hierzu wurde für den Nachweis von PARP und Cleaved Caspase-3 monoklonale Anti-PARP bzw. Anti-Cleaved Caspase-3-Kaninchenantikörper (Cell Signaling Technology Europe, B.V. Leiden, Niederlande; #9542 & #9661) 1:1000 verdünnt verwendet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Nachweis von β -Aktin erfolgte mittels monoklonalem Anti- β -Aktin-Mausantikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Monoclonal, Clone AC-74, A2228) 1:20 000 verdünnt, welcher bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert wurde. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST und anschließend zweimal für 15 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurden die sekundären Antikörper aufgetragen. Hierzu wurden zum Nachweis von PARP und Cleaved Caspase-3 peroxidasekonjugierte Anti-Kaninchen-Antikörper (Cell Signaling Technology Europe, #7074,) 1:2000 mit 2,5 %igem BSA verdünnt, verwendet. Für den β -Aktin-Nachweis wurde ein peroxidaskonjugierter Anti-Maus-Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, A9044) 1:60000 mit BSA verdünnt verwendet. Danach wurde die Membran nochmals mit dreimal TBST für 10 Minuten und zweimal TBS für 15 Minuten gewaschen. Abschließend wurde eine 1:50 verdünnte Pierce ECL-2-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland) auf die Membran aufgetragen, diese für fünf Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und die Proteinexpression mittels luminolverstärkter Chemilumineszenz im ChemiDocXRS-System (Bio-Rad Laboratories) visualisiert und fotografiert.

Die Membranen wurden wieder mit TBS kurz gewaschen, um den gebundenen Antikörper 15 Minuten 37 °C und 15 min bei Raumtemperatur zu stripfen (Stripp- Puffer: 25 mM Glycin, 1 % SDS pH 2). Dann wiederholt sich der übliche Waschvorgang und die Membran wird 30 min bei 37 °C mit 2,5 % BSA geblockt.

Danach erfolgte der Nachweis von β -Aktin mittels monoklonalem Anti- β -Aktin-Mausantikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Monoclonal, Clone AC-74, A2228) 1:20 000 verdünnt, welcher bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert wurde. Als Sekundärantikörper wurde peroxidaskonjugierter Anti-Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A9044) 1:60000 mit BSA verdünnt verwendet. Auch beim Nachweis von

β-Aktin als Kontrolle sind die Wasch -und Entwicklungsprozesse identisch dem ersten Prozedere.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Substanz	Konzentration	Trenngel		Sammelgel
		6 %	14 %	5 %
H ₂ O [ml]	/	4,05	1,34	4,1
Tris pH 8,8 [ml] (Carl Roth GmbH & Co. KG)	1 M	3,75	3,75	0,75
Acrylamid [ml] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	30 %	2	4,7	1
SDS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	10 %	100	100	50
APS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH)	10 %	100	100	50
TEMED [μl] (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)	1 %	10	10	5

2.2 *In-vivo*-Versuche

2.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 336 ± 67 Tage (Mittelwert und Standardabweichung) alte männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Diese entstammten der F1-Generation von C57BL/6J Mäusen mit heterozygoter Leptinmutation (B6.Cg-Lep^{ob/-}). Der Mausstamm wurde ursprünglich von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA) erworben und in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock weiter vermehrt. Die Tierhaltung erfolgte unter Standard-Laborbedingungen mit Futter und Wasser ad libitum. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit der deutschen Gesetzgebung und der EU-Direktive 2010/63/EU durchgeführt.

2.2.2 Orthotope Tumorzellinjektion

Um die Zellen für die Injektion vorzubereiten, wurde die benötigte Anzahl der suspendierten Zellen (Für die Vorarbeit siehe Punkt 1.1.2.) mittels dreiminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm konzentriert und das Pellet in einem entsprechenden Volumen gekühltem PBS aufgenommen, sodass man eine Zellsuspension mit der Konzentration $1,25 \times 10^7$ Zellen/ml erhielt. Diese wurde mit zuvor auf Eis gekühltem Matrigel (BD Bioscience, San José, Californien, USA, Nr: 354248) im Verhältnis 1:1 gründlich vermischt und in einem Mikroreaktionsgefäß auf Eis gelagert. Die Operation der Versuchstiere erfolgte in Isofluran-Inhalationsnarkose mit 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) 0,8 l/min O₂ und 1,6 l/min N₂O (Inhalationsgerät Sulla 808, Dräger Medical, Lübeck, Deutschland). Nach einer s.c. Injektion von 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), um die postoperative Analgesie zu gewährleisten und dem Auftragen einer fünfprozentigen Dexapanthenolsalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde das Tier in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und die Narkose mittels Narkosemaske aufrecht gehalten. Das Abdomen wurde rasiert, mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert und mit einem ca. 2 cm langen, queren Oberbauchschnitt etwa 1 cm unterhalb des Sternums eröffnet (Abb.1 A). Anschließend wurde das Duodenum aufgesucht und mit der Gewebefasspinzette nach Adson-Brown vorsichtig mobilisiert, um den Pankreaskopf darzustellen. Nun wurde die Matrigel-Zell-Suspension gut durchmischt und 20 µl (entsprechend $2,5 \times 10^5$ Zellen) in einer gekühlten Hamiltonspritze aufgezogen. Deren Kanüle wurde vorsichtig in das Pankreasparenchym eingeführt und $2,5 \times 10^5$ Zellen langsam injiziert, sodass bei korrekter Injektion

die Ausbildung einer kleinen Quaddel beobachtet werden konnte. Nach Injektion verblieb die Kanüle für ca. 20 Sekunden im Stichkanal, um eine ausreichende Verfestigung des Matrigels zu gewährleisten (Abb. 1 B). Beim Zurückziehen der Nadel wurde die Injektionsstelle zusätzlich mit einem Wattestäbchen abgedeckt um eine Dissemination der Tumorzellen in den intraperitonealen Bereich zu verhindern. Nach Reposition der Organe wurde die abdominelle Muskulatur durch eine fortlaufende Naht mit einem 5-0 Vicrylfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Bauchhaut durch Einzelknopfnähte mit einem 4-0 Polypropylenfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH) verschlossen (Abb. 1 C). Zudem wurde ein OpSite- Sprühverband (Smith&Nephew, Hamburg, Deutschland) auf die verschlossene Bauchdecke aufgetragen. Durch saches Greifen der Maus an den Pfoten und leichtes Schütteln in alle Richtungen wurde einer Verschlingung von intraabdominellen Organen vorgebeugt. Dann wurde das Tier in Seitenlage vor einer Wärmelampe platziert und das Erwachen aus der Narkose abgewartet.

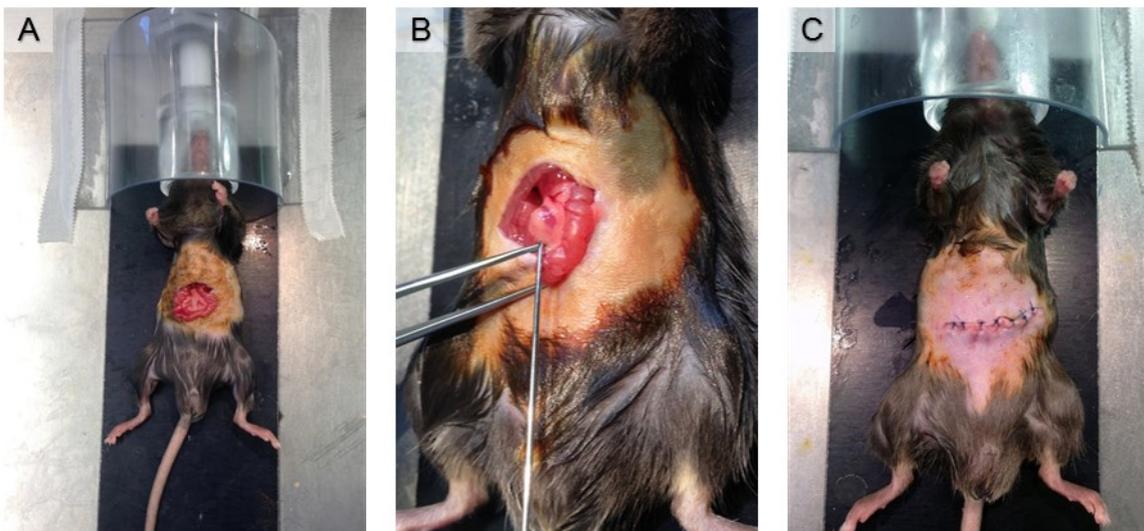


Abbildung 1: Orthotope Tumorzellinjektion. Unter Inhalationsnarkose erfolgte die Querlaparotomie und Mobilisation der Duodenalschlinge (A). Anschließend erfolgte die Injektion des Tumorzell-Matrigel-Gemisches in den Pankreaskopf (B). Der Wundverschluss erfolgte mittels Einzelknopfnähten und Sprühverband (C).

2.2.3 Versuchsaufbau

Zu Beginn des Versuches wurden die Versuchstiere am Tag 0 individuell markiert und es erfolgte unter Isofluran/N₂O-Narkose die retrobulbäre Blutentnahme mittels einer EDTA-beschichteter Glaskapillare. An Tag 7 wurde die Tumorzellinjektion nach dem in Punkt 1.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Unmittelbar postoperativ bis zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme wurde dem Trinkwasser der Versuchstiere 800 mg/l Metamizolnatrium (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zwecks postoperativer Analgesie und zur Vermeidung tumorbedingter Schmerzen hinzugefügt. Durch Punktion der distalen Schwanzspitze mit einer Kanüle wurde an einigen Blutstropfen die Blutglukosekonzentration mittels Blutzuckermessgerät (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) überprüft und eine engmaschige Kontrolle des Körpergewichts und des Gesundheitszustandes der Mäuse durchgeführt (siehe Abb. 2).

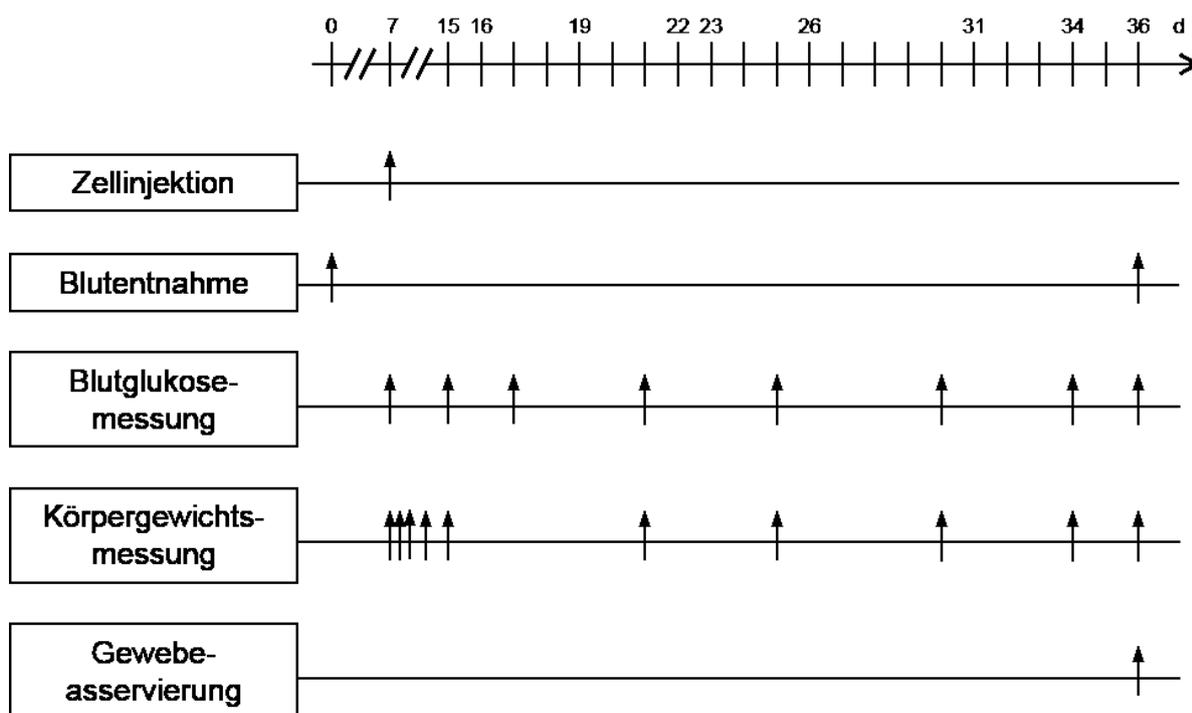


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Interventionen. Am Tag 0 und am Tag 36 erfolgte die Blutentnahme. Am Tag 7 erfolgte die orthotope Tumorzellinjektion. Von Tag 7 bis Tag 36 wurden das Körpergewicht und die Blutglukosekonzentration regelmäßig gemessen. Der Tierversuch endete am Tag 36 nach erfolgter Euthanasie der Mäuse.

In der ersten postoperativen Woche, an Tag 15, wurde mit dem Behandlungsplan begonnen (siehe Abb. 3). Alle Pharmaka bzw. PBS, im Sinne eines Placebos, wurden am Tag der Injektion körpergewichtsadaptiert intraperitoneal appliziert. Die Mäuse des

Metformin-Behandlungsarms erhielten Metformin von Tag 15 bis Tag 22 in einer Dosierung von 250mg/kg Körpergewicht und von Tag 23 bis 36 in reduzierter Dosierung von 125 mg/kg Körpergewicht. Die Versuchstiere der Gemcitabinbehandlungsgruppe erhielten an den Tagen 16, 19, 23, 26, 31 und 34 Gemcitabin in der Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht. Tieren, welche eine Kombinationsbehandlung aus Gemcitabin und Metformin erhielten, wurden beide Pharmaka entsprechend der o.g. Therapieprotokolle der Monotherapiearme appliziert. Der Abstand zwischen Metformin- und Gemcitabininjektion betrug 1,5 Stunden. Die Mäuse des „Sham“- Behandlungsarmes erhielten eine Scheinbehandlung durch PBS-Injektion entsprechend der Häufigkeit des Gemcitabin+Metformin- Behandlungsarmes.

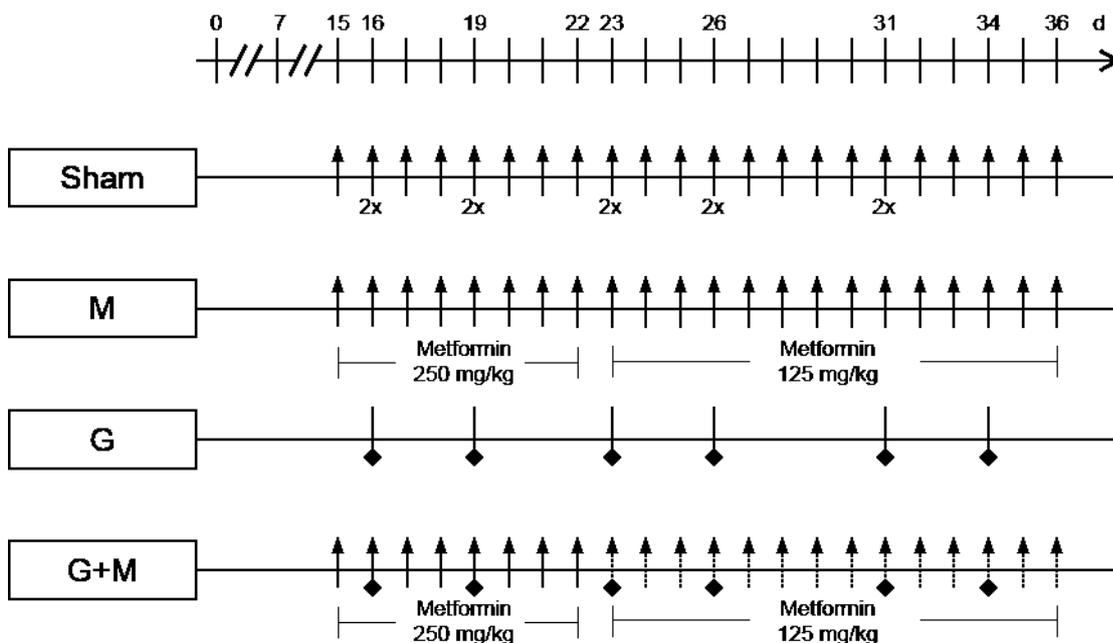


Abbildung 3: Behandlungsplan. Jeweils eine Gruppe von Versuchstieren wurde entweder mit PBS (Sham), Metformin (M), Gemcitabin (G) oder sowohl Metformin als auch Gemcitabin (G+M), wie im Behandlungsplan angegeben, i.p. injiziert. Die Dosis von Metformin betrug 250 mg/kg Körpergewicht während der ersten Woche und 125 mg/kg Körpergewicht in den folgenden zwei Wochen, während die Gemcitabindosis während der gesamten Therapie 50 mg/kg betrug.

Zweieinhalb Stunden vor Euthanasie des Versuchstieres wurden 2,5 µl/g KG BrdU-Lösung (20 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, B5002) intraperitoneal injiziert. Für die Narkose wurden Ketamin 10 % (100 mg/ml, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und Xylazin 2 % (20 mg/ml, Rompun, Bayer Healthcare, Leverkusen,

Deutschland) im Verhältnis 1:3 gemischt und in der Dosierung 1,3 µl/g KG intraperitoneal gespritzt. Nach Injektion des Narkosemittels wurde durch Setzen eines Schmerzreizes die Tiefe der Analgesie überprüft. Blut wurde mittels Glaskapillare retrobulbär entnommen und in EDTA-Röhrchen gesammelt. Mittels KX-21-Hämatologiegerät (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde das Blutbild analysiert und danach die Blutprobe bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert, um das isolierte Plasma bei -20° einzufrieren. Die Euthanasie des Tieres erfolgte durch Genickbruch. Mittels Präparierschere erfolgte eine Längslaparotomie von der Pubesregion bis zum Sternum, die durch einen V-förmigen Schnitt von der Medianlinie in Richtung der Rippenbögen erweitert wurde. Der Magen wurde mit der Pinzette mobilisiert, der Ösophagus im Kardiabereich abgetrennt. Dann wurde das Rektum aufgesucht und durchtrennt. Unter Zug an Rektum, Kolon und Ileum wurde das Mesenterium dargestellt und von kaudal nach kranial vom Retroperitoneum abpräpariert. Nach Durchtrennung des Gallengangs wurde unter Zug am Duodenum das Pankreas vorsichtig zur Milz hin freipräpariert, sodass das gesamte Organpaket bestehend aus Magen, Därmen, Pankreas und Milz en bloc aus dem Situs entfernt werden konnte. Der Pankreastumor wurde freipräpariert und dabei das Pankreas vom Duodenum und der Milz getrennt. Es folgte die Gewichtsbestimmung von Tumor, Pankreas und Milz. Anschließend wurde der Tumor mittig zerteilt. Die im Situs verbliebene Leber wurde entfernt und makroskopisch auf Metastasen untersucht. Das Mesenterium wurde von den Gedärmen abpräpariert. Pankreas, rechter Leberlappen, Mesenterium und eine Tumorthälfte wurden in Formalin fixiert. Der linke Leberlappen und der restliche Tumor wurden kryokonserviert. Gewebeproben wurden zur histologischen Aufarbeitung in Jet-Kassetten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) mittels 4 % Formalin (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert. Proben für molekularbiologische Untersuchungen wurden in 1,8 ml-Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG) in flüssigen Stickstoff und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4 Histologische und Immunhistochemische Analysen

2.2.4.1 Aufbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden nach ca. 24 h Fixierung in 4 %igem Formalin mittels eines TP1020-Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) vollautomatisch entwässert und mit Paraffin infiltriert. Der Präparatkorb wurde dabei entsprechend Tab. 3 in die Reagenzien abgesenkt, gehoben und durch Rotation zur nächsten Station geführt.

Table 3: Dehydrierung der Gewebeproben

Reagenz	Behandlungsdauer
Ethanol 70 % I (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)	1 h
Ethanol 70 % II (Medite GmbH)	1 h
Ethanol 80 % I (Medite GmbH)	1 h
Ethanol 80 % II (Medite GmbH)	2 h
Ethanol 90 % II (Medite GmbH)	1 h
Ethanol abs. (Medite GmbH)	1 h
X-TRA (Medite GmbH)	2 h
X-TRA (Medite GmbH)	2 h
Paraffin I (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	2 h
Paraffin II (Merck KGaA)	2 h

Anschließend wurden die Gewebestücke so in der Histokassette positioniert, dass die gewünschte Schnittfläche genau plan zur Blockoberfläche ausgerichtet wurde und mit Hilfe des EG 1160-Einbettungsautomaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) mit warmen Paraffin (56-58 °C, Merck KGaA) überschichtet. Die so erhaltenen Paraffinblöcke wurden auf Gefrierenlementen gekühlt. Mit einem RM2145-Rotationsmikrotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einem Pinsel in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Nach vollständiger Entfaltung der Gewebeschnitte wurden diese mit einem Objektträger aufgenommen und das Paraffin bei 66 °C für 1 h geschmolzen. Für Gewebeschnitte, die später eine H/E oder CAE-Färbung erhielten, wurden unbeschichtete Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) und für die BrdU-Immunhistologie wurden Adhäsionsobjektträger (Polysine Slides, Thermo Fisher Scientific Germany BV

& Co KG) verwendet. Unmittelbar vor der Durchführung histologischer oder immunhistochemischer Färbungen wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe nach folgendem Schema (siehe Tab. 4) entparaffiniert und rehydriert.

Tabelle 4: Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Reagenz	Behandlungsdauer
X-TRA I (Medite GmbH)	10 min
X-TRA II (Medite GmbH)	10 min
X-TRA II (Medite GmbH)	5 min
Ethanol 100 % I (Medite GmbH)	5 min
Ethanol 100 % II (Medite GmbH)	5 min
Ethanol 96 % (Medite GmbH)	5 min
Ethanol 80 % (Medite GmbH)	5 min
Ethanol 70 % (Medite GmbH)	5 min
Aqua dest.	3 min

2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die morphologischen Charakteristika der Gewebeproben zu untersuchen und um die Nekrosefläche innerhalb der Tumoren planimetrisch zu bestimmen, erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Hämatoxylin ist farblos und wird zu Hämatein oxidiert, welches durch Komplexbildung mit Aluminiumionen, den eigentlichen Farbstoff Hämalan, bildet. Dieser bindet im sauren Milieu an anionische Strukturen, wie beispielsweise Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, und führt so zu einer selektiven Färbung des Zellkerns. Die Gegenfärbung mit Eosin dient der Kontrasterhöhung. Nach erfolgter Entparaffinierung der Schnitte wurden diese aus dem destillierten Wasser herausgenommen und für 5 Minuten in eine Hämalanlösung nach Meyer (Merck KGaA) gegeben. Danach wurde die überschüssige Farbe mit Aqua dest. abgespült, die Schnitte 10 Minuten lang in lauwarmen Wasser „gebläut“ und mit wässriger Eosinlösung 0,3 % (Merck KGaA) für eine Minute gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tab. 5) dehydriert. Auf die so gefärbten Schnitte wurden einige Tropfen Eindeckmedium aufgetragen und diese vorsichtig und möglichst blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt.

Tabelle 5: Dehydrierung der Gewebeschnitte

Reagenz	Behandlungsdauer
Ethanol 70 % (Meditate GmbH)	30 s
Ethanol 96 % (Meditate GmbH)	30 s
Ethanol 100 % I (Meditate GmbH)	30 s
Ethanol 100 % II (Meditate GmbH)	30 s
X-TRA I (Merck KGaA)	30 s
X-TRA II (Merck KGaA)	30 s

2.2.4.3 Nachweis der Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase (CAE-Färbung)

Das Enzym Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase ist spezifisch für neutrophile Granulozyten ab dem Promyelozytenstadium und für Mastzellen. Es hydrolysiert das Substrat Naphtol-AS-D-Chloracetat zu freiem Naphthol-AS, welches mit Echtgranatsalz zu einem roten Azofarbstoffniederschlag reagiert. Auf diese Weise können neutrophile Granulozyten selektiv im Gewebe dargestellt werden.

Tabelle 6: Materialien für die CAE-Färbung

Material	Produktnummer & Hersteller
Echtgranatsalz Fast Garnet GBC	F8761 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Naphtol-AS-D-Chloracetat	N0758 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Dimethylsulfoxid	K42474852203 (Merck Chemicals GmbH)
Dikaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1104289 (Merck Chemicals GmbH)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	K33351980429 (Merck Chemicals GmbH)
Eindeckmedium Ultramount Aqueous Permanent	S1964 (Dako GmbH, Hamburg) Deutschland

Zunächst wurden zur Herstellung eines PBS-Pufferkonzentrats 2,95 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,49 g KH₂PO₄ und 16 g NaCl in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden getrennt 10 mg Echtgranatsalz in 100 ml einer 1:10 verdünnten PBS-Pufferlösung und 16 mg Naphtol-AS-D-Chloracetat in 2 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Diese beiden Lösungen wurden miteinander vermischt, kräftig geschüttelt und filtriert und die entparaffinierten Gewebeschnitte für drei Stunden bei Zimmertemperatur in dem Filtrat inkubiert. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Wasser abgespült, fünf Minuten lang in Hämalaunlösung gegengefärbt, mit einigen Tropfen Ultramount-Eindeckmedium überschichtet und blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt.

2.2.4.4 Bromdesoxyuridin-Immunhistochemie

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Nukleosidanalogen und wird während der S-Phase in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert. Nach Denaturierung der DNA kann BrdU durch spezifische primäre Antikörper gebunden werden. Nach Bindung von Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper an die Primärantikörper wird der Umsatz eines Chromogens und somit die selektive Darstellung sich in Proliferation befindlicher Zellen ermöglicht.

Tabelle 7: Materialien für die BrdU-Immunhistochemie

Material	Produktnummer & Hersteller
<u>Primärer Antikörper:</u> Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine Clone Bu20a	M 0744, Dako GmbH
<u>Sekundärer Antikörper:</u> Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	P 0447, Dako GmbH
Mikrowellenpuffer pH 6 (Target Retrieval Solution)	S1699, Dako GmbH
Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent	S2003, Dako GmbH
Protein Block Serum Free	X0909, Dako GmbH

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurden diese mit Wasser abgespült und in ein hitzebeständiges Gefäß gegeben, welches mit Mikrowellenpuffer pH 6 gefüllt wurde. Anschließend erfolgte die hitzeinduzierte Antigendemaskierung für sieben Minuten bei 700 W im Mikrowellenofen. Nach Abkühlung und dreimaligem Spülen mit Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit der Peroxidaseblockreagenz behandelt und anschließend nochmal gespült. Danach erfolgte die fünfzehnminütige Behandlung

mit Proteinblocklösung, welche im Anschluss durch sanftes Aufklopfen der Objektträger auf einem Tuch entfernt wurde. Die Primärantikörperlösung wurde 50-fach verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in dieser inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte bei Raumtemperatur dreimal zwei Minuten mit Leitungswasser gespült und anschließend in einer 100fach verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. und die Inkubation für vier Minuten in Substratchromogen. Nach Spülung mit Aqua dest., Gegenfärbung mit Hämalaun und anschließender „Bläuung“ im Wasserbad durchliefen die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe und wurden eingedeckt.

2.2.4.5 Histologische und Immunhistochemische Auswertung

Die histologische Auswertung aller Präparate erfolgte nach Verblindung am BX51 Mikroskop (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). 120-270 µm vom Tumorrand entfernt wurden 10 zufällig auf die gesamte Zirkumferenz des Tumors verteilte Gesichtsfelder ausgewählt und mittels Zählgitter-Okular evaluiert. Präparate der BrdU-Immunhistochemie wurden unter 400facher Vergrößerung und CAE-Präparate unter 200facher Vergrößerung ausgewertet. Zur Bestimmung der Nekroseareale wurden 10 zufällige Fotografien im Tumorrandbereich der H.E. gefärbten Präparate bei 200facher Vergrößerung angefertigt. Mit Hilfe von Adobe Photoshop CS5 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) wurde die Fläche der Nekrosezone erfasst und der prozentuale Anteil an der Gesamtfläche berechnet.

2.2.5 Analyse des Blutplasmas

Sämtliche Analysen von Enzymaktivitäten wurden mithilfe des Cobas c111 Spektrophotometers und den dazugehörigen Testreagenzien (siehe Tab. 6; Roche Diagnostics GmbH), Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 8: Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität

Reagenz	Zusammensetzung
Lipase (Best.-Nr.: 05401704 190)	
R1	N,N-bis(2hydroxyethyl)glycin Puffer: 50 mmol/L, pH 8,0; Colipase (Schweinepankreas): $\geq 0,9$ mg/L; Natriumdesoxycholat: 1,6 mmol/L; Calciumchlorid: 10 mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel
SR	Tartrat-Puffer: 10 mmol/L, pH 4,0; 1,2-ODilauryl-rac- glycerol -3-glutar-säure-(6-methylresorufin)ester: 0,27 mmol/L; Taurodesoxycholat: 8,8 mmol/L; Detergenz; Konservierungsmittel
Alanin-Aminotransferase (Best.-Nr.:04718569190)	
R1	TRIS-Puffer: 224 mmol/L, pH 7.3 (37 °C); L-Alanin: 1120 mmol/L; Albumin (Rind): 0.25 %; LDH (Mikroorganismen): ≥ 45 μ kat/L; Stabilisatoren; Konservierungsmittel
PYP	Pyridoxalphosphat (DL): 730 μ mol/L; Konservierungsmittel
SR	NADH(Hefe): ≥ 1.7 mmol/L; 2-Oxoglutarat: 94 mmol/L; Konservierungsmittel; Additive
Aspartat-Aminotransferase (Best.-Nr.:04657543190)	
R1	TRIS-Puffer: 264 mmol/L, pH 7.8(37 °C); L-Aspartat: 792 mmol/L; MDH (Schweineherz): ≥ 24 μ kat/L; LDH (Mikroorganismen): ≥ 48 μ kat/L; Albumin (Rind): 0.25 %; Konservierungsmittel
PYP	Pyridoxalphosphat (DL): 730 μ mol/L; Konservierungsmittel
SR	NADH(Hefe): ≥ 1.7 mmol/L; 2-oxoglutarate: 94 mmol/L; Konservierungsmittel

2.2.5.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität im Blutplasma

Die Pankreaslipase dient der enzymatischen Verdauung von Nahrungsfetten und katalysiert die Hydrolyse von Esterbindungen zwischen Fettsäuren und Glycerol in Triacylglyceriden [148]. Zur Entfaltung der vollen enzymatischen Aktivität benötigt sie zusätzlich eine Colipase und Gallensäuren zur Substratemulsion. Die kolorimetrische Messung der Lipaseaktivität beruht auf einer Extinktionszunahme durch enzymatische Spaltung des lipasespezifische Chromogens 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerol-3-Glutarsäure-(6-methylresorufin)-Ester. Dieser wird zu Glutarsäure-(6-methylresorufin)- Ester katalysiert, welcher in alkalischer Lösung spontan zu Glutarsäure und 6-Methylresorufin, einem roten Farbstoff, zerfällt. Hierbei ist bei 583 nm ist die Extinktion direkt proportional zur Lipaseaktivität im Blutplasma. Zur Messung wurden 80 μ l R1 Reagenz

mit 2 µl der Blutplasmaprobe und 48 µl SR-Reagenz in ein Messröhrchen pipettiert (Zusammensetzungen siehe Tab. 6) und anschließend die Absorption bei 583nm im Spektrophotometer gemessen.

2.2.5.2 Messung der Alanin-Aminotransferase-Aktivität im Blutplasma

Die Alanin-Aminotransaminase (ALT) ist ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym und katalysiert die reversible Transaminierung zwischen L-Alanin und 2-Oxoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat [149]. Sie ist vor allem in Zytosol von Hepatozyten lokalisiert, findet sich jedoch auch in Zellen von Niere, Herz, Skelettmuskeln, Pankreas, Milz, Lunge und in Erythrozyten. Eine Erhöhung der ALT-Aktivität im Serum deutet auf eine Schädigung des Lebergewebes hin. Zur Bestimmung der ALT-Aktivität wurden 11 µl der Plasmaprobe mit 59 µl R1-Reagenz, 17 µl SR-Reagenz sowie 18 µl Pyridoxalphosphat (Vitamin B6) als Koenzym versetzt (Zusammensetzungen siehe Tab. 6). Das durch die ALT-vermittelte Reaktion gebildete Pyruvat wird von der Lactatdehydrogenase, unter Oxidation von NADH zu NAD⁺, zu L-Lactat umgesetzt. Der Verbrauch von NADH geht mit einer Extinktionsabnahme einher, welche proportional zur ALT-Aktivität ist und bei der Wellenlänge von 430nm mittels Spektrophotometer erfasst wurde.

2.2.5.3 Messung der Aspartat-Aminotransferase-Aktivität im Blutplasma

Die Aspartat-Aminotransaminase (AST) dient der Übertragung von Aminogruppen zwischen Aspartat und α-Ketoglutarat, wobei Oxalacetat und Glutamat entstehen. Das Enzym kommt in fast allen Geweben vor und zeigt die höchste Aktivität in Leber und Herzmuskel. Da es in Hepatozyten zu 80 % mitochondrial lokalisiert ist, steigt die AST-Aktivität erst bei einer stärkeren Schädigung des Lebergewebes [149]. Zur Bestimmung der AST-Aktivität wurden 11 µl Blutplasma mit 40 µl R1-Reagenz, 17 µl SR-Reagenz sowie 18 µl Pyridoxlphosphat versetzt (Zusammensetzungen siehe Tab. 6). L-Aspartat wird durch die AST zu Oxalacetat umgesetzt, welches im Anschluss NADH-abhängig durch die Malatdehydrogenase zu L-Malat reduziert wird. Die Oxidation von NADH zu NAD⁺ führt zur Extinktionsabnahme proportional zur Enzymaktivität der AST im Blutplasma bei 430 nm, welche mittels Spektrophotometer erfasst wurde.

2.3 Statistik

Alle Testungen auf Signifikanz wurden mit Hilfe von SigmaPlot 12 (Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt. Auch zur Erstellung der Diagramme und zur Berechnung der EC50-Werte diente o.g. Programm. Linienstreudiagramme zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. Boxplots zeigen den Median, sowie das 25. und 75. Quartil in Form einer Box. Das 10. und das 90. Quantil stellen sich als Whiskers dar. Signifikante Unterschiede wurden anhand des Mann-Whitney Rank-Sum Test berechnet. Dabei wurde die Akkumulation des α - Fehlers bei mehrfachen Vergleichen mittels Bonferroni Korrektur berücksichtigt. Unterschiede mit $p \leq 0,05$ dividiert durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als signifikant bezeichnet. Unterschiede mit $p \leq 0,08$ dividiert durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche wurden als Tendenz bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Versuche

3.1.1 Gemcitabin hemmt die Proliferation von drei Tumorzelllinien

Das Pyrimidin-Analogon Gemcitabin findet breite Anwendung in der zytostatischen Therapie verschiedener Malignome, darunter auch des PDA. Daher wurde zunächst die Chemosensitivität der verwendeten Karzinomzelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA mittels WST-1- und BrdU-Assay evaluiert.

Im WST-1-Assay zeigte sich eine deutliche Reduktion des Zellstoffwechsels als indirektes Maß für die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Höhe der Gemcitabinkonzentration. Während eine 0,005 μM Gemcitabinlösung nur zu einer sehr geringen Reduktion der Absorption im WST-1-Assay führte, bewirkte eine 0,025 μM Gemcitabinkonzentration bei allen drei Zelllinien eine substantielle und eine 0,125 μM Gemcitabinlösung eine maximale Reduktion der Absorption. Auch durch eine Erhöhung der Gemcitabinkonzentration auf 0,625 μM war keine weitere Reduktion der Absorption möglich (Abb. 4 A). Anhand der aus den einzelnen WST-1-Assays ermittelten EC50-Werten konnten die verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Chemosensitivität verglichen werden (Abb. 4 B). Alle drei Zelllinien wiesen eine hinreichende Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin auf. Zwischen den Zelllinien 6606PDA und 6606I bestanden keine signifikanten Unterschiede in den EC50-Werten für Gemcitabin. Der EC50-Wert der 7265PDA-Zelllinie hingegen war nicht nur signifikant niedriger als der, der 6606 PDA-Zelllinien, sondern auch signifikant niedriger als der EC50-Wert der 6606I-Zellen. Die 7265PDA-Zelllinie zeigte somit im WST-1-Assay die höchste Sensitivität für Gemcitabin. Auch der BrdU-Assay zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt von Gemcitabin auf die Proliferation der drei Zelllinien (Abb. 4 C). Die niedrigste Gemcitabinkonzentration (0,005 μM) hatte nahezu keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der drei Zelllinien. Bei Erhöhung der Gemcitabinkonzentration auf 0,025 μM bzw. 0,125 μM wurde, in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie, eine geringe bis deutliche Hemmung der Zellproliferation erreicht. Die maximale Hemmung der Zellproliferation wurde bei allen drei Zelllinien durch eine 0,625 μM Gemcitabinkonzentration erreicht. Ein Vergleich der EC50-Werte für Gemcitabin zeigte, übereinstimmend mit den Ergebnissen des WST-1-Assays, Unterschiede in der Chemosensitivität der einzelnen Zelllinien. Dabei wies die Zelllinie 6606PDA die geringste Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin auf.

Die Zelllinie 6606I zeigte eine geringfügig größere Chemosensitivität, jedoch ohne dabei Signifikanzniveau im Vergleich zu 6606PDA zu erreichen. 7265PDA erwies sich hingegen auch im BrdU-Assay als die Karzinomzelllinie mit der ausgeprägtesten Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin. Ihr EC50-Wert war tendenziell niedriger als jener der 6606I-Zelllinie und im Vergleich zur Zelllinie 6606PDA signifikant erniedrigt. Somit sind die Daten des BrdU-Assays konsistent mit den Daten des WST-1 Assays.

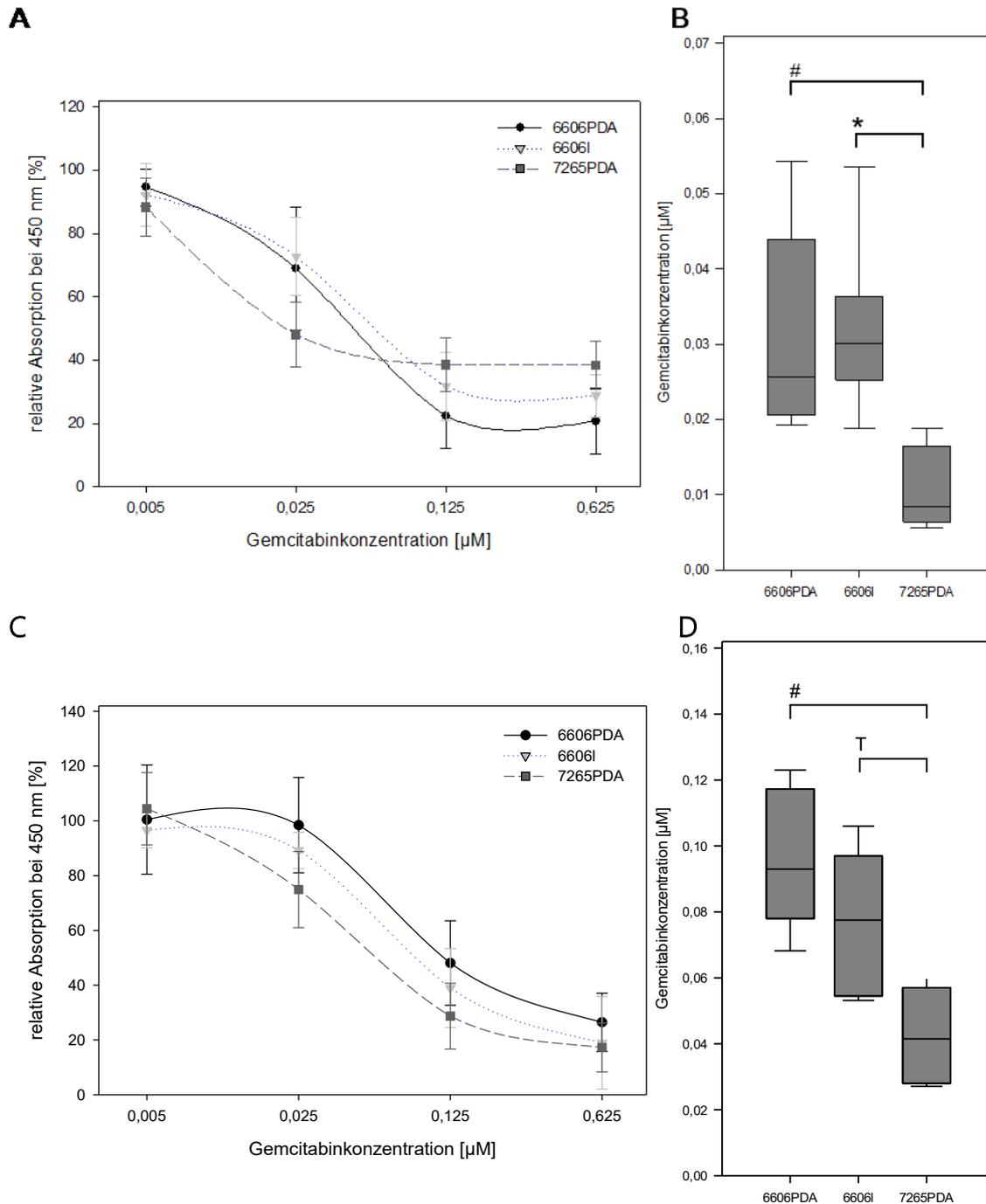


Abbildung 4: Gemcitabin hemmt die Proliferation der drei Zelllinien. Die konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der Zelllinien 6606PDA 6606Liver, 6606I und 7265PDA durch Gemcitabin wurde mittels WST-1-Assay (A, B) nach 48 h Exposition und BrdU-Assay (C, D) nach 24 h Exposition gegenüber Gemcitabin gemessen. Die aus der Dosis-Response-Kurve (A, C) ermittelten EC50-Werte (B, D) zeigen eine höhere Gemcitabinsensitivität der 7265PDA Zellen im Vergleich zu 6606PDA und 6606I Zellen. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole * und # mit $p=0,001$ (B, D) dargestellt. Tendenzielle Unterschiede sind mit dem Symbol T mit $p=0,026$ (D) dargestellt. Anzahl der unabhängigen WST Assays: $n=7$ bei 6606PDA, $n=8$ bei 6606I, $n=7$ bei 7265PDA . Anzahl der unabhängigen BrdU-Assays: $n=7$ bei 6606PDA, $n=6$ bei 6606Liver, $n=6$ bei 7265PDA.

3.1.2 Induktion des Zelltodes durch Gemcitabin

Neben proliferationshemmenden Eigenschaften besitzt das Chemotherapeutikum Gemcitabin auch zytotoxische Eigenschaften. Um diese Wirkung auf die Karzinomzelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA zu evaluieren, wurde die Anzahl abgestorbener Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 0,625 μM Gemcitabin im Vergleich zur Kontrolle evaluiert.

Bereits bei der lichtmikroskopischen Evaluation der Zellkultur zeigten sich eine deutliche Ausdünnung des Zellrasens am Boden der Mikrotiterplatte und eine deutlich höhere Anzahl an avitalen Zellen nach Gemcitabinexposition (Abb. 5 A). Avitale Zellen verlieren ihre Adhäsion zum Kunststoffuntergrund, nehmen eine runde Form an und flottieren frei im Medium. Um den Gemcitabin-induzierten Zelltod zu quantifizieren, wurde nach 48-stündiger Inkubation der drei Karzinomzelllinien mit 0,625 μM Gemcitabin bzw. Normalmedium (Kontrolle) ein Trypanblau-Assay durchgeführt (Abb. 5 B). Alle drei Zelllinien wiesen in der Kontrolle nur wenige avitale Zellen auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen bestanden nicht. Bei allen drei Zelllinien kam es nach 48-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Zunahme des Zelltodes im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Zelllinie 6606I zeigte hierbei die geringste Fraktion avitaler Zellen. Der relative Anteil trypanblau-positiver Zellen war im Vergleich zu dem der Zelllinien 6606PDA und 7265PDA signifikant niedriger. Die Zelllinie 7265PDA zeigte im Trypanblau-Assay den höchsten Anteil toter Zellen. Dieser war signifikant höher als bei der Zelllinie 6606I. Zudem zeigte 7265PDA einen signifikant höheren Anteil an avitalen Zellen als die Zelllinie 6606PDA. Die Zelllinie 7265PDA erwies sich also auch im Trypanblau-Assay als die Karzinomzelllinie mit der größten Gemcitabinsensibilität.

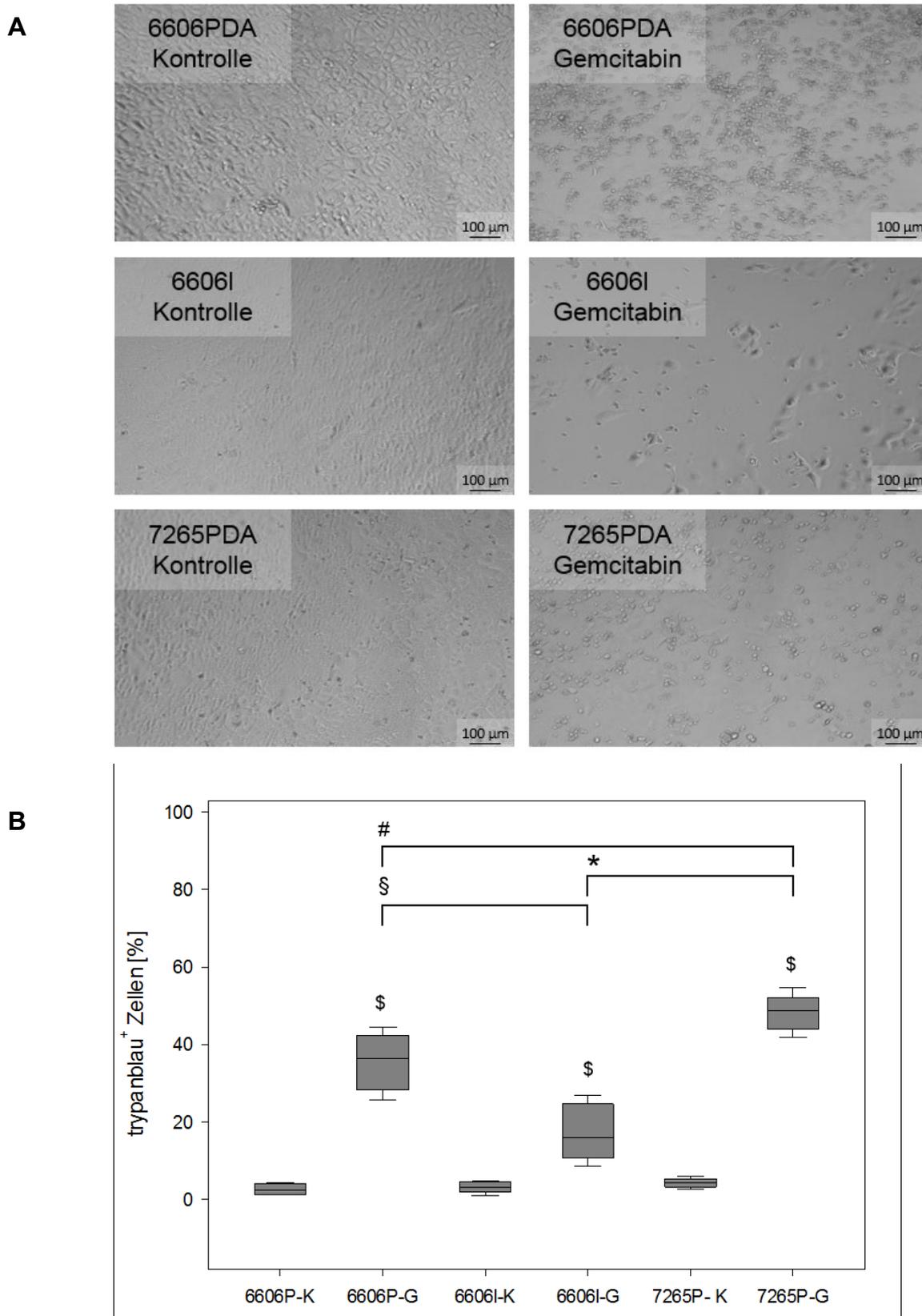


Abbildung 5: Induktion des Zelltodes durch Gemcitabin. Die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Zellkultur bei 100-facher Vergrößerung (B) zeigt eine deutliche Reduktion der Zellkonfluenz und ein Zunahme von Zelldetritus nach 48 h Inkubation in 0,1 µM Gemcitabin im Vergleich zu Normalmedium (Kontrolle), Maßstabsbalken entspricht 100 µM. Quantifizierung des Zelltodes der drei Zelllinien 6606PDA (6606P),

6606I und 7265PDA (7265P) nach 48 h Inkubation mit einer 0,625 μ M Gemcitabinlösung bzw. Normalmedium mittels Trypanblau-Assay (A). K=Kontrolle, G= Gemcitabin 0,625 μ M. Anzahl der unabhängigen Trypanblau-Assays: n= 10 für 6606PDA, n=8 für 6606I und n=7 für 7265PDA. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole \$ (G vs. K) mit $p < 0,001$, # mit $p = 0,005$, * mit $p < 0,001$ und § mit $p = 0,001$ dargestellt.

3.1.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Metformin auf Tumorzellen

Um zu überprüfen, inwieweit Metformin wichtige Charakteristika von Karzinomzellen, wie Zellviabilität, Zellproliferation und Zelltod beeinflusst, führten wir WST-1- Assays, BrdU-Inkorporationsassays und mikroskopische Beobachtungen mit unterschiedlichen Metforminkonzentrationen durch. Zur Evaluation des Einflusses von Metformin auf die Zellviabilität der drei Karzinomzelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA wurde ein WST-1-Assay nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Metforminkonzentrationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Extinktionsabnahme bei allen drei Zelllinien ab 0,8 mM Metformin (Abb. 6 A). Diese Beobachtung ließ sich vor allem auf eine Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels durch Metformin zurückführen, da für die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zelluläre Stoffwechselprodukte als Reduktionsmittel benötigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte der BrdU-Assay bei der Verwendung von 0,8-20 mM keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferationsrate der drei Karzinomzelllinien (Abb. 6 B). Erst eine sehr hohe Konzentration von 100 mM Metformin führte zu einer starken Reduktion der BrdU-Inkorporation. Diese Ergebnisse waren konsistent mit den Beobachtungen in der Zellkultur (Abb. 6 C). Während die 48-stündige Inkubation mit 20 mM keinen sichtbaren Effekt auf die Konfluenz und somit das Wachstumsverhalten der drei Zelllinien zeigte, führte eine 100 mM Metforminkonzentration zu einer erheblichen Ausdünnung des Zellrasens und einer deutlichen Zunahme abgerundeter Zellen. Diese Daten zeigten, dass der WST-1-Assay zur Quantifizierung von Proliferation und Zelltod in dieser Versuchsanordnung ungeeignet war, da dessen Ergebnisse sowohl im Widerspruch zu den eindeutigen Beobachtungen in der Zellkultur, als auch zur Messung der BrdU-Inkorporation standen.

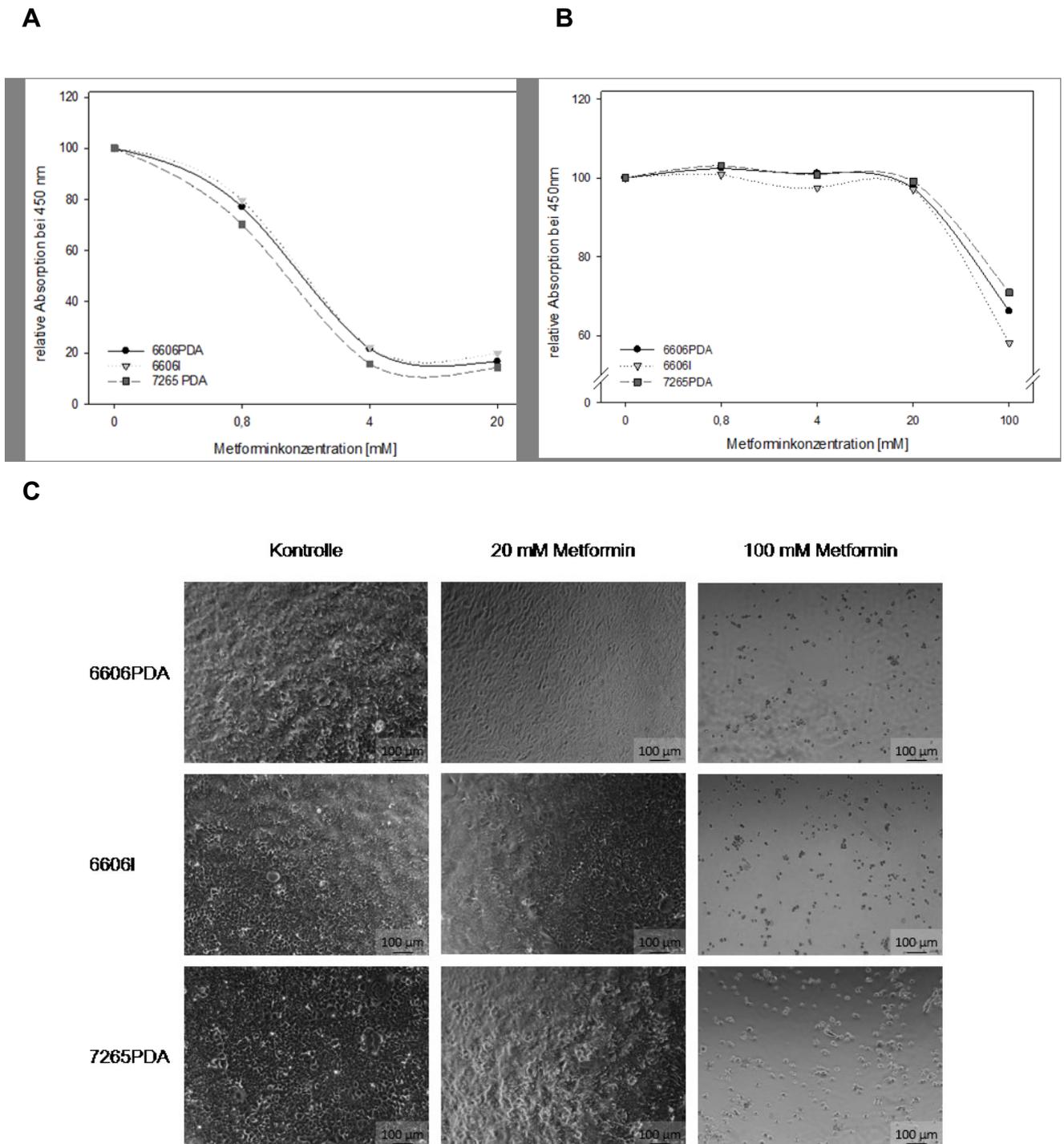


Abbildung 6: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Metformin auf Karzinomzellen. Mittels WST-Assay konnte nach 48-stündiger Metforminexposition eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellmetabolismus ab 0.8 mM Metformin festgestellt werden (A). Ab einer Metforminkonzentration von 100 mM ist eine proliferationshemmende Wirkung von Metformin nach 24 Stunden mittels BrdU-Assay nachweisbar (B). Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen der kultivierten Zellen nach 48 h Wachstum in Normalmedium (Kontrolle) und 20 mM bzw. 100 mM Metformin bei 100facher Vergrößerung zeigten eine reduzierte Zellkonfluenz und viele abgerundete Zellen bei einer Konzentration von 100 mM, aber nicht bei 20 mM Metformin.

3.1.4 Metformin erhöht nicht den Gemcitabin-induzierten Zelltod

Um eine mögliche Synergie von Gemcitabin und Metformin bei der Induktion des Zelltodes zu evaluieren, wurden die drei Zelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA über einen Zeitraum von 48 Stunden mit 0,1 μM Gemcitabin, 20 mM Metformin oder der Kombination aus beiden Pharmaka behandelt. Anschließend wurde der Zelltod mittels Trypanblau-Assay quantifiziert (Abb. 7 A-C). Die Behandlung mit 0,1 μM Gemcitabin führte bei der Zelllinie 6606PDA zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltodes im Vergleich zum Normalmedium. Die Behandlung mit 20 mM Metformin führte hingegen zu einer geringen Erhöhung des Zelltodes im Vergleich zum Normalmedium. Zudem lag die Anzahl toter Zellen bei dieser Behandlung signifikant niedriger als bei der Behandlung mit Gemcitabin. Die Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltodes im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings war der relative Anteil toter Zellen bei der Kombinationsbehandlung tendenziell niedriger als bei Behandlung mit 0,1 μM Gemcitabin alleine. Die Addition von 20 mM Metformin zu 0,1 mM Gemcitabin führte also zu einer Verringerung des Gemcitabin-induzierten Zelltodes (Abb. 7 A). Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch die Evaluation der Zelllinien 6606I (Abb. 7 B) und 7265PDA (Abb. 7 C). Auch bei diesen Zelllinien führte 0,1 μM Gemcitabin zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltodes im Trypanblau-Assay. Die Behandlung mit 20 mM Metformin erbrachte auch hier nur eine geringe Erhöhung des Zelltodes. Die Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Metformin führte zwar auch hier zu einer erkennbaren Reduktion des Gemcitabin-induzierten Zelltodes, jedoch ohne Tendenz- oder Signifikanzniveau zu erreichen. Die Ergebnisse des Trypanblau-Assay spiegelten sich auch in den mikroskopischen Betrachtungen des Wachstumsmuster der drei Karzinomzelllinien nach Behandlung wieder (Abb. 7 D). Nach 48-stündigem Wachstum im Normalmedium zeigte sich eine hohe Konfluenz der adhärennten Karzinomzellen auf dem Boden der Mikrotiterplatte. Im Gegensatz dazu, zeigten sich nach Inkubation mit 0,1 μM Gemcitabin eine deutliche Reduktion der Zellkonfluenz und zahlreiche, avitale, frei im Medium flottierende Zellen. Auch nach Inkubation mit der Kombination aus Gemcitabin und Metformin, konnte eine Ausdünnung des Zellrasens und eine Zunahme an avitalen Zellen beobachtet werden. Diesen waren jedoch augenscheinlich weniger ausgeprägt, als nach Gemcitabinbehandlung. Die Inkubation mit 20 mM Metformin hatte hingegen keinen sichtbaren Einfluss auf das Zellwachstum. Im Vergleich zur Kontrolle war die Zellkonfluenz unverändert. Zusammengefasst sprechen die hier gezeigten Daten aus Trypanblau-Assay und

Mikroskopie für einen hemmenden Einfluss von Metformin auf den Gemcitabin-induzierten Zelltod.

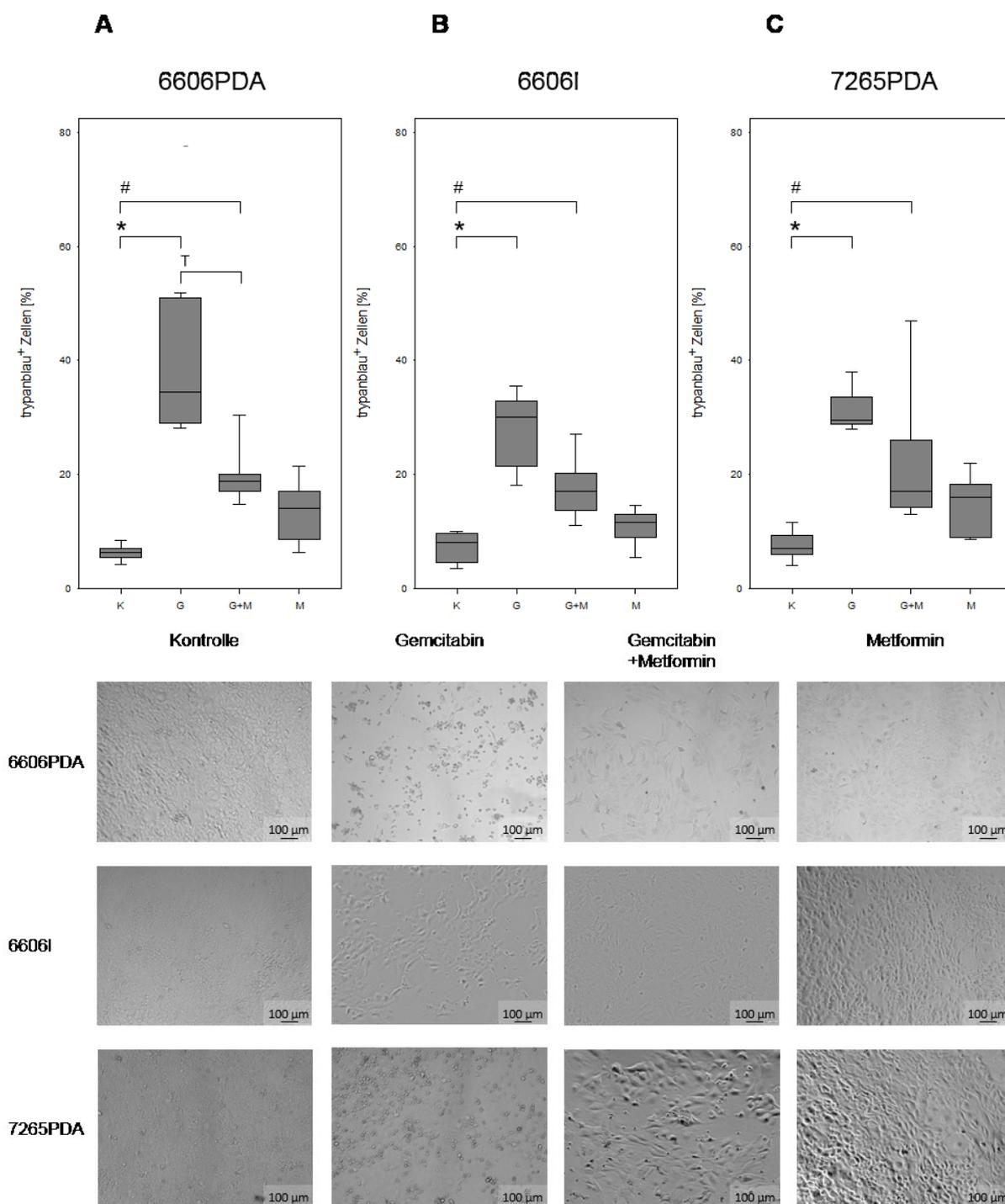


Abbildung 7: Metformin erhöht nicht den Gemcitabin-induzierten Zelltod. Trypanblau-Assay der drei Zelllinien 6606PDA (A), 6606I (B) und 7265PDA (C) nach 48h Inkubation in Normalmedium (K), 0,1 μ M Gemcitabin(G), 20 mM Metformin (M) und der Kombination beider Pharmaka (G+M). Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole *, # mit $p=0,002$ für A, *, # mit $p=0,008$ für B und *, # mit $p=0,008$ für C. Tendenzielle Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch den Buchstaben T mit $p=0,015$ dargestellt (A). Anzahl der unabhängigen Trypanblau-Assays: $n=6$ für 6606PDA, $n=5$ für 6606I und $n=5$ für 7265PDA. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach 48h Inkubation unter o.g. Bedingungen bei 100-facher Vergrößerung zeigten nach Kombinationsbehandlung (Gemcitabin+Metformin) weniger avitale Zellen als nach Gemcitabinbehandlung (D).

3.1.5 Metformin hemmt die Gemcitabin-induzierte Apoptose der Zelllinie 6606PDA

Um die unter 3.1.4 dargestellten Beobachtungen zu reproduzieren und genauer zu charakterisieren, erfolgte eine molekularbiologische Untersuchung der Auswirkung von Metformin auf die Gemcitabin-induzierte Apoptose in der Zelllinie 6606PDA. Dazu wurde mittels Western Blot semiquantitativ die Menge und proteolytische Spaltung der Cleaved Caspase-3, der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) sowie die Expression von β -Aktin nach 24-stündiger und nach 48-stündiger Behandlung mit Normalmedium, 0,1 μ M Gemcitabin, 0,1 μ M Gemcitabin + 20 mM Metformin und 20 mM Metformin dargestellt (Abb. 8 A-C). Im Rahmen der Apoptose wird Caspase 3 durch proteolytische Spaltung aktiviert und katalysiert die Spaltung verschiedener Proteine, darunter auch PARP.

Bei der Evaluation der Cleaved Caspase-3 stellte sich nach Behandlung mit 0,1 μ M Gemcitabin eine deutlich ausgeprägte Proteinbande bei 17-19 kDa dar. Diese Proteinbande repräsentiert das Größere der beiden Bruchstücke nach proteolytischer Aktivierung der Caspase-3. Nach Behandlung mit 0,1 μ M Gemcitabin und 20 mM Metformin in Kombination zeigte sich sowohl bei 24 bzw. 48 Stunden eine wesentlich geringere Ausprägung dieser Proteinbande. Zu beiden Zeitpunkten konnte keine Aktivierung der Caspase-3 nach Inkubation in Normalmedium oder 20 mM Metformin beobachtet werden (Abb.8 A). Bei der Analyse der PARP Expression konnten nach Behandlung mit 0,1 μ M Gemcitabinlösung über 24 bzw. 48 Stunden zwei Proteinbanden dargestellt werden. Die erste Proteinbande bei 116 kDa repräsentierte das intakte Enzym. Die zweite Proteinbande bei 89 kDa stellte das Spaltprodukt der PARP dar und belegte somit die Aktivierung der Caspase-Kaskade im Rahmen der Apoptose. Nach Inkubation in Normalmedium, Metformin oder der Kombination aus Metformin und Gemcitabin über 24 bzw. 48 Stunden stellte sich nur intakte PARP, nicht jedoch das Spaltprodukt des Enzyms im Western Blot dar (Abb. 8 B). Der Nachweis des ubiquitär exprimierten Proteins β -Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele mit Proteinlysaten und zeigte, dass die verschiedenen Behandlungen die Expression von β -Aktin nicht beeinflussten (Abb. 8 C). Zum einen belegen diese Ergebnisse, dass Metformin alleine kaum Einfluss auf die Apoptose der Tumorzellen hatte, Gemcitabin jedoch zu einer deutlichen Induktion der Apoptose führte. Zum anderen zeigen sie, dass Metformin zu einer Reduktion der Gemcitabin-induzierten Zelltodes führte.

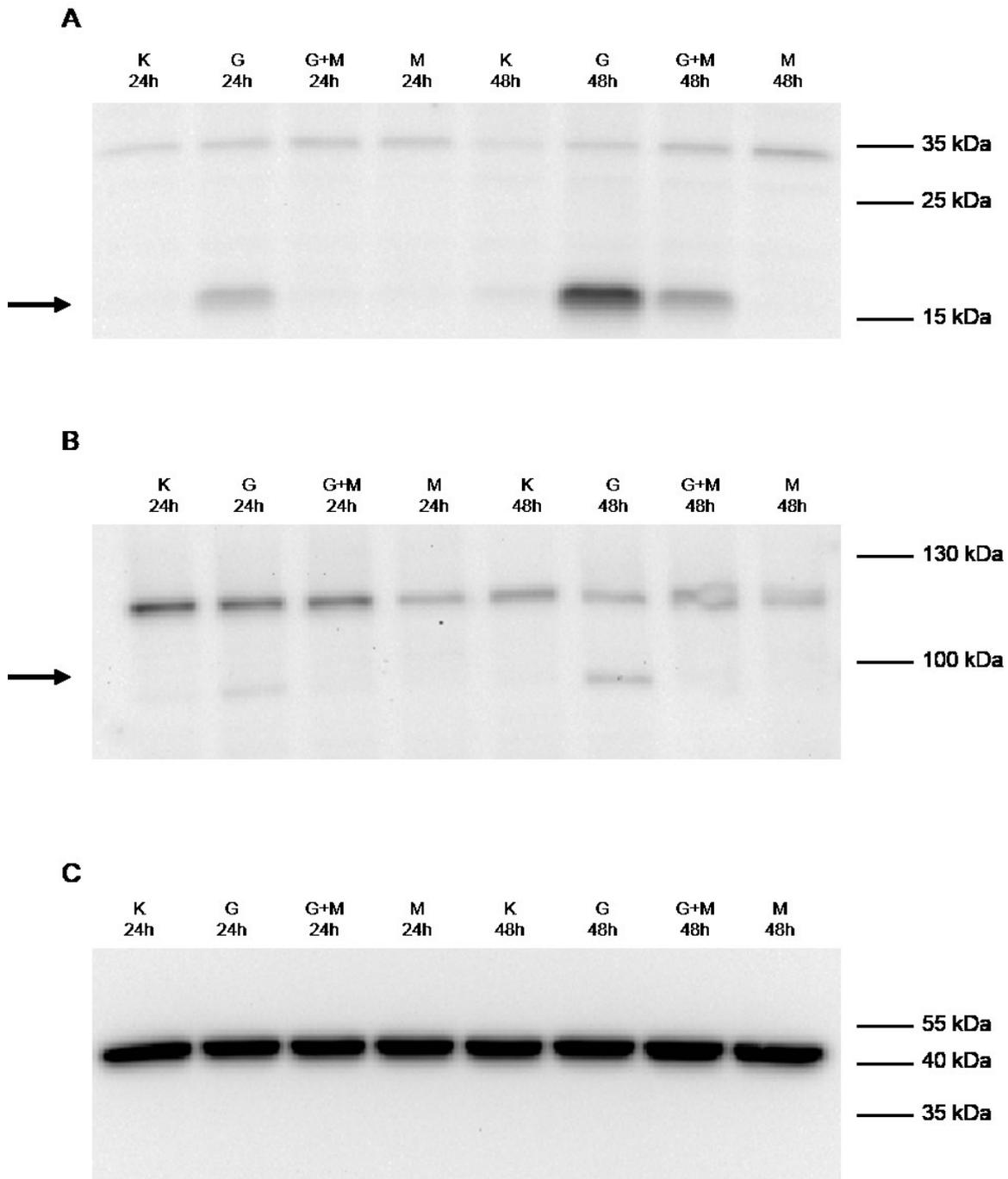


Abbildung 8: Metformin hemmt die Gemcitabin-induzierte Apoptose der Zelllinie 6606PDA. Ein nach 24 und 48-stündiger Inkubation der Zelllinie 6606PDA in Normalmedium (K), 0,1 μ M Gemcitabin (G), 0,1 μ M Gemcitabin+ 20 mM Metformin (G+M) oder 20mM Metformin (M) durchgeführter Western Blot belegt, dass Metformin die durch Gemcitabin verursachten Aktivierung der Caspase 3 (Pfeil in A) und den proteolytischen Abbau der PARP (Pfeil in B) reduzierte. Die Expression von β -Aktin wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst und diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele mit Proteinlysaten (C).

3.1.6 Keine synergistische Reduktion der Proliferation durch Metformin & Gemcitabin

Um eine mögliche synergistische Wirkung von Gemcitabin mit Metformin auf die Hemmung der Proliferation der drei Karzinomzelllinien 6606PDA, 6606I und 7265PDA zu evaluieren, wurde ein BrdU-Assay durchgeführt. Die Inkubation der Zelllinie 6606PDA in 0,1 μM Gemcitabin führte zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Inkorporation im Vergleich zur Inkubation in Normalmedium (Abb. 9 A). Ebenso reduzierte die Behandlung mit der Kombination aus 0,1 μM Gemcitabin und 20 mM Metformin die Zellproliferation, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant. Im Gegensatz dazu verursachte die Behandlung mit 20 mM nur eine geringfügige Reduktion der Zellproliferation (Abb. 9 A). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Zelllinien 6606I (Abb. 9 B) und 7265PDA (Abb. 9 C). Auch hier führte sowohl die Behandlung mit 0,1 μM Gemcitabin als auch mit der Kombination aus 0,1 μM Gemcitabin und 20 mM Metformin zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle. Zudem war die Proliferation nach dieser Behandlung auch im Vergleich zur Inkubation mit 20 mM Metformin signifikant reduziert. Die Behandlung mit 20 mM Metformin alleine bewirkte hingegen nur eine geringe Hemmung der Zellproliferation.

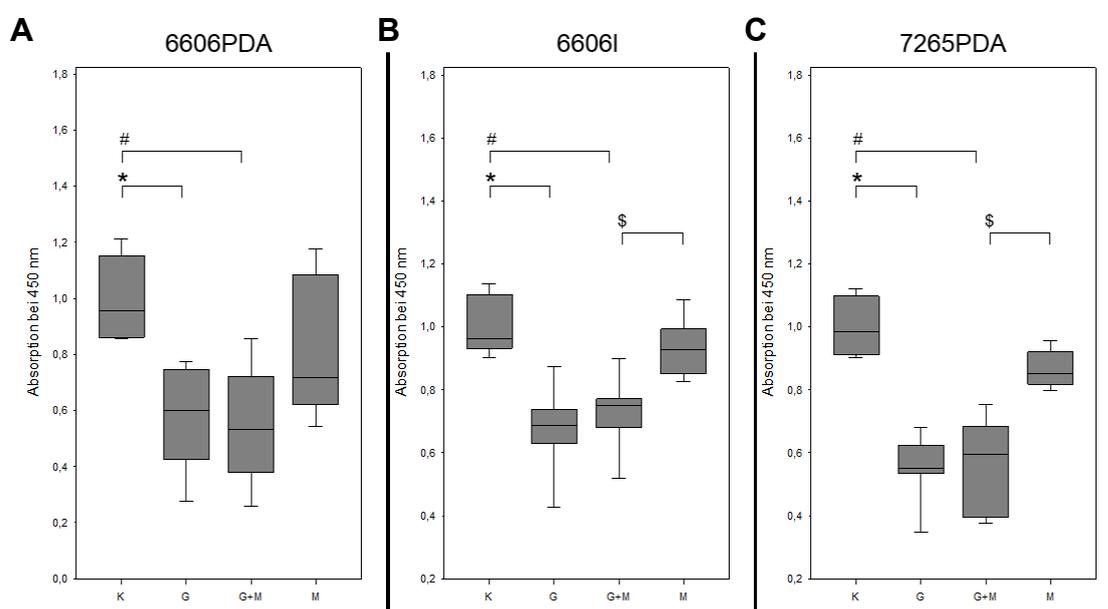


Abbildung 9: Keine synergistische Reduktion der Proliferation durch Metformin & Gemcitabin. Die Proliferation der Zelllinien 6606PDA (A), 6606I (B) und 7265PDA (C) wurde nach 24 h Inkubation in Normalmedium (K), 0,1 μM Gemcitabin (G), 0,1 μM Gemcitabin+ 20 mM Metformin (G+M) oder 20mM Metformin (M) mittels BrdU-Assay evaluiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen mit Gemcitabin und mit der Kombination von Gemcitabin mit Metformin. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole * mit $p=0,002$ (A, B, C), # mit $p=0,009$ (A), $p=0,004$ (B), $p=0,002$ (C) und \$ mit $p=0,009$ (B), $p=0,002$ (C) dargestellt. Anzahl der unabhängigen BrdU-Assays: $n=6$ für 6606PDA, $n=6$ für 6606I und $n=6$ für 7265PDA.

3.2 *In vivo*-Versuche

3.2.1 Verlauf von Körpergewicht und Blutglukosekonzentration

Zur Evaluation der antineoplastischen Wirkung der verschiedenen Therapien injizierten wir 6606PDA Zellen orthotop in das Pankreas von C57BL/6J Mäuse und behandelten sie entsprechend des in 2.2.3 gezeigten Behandlungsschemas. Hierbei diente die regelmäßige Kontrolle des Körpergewichtes sowohl zur Erfassung von tumorbedingten Komplikationen, wie beispielsweise gastrointestinale Passagestörungen oder Kachexie, als auch zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der verschiedenen Therapieregime auf den Ernährungszustand. Ebenso wurden regelmäßige Messungen der Blutglukosekonzentration durchgeführt, um eine Beeinflussung der Glukosehomöostase durch das Tumorleiden oder die antineoplastische Therapie, insbesondere durch die Metforminapplikation, zu evaluieren. Die vier Behandlungsgruppen Sham, Gemcitabin, Gemcitabin+Metformin und Metformin besaßen vor der Tumorzellinjektion an Tag 7 ein nahezu identisches Körpergewicht (Abb. 10 A). Postoperativ verloren alle Gruppen kurzzeitig an Gewicht. Bis zum Tag 15 hatte sich der Gewichtsverlauf jedoch wieder weitgehend stabilisiert. Nach Beginn der Therapie verloren die Mäuse unter antineoplastischer Therapie leicht an Gewicht, wohingegen das Gewicht der Mäuse aus der Sham-Kohorte weitgehend konstant blieb. Gegen Ende des Versuches sank das Körpergewicht aller Behandlungsgruppen leicht ab. Dieser Umstand war am ehesten auf die fortgeschrittene Tumorerkrankung zurückzuführen. Die Blutglukosekonzentrationen der vier Behandlungsgruppen waren am Tag der Tumorzellinjektion weitgehend gleich und wichen bis zu Tag 15 nur geringfügig voneinander ab (Abb. 10 B). Nach Beginn der Therapie an Tag 15 sank an Tag 21 die Blutglukosekonzentration einiger Mäuse unter Metformintherapie abrupt und stark ab (Abb. 10 C), sodass eine Reduktion der Metformindosis um die Hälfte für den weiteren Versuchverlauf notwendig wurde.

3.2.2 Gemcitabinapplikation verursacht eine Reduktion der Leukozytenzahl

Die Versuchstiere wiesen am Tag 36 nach Gemcitabin- oder Gemcitabin+Metforminbehandlung eine starke Reduktion in der Anzahl der Leukozyten im Blut in Vergleich zu Mäusen nach Shambehandlung auf (Abb. 10 D). Eine Evaluation der Leukozyten-Subpopulationen ließ erkennen, dass vor allem die Zahl der Lymphozyten durch Gemcitabin signifikant reduziert wurde (Abb. 10 E). Der Nachweis der relativen Leukopenie bzw. Lymphopenie bestätigte, dass Gemcitabin in klinisch relevanten Dosen

appliziert wurde. Die Therapie mit Metformin hatte hingegen keine signifikante Auswirkungen auf die Anzahl der Leukozyten bzw. Lymphozyten.

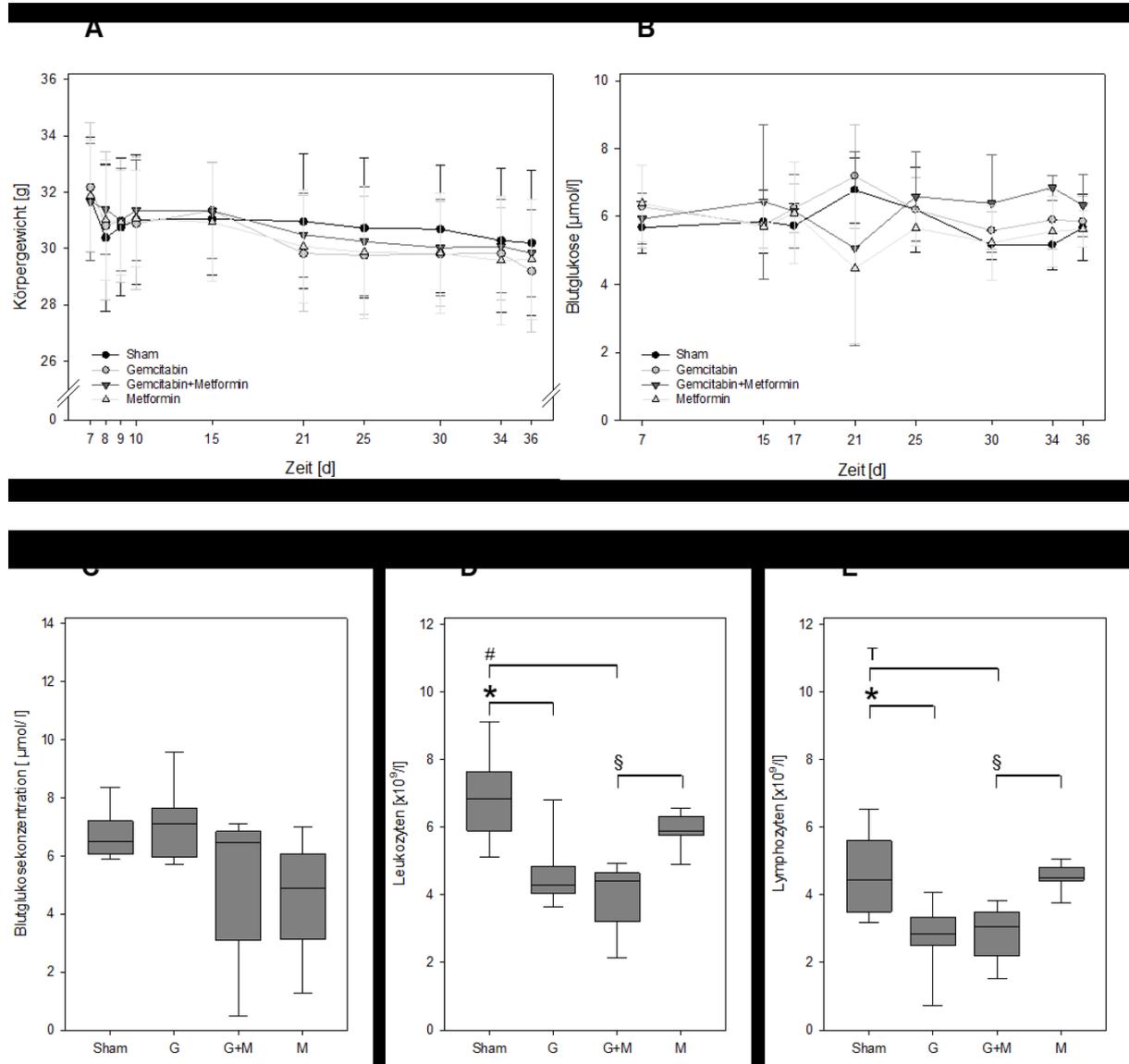


Abbildung 10: Auswirkung der Therapien auf Körpergewicht, Blutglukosekonzentration und Blutbild der vier Behandlungsgruppen Sham (n=8), Gemcitabin (G, n=8), Gemcitabin+Metformin (G+M, n=8) und Metformin (M, n=7). Abgesehen von einem transienten postoperativen Gewichtsverlust nahm das Körpergewicht aller vier Behandlungsgruppen im Laufe des Versuches nur gering ab (A) und die Blutglukosekonzentration blieb weitgehend konstant (B). Eine Therapie mit 250 mg/kg Metformin pro Tag reduzierte die Blutglukosekonzentration an Tag 21 (C). Bei den Behandlungsgruppen Gemcitabin und Gemcitabin+Metformin zeigte sich im Differentialblutbild vom letzten Versuchstag eine Reduktion der Leukozyten (D) und Lymphozyten (E) im Vergleich zu den Behandlungsgruppen Sham und Metformin. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole * mit $p=0,005$ (D) und $p=0,007$ (E); # mit $p<0,001$ (D) sowie § mit $p=0,001$ (D, E) dargestellt. Tendenzielle Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch den Buchstaben T mit $p=0,01$ (E) dargestellt.

3.2.3 Einfluss der Chemotherapie auf das Pankreasgewebe und die Leber

Zur Evaluation einer möglichen Pankreasatrophie nach Behandlung mit Gemcitabin oder Metformin wurden die Pankreata der Versuchstiere an Tag 36 gewogen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abb. 11 A). Die Aktivität der Lipase im Blutplasma entsprach dem Referenzwert von unbehandelten C57Bl/6J Mäusen, wobei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen nicht gefunden wurden (Abb. 11 B). Zudem führte die Tumorerkrankung nicht zu einer Erhöhung der Serumaktivität der Pankreaslipase außerhalb des Referenzwertes von unbehandelten C57Bl/6J Mäusen [150]. Um eine Schädigung des Lebergewebes durch die antineoplastische Therapie zu erfassen, wurden die Aktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (Abb. 11 C) und der Alanin-Aminotransferase (Abb. 11 D) im Blutplasma ermittelt. Dabei zeigten sich keine Auswirkungen der verschiedenen Therapien auf die Konzentration der Aminotransferasen im Blutplasma.

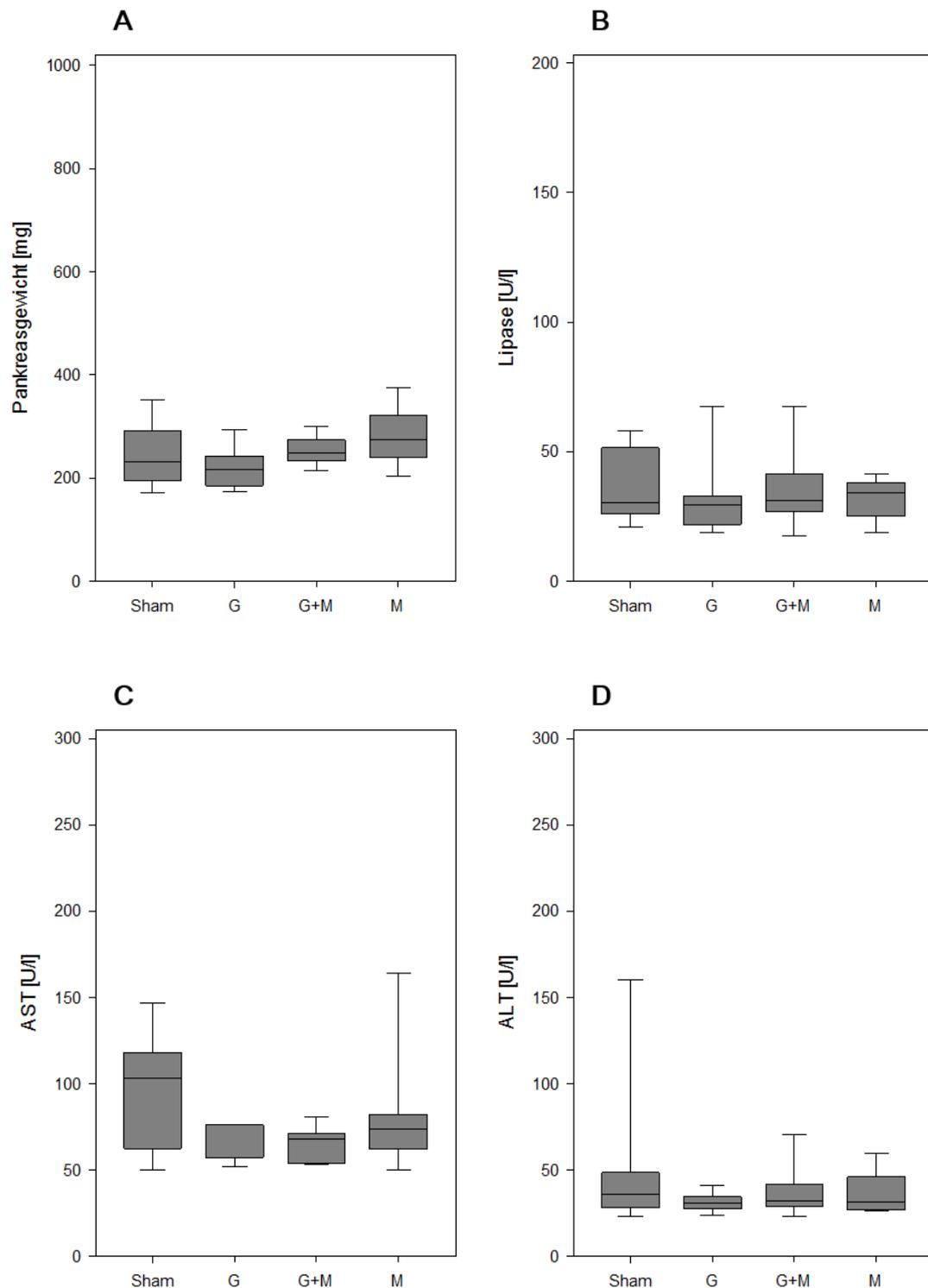


Abbildung 11: Keine Pankreas- bzw. Leberschädigung durch Gemcitabin und Metformin. Nach Kontroll- (Sham, n=8), Gemcitabin- (G, n=8), Metformin- (M, n=7) und Gemcitabin+Metformin-Behandlung (G+M, n=8) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Pankreasmasse beobachtet werden (A). Die Lipaseaktivität im Serum an Tag 36 (B) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Evaluation der Aktivität der Lebertransaminasen AST (C) und ALT (D) an Tag 36 zeigte keine hepatotoxische Wirkung der Therapeutika.

3.2.4 Reduktion des Tumorgewichtes durch antineoplastische Therapie

Als primärer Endpunkt der Studie wurde das Tumorgewicht nach 21 Tagen Therapie bzw. Shambehandlung erfasst. Bereits bei Präparation der inneren Organe zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in der Größe der Tumoren. Die Tumoren der Sham-Gruppe waren augenscheinlich größer als die der Interventionsgruppen (Abb. 12 A). Zur genaueren Evaluation der Wirksamkeit der einzelnen Behandlungen wurde der Tumor aus dem Pankreas und dem evtl. adhärennten Gewebe herauspräpariert und gewogen (Abb. 12 B). Dabei zeigte sich, dass die Behandlungen mit Gemcitabin, Metformin oder der Kombination aus diesen beiden Pharmaka in der Lage waren, das Tumorgewicht, im Vergleich zur Shamtherapie, zu reduzieren. Die Therapie mit dem klassischen Chemotherapeutikum Gemcitabin führte lediglich zu einer tendenziellen Reduktion des Tumorgewichtes im Vergleich zur Shamtherapie. Im Gegensatz dazu war die Behandlung mit dem Antidiabetikum Metformin, verglichen mit der Shambehandlung, in der Lage das Tumorgewicht signifikant zu reduzieren ($p=0,004$). Die stärkste Reduktion des Tumorgewichts wurde mit der Kombinationstherapie aus Gemcitabin plus Metformin erreicht ($p<0,001$). Somit weisen Gemcitabin und Metformin einen geringfügig additiven Effekt in diesem Tierversuch auf.

3.2.5 Evaluation von Proliferation, Nekrose und Inflammation

Um zu überprüfen, in wie weit die Therapeutika die Karzinomzellproliferation in den Tumoren hemmt, wurde der Anteil proliferierender Zellen mittels BrdU-Immunhistochemie dargestellt (Abb. 13 A). Die Therapie mit Gemcitabin, Metformin oder die Kombination beider Therapeutika reduzierte den Prozentsatz BrdU-positiver Zellen im Vergleich zur Shamtherapie, wobei die beobachteten Unterschiede jedoch nicht signifikant waren (Abb. 13 B). Um Zelltod innerhalb der Karzinome zu quantifizieren, wurden nekrotische Flächen mittels HE-Färbung dargestellt. Die nekrotischen Flächen waren dabei durch einen Verlust der Zytoarchitektur sowie fehlende Darstellung der Zellkerne gekennzeichnet (Abb. 13 C). Die Quantifizierung der Nekroseflächen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 13 D). Mittels CAE-Färbung wurde die Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe analysiert (Abb. 13 E). Es zeigte sich jedoch nur ein marginaler Anstieg der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Tumoren nach Behandlung mit Gemcitabin, Gemcitabin+Metformin und Metformin im Vergleich zur Sham-Behandlungsgruppe (Abb. 13 F). Die Reduktion des Tumorgewichts durch die verwendeten Pharmaka ist daher nicht

auf eine Zunahme der Tumorgewebsnekrose oder eine verstärkte Inflammation zurückzuführen, könnte jedoch durch eine geringfügig reduzierte Karzinomzellproliferation verursacht werden.

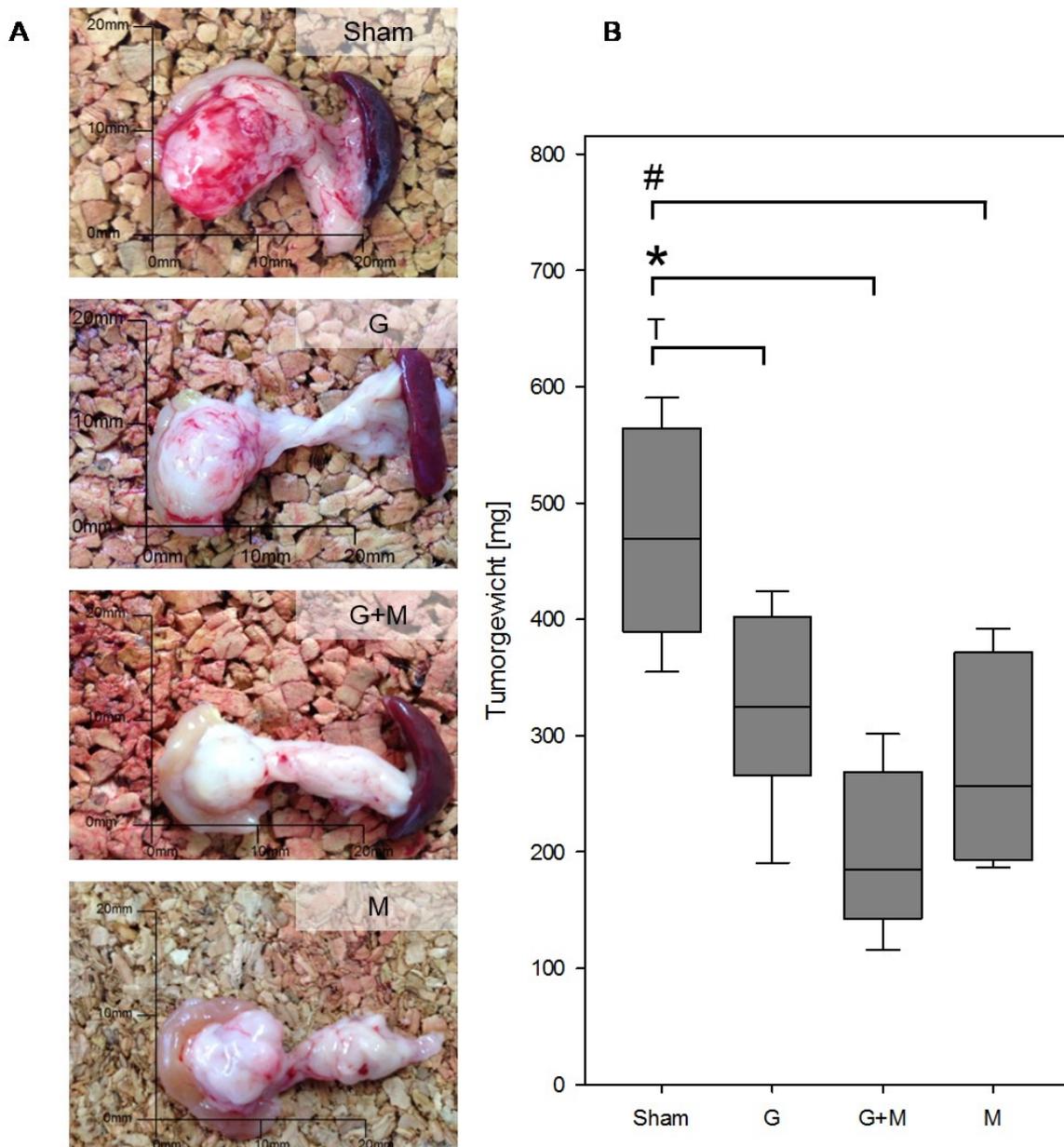


Abbildung 12: Antineoplastische Therapien reduzieren das Tumorgewicht. Darstellung der Karzinome (A) und der Quantifizierung des Karzinomgewichtes (B) der Behandlungsgruppen nach Shambehandlung der Tiere (Sham), bzw. Gemcitabin (G), Metformin (M) oder Gemcitabin+Metformin (G+M) Therapie. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Tumormasse bei den Interventionsgruppen im Vergleich zur Shamgruppe. Die stärkste Reduktion wurde durch die Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin+Metformin erreicht. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch die Symbole * mit $p < 0,001$, # mit $p = 0,004$ dargestellt. Tendenzielle Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch den Buchstaben T mit $p = 0,015$ dargestellt.

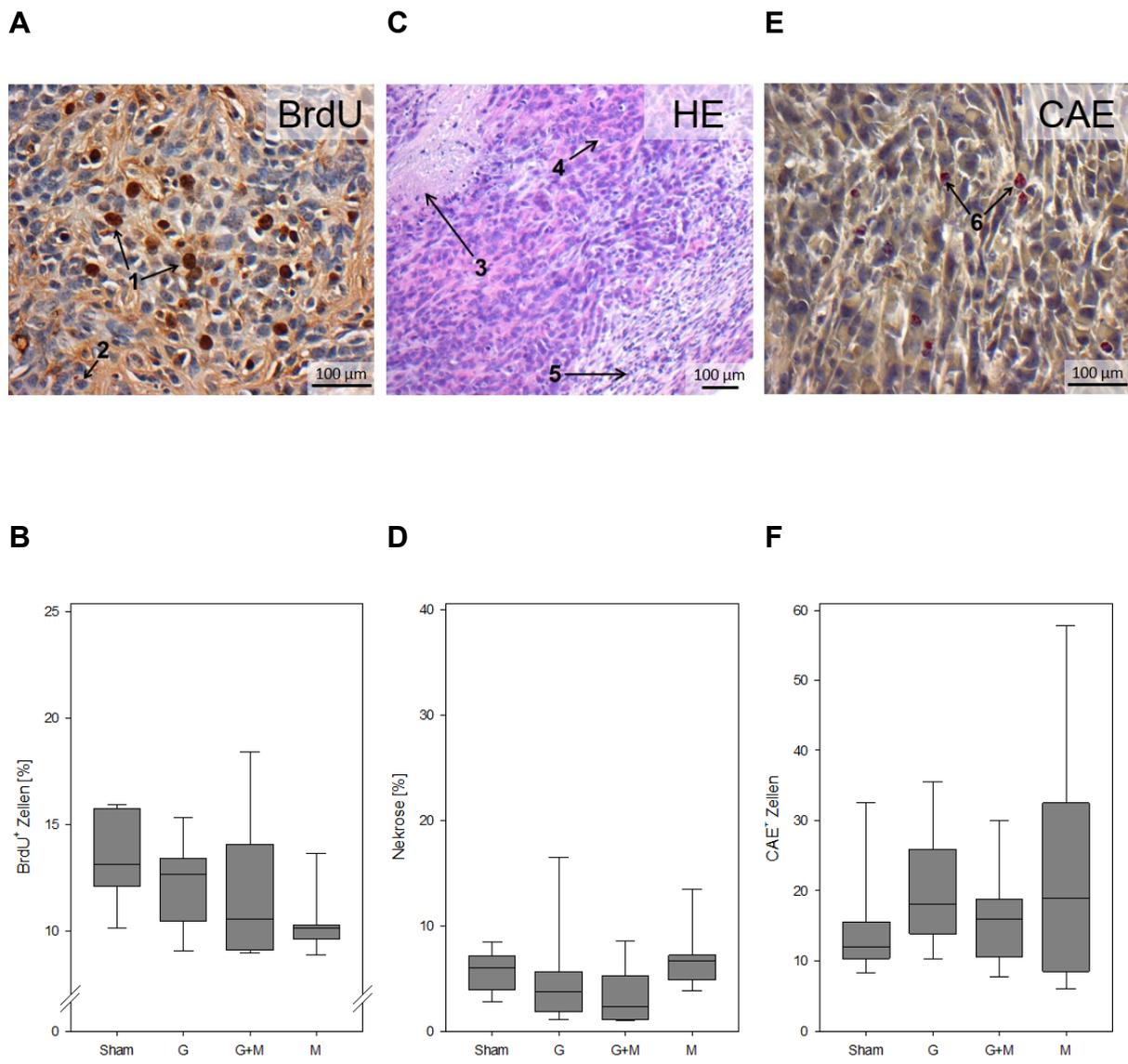


Abbildung 13: Evaluation von Proliferation, Nekrose und Inflammation. Mittels BrdU-Immunohistochemie wurde die Anzahl BrdU-positiver Zellen (1) und nichtproliferierender, BrdU-negativer Zellen (2) innerhalb der Tumoren dargestellt (A). Der Prozentsatz sich in Proliferation befindlicher Zellen wurde in der Kontrollgruppe (Sham) sowie nach Gemcitabin- (G), Metformin- (M) und Gemcitabin+Metformin-Behandlung (G+M) quantifiziert. Zudem wurden Gewebsschnitte der Tumoren mittels HE-Färbung (C) gefärbt und die Nekrosenflächen (3) innerhalb vitaler Tumorareale (4) in der Nähe des Tumorrandes (5) ausgemessen und ihr relativer Anteil an der Gesamtfläche berechnet (D). Eine Erhebung der Anzahl neutrophiler Granulozyten (6) innerhalb der Tumoren mittels CAE-Immunohistochemie (E) zeigte eine geringfügig erhöhte Inflammation bei den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (F).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1 *In vitro*

4.1.1.1 Auswahl der Tumorzelllinien

Die drei Tumorzelllinien wurden uns freundlicherweise von Prof. Tuveson vom Cambridge Research Institute, University of Cambridge, UK zur Verfügung gestellt. Da sie aus einem Pankreaskarzinom einer transgenen LSL-*Kras*^{G12D} Maus isoliert wurden, tragen die Zelllinien eine onkogene *Kras*-Mutation. Da dies die häufigste Mutation im PDA ist, scheinen die Zellen für ein Pankreaskarzinommodell gut geeignet [151]. Die Zelllinie 7265PDA trägt zusätzlich eine Punktmutation des Tumorsuppressorgens *p53* (*p53*^{R172H}). Auch *p53*-Mutationen sind häufig beim PDA mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert [152–154]. Eine Alternative wäre die Zelllinie Panc02 gewesen [112]. Da diese Zelllinie schon relativ alt ist und ihre Charakterisierung in der Literatur unterschiedlich dargestellt wird, erscheint die Charakterisierung neuer muriner Zelllinien jedoch interessanter [155].

4.1.1.2 WST-1- und BrdU-Assay zur Evaluation der Zellproliferation

Der WST-1-Assay findet in der Forschung breite Anwendung zur Evaluation von Zellproliferation und –viabilität *in vitro* [156]. Vorteilhaft sind dabei die kommerzielle Verfügbarkeit und die einfache Anwendung mit relativ wenigen Arbeitsschritten. Es muss jedoch beachtet werden, dass dieses Nachweisverfahren weder die Anzahl vitaler Zellen noch die Zellproliferation direkt misst, sondern lediglich Auskunft über den Zellstoffwechsel, genauer die intrazelluläre NADH-Produktion, gibt. Dies ist meist unerheblich, da Zellstoffwechsel und Proliferation gut miteinander korrelieren. Problematisch ist hingegen die Evaluation der Proliferation, wenn der Zellstoffwechsel durch unbekannte Faktoren beeinflusst wird. Der Blick auf die molekularen Mechanismen des WST-1-Assays verdeutlicht die Einschränkungen der Validität dieses Messverfahrens. Der WST-1-Assay ist einer der neueren kolorimetrischen Assays auf Basis von Tetrazoliumfarbstoffen. Diese beruhen im Wesentlichen auf Messung einer Absorptionsänderung, hervorgerufen durch einen Farbumschlag. Durch Reduktion des jeweiligen Tetrazoliumsalzes wird die zentrale Struktur des Moleküls, ein aus vier Stickstoffatomen bestehender Tetrazolring, aufgebrochen. Dies verursacht ein kräftige rote bis violette Färbung der jeweiligen Lösung, abhängig von dem verwendeten Tetrazoliumsalz

[157]. Im Unterschied zu anderen, positiv geladenen Tetrazoliumfarbstoffen, die hauptsächlich durch mitochondriale Reduktasen reduziert werden, kann WST-1 aufgrund seiner negativen Ladung die Zellmembran nicht durchdringen [158]. Daher ist dem WST-1-Reagenz 1-Methoxy-5-methyl-Phenazinmetholsulfat (mPMS) als intermediärer Elektronenakzeptor beigemischt. Dieser vermittelt die Übertragung von Elektronen unter Beteiligung eines Trans-Plasmamembran-Transporters von NADH auf WST-1 [159]. Die beobachtete konzentrationsabhängige Absorptionshemmung durch Metformin ist also nicht über eine Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu erklären, da dies zu einer Reduktion des NADH-Verbrauches und somit zumindest zu einem intramitochondrialen NADH-Konzentrationsanstieg führen würde [160]. Eine mögliche Erklärung wäre eine Zunahme der aeroben Glykolyse unter Metformineinfluss mit konsekutiver Induktion der Laktatdehydrogenase [161]. Dieses Enzym reduziert Pyruvat zu Laktat unter Verbrauch von NADH. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass der WST-1-Assay nicht zur Evaluation der Zellproliferation geeignet ist, wenn Substanzen untersucht werden sollen, die wesentlichen Einfluss auf den Zellstoffwechsel haben. Der BrdU-Assay hingegen misst die Menge an BrdU-Inkorporation in die DNA [162]. Da diese nahezu ausschließlich in der S-Phase der Zellproliferation stattfindet, ist der Messwert direkt proportional zu der Anzahl proliferierender Zellen. Der Vorteil dieses Nachweisverfahrens ist daher seine Spezifität für die Proliferation. Nachteile bietet der BrdU-Assay durch die Notwendigkeit mehrerer Arbeitsschritte, welche die Anzahl möglicher Fehlerquellen erhöht.

4.1.1.3 Trypanblau-Assay zur Evaluation des Zelltodes

Der Trypanblauassay ist ein seit Langem etabliertes Verfahren zur Beurteilung der Zellvitalität. Im Gegensatz zu anderen Verfahren zur Erfassung von Zelltod, wie der Nachweis von DNA-Leitern, die *terminal dUTP nick end-labeling* (TUNEL)-Methode, die Durchflusszytometrie oder den Cytochrom C-Nachweis, wird für diesen Assay nur ein einfaches Durchlichtmikroskop, eine Neubauer-Zählkammer und Trypanblau als Farbstoff benötigt [163–166]. Trypanblau kann die intakte Zellmembran nicht durchdringen. Kommt es zu Schäden an der Zellmembran, entweder bei Nekrose oder späten Phasen der Apoptose, gelangt der Farbstoff in die Zelle und färbt diese homogen blau. Dabei ist auf eine zügige Arbeitsweise und zeitnahe Mikroskopie zu achten, da Trypanblau selbst zytotoxisch wirkt. Sind die zu untersuchenden Zellen dem Farbstoff zu lange ausgesetzt, kann dies zu falsch positiven Ergebnissen führen [167]. Des Weiteren können einige Trypanblau-Lösungen agglutinierte Farbstoffpartikel enthalten, die

dann ein „Hintergrundrauschen“ erzeugen und die Differenzierung avitaler Zellen erschweren. Hinzu kommt, dass die Zellen im Verlauf ihrer Apoptose schrumpfen und zu sog. Apoptosekörperchen zerfallen, welche nur noch schwer von anderen Verunreinigungen zu unterscheiden sind [168]. Der Assay kann daher nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Da die Auswertung des Trypanblauassays auch immer eine subjektive Komponente enthält, ist oft eine Interobserver-Variabilität in der Auswertung zu beobachten. Durch Verblindung der einzelnen Proben wurde jedoch einer subjektiven Beeinflussung der Ergebnisse entgegengewirkt.

4.1.1.4 PARP und Cleaved Caspase 3 als molekulare Marker der Apoptose

Zur Detektion von Apoptose in Zellkultur gibt es zahlreiche Methoden mit spezifischen Vor- und Nachteilen. Dazu gehören der Nachweis der DNA-Fragmentation mittels DNA-Leitern, die TUNEL-Methode sowie die Markierung von Phosphatidylserinresten der Plasmamembran nekrotischer Zellen durch Annexin V oder der Nachweis der Cytochrom C-Freisetzung [163–166]. Ein gemeinsamer Nachteil der ersten beiden Methoden besteht in einem Fehlen der sicheren Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose [169]. Annexin V-Labeling ist zwar sehr spezifisch, benötigt jedoch eine zusätzliche Färbung zur Markierung nekrotischer Zellen [170]. Der Cytochrom c-Nachweis gestaltet sich schwierig aufgrund dessen kurzer Halbwertszeit im Zytosol [171]. Mittels Detektion einer Aktivierung der Caspase-Kaskade lässt sich die Apoptose von Zellen hochspezifisch nachweisen [172]. Besonders geeignet ist hierfür die aktivierte Caspase 3 („cleaved“ caspase). Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion münden in einer Spaltung der Procaspase 3 zu ihrer aktiven Form durch Initiatorcaspasen. Als Effektorcaspase bewerkstelligt Caspase 3 die Spaltung verschiedener Proteine, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität bedeutend sind, darunter auch die Poly- (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Die Detektion der aktivierten Caspase-3 mittels Western Blot erfordert zwar relativ hohe Zellzahlen und eine aufwendige Aufbereitung der Proben, ist jedoch hochspezifisch zum Nachweis apoptotischer Zellen [173]. Zusätzlich wird diese Selektivität durch den Nachweis der Aktivierung der Caspase-3 in Form von PARP-Spaltprodukten weiter erhöht.

4.1.2 *In vivo*

4.1.2.1 Orthotopes syngenes Pankreaskarzinommodell

Zum Vergleich verschiedener Therapien des Pankreaskarzinoms im Tierversuch ist ein Modell erforderlich, das zuverlässig Tumoren vergleichbarer Größe und Histologie zur Verfügung stellt. Die subkutane oder orthotope Transplantation von *patient-derived xenografts* bei immunkompromittierten Mäusen ist hierfür eher ungeeignet, da zum einen Tumoren unterschiedlicher Histologien entstehen, und zum anderen sind die inflammatorische Reaktion auf den Tumor und deren potenzielle Beeinflussung durch die Therapie nur unzureichend beurteilbar [174,175]. Die Injektion humaner Pankreaskarzinomzelllinien, subkutan oder orthotop, führt zwar zur Entstehung von Tumoren von vergleichbarer Histologie und Größe, jedoch ist auch in diesem Modell die potenzielle Beeinflussung tumorimmunologischer Aspekte durch die Therapie nur unzureichend beurteilbar. Erst die Verwendung von murinen Karzinomzellen erlaubt die Etablierung von Tumormodellen mit naturnahem Tumormikromilieu [176]. Deren subkutane Injektion ist zwar technisch einfach und erlaubt die kontinuierliche Größenmessung der heranwachsenden Tumoren, bringt allerdings eine eher unphysiologische Tumor-Stroma-Interaktion mit sich, da die Tumoren nicht im Pankreas selbst entstehen [177]. Die orthotope Injektion von murinen Karzinomzellen hingegen erlaubt die Entstehung von Pankreaskarzinomen gleicher Größe und Histologie im physiologischen Ursprungsgewebe eines immunkompetenten Wirtes. Im Vergleich zur Verwendung transgener Mausmodelle des Pankreaskarzinoms, wie z.B. LSL-*Kras*^{G12D/+};Pdx-1-Cre-Mäuse, erfordert unser Modell einen wesentlich geringeren finanziellen und zeitlichen Aufwand. Nach einigen Vorversuchen erreichten wir eine *tumor take rate* von nahezu 100 % und eine gegen Null gehende perioperative Mortalität. Die Entstehung einer Peritonealkarzinose durch intraoperative Tumorzell dissemination wurde durch Aufpressen eines Wattestäbchens auf den Injektionskanal effektiv vermieden. Die asservierten Tumoren wiesen zwar im Gegensatz zu humanen Pankreaskarzinomen ein eher verdrängendes als infiltratives Wachstum auf und ließen zudem Lymphknoten- und Organmetastasen vermissen. Dennoch ähnelten sie histologisch humanen PDAs und zeigten eine desmoplastische Reaktion in der Tumorperipherie. Daher ist dieses Modell aufgrund der geringen interindividuellen Unterschiede von Tumorgröße und Beschaffenheit zwischen den einzelnen Versuchstieren ideal geeignet, um die Auswirkungen verschiedener Substanzen auf das Tumorwachstum zu evaluieren.

4.1.2.2 Antineoplastische Therapie mit Gemcitabin und Metformin

Im Gegensatz zur Publikation von Little et al. [111], konnte bei einer Dosis von 20 mg/kg KG Gemcitabin keine Reduktion des Tumorgewichtes in Vorversuchen beobachtet werden (Daten wurden nicht gezeigt), sodass alle beschriebenen Experimente mit 50 mg/kg Gemcitabin pro Injektion durchgeführt wurden. Dadurch wurde eine kumulative Gesamtdosis von 300 mg/kg KG Gemcitabin erreicht. Im Vergleich dazu erhält ein Patient im ersten Zyklus seiner Chemotherapie bei PDA 1000 mg Gemcitabin/m² Körperoberfläche einmal wöchentlich über sieben Wochen, gefolgt von weiteren Zyklen mit jeweils einer Dauer von drei Wochen mit einer Woche Pause zwischen den Zyklen. Unter Annahme eines 70 kg schweren Patienten ist nach Berechnung mit der Livingston-Lee-Formel von einer Gemcitabineinzeldosis von näherungsweise 26 mg/kg Körpergewicht auszugehen [178]. Die kumulativen Dosen Gemcitabin eines Menschen bei PDA-Therapie betragen also in einem Behandlungszeitraum von 3 Wochen 78 mg/kg KG, nach dem ersten Therapiezyklus von 7 Wochen 183 mg/kg KG und nach Vollendung von zwei Therapiezyklen 261 mg/kg KG. Daher sind die in dieser Studie verwendeten Gemcitabindosierungen annähernd vergleichbar mit der klinischen Anwendung. Die Dosierung von Metformin orientierte sich an mehreren Studien, die einen antiproliferativen Effekt einer täglichen Metformindosis von 250 mg/kg Körpergewicht auf Xenografts von Pankreas und Kolonkarzinomen sowie bei Leukämie im Tierversuch nachweisen konnten [179]. Im Vergleich dazu beträgt maximale Tagesdosis eines Typ-2-Diabetikers 2000 mg Metformin oral [180]. Bei einer oralen Bioverfügbarkeit von 50-60 % entspricht dies einer effektiven Dosis von 1000-1200 mg täglich und somit bei einem 70 kg schweren Patienten ca. 14-17 mg/kg Körpergewicht. Die hier verwendete Metformintherapie liegt mit 250 bzw. 125 mg/kg Körpergewicht deutlich über den Dosierungen bei Typ-2-Diabetikern und unterschied sich darüber hinaus auch, aufgrund der intraperitonealen Applikation, von der Pharmakokinetik einer oralen Therapie. Da jedoch eine orale Verabreichung von Metformin über das Trinkwasser oder die Nahrung unter Umständen zu interindividuellen Dosisschwankungen zwischen den einzelnen Versuchstieren geführt hätte und zudem für die Gemcitabinapplikation ohnehin eine intraperitoneale Injektion erforderlich war, schien diese Applikationsform auch für die Metformin- bzw. Shamtherapie naheliegend.

4.1.2.3 BrdU-Immunhistologie zur Beurteilung der Proliferation

Zur Beurteilung der Zellproliferation in histologischen Gewebeproben sind zahlreiche Methoden verfügbar. Zu den etabliertesten gehören der immunhistochemische Nachweis der BrdU-Inkorporation, des Ki-67 Proteins und des proliferating cell nuclear antigen (PCNA) sowie die in situ-Hybridisierung von Histon-mRNA [181,182]. PCNA ist ein Hilfsprotein der DNA-Polymerasen δ und ϵ und wird in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen unterschiedlich stark exprimiert. Seine Expression nimmt in der G1-Phase zu, erreicht in der S-Phase ihr Maximum und nimmt in der G2 und M-Phase wieder ab [181,182]. PCNA ist nur eingeschränkt als Proliferationsmarker nutzbar, da zwischen einzelnen Zellpopulationen starke Unterschiede in der PCNA-Expression bestehen, es außerdem im Rahmen von DNA-Reparaturprozessen exprimiert wird und die S-Phase-Fraktion der Zellen nicht sicher bestimmt werden kann [183,184]. Zudem zeigte es eine unzureichende Korrelation mit anderen Proliferationsmarkern und ist aufgrund seiner langen Halbwertszeit zur Proliferationsbeurteilung von schnell wachsenden Zellen eher ungeeignet [185,186]. Ki-67 ist ein nukleäres Protein und wird in allen Phasen des Zellzyklus, mit Ausnahme der G0-Phase exprimiert [187]. Daher findet der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 breite Anwendung in der Pathologie zur Bestimmung der Wachstumsfraktion von Tumoren. Nachteil dieser Methode ist die fehlende S-Phase-Spezifität. Des Weiteren wird die Ki-67-Expression durch DNA-Schäden und Zellzyklusarrest wenig beeinflusst, was bei der Evaluation antineoplastischer Substanzen zu Fehlinterpretationen führen kann [188]. Histon-mRNA wird ausschließlich in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert und nach dieser rasch degradiert [189]. Daher ist ihr Nachweis mittels in situ-Hybridisierung hervorragend geeignet, um Zellen innerhalb der S-Phase selektiv darzustellen [190]. Allerdings ist diese Methode anfällig für Kontaminationen durch RNAsen und verliert zudem bei Überschreiten einer Fixierungszeit von 24 h zunehmend an Sensitivität [191]. Da in dieser Studie der Einfluss verschiedener Substanzen auf relativ schnell proliferierende Tumorzellen untersucht werden sollte, fiel die Wahl auf BrdU als Proliferationsmarker. Sein Einbau in die DNA erfolgt hauptsächlich in der S-Phase, jedoch auch zu geringerem Maße bei der DNA-Reparatur [192]. Zellen mit BrdU-Inkorporation durch DNA-Synthese zeigen eine homogene Braunfärbung des Zellkerns bei histochemischen Nachweis, wohingegen Kerne von Zellen, die BrdU im Rahmen von DNA-Reparatur einlagerten, sich braun-

gepunktet darstellen [193]. Nachteile des BrdU-Labeling bestehen in der Notwendigkeit der vorherigen intraperitonealen Injektion bei Versuchstieren und einer möglichen Mutagenität dieser Substanz [194].

4.1.2.4 Planimetrische Bestimmung nekrotischer Tumoranteile

Da die Gefäßversorgung der meisten Tumoren durch Rekrutierung vorhandener Gefäße und Neoangiogenese in der Peripherie der Neoplasie gesichert wird, entstehen Nekrosen meist zentral aufgrund eines Missverhältnisses von Tumorwachstum und Substratversorgung. Vor allem schnell und aggressiv wachsende Tumoren wie das PDA zeigen daher häufig zentrale nekrotische Areale [195]. Die Größe von zentralen Tumornekrosen belegt daher nicht zwangsläufig die Effektivität einer zytostatischen Therapie, da diese vorwiegend in Karzinombereichen mit vorhandener Gefäßversorgung wirkt. Daher fokussierten wir uns auf die Analyse nekrotischer Areale am Tumorrand, ohne die in den Karzinomen unabhängig von der Behandlung ebenfalls klar erkennbaren zentralen Nekrosen zu quantifizieren. Dennoch kann es zu Fehlinterpretationen kommen, wenn man ausgehend von zweidimensionalen Flächen Messungen anhand histologischer Präparate Schlussfolgerungen auf dreidimensionale Strukturen zieht. Es ist z.B. möglich, dass Nekrosen im histologischen Präparat lediglich tangential angeschnitten wurden und somit nicht vollständig repräsentiert waren. Ob jedoch eine präzisere Darstellung der Tumornekrosen im Randbereich mittels Magnetresonanztomographie oder kontrastmittelverstärkter Computertomographie möglich gewesen wäre, bleibt äußerst fraglich, da die Quantifizierung dieser kleinen nekrotischen Bereiche eine hohe Auflösung voraussetzt.

4.1.2.5 CAE-Färbung zur Beurteilung der Inflammation

Die Darstellung der Chloracetatesterase ist eine spezifische und gut etablierte Methode zur selektiven Darstellung neutrophiler Granulozyten und Mastzellen [196]. Das Tumormikromilieu enthält zahlreiche Immunzellen. Darunter myeloide Suppressorzellen (MDSC), regulatorische T-Zellen und Makrophagen, die in ihrem Zusammenspiel eine Immunprivilegierung des Tumors hervorrufen [197]. So unterdrücken beispielsweise MDSC die Funktion von T-Effektorzellen [198]. Während die antineoplastische Funktion CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen hinreichend untersucht wurde, ist die Rolle von neutrophilen Granulozyten innerhalb von Tumoren noch nicht vollständig geklärt. So zeigte sich bei einigen Karzinomen eine Assoziation zwischen erhöhter intratumoralen Neutrophilenzahl und schlechterer Prognose [199-203].

Andererseits zeigen neutrophile Granulozyten auch eine Antitumoraktivität durch Freisetzung des TRAIL-Liganden, TNF α und weiterer zytotoxischer Faktoren [204,205]. In dieser Studie konnte kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Therapien auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Tumoren gezeigt werden. Eine zusätzliche Darstellung von CD8⁺-T-Effektorzellen und Makrophagen wäre wünschenswert gewesen, um die Entzündungsreaktion im Bereich der Tumoren genauer zu beurteilen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Antineoplastische Wirkung von Gemcitabin

4.2.1.1 Gemcitabin hemmt die Zellproliferation und induziert den Zelltod *in vitro*

Das Pyrimidin-Analogon Gemcitabin findet seit etwa einem Jahrzehnt Anwendung in der Therapie der verschiedensten Malignome [206]. Die Gemcitabinmonotherapie ist die 1. Wahl zur adjuvanten Chemotherapie nach Resektion eines PDA und ist immer noch Erstlinientherapie bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten PDAs [37]. Die antiproliferativen Effekte von Gemcitabin auf murine oder humane Pankreaskarzinomzellen sind hinreichend bekannt [155,207]. In Einklang mit diesen Studien zeigte Gemcitabin bei der Behandlung der drei PDA-Zelllinien sowohl antiproliferative als auch pro-apoptische Effekte. Die dabei verwendeten Gemcitabinkonzentrationen lagen weit unterhalb der Plasmakonzentrationen, die während der Chemotherapie des PDA beim Menschen erreicht werden [120]. Die Quantifizierung der Sensitivität von 6606PDA, 6606I und 7265PDA Zellen gegenüber Gemcitabin diente der Charakterisierung dieser neuartigen Zelllinien und bildete den Grundstein für den experimentellen Aufbau der *in vitro* und *in vivo* Versuche zwecks Evaluation der Kombinationstherapie von Metformin mit Gemcitabin.

4.2.1.2 Einfluss von Gemcitabin auf die Pathophysiologie des PDA

Auch der Einfluss von Gemcitabin auf das Karzinomwachstum wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen des PDAs evaluiert [111,208]. Bei Vorversuchen mit dem o.g. Therapieprotokoll [111] konnte jedoch keine Reduktion des Tumorgewichtes erreicht werden (Daten nicht gezeigt), sodass eine Dosissteigerung auf 50 mg/kg KG beschlossen wurde. Dadurch konnte zwar eine Reduktion des Tumorgewichtes durch Gemcitabin erreicht werden, jedoch war diese nicht signifikant und weniger ausgeprägt als in den Metformin und Metformin+Gemcitabin-Kohorten. Es erscheint unwahr-

scheinlich, dass diese Ergebnisse aus einer zu geringen Dosis oder fehlerhaften Wirkstoffapplikation resultierten, da sich im Differentialblutbild eine deutliche Leukopenie als typische Nebenwirkung der Gemcitabintherapie zeigte [209]. Ein anderer Erklärungsansatz besteht aus einer mangelnden Wirkstoffabgabe im Tumor und einer ungünstigen Tumor-Stroma-Interaktion. Das Adenokarzinom des Pankreas ist charakterisiert durch geringe Perfusion und eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion [105,210]. Neben den eigentlichen Tumorzellen finden sich im Tumormikromilieu Endothelzellen, Immunzellen, Fibroblasten und Pankreassternzellen (PSC). Vor allem die beiden letzteren Zellentitäten gelten als Vermittler der desmoplastischen Reaktion und können das Verhalten von Pankreastumoren hinsichtlich Aggressivität und Chemoresistenz negativ beeinflussen [211]. PSC liegen unter physiologischen Bedingungen ruhend im Pankreasgewebe und sind durch die Speicherung von Retinol charakterisiert [212]. Unter dem Einfluss von Inflammation im Rahmen einer Pankreatitis oder eines Karzinoms nehmen sie jedoch Myofibroblasten-ähnliche Eigenschaften an und produzieren große Mengen extrazellulärer Matrixproteine wie Laminin, Desmin, und Kollagen I & III, welche das Tumorstroma verdichten und den Zugang von Chemotherapeutika zu den Tumorzellen einschränken [213]. Auch bei den in dieser Studie gewonnenen Tumoren konnte in weiterführenden Analysen eine desmoplastische Reaktion im Tumorrandbereich nachgewiesen werden [214]. Diese könnte zu einer verminderten Wirksamkeit der Gemcitabin-Monotherapie *in vivo* beigetragen haben. Zudem können sich PSC und Tumorzellen gegenseitig in ihrem Wachstum beeinflussen und führen u.a. durch die Förderung der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zu einer erhöhten Chemoresistenz von Karzinomzellen [215-220].

Ein weiterer Faktor, der die Wirkstoffkonzentration nach Applikation des Chemotherapeutikums beeinflusst, ist die Perfusion des Tumorgewebes [221]. In einigen Arbeiten konnte mittels feingeweblicher Untersuchung von Operationspräparaten eine erhöhte Dichte an Kapillaren, Arteriolen und Venolen (microvascular density, MVD) innerhalb von PDAs gezeigt werden [222,223]. Dennoch stellen sich Adenokarzinome des Pankreas in bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise der kontrastmittelverstärkten Computertomographie, im Vergleich zum umgebenden Gewebe als minderperfundiert dar [224,225]. Dabei zeigte sich in Studien nicht nur ein verminderter Gesamt-Blutfluss, sondern auch eine verminderte Gefäßpermeabilität [226]. Die Ergebnisse der Bildgebung deckten sich hierbei mit dem Nachweis eines hypoxischen Milieus im Tu-

morinneren [227]. Einige Autoren gehen daher davon aus, dass das ausgeprägte, kollagen- und glykosaminoglykanreiche Stroma einen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck hervorruft, welcher durch Gefäßkompression die Tumordurchblutung einschränkt und so die Wirkstoffabgabe in das Tumorgewebe reduziert [228,229]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen von Park und Kollegen gestützt, die in ihrer Arbeit eine Korrelation zwischen Tumorperfusion und Ansprechen auf eine Radio-Chemo-Therapie fanden [230]. Vermutlich waren auch die Tumoren in der vorliegenden Studie eher minderperfundiert. Zwar zeigten sie vereinzelte Gefäße im Randbereich, die Tumoren erschienen jedoch bei Präparation unmittelbar nach Eröffnung des Situs sehr blass.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Bedingungen für einen antiproliferativen Effekt von Gemcitabin *in vitro* sich deutlich von denen *in vivo* unterscheiden. Während die Zellen auf der Mikrotiterplatte von allen Seiten gleichmäßig und dauerhaft mit Gemcitabin umspült werden, wird die Wirkstoffabgabe im Tiermodell durch ungünstige Perfusionsverhältnisse und ein dichtes Tumorstroma eingeschränkt. Zudem könnten die umgebenden Zellen des Tumormikromilieus verschiedene Wachstumsfaktoren freisetzen, welche der antiproliferativen und pro-apoptotischen Wirkung des Gemcitabins entgegenwirken können [231].

4.2.2 Antineoplastische Wirkung von Metformin

4.2.2.1 Erklärungshypothesen der antineoplastischen Wirkung von Metformin

Schon vor einigen Jahren suggerierten die Daten epidemiologischer Studien eine Assoziation zwischen einer Metformintherapie und einem verringerten Erkrankungsrisiko für verschiedene Malignome [92,232]. Seitdem wird eine potentielle antineoplastische Wirkung von Metformin in der Literatur kontrovers diskutiert, insbesondere da Diabetes mellitus, als unabhängiger Risikofaktor für Malignome, einen möglichen Confounder dieses Zusammenhangs darstellt. Zahlreiche Arbeiten, darunter sowohl *in vitro*-Studien, Tierversuche als auch erste klinische Studien haben sich mit dem Einsatz von Metformin als antineoplastisches Agens auseinandergesetzt [233,234]. Zur Erklärung der dabei beobachteten antiproliferativen Eigenschaften von Metformin kommen aus molekularbiologischer Sicht mehrere Wirkmechanismen in Betracht.

Von besonderem Interesse ist hierbei die Hemmung des *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalweges durch Metformin (siehe Abb. 14). mTOR ist als Bestandteil des mTORC1 Komplexes ein wichtiger Regulator der Proteinsynthese. Der

mTORC1-Komplex bzw. dessen Regulator, der dimere Hamartin-Tuberin-Proteinkomplex (TSC-1/2), stellen einen elementaren Knotenpunkt für verschiedene Signalwege dar und dienen der Vermittlung von proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Signalen [235]. So ist mTORC1 mitverantwortlich für die Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen verschiedener Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IGF-1, VEGF, EGF und PDGF, deren wachstumsfördernde Eigenschaften auf Tumorzellen hinreichend bekannt sind [236–238]. Des Weiteren befindet sich mTOR innerhalb der, beim PDA typischerweise veränderten, Signaltransduktionswege von Kras [239], p53 [240,241] sowie PTEN [242] und erfährt durch diese Mutationen eine Überaktivierung. Daher stellen mTOR und seine assoziierten Proteine einen vielversprechenden pharmakologischen Angriffspunkt für Metformin und andere Pharmaka in der Therapie des Pankreaskarzinoms dar.

4.2.2.2 Fragliche antineoplastische Wirkung von Metformin *in vitro*

Bis zum heutigen Tage hat sich eine Fülle von Arbeiten mit der Wirkung von Metformin alleine oder in Kombination mit anderen antineoplastischen Substanzen in der Zellkultur befasst. Dabei wurden Zelllinien von Prostata-, Bronchial-, Ovarial-, Mamma- und Pankreaskarzinome sowie von einer Vielzahl weiterer Malignome untersucht. Dabei zeigte Metformin meist antiproliferative Effekte mit Arrest des Zellzyklus in der G1/G0-Phase, bei einigen Zelllinien führte es zur Induktion der Apoptose [243–254]. Trotz dieser mutmaßlich vorteilhaften Effekte von Metformin konnte in dieser Arbeit nur ein sehr geringer Effekt von Metformin auf die Zellproliferation und die Apoptose *in vitro* festgestellt werden. Die für die Versuche in der Zellkultur verwendeten Metforminkonzentrationen lagen um mehr als drei Zehnerpotenzen über den üblichen Plasmakonzentrationen unter antidiabetischer Therapie. Diese betragen im steady state durchschnittlich unter 1 mg/l (7,74 µmol/l) und überschreiten bei gesunden Patienten auch nach maximaler Dosierung nicht 4 mg/l (30,96 µmol/l) [255]. Zudem zeigte sich erst bei einer sehr hohen Konzentration von 100 mM Metformin eine massive Hemmung der Proliferationsrate. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine unzureichende Aufnahme von Metformin in die Karzinomzellen aufgrund einer verminderten oder fehlenden Expression des OCT-1 (SLC22A1) und ein toxischer Effekt von Metformin auf die Zellmembran bei hohen Konzentrationen [138].

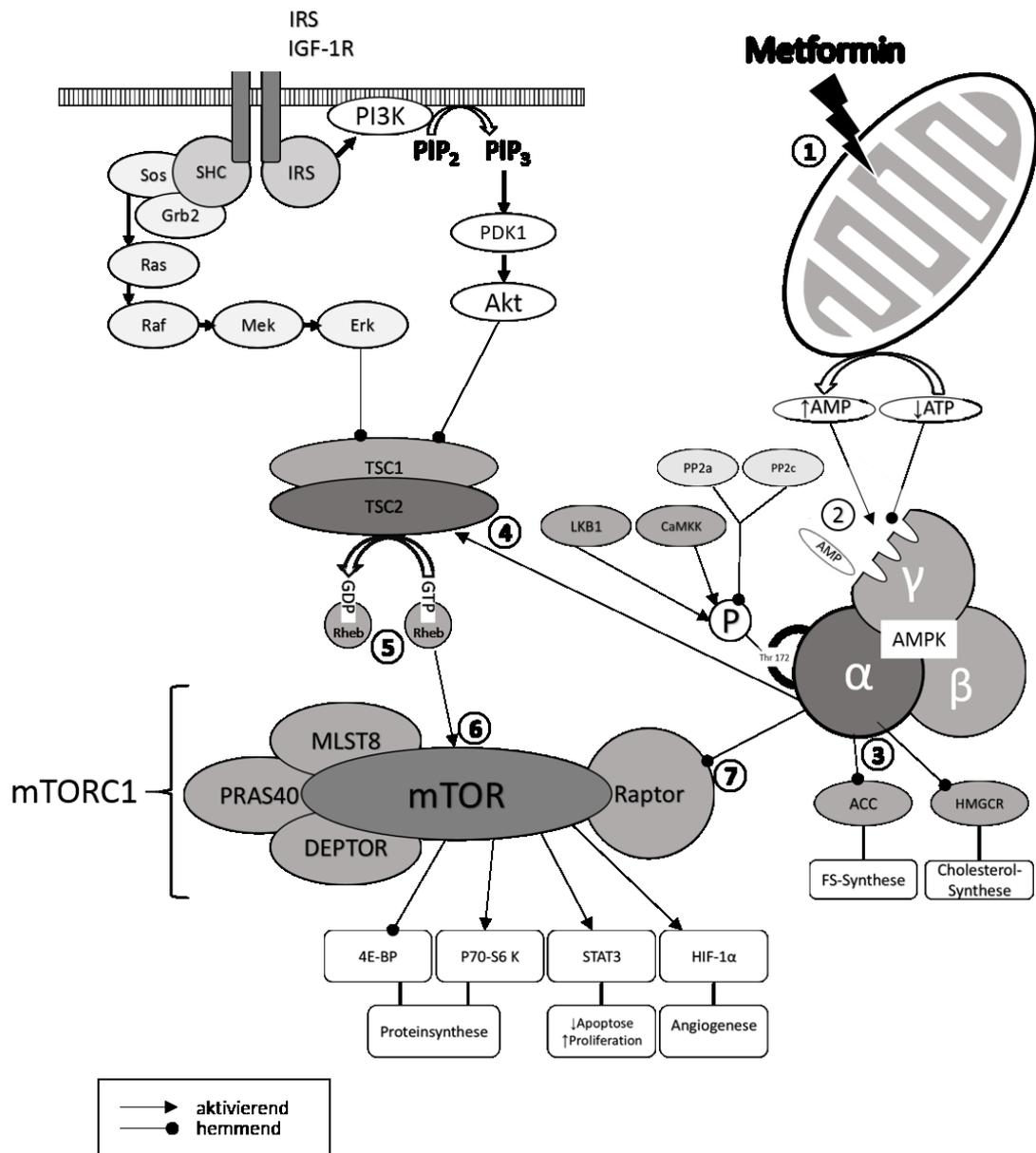


Abbildung 14: Einfluss von Metformin auf den mTORC1-Signalweg. Metformin blockiert den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und erhöht so den intrazellulären AMP-Gehalt^①. Durch Bindung von AMP an die regulatorische γ -Untereinheit der *AMP-activated protein kinase* (AMPK)^② wird die aktivierende Phosphorylierung an Thr 172 der katalytischen α -Untereinheit durch die Leberkinase B1 (LKB1) oder Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen-Kinasen (CaMKK) aktiviert. Durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase und der HMG-CoA-Reduktase werden die Fettsäurensynthese und die Cholesterolsynthese gehemmt^③. Die AMPK phosphoryliert den dimeren Hamartin-Tuberin-Protein-Komplex (TSC1/2)^④. Dieser aktiviert die GTPase-Aktivität von Rheb, welches daraufhin GTP zu GDP hydrolysiert^⑤ und seine Fähigkeit verliert, den *mammalian target of rapamycin complex-1* (mTORC1) zu aktivieren^⑥. Zusätzlich hemmt die AMPK mTORC1 durch direkte Phosphorylierung des *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor)^⑦. Durch Inhibition von mTORC1 werden die Proteinsynthese, die Proliferation und die Angiogenese gehemmt und die Apoptose gefördert.

Da sich jedoch im WST-Assay eine dosisabhängige Hemmung des Zellstoffwechsels durch Metformin zeigte und in weiteren Analysen die Expression von SLC22A1 in den drei Karzinomzelllinien nachgewiesen werden konnte, ist eine Aufnahme von Metformin über Transportproteine anzunehmen. Geht man nun davon aus, dass Metformin in adäquater Menge im Zellinneren vorliegt, müssen andere Mechanismen für die „Metforminresistenz“ der PDA-Zelllinien verantwortlich sein. Dabei müssen vor allem Mechanismen der Gegenregulation auf Ebene der zellulären Signaltransduktion als Reaktion auf eine Hemmung des mTORC1-Komplex in Betracht gezogen werden. Aktiver mTORC1 vermittelt über die S6-Kinase eine inhibitorische Phosphorylierung und transkriptionale Hemmung des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 (IRS-1) sowie des *growth factor receptor-bound protein 10* (Grb10) und bewirkt somit eine Hemmung des von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgehenden PI3K/Akt-Signalweges [256]. Daher ist es möglich, dass eine pharmakologische Inhibition von mTORC1 durch Entfall des negativen Feedbacks eine Überaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nach sich zieht, die dem gewünschten antiproliferativen Effekt entgegenwirkt [257].

4.2.2.3 Metformin antagonisiert die antineoplastische Wirkung von Gemcitabin *in vitro*

Besonders auffällig waren die Resultate der Kombinationsbehandlung mit Metformin und Gemcitabin *in vitro*, welche in einer Reduktion der pro-apoptotischen Wirkung von Gemcitabin resultierte. Diese Ergebnisse scheinen sowohl im Widerspruch zu den Ergebnissen des tierexperimentellen Teils dieser Arbeit als auch zum Großteil der Literatur zu stehen. Die Kombination von Metformin mit konventionellen Zytostatika, wie Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, Doxorubicin, 5-FU, Gemcitabine, Etoposid, Daunorubicin, L-Asparaginase sowie mit Tyrosinkinaseinhibitoren in ihrer Wirkung auf verschiedene Karzinomzelllinien wurde *in vitro* bereits evaluiert [251,258–266]. Die überwiegende Mehrheit der Autoren berichtete von einem additiven oder synergistischen Effekt der o.g. Kombinationen. Dabei ist das Vorliegen eines Publikationsbias nicht auszuschließen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die hier gezeigten Ergebnisse besteht im Einfluss von Metformin auf den Zellzyklus. Wie bereits in *in-vitro* Studien gezeigt wurde, ist Metformin in der Lage, Tumorzellen am Übergang von der G1- in die S-Phase zu hindern [254,267]. Dies geschieht vor allem durch Hemmung des mTORC1, der maßgeblich an der Zellzyklusprogression beteiligt ist [268–270], zum Teil aber auch durch die direkte Aktivierung des FOXO3a Transkriptionsfaktors durch AMPK [271].

Da antineoplastische Nukleosidanaloga vor allem in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert werden, wäre eine Hemmung des Gemcitabin-Einbaus in die DNA durch eine Metformin-induzierte Verzögerung des Zellzyklus denkbar [272]. Dadurch würden weniger DNA-Strangbrüche entstehen und folglich würde bei weniger Zellen der programmierte Zelltod ausgelöst. Diese These ist allerdings nicht in der Lage, die von uns gemachten Beobachtungen hinreichend zu erklären. Zum einen konnte für Gemcitabin eine Wirksamkeit unabhängig vom Zellzyklus gezeigt werden [9], zum anderen belegte der BrdU-Assay, dass zwischen den PDA-Zellen unter Gemcitabinbehandlung und denen unter Gemcitabin-Metformin-Kombinationsbehandlung keine signifikanten Unterschiede in der Zellproliferation bestanden. Es müssen daher andere Mechanismen für die Hemmung der Gemcitabin-induzierten Apoptose durch Metformin verantwortlich sein.

Ein weiteres Erklärungsmodell bieten die bereits oben genannten Gegenregulationsmechanismen, die bei Hemmung des mTOR-Signalweges durch Metformin in Kraft treten. So beschreiben zwei Publikationen eine Antagonisierung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin auf Tumorzellen durch Metformin *in vitro*. Beide Autoren schreiben diesen Effekt einer verstärkten Aktivität der Akt-Kinase zu und konnten die verstärkte Expression dieses Proteins unter Metformineinfluss nachweisen [273,274]. Eine verstärkte Stimulation des PI3K/Akt-Signalweges führt zu einer Hemmung des programmierten Zelltodes. Akt bewerkstelligt via Phosphorylierung die Inaktivierung des *Bcl-2-associated death promotor* (BAD), einem pro-apoptotischen Protein und eines pro-apoptotischen *Forkhead Transcription Factor* (FKHRL1) [275,276]. Darüber hinaus hemmt Akt direkt Caspase 9 [277]. Da im Zellmedium durch Zusatz von fetalem Kälberserum eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren enthalten ist, welche über Rezeptor-Tyrosinkinasen den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren, könnte dessen zusätzliche Verstärkung der Gemcitabin-induzierten Apoptose entgegenwirken [278].

Einen weiteren Beitrag zur Hemmung des Zelltodes könnte die Aktivierung der AMP-Kinase durch Metformin leisten. Dieses Enzym ist der Energiesensor der Zelle und vermittelt als Reaktion auf zellulären Stress die Hemmung anaboler Prozesse und bewirkt unter anderem die Hemmung des mTORC1 [279]. Jedoch kann die Aktivierung der AMPK auch verschiedene Prozesse auslösen, die den Erfolg einer chemotherapeutischen Behandlung von Karzinomzellen schmälern können. Es zeigte sich, dass DNA-Schäden über eine Aktivierung der AMPK zu einer verstärkten Expression von DNA-Reparaturenzymen führte, diese jedoch bei AMPK-defizienten Zellen unterblieb

[280]. Des Weiteren konnten Xie und Mitarbeiter zeigen, dass es unter Chemotherapie zu einer verstärkten Autophagie, vermittelt durch AMPK, in Krebszellen kommt. Man geht davon aus, dass der Vorgang der Autophagie maßgeblich zu der Chemoresistenz verschiedener Malignome beiträgt [281].

Die hier präsentierten Ergebnisse konnten zeigen, dass Metformin nicht nur vorteilhafte Eigenschaften bei einem Einsatz als Chemotherapeutikum besitzt. Auch wenn zahlreiche epidemiologische Daten und experimentelle Studien die vorteilhafte Wirkung von Metformin unterstreichen, sollten potenzielle Nachteile bei einer Kombination mit „klassischen“ Chemotherapeutika nicht außer Acht gelassen werden. Wir konnten zeigen, dass zumindest *in vitro* Metformin die Chemotherapie-induzierte Apoptose antagonisieren kann. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Bedingungen *in vitro* sich wesentlich von den physiologischen Begebenheiten im Tiermodell und im Menschen unterscheiden. Im Nährmedium stehen den Tumorzellen nahezu uneingeschränkt Wachstumsfaktoren und Nährstoffe zur Verfügung. Im Organismus hingegen unterliegt die Substratversorgung des Tumors zahlreichen lokalen und systemischen Regulationsmechanismen. Die Ergebnisse aus den hier gezeigten Tierversuchen verdeutlichten, dass Metformin scheinbar pleiotrope Effekte *in vivo* verursachte, die zur einer signifikanten Reduktion des Tumorstwachstums führten. Darüber hinaus führte eine Kombinationstherapie aus Metformin und Gemcitabin zu einer deutlichen Synergie. Die Ursachen für die Effektivität dieser Therapie sollen im Folgenden erörtert werden.

4.2.2.4 Metformin reduziert das Tumorgewicht *in vivo*

Sowohl die Metformin-Monotherapie als auch die Kombinationstherapie aus Metformin und Gemcitabin führten zu einer signifikanten Reduktion des Tumorgewichtes im Tierversuch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei führte Metformin nicht zu verstärkter Nekrose sondern hemmte die Zellproliferation im Karzinom, wobei diese Hemmung nicht signifikant war (Abb. 13 B). Erst die Evaluierung der histologischen Präparate an unterschiedlichen Stellen im Karzinom durch eine weitere Person zeigte eine signifikante Hemmung der Zellproliferation in Abhängigkeit vom Abstand zur desmoplastischen Reaktion. Konsistent mit unseren Ergebnissen finden sich in der Literatur zahlreiche Arbeiten, die einen wachstumshemmenden Effekt von Metformin in Mausmodellen zahlreicher Malignome beschreiben, wie z.B der Entitäten Nierenzell-, Urothel- und Endometriuskarzinom sowie multiples Myelom, um nur einige zu nennen [252–254,282,283]. Einige Arbeitsgruppen haben auch den Effekt von Metformin auf das

Tumorwachstum in Tiermodellen des pankreatischen Adenokarzinoms untersucht. Sowohl die Arbeitsgruppen um Krisztina Kisfalvi, als auch Nair und Kollegen benutzten dazu ein orthotopes Pankreaskarzinommodell unter der Verwendung humaner Pankreaskarzinomzelllinien [284,285]. Lonardo et al. hingegen untersuchten die Auswirkungen von Metformin auf *patient-derived tumour xenografts* sowohl nach subkutaner als auch nach orthotoper Transplantation [286]. Mohammed et al. evaluierten in ihrer Arbeit den Einfluss von Metformin auf die PanIN-Progression in transgenen Mäusen ($p48^{Cre/+}$.LSL-*Kras*^{G12D/+}C57.B6) [287]. Zum jetzigen Zeitpunkt sind wir unseres Wissens die ersten, die den antineoplastischen Effekt von Metformin in einem syngenem und orthotopen Mausmodell untersucht haben. Auch die Kombination von Metformin und Gemcitabin wurde bisher noch nicht zur Therapie von Pankreaskarzinomen in einem orthotopen Modell beschrieben. Suzuki et al. beschrieben eine erfolgreiche Metformin-Gemcitabin-Kombinationstherapie bei der Behandlung von *patient-derived tumour xenografts* von athymischen Mäusen [288]. Die potenzielle antineoplastische Wirkung von Metformin scheint hierbei nicht auf einem spezifischen Wirkungsmechanismus alleine zu bewirken, sondern ist eher das Resultat aus einem Zusammenspiel pleiotroper Effekte des Medikamentes.

Metformin führt bei der Therapie des DM2 über Hemmung der hepatischen Glukoneogenese zu einer Reduktion der Blutglukosekonzentration und damit zu einer geringeren Insulinausschüttung [289]. Es bewirkt darüber hinaus eine Normalisierung der Hyperinsulinämie bei normoglykämischen adipösen Patienten und führt zur einer Reduktion des Fettgewebes [290]. In der Theorie kann diese Wirkung bei einem Teil der Patienten mit PDA bzw. der Krebspatienten allgemein prognoseverbessernde Effekte hervorrufen. Zunächst könnte auf zellulärer Ebene die Reduktion des Insulinspiegels für diese Effekte verantwortlich sein [291,292]. PDA-Zellen exprimieren Rezeptoren von Tyrosinkinasetyp für Insulin (IR) [293,294], *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) [295–298] sowie IR/IGF-1-Hybridrezeptoren [299] und zeigen zudem eine Überexpression von Insulinrezeptorsubstraten (IRS) [300,301]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigte sich eine Förderung der Zellwachstums des exokrinen Pankreasgewebes [302,303] und eine Steigerung der Tumorzellproliferation durch Insulin [304–306]. Aufgrund der engen Homologie zwischen den o.g. Rezeptoren ist Insulin auch in der Lage als Ligand am IGF-1 Rezeptor zu wirken [307,308]. Zusätzlich führt Insulin zu einer verringerten Synthese des *Insulin-like growth factor-binding-protein* (IGFBP) in der Le-

ber und erhöht so die Verfügbarkeit von IGF-1 [309]. Somit könnte die Hyperinsulinämie bei DM2 durch Aktivierung der Phosphatidylinositol3-kinase(PI3K)/Akt/mTOR-Signalkaskade und des MAP-Kinase-Signalweges über IR, IGF-1R oder Hybridrezeptoren die Proliferation von Tumorzellen fördern und anti-apoptotisch wirken [242,310–312]. Daher kann eine Normalisierung einer Hyperinsulinämie durch antidiabetische Therapie dem Karzinomwachstum abträglich sein. Des Weiteren leistet die erhöhte Blutglukosekonzentration bei Typ-2-Diabetikern einen Beitrag zur Pathogenese des PDA. Neben der Bereitstellung von Energie im Sinne des Warburg Effekts [313,314] fördern hohe Blutglukosekonzentrationen die Expression und Transaktivierung des Rezeptors für den *endothelial growth factor* (EGFR) [315]. Außerdem zeigte sich im Tierversuch eine Überexpression des *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) in PanINs und PDAs, einhergehend mit gesteigerter Autophagozytose und reduzierter Apoptose. Daher könnte der vermehrte Anfall von AGEs bei DM2 ebenfalls zur Tumorinduktion und –progression beitragen [316,317]. Diese Senkung der Blutglukosekonzentration durch Metformin könnte somit zu den protektiven und antineoplastischen Eigenschaften dieses Medikamentes beitragen. Des Weiteren wird durch die Verminderung des Fettgewebes unter Metformintherapie dessen Ausschüttung proinflammatorischer und proliferationsfördernder Zytokine gehemmt [318].

Zur Erklärung der hier gezeigten Ergebnisse im Tierversuch reichen die genannten Hypothesen jedoch nicht vollständig aus, da weder eine deutliche Gewichtsreduktion, noch eine langfristige, stärkere Reduktion der Blutglukosekonzentration beobachtet wurde (Abb. 10 A). Die bei einigen Mäusen beobachtete transiente Hypoglykämie nach einer Woche Metformintherapie (Abb. 10 C), stellt eine untypische Nebenwirkung des Medikamentes dar, welche zwar eine Dosisreduktion notwendig machte, vermutlich aber aufgrund ihrer kurzen Dauer keinen Einfluss auf das Tumorwachstum genommen hat [319,320]. Da keine dauerhafte Senkung der Blutglukosekonzentration durch Metformin erreicht wurde, ist es unwahrscheinlich, dass Metformin wesentlichen Einfluss auf den Insulinspiegel genommen hat. Dennoch könnte Metformin die Insulin/IGF-1-Signaltransduktion beeinflusst haben. Bei Brustkrebspatientinnen konnte eine signifikante Reduktion der Insulinrezeptorexpression und eine verminderte Aktivität von Akt durch Metformin erreicht werden [321]. Zudem konnte in einigen Tumormausmodellen des Magen- und des Pankreaskarzinoms eine Downregulation von IGF-1-Rezeptoren unter Metformintherapie gezeigt werden [249,322]. Zudem ist anzunehmen, dass die unter 4.2.1.2 beschriebene Gegenregulation der mTORC1-Inhibition im Tierversuch

weniger ins Gewicht fällt, da *in vivo* weniger Agonisten von Rezeptor-Tyrosinkinasen als in der Zellkultur verfügbar sind. Für den Erfolg der Metformintherapie könnte jedoch auch eine Modifikation der Tumor-Stroma-Interaktion und des Tumormikromilieus verantwortlich sein. Wie schon zuvor erwähnt, verstärken sich Karzinomzellen und die Zellen des Tumorstromas, namentlich pankreatische Sternzellen und Fibroblasten, gegenseitig in ihrem Wachstum durch parakrine Signale. [267,323-326]. Es wäre daher möglich, dass Metformin auch beim PDA die desmoplastische Reaktion reduziert und somit dem aggressiven Wachstum entgegenwirkt. Jedoch zeigte sich in den weiterführenden Analysen der histologischen Proben durch die Doktorandin Ann-Christin Albert, nur ein geringer Einfluss von Metformin auf das Ausmaß der desmoplastischen Reaktion.

Die Modifikation der zellulären Energiegewinnung der Karzinomzellen stellt einen weiteren potenziellen Mechanismus der Metforminwirkung dar. Zahlreiche Daten stützen die Hypothese, dass PDA-Zellen einen Großteil ihrer Energie aus einer verstärkten aeroben Glykolyse im Sinne des klassischen Warburg-Effektes gewinnen und weniger auf die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien angewiesen sind [327–330]. Eine Metformin-induzierte Aktivierung der AMPK hätte in dem Falle sogar eine Verstärkung der Glykolyse zur Folge [331]. Für andere Tumoren wurde kürzlich ein neues Erklärungsmodell der Energiegewinnung mit zwei „Kompartimenten“ vorgeschlagen [332]. Es mehren sich Hinweise, dass Tumorzellen sehr wohl oxidative Phosphorylierung betreiben und energiereiche Substrate aus Stromazellen beziehen, indem sie diese zu Autophagie, Mitophagie und aerober Glykolyse anregen [333,334]. Auch einige Pankreaskarzinome zeigen einen solchen metabolischen Phänotyp [335]. Metformin könnte in diesem Falle als potenter Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette die Energieversorgung von Tumorzellen stark einschränken.

Zudem zeigte sich, dass Metformin vor allem zytotoxisch auf ruhende Tumorzellen wirkt. Diese Tumorzellen besitzen Stammzelleigenschaften (*cancer stem cells*, CSC) und werden nur unzureichend durch konventionelle Chemo- oder Strahlentherapie zerstört [286,336–338]. Zahlreiche Autoren sehen in diesen CSCs den Ursprung der Chemo- bzw. Strahlenresistenz des Pankreaskarzinoms und die Ursache für dessen hohe Rezidivrate [339–343].

Auch eine Veränderung der Immunantwort durch Metformin könnte für die Reduktion der Tumormasse mitverantwortlich sein. Beim PDA unterbleibt eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort zum einen durch eine verminderte Immunogenität des Tumors

selbst und zum anderen durch eine unzureichende Aktivität von Immunzellen [344-348]. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Metformin durch verminderte Apoptose von CD8⁺-T-Zellen, Reduktion tumorassoziierte Makrophagen sowie durch Re-Expression des *major histocompatibility complex* (MHC-I) zu einer verstärkten Anti-Tumor Immunantwort beitragen [349-356].

Alle genannten Wirkmechanismen von Metformin könnten in dieser Studie zu einer Reduktion des Tumorgewichtes durch die Metformin- bzw. Metformin+Gemcitabin-Therapie beigetragen haben. Eine sorgfältige Analyse aller möglichen Mechanismen ist diesbezüglich jedoch notwendig, um den antineoplastischen Effekt von Metformin zu verstehen.

Unabhängig von den zugrunde liegenden Mechanismen konnte mit dem hier präsentierten Tierversuch belegt werden, dass die antineoplastische Wirkung von Metformin auf Pankreaskarzinome über eine bloße Senkung der Blutzuckerspiegel und Insulinausschüttung hinausgeht und diese auch bei nichtdiabetischen Individuen zum Ausdruck kommt. Darüber hinaus führte eine Kombinationstherapie aus Metformin und Gemcitabin zu einer Synergie der beiden Substanzen.

4.2.3 Relevanz der Ergebnisse

Die innerhalb weniger Jahren veröffentlichte Vielzahl von Studien, die sich mit der Evaluation möglicher antineoplastischen Eigenschaften von Metformin *in vitro* und *in vivo* beschäftigten, spiegelt die allgemeine Euphorie um diese seit Jahrzehnten bewährte Medikament wider. In den letzten Jahren wurde damit begonnen, Metformin als antineoplastisches Agens im Rahmen klinischer Studien zu erproben. Dabei stammen bisher vorliegende Daten zum Mamma-Karzinom meist aus sog. *window of opportunity*-Studien. Die Interventionen erfolgten mit Metformin bzw. mit einem Placebo, alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen, zwischen dem Zeitpunkt der Diagnose mittels Tumorbiopsie und der operativen Resektion des Tumors. Dabei fanden die Autoren keinen signifikanten Effekt von Metformin auf das Proliferationsverhalten der Tumoren, fanden jedoch in Subgruppenanalysen eine zum Teil signifikante antiproliferative Wirkung bei übergewichtigen Patientinnen oder solchen mit erhöhter Insulinresistenz [234,357]. In Anbetracht des geringen medianen Gesamtüberlebens von etwa sechs Monaten bei Patienten mit fortgeschrittenem PDA erscheint eine Verlängerung dieses Zeitraums um einige Wochen schon als großer Fortschritt [358]. Eine Metformintherapie war in einer aktuellen retrospektiven Studie mit einem verlängerten Ge-

samtüberleben von Patienten mit fortgeschrittenem PDA unter palliativer Chemotherapie assoziiert [359]. Im Gegensatz dazu konnte in zwei kürzlich durchgeführten Phase II Studien keine Verlängerung des Überlebens durch eine Kombination von Metformin mit Gemcitabin und Erlotinib bzw. mit Paclitaxel erreicht werden [360, 361]. Trotzdem untermauern die Ergebnisse unserer Studie die Empfehlung bei gleichzeitigem Vorliegen eines PDA und eines Diabetes mellitus Metformin vor anderen antidiabetischen Pharmaka zur Kontrolle der Blutglukosekonzentration den Vorzug zu geben [362]. In Anbetracht der in dieser Studie belegten antiapoptotischen Wirkung von Metformin auf Karzinomzellen muss man bei einer Kombination von Metformin mit klassischen Zytostatika zur Vorsicht raten.

4.3 Ausblick

Zurzeit befassen sich zahlreiche klinische Interventionsstudien mit dem Einsatz von Metformin als Bestandteil der Chemotherapie. Es bleibt abzuwarten, ob deren Ergebnisse ähnlich enttäuschend sind wie in der Studie von Kordes et al. [360] oder ob sie an den Erfolg präklinischer Arbeiten anknüpfen können. Möglicherweise muss die Dosierung von Metformin in der Tumorthherapie anders erfolgen als bisher praktiziert oder es müssen die pharmakologischen Eigenschaften des Medikamentes modifiziert werden. Am Beispiel von *nab*-Paclitaxel zeigt sich, wie sich durch eine Veränderung der Galenik eines bewährten Wirkstoffes dessen Pharmakokinetik und Effektivität verbessern lassen [363]. In Analogie dazu wäre eine Modifikation der pharmakokinetischen Eigenschaften von Metformin erstrebenswert. Dadurch könnte bei gleichzeitiger Erhöhung der intratumoralen Wirkstoffkonzentration die Gesamtdosis reduziert werden. Trotz der ernüchternden Ergebnisse der kürzlich publizierten Studien bleibt zu hoffen, dass sich andere Zytostatika als „Synergiepartner“ finden, die in Kombination mit Metformin bessere Ergebnisse erzielen. Zudem steht mit Phenformin ein weiteres, weniger gut erforschtes Biguanid zu Verfügung. Zwar spielt es in der antidiabetischen Therapie kaum noch eine Rolle, zeigte jedoch bereits in *in vivo*-Studien antineoplastische Wirkung [364]. Phenformin besitzt eine höhere Lipophilität als Metformin und gelangt auch ohne spezifische Transportproteine in Tumorzellen [465]. Daher wäre es möglich, dass Phenformin durch das Erreichen einer höheren intrazellulären Wirkstoffkonzentration einen stärkeren antineoplastischen Effekt auf Karzinomzellen zeigt als Metformin.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnummer	Beschriftung
Abbildung 1	Orthotope Tumorzellinjektion
Abbildung 2	Zeitlicher Ablauf der Interventionen
Abbildung 3	Behandlungsplan
Abbildung 4	Gemcitabin hemmt die Proliferation von drei Zelllinien
Abbildung 5	Induktion des Zelltodes durch Gemcitabin
Abbildung 6	Konzentrationsabhängiger Einfluss von Metformin auf Karzinomzellen
Abbildung 7	Metformin erhöht nicht den Gemcitabin-induzierten Zelltod
Abbildung 8	Metformin hemmt die Gemcitabin-induzierte Apoptose der Zelllinie 6606PDA
Abbildung 9	Keine synergistische Reduktion der Proliferation durch Metformin & Gemcitabin
Abbildung 10	Auswirkung der Therapien auf Körpergewicht, Blutglukosekonzentration und Blutbild
Abbildung 11	Keine Pankreas bzw. Leberschädigung durch Gemcitabin und Metformin
Abbildung 12	Antineoplastische Therapien reduzieren das Tumorgewicht
Abbildung 13	Evaluation von Proliferation, Nekrose und Inflammation
Abbildung 14	Einfluss von Metformin auf den mTORC1-Signalweg
Tabellennummer	Beschriftung
Tabelle 1	Zusammensetzung des Lysispuffers
Tabelle 2	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele
Tabelle 3	Dehydrierung der Gewebeproben
Tabelle 4	Entparaffinierung der Gewebeschnitte
Tabelle 5	Dehydrierung der Gewebeschnitte
Tabelle 6	Materialien für die CAE-Färbung
Tabelle 7	Materialien für BrdU-Immunhistochemie
Tabelle 8	Reagenzien zur Bestimmung der Enzymaktivität

Literaturverzeichnis

1. Korf H, Schiebler TH: **Anatomie**. 10., vollst. überarb. Aufl. edn. Heidelberg: Steinkopff; 2007.
2. Moll K, Moll M: **Anatomie**. 18., vollst. überarb. Aufl. edn. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer; 2006.
3. Kirschniak A, Drews U: **Endoskopisch-Chirurgische Anatomie**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
4. Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V: **Praxis der Viszeralchirurgie. Gastroenterologische Chirurgie**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
5. Murtaugh LC: **Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible**. *Development* 2007, **134**:427-438.
6. Silverthorn DU: **Physiologie**. 4., aktualisierte Auflage, München: Pearson Education; 2009
7. Pandol SJ. **The Exocrine Pancreas**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
8. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos, Anneclaire J, Bowen DJ: **Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**:1766-73.
9. Capella C, Albarello L, Capelli P, Sessa F, Zamboni G: **Carcinoma of the exocrine pancreas: The histology report**. *Dig Liver Dis* 2011, **43** Suppl 4: 282–92
10. Wood LD, Hruban RH: **Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms**. *Cancer J* 2012, **18**:492-501.
11. Saiki Y, Horii A: **Molecular pathology of pancreatic cancer**. *Pathol Int* 2014, **64**:10-19.
12. Hidalgo M: **Pancreatic cancer**. *N Engl J Med* 2010, **362**:1605-1617.
13. Lüttges J, Klöppel G: **Das duktales Pankreaskarzinom und seine Vorläufer**. *Pathologe* 2005, **26**:12-17.
14. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB: **Epidemiology of pancreatic cancer: an overview**. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009, **6**:699-708.

15. Robert-Koch-Institut: **Krebs in Deutschland 2009/2010**. URL: http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf
16. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M: **Pancreatic cancer**. *Lancet* 2011, **378**:607-620.
17. Conroy T, Gavaille C, Adenis A: **Metastatic pancreatic cancer: old drugs, new paradigms**. *Curr Opin Oncol*. 2011, **23**:390-395.
18. Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, Neoptolemos JP, Whitcomb DC, Hruban RH, Brentnall TA, Lynch HT, Canto MI: **Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer**. *Gut*. 2007, **56**:1460-1469.
19. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, Rozenblum E, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH: **Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer**. *Clin Cancer Res-2001*, **7**: 738-44.
20. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC: **Inherited pancreatic cancer syndromes**. *Cancer J*. 2012, **18**:485-491.
21. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, Negri E, Li D, Risch HA, Olson SH, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Bertuccio P, Gao YT, Hassan M, Yu H, Kurtz RC, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Duell EJ *et al.*: **Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4)**. *Ann Oncol* 2012, **23**:1880-1888
22. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB: **Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis**. *Langenbecks Arch Surg* 2008, **393**:535-545.
23. Larsson SC, Orsini N, Wolk A: **Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies**. *Int J Cancer* 2007, **120**:1993-1998.
24. Trayhurn P, Wood IS: **Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue**. *Br J Nutr* 2004, **92**:347-355.
25. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocchio R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C: **Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation**. *Int J Cancer* 2010, **126**:1474-1486.

26. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R: **Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010, **24**:349-358.
27. Whitcomb DC: **Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **287**:315-319.
28. Momi N, Kaur S, Krishn SR, Batra SK: **Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer** *Minerva Gastroenterol Dietol* 2012, **58**: 283-97
29. Whipple AO, Parsons WB, Mullins CR: **Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater.** *Ann Surg* 1935, **102**:763-779.
30. Traverso LW, Longmire, W P Jr: **Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy a follow-up evaluation.** *Ann Surg* 1980, **192**:306-310.
31. Diener MK, Fitzmaurice C, Schwarzer G, Seiler CM, Hüttner FJ, Antes G, Knaebel H, Büchler MW: **Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma.** *Cochrane Database Syst Rev* 2014, **11**:CD006053.
32. Gaedcke J, Gunawan B, Grade M, Szöke R, Liersch T, Becker H, Ghadimi BM: **The mesopancreas is the primary site for R1 resection in pancreatic head cancer: relevance for clinical trials.** *Langenbecks Arch Surg* 2010, **395**:451-458.
33. Shoup M, Conlon KC, Klimstra D, Brennan MF: **Is extended resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas justified?** *J Gastrointest Surg* 2003, **7**:946-952.
34. Fabre JM, Houry S, Manderscheid JC, Huguier M, Baumel H: **Surgery for left-sided pancreatic cancer.** *Br J Surg* 1996, **83**:1065-1070.
35. Shimada K, Sakamoto Y, Sano T, Kosuge T: **Prognostic factors after distal pancreatectomy with extended lymphadenectomy for invasive pancreatic adenocarcinoma of the body and tail.** *Surgery* 2006, **139**:288-295.
36. Shrikhande SV, Kleeff J, Reiser C, Weitz J, Hinz U, Esposito I, Schmidt J, Friess H, Buchler MW: **Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2007, **14**:118-127.
37. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): **S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom**, Langversion 1.0, 2013,

- AWMF Registernummer: 032-010OL, URL: <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Leitlinien.7.0.htm>
38. National Comprehensive Cancer Network. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma.** V.1.2014. URL: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic.pdf on May 16, 2014..
39. McClaine RJ, Lowy AM, Sussman JJ, Schmulewitz N, Grisell DL, Ahmad SA: **Neoadjuvant therapy may lead to successful surgical resection and improved survival in patients with borderline resectable pancreatic cancer.** *HPB (Oxford)* 2010, **12**:73-79.
40. Laurence JM, Tran PD, Morarji K, Eslick GD, Lam, Vincent Wai To, Sandroussi C: **A systematic review and meta-analysis of survival and surgical outcomes following neoadjuvant chemoradiotherapy for pancreatic cancer.** *J Gastrointest Surg* 2011, **15**:2059-2069.
41. Liao W, Chien K, Lin Y, Wu M, Lin J, Wang H, Tu Y: **Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis.** *Lancet Oncol* 2013, **14**:1095-1103.
42. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, Sinn M, Hinke A, Riess H: **Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial.** *JAMA* 2013, **310**:1473-1481.
43. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Buchler MW: **Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2010, **304**:1073-1081.
44. Hazard L, Tward JD, Szabo A, Shrieve DC: **Radiation therapy is associated with improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma: results of a study from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry data.** *Cancer* 2007, **110**:2191-2201.

45. Morganti AG, Falconi M, van Stiphout, Ruud G P M, Mattiucci G, Alfieri S, Calvo FA, Dubois J, Fastner G, Herman JM, Maidment BW, Miller RC, Regine WF, Reni M, Sharma NK, Ippolito E, Valentini V: **Multi-institutional pooled analysis on adjuvant chemoradiation in pancreatic cancer.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014, **90**:911-917.
46. Regine WF, Winter KA, Abrams R, Safran H, Hoffman JP, Konski A, Benson AB, Macdonald JS, Rich TA, Willett CG: **Fluorouracil-based chemoradiation with either gemcitabine or fluorouracil chemotherapy after resection of pancreatic adenocarcinoma: 5-year analysis of the U.S. Intergroup/RTOG 9704 phase III trial.** *Ann Surg Oncol* 2011, **18**:1319-1326.
47. Smeenk HG, van Eijck, Casper H J, Hop WC, Erdmann J, Tran, Kheetje C K, Debois M, van Cutsem E, van Dekken H, Klinkenbijn JH, Jeekel J: **Long-term survival and metastatic pattern of pancreatic and periampullary cancer after adjuvant chemoradiation or observation: long-term results of EORTC trial 40891.** *Ann Surg* 2007, **246**:734-740.
48. van Laethem J, Hammel P, Mornex F, Azria D, van Tienhoven G, Vergauwe P, Peeters M, Polus M, Praet M, Mauer M, Collette L, Budach V, Lutz M, van Cutsem E, Haustermans K: **Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:4450-4456.
49. Neoptolemos John P., Stocken Deborah D., Friess Helmut, Bassi Claudio, Dunn Janet A., Hickey Helen, Beger Hans, Fernandez-Cruz Laureano, Dervenis Christos, Lacaine François, Falconi Massimo, Pederzoli Paolo, Pap Akos, Spooner David, Kerr David J., Büchler Markus W.: **A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1200-1210
50. Koshy MC, Landry JC, Cavanaugh SX, Fuller CD, Willett CG, Abrams RA, Hoffman JP, Thomas CR: **A challenge to the therapeutic nihilism of ESPAC-1.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, **61**:965-966.
51. Arbuck SG: **Chemotherapy for pancreatic cancer.** *Baillieres Clin Gastroenterol* 1990, **4**:953-968.

52. Crown J, Casper ES, Botet J, Murray P, Kelsen DP: **Lack of efficacy of high-dose leucovorin and fluorouracil in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma.** *J Clin Oncol* 1991, **9**:1682-1686.
53. Weirnerman BH, MacCormick RE: **A phase II survival comparison of patients with adenocarcinoma of the pancreas treated with 5-fluorouracil and calcium leucovorin versus a matched tumor registry control population.** *Am J Clin Oncol* 1994, **17**:467-469
54. Burris, H A 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff, D D: **Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.** *J Clin Oncol* 1997, **15**:2403-2413.
55. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB 3rd: **Phase III Study of Gemcitabine in Combination With Fluorouracil Versus Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297.** *J Clin Oncol* 2002, **20**:3270-3275.
56. Bernhard J, Dietrich D, Scheithauer W, Gerber D, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schüller J, Saletti P, Bauer J, Figer A, Pestalozzi BC, Köhne C, Mingrone W, Stemmer SM, Tàmas K, Kornek GV, Koeberle D, Herrmann R: **Clinical benefit and quality of life in patients with advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine plus capecitabine versus gemcitabine alone: a randomized multicenter phase III clinical trial--SAKK 44/00-CECOG/PAN.1.3.001.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:3695-3701.
57. Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taieb J, Faroux R, Lepere C, Gramont A de: **Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:3509-3516.
58. Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, Gebbia V, Carteni G, Massidda B, Dapretto E, Manzione L, Piazza E, Sannicolò M, Ciaparrone M, Cavanna L, Giuliani F, Maiello E, Testa A, Pederzoli P, Falconi M, Gallo C, Di Maio M, Perrone F: **Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared**

- with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:1645-1651.
59. Rocha Lima, Caio M, Green MR, Rotche R, Miller WH, Jeffrey GM, Cisar LA, Morganti A, Orlando N, Gruia G, Miller LL: **Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate.** *J Clin Oncol* 2004, **22**:3776-3783.
60. Oettle H, Richards D, Ramanathan RK, van Laethem, J L, Peeters M, Fuchs M, Zimmermann A, John W, Hoff D von, Arning M, Kindler HL: **A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer.** *Ann Oncol* 2005, **16**:1639-1645.
61. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, Wong R, O'Reilly EM, Flynn PJ, Rowland KM, Atkins JN, Mirtsching BC, Rivkin SE, Khorana AA, Goldman B, Fenoglio-Preiser CM, Abbruzzese JL, Blanke CD: **Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:3605-3610.
62. Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE: **Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:8033-8040.
63. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W: **Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:1960-1966.
64. Rougier P, Riess H, Manges R, Karasek P, Humblet Y, Barone C, Santoro A, Assadourian S, Hatteville L, Philip PA: **Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** *Eur J Cancer* 2013, **49**:2633-2642.

65. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M: **FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer**. *N Engl J Med* 2011 **364**:1817-25.
66. Gourgou-Bourgade S, Bascoul-Mollevis C, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul J, Boige V, Berille J, Conroy T: **Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial**. *J Clin Oncol* 2013, **31**:23-29.
67. Von Hoff, Daniel D, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF: **Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine**. *N Engl J Med* 2013, **369**:1691-1703.
68. Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, Rougier P, Mariette C, Bouche O, Bosset JF, Aparicio T, Mineur L, Azzedine A, Hammel P, Butel J, Stremsdoerfer N, Maingon P, Bedenne L: **Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study**. *Ann Oncol* 2008, **19**:1592-1599.
69. Loehrer PJ, Feng Y, Cardenas H, Wagner L, Brell JM, Cella D, Flynn P, Ramanathan RK, Crane CH, Alberts SR, Benson AB: **Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial**. *J Clin Oncol* 2011, **29**:4105-4112.
70. Huguet F, Andre T, Hammel P, Artru P, Balosso J, Selle F, Deniaud-Alexandre E, Ruszniewski P, Touboul E, Labianca R, Gramont A de, Louvet C: **Impact of chemoradiotherapy after disease control with chemotherapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma in GERCOR phase II and III studies**. *J Clin Oncol* 2007, **25**:326-331.

71. Habermehl D, Brecht IC, Debus J, Combs SE: **Palliative radiation therapy in patients with metastasized pancreatic cancer - description of a rare patient group.** *Eur J Med Res* 2014, **19**:24.
72. Guthrie RA, Guthrie DW: **Pathophysiology of diabetes mellitus.** *Crit Care Nurs Q* 2004, **27**:113-125.
73. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang Y, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M: **National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants.** *Lancet* 2011, **378**:31-40.
74. Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C: **Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1).** *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013, **56**:668-677.
75. Pisani P: **Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies.** *Arch Physiol Biochem* 2008, **114**:63-70.
76. Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z: **Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies.** *Eur J Cancer* 2011, **47**:1928-1937.
77. Sasazuki S, Charvat H, Hara A, Wakai K, Nagata C, Nakamura K, Tsuji I, Sugawara Y, Tamakoshi A, Matsuo K, Oze I, Mizoue T, Tanaka K, Inoue M, Tsugane S: **Diabetes mellitus and cancer risk: pooled analysis of eight cohort studies in Japan.** *Cancer Sci* 2013, **104**:1499-1507.
78. Zendejdel K: **Cancer Incidence in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Population-Based Cohort Study in Sweden.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**:1797-1800.
79. Swerdlow AJ, Laing SP, Qiao Z, Slater SD, Burden AC, Botha JL, Waugh NR, Morris AD, Gatling W, Gale EA, Patterson CC, Keen H: **Cancer incidence and mortality in patients with insulin-treated diabetes: a UK cohort study.** *Br J Cancer* 2005, **92**:2070-2075.
80. Stevens RJ, Roddam AW, Beral V: **Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis.** *Br J Cancer* 2007, **96**:507-509.

81. Basso D, Valerio A, Seraglia R, Mazza S, Piva MG, Greco E, Fogar P, Gallo N, Pedrazzoli S, Tiengo A, Plebani M: **Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 MW peptide**. *Pancreas* 2002, **24**:8-14.
82. Aggarwal G, Ramachandran V, Javeed N, Arumugam T, Dutta S, Klee GG, Klee EW, Smyrk TC, Bamlet W, Han JJ, Rumie Vittar, Natalia B, Andrade M de, Mukhopadhyay D, Petersen GM, Fernandez-Zapico ME, Logsdon CD, Chari ST: **Adrenomedullin is up-regulated in patients with pancreatic cancer and causes insulin resistance in β cells and mice**. *Gastroenterology* 2012, **143**:1510-1517
83. Sah RP, Nagpal, Sajan Jiv Singh, Mukhopadhyay D, Chari ST: **New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes**. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**:423-433.
84. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González, A, Barzi F, Woodward M: **Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies**. *British journal of cancer* 2005, **92**:2076-2083.
85. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST: **Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus**. *Gastroenterology* 2008, **134**:981-987.
86. Karlstad O, Starup-Linde J, Vestergaard P, Hjellvik V, Bazelier MT, Schmidt MK, Andersen M, Auvinen A, Haukka J, Furu K, Vries F de, De Bruin, Marie L: **Use of insulin and insulin analogs and risk of cancer - systematic review and meta-analysis of observational studies**. *Curr Drug Saf* 2013, **8**:333-348.
87. Bodmer M, Becker C, Meier C, Jick SS, Meier CR: **Use of antidiabetic agents and the risk of pancreatic cancer: a case-control analysis**. *The American journal of gastroenterology* 2012, **107**:620-626.
88. Li D, Yeung SJ, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL: **Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer**. *Gastroenterology* 2009, **137**:482-488.
89. Ioacara S, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Fica S, Roden M: **Cancer specific mortality in insulin-treated type 2 diabetes patients**. *PloS one* 2014, **9**:e93132.
90. Chiu C, Huang C, Chen Y, Chen T, Liang Y, Lin S, Chen J, Leu H, Chan W: **Increased Risk of Gastrointestinal Malignancy in Patients with Diabetes Mellitus and Correlations with Anti-Diabetes Drugs: A Nationwide Population-based Study in Taiwan**. *Intern. Med.* 2013, **52**:939-946.

91. Soranna D, Scotti L, Zambon A, Bosetti C, Grassi G, Catapano A, La Vecchia C, Mancina G, Corrao G: **Cancer risk associated with use of metformin and sulfonylurea in type 2 diabetes: a meta-analysis.** *The oncologist* 2012, **17**:813-822.
92. Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S: **Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 2010, **3**:1451-1461.
93. Hwang AL, Haynes K, Hwang W, Yang Y: **Metformin and survival in pancreatic cancer: a retrospective cohort study.** *Pancreas* 2013, **42**:1054-1059.
94. Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung SJ, Hassan M, Li D: **Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:2905-2912.
95. Pour P, Althoff J, Kruger FW, Mohr U: **A potent pancreatic carcinogen in Syrian hamsters: N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine.** *J Natl Cancer Inst* 1977, **58**:1449-1453.
96. Fujii K, Hayakawa T, Kikuchi M: **Tumor induction in mice administered neonatally with bis(2-oxopropyl)nitrosamine.** *Tohoku J Exp Med* 1994, **174**:361-368.
97. Osvaldt AB, Wendt LR, Bersch VP, Backes AN, de Cássia A Schumacher, Rita, Edelweiss, Maria I A, Rohde L: **Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice.** *Surgery* 2006, **140**:803-809.
98. Sandgren EP, Quaife CJ, Paulovich AG, Palmiter RD, Brinster RL: **Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:93-97.
99. Brembeck FH, Schreiber FS, Deramautd TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK: **The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice.** *Cancer Res* 2003, **63**:2005-2009.
100. Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP: **Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice.** *Cancer Res* 2003, **63**:2016-2019.

101. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright, Christopher V E, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA: **Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.** *Cancer Cell* 2003, **4**:437-450.
102. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, Depinho RA: **Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Genes Dev* 2003, **17**:3112-3126.
103. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng K, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, Depinho RA: **Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:5947-5952.
104. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramandt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA: **Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.** *Cancer Cell* 2005, **7**:469-483.
105. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, Feig C, Nakagawa T, Caldwell ME, Zecchini HI, Lolkema MP, Jiang P, Kultti A, Thompson CB, Maneval DC, Jodrell DI, Frost GI, Shepard HM, Skepper JN, Tuveson DA: **Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer.** *Gut* 2013, **62**:112-120.
106. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset J, Galbán S, Galbán CJ, Rakshit S, Flannagan KS, Adsay NV, Pasca di Magliano, Marina: **Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**:639-653.
107. Fendrich V, Oh E, Bang S, Karikari C, Ottenhof N, Bisht S, Lauth M, Brossart P, Katsanis N, Maitra A, Feldmann G: **Ectopic Overexpression of Sonic Hedgehog (Shh) Induces Stromal Expansion and Metaplasia in the Adult Murine Pancreas¹².** *Neoplasia* 2011, **13**:923-930.
108. Rygaard J, Povlsen CO: **Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice.** *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969, **77**:758-760.

109. Zheng L, Xue J, Jaffee EM, Habtezion A: **Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Gastroenterology* 2013, **144**:1230-1240.
110. Partecke LI, Sendler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, Nguyen TD, Albers N, Speerforck S, Lerch MM, Heidecke CD, Bernstorff W von, Stier A: **A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines.** *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* 2011, **47**:98-107.
111. Little EC, Wang C, Watson PM, Watson DK, Cole DJ, Camp ER: **Novel immunocompetent murine models representing advanced local and metastatic pancreatic cancer.** *The Journal of surgical research* 2012, **176**:359-366.
112. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold, D P Jr, Schabel, F M Jr: **Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice.** *Cancer Res* 1984, **44**:717-726.
113. Reid MD, Bagci P, Adsay NV: **Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all?** *Journal of surgical oncology* 2013, **107**:67-77.
114. Reid Y, Storts D, Riss T, Minor L: **Assay Guidance Manual.** Bethesda : Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004
115. Unteregger G: **Qualitätssicherung und Standardisierung im Zellkulturlabor: Warum wir endlich eine „good cell culture practice“ brauchen.** *BIOspektrum* 2008, **1**:55-57
116. Tseng WW, Winer D, Kenkel JA, Choi O, Shain AH, Pollack JR, French R, Lowy AM, Engleman EG: **Development of an orthotopic model of invasive pancreatic cancer in an immunocompetent murine host.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**:3684-3695.
117. Partecke IL, Kaeding A, Sendler M, Albers N, Kühn J, Speerforck S, Roesse S, Seubert F, Diedrich S, Kuehn S, Weiss UF, Mayerle J, Lerch MM, Hadlich S, Hosten N, Heidecke C, Puls R, Bernstorff W von: **In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model.** *BMC cancer* 2011, **11**:40.

118. Peruche B, Schulz M: **Pharmazeutische Zeitung online: Gemcitabin, ein neues Zytostatikum.** URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=20184>.
119. Wong A, Soo RA, Yong W, Innocenti F: **Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine.** *Drug metabolism reviews* 2009, **41**:77-88.
120. **Gemzar-Fachinformation:** <http://www.successtudie.de/b/downloads/Fachinfo/GemzarFI07Jan.pdf>
121. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE: **Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines.** *Cancer Res* 1998, **58**:4349-4357.
122. Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W: **Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine.** *Cancer Res* 1988, **48**:4024-4031.
123. Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL: **Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase.** *Biochem Pharmacol* 1993, **45**:1857-1861.
124. Gandhi V, Plunkett W: **Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides.** *Cancer Res* 1990, **50**:3675-3680.
125. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W: **Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis.** *Cancer Res* 1991, **51**:6110-6117.
126. Ross DD, Cuddy DP: **Molecular effects of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) on DNA replication in intact HL-60 cells.** *Biochem Pharmacol* 1994, **48**:1619-1630.
127. Ruiz van Haperen, V W, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ: **2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines.** *Biochem Pharmacol* 1993, **46**:762-766.
128. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W: **Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine.** *Mol Pharmacol* 1990, **38**:567-572.

129. Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y: **Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:2499-2504.
130. Gmeiner WH, Yu S, Pon RT, Pourquier P, Pommier Y: **Structural basis for topoisomerase I inhibition by nucleoside analogs.** *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 2003, **22**:653-658.
131. Slotka KH, Tschesche R: **Über Biguanide, II. : Die blutzucker-senkende Wirkung der Biguanide.** *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* 1929, **62**:1398-1405.
132. Meyer U, Schumann A, Friedrich C: **Geschichte der oralen Antidiabetika: Zufall und gezielte Entwicklung!** *Pharm Unserer Zeit* 2002, **31**:242-250.
133. Neye H: **Therapeutic renaissance. Biguanides in type-2 diabetes: metformin.** *Pharm Unserer Zeit* 2002, **31**:264-270.
134. **The University Group Diabetes Program. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. V. Evaluation of pheniformin therapy.** *Diabetes* 1975, **24 Suppl 1**:65-184.
135. Luft D, Schmulling RM, Eggstein M: **Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics: a review of 330 cases.** *Diabetologia* 1978, **14**:75-87.
136. **Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34).** *Lancet* 1998, **352**:854-865.
137. Mogensen CE: **Pharmacotherapy of diabetes.** New York: Springer; 2007.
138. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM: **Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action.** *J Clin Invest* 2007, **117**:1422-1431.
139. Hardie DG: **AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer.** *Diabetes* 2013, **62**:2164-2172.
140. Oakhill JS, Steel R, Chen Z, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE: **AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase.** *Science* 2011, **332**:1433-1435.
141. Hardie DG, Alessi DR: **LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after.** *BMC Biol* 2013, **11**:36.

142. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Au-berger P, Tanti J, Giorgetti-Peraldi S, Bost F: **Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1.** *Cancer Res* 2011, **71**:4366-4372.
143. Feng Y, Velazquez-Torres G, Gully C, Chen J, Lee M, Yeung SJ: **The impact of type 2 diabetes and antidiabetic drugs on cancer cell growth.** *J Cell Mol Med* 2011, **15**:825-836.
144. Karnevi E, Said K, Andersson R, Rosendahl AH: **Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells.** *BMC cancer* 2013, **13**:235.
145. Qu Z, Zhang Y, Liao M, Chen Y, Zhao J, Pan Y: **In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma.** *Hepatol Res* 2012, **42**:922-933.
146. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M: **Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:10269-10273.
147. Choi YK, Park K: **Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells.** *Mol Cells* 2013, **36**:279-287.
148. Brownlee IA, Forster DJ, Wilcox MD, Dettmar PW, Seal CJ, Pearson JP: **Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase.** *Nutr Res Rev* 2010, **23**:146-154.
149. Gressner AM, Arndt T: **Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.** 2., vollst. überarb. Aufl. edn. Berlin: Springer; 2013.
150. Zechner D, Spitzner M, Bobrowski A, Knapp N, Kuhla A, Vollmar B: **Diabetes aggravates acute pancreatitis and inhibits pancreas regeneration in mice.** *Diabetologia* 2012, **55**:1526-1534.
151. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: **Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.** *Cell* 1988, **53**:549-554.
152. Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S: **Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations.** *Am J Pathol* 1993, **142**:1534-1543.
153. Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Evans, T R Jeffry, Sansom

- OJ: **Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:246-251.
154. Weissmueller S, Manchado E, Saborowski M, Morris, John P 4th, Wagenblast E, Davis CA, Moon S, Pfister NT, Tschaharganeh DF, Kitzing T, Aust D, Markert EK, Wu J, Grimmond SM, Pilarsky C, Prives C, Biankin AV, Lowe SW: **Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling.** *Cell* 2014, **157**:382-394.
155. Torres MP, Rachagani S, Soucek JJ, Mallya K, Johansson SL, Batra SK: **Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy.** *PloS one* 2013, **8**:e80580.
156. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: **Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.** Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
157. Berridge MV, Herst PM, Tan AS: **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.** *Biotechnol Annu Rev.* 2005; **11**:127-52
158. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D: **Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction.** *J Neurochem*1997, **69**:581-593.
159. Berridge MV, Tan AS: **Trans-plasma membrane electron transport: A cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1.** *Protoplasma* 1998, **205**:74-82.
160. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. **Molecular Cell Biology.** 4. vollst. überarb. Aufl. edn. New York: W. H. Freeman; 2000.
161. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin M, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, Cabo R de: **Metformin improves healthspan and lifespan in mice.** *Nat Commun* 2013, **4**:2192.
162. Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I: **Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on**

- 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation.** *Toxicol Lett* 2001, **119**:203-208.
163. Wyllie AH: **Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.** *Nature* 1980, **284**:555-556.
164. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: **Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.** *J Cell Biol* 1992, **119**:493-501.
165. Bossy-Wetzel E, Green DR: **Detection of apoptosis by annexin V labeling.** *Methods Enzymol* 2000, **322**:15-18.
166. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ: **A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis.** *Dev Cell* 2002, **2**:55-67.
167. Goldmann EE: **Vitalfärbung am Zentralnervensystem; Beitrag zur Physiopathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute.** *Abhandlungen der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften, Physikalisch-Mathematische Classe* 1913, **1**
168. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**:239-257.
169. Van Cruchten S, Van Den Broeck, W: **Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis.** *Anat Histol Embryol* 2002, **31**:214-223.
170. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**:495-516.
171. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR: **The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:156-162.
172. Gurtu V, Kain SR, Zhang G.: **Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis.** *Anal Biochem.* 1997, **251**:98-102.
173. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B: **Evaluation of caspase activity in apoptotic cells.** *J Immunol Methods* 2002, **265**:97-110.
174. Colvin EK, Scarlett CJ: **A historical perspective of pancreatic cancer mouse models.** *Semin Cell Dev Biol* 2014, **27**:96-105.

175. Leach SD: **Mouse models of pancreatic cancer**. *Cancer cell* 2004, **5**:7-11.
176. Zhang Y, Chen L, Yang J, Fleming JB, Chiao PJ, Logsdon CD, Li M: **Study human pancreatic cancer in mice: how close are they?** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1835**:110-118.
177. Richmond A, Su Y: **Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics**. *Dis Model Mech* 2008, **1**:78-82.
178. Livingston EH, Lee S: **Body surface area prediction in normal-weight and obese patients**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **281**:586–591.
179. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F: **Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview**. *Clin Sci (Lond)* 2012, **122**:253-270.
180. Hien P, Claudi-Böhm S, Böhm B: **Diabetes 1x1: Diagnostik, Therapie, Verlaufskontrolle**. 2. vollst. überarb. Aufl. edn. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014
181. Shivji MK, Kenny MK, Wood RD: **Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair**. *Cell* 1992, **69**:367-374.
182. Foley J, Ton T, Maronpot R, Butterworth B, Goldsworthy TL: **Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats**. *Environ Health Perspect* 1993, **101 Suppl 5**:199-205.
183. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R: **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms**. *J Pathol* 1990, **162**:285-294.
184. Yu CC, Filipe MI: **Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications**. *Histochem J* 1993, **25**:843-853.
185. Morris GF, Mathews MB: **Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle**. *J Biol Chem* 1989, **264**:13856-13864.
186. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB: **Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA**. *J Histochem Cytochem* 2003, **51**:1681-1688.

187. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol* 1984, **133**:1710-1715.
188. Scholzen T, Gerdes J: **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *J Cell Physiol* 2000, **182**:311-322.
189. Heintz N, Sive HL, Roeder RG: **Regulation of human histone gene expression: kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and in the half-lives of individual histone mRNAs during the HeLa cell cycle.** *Mol Cell Biol* 1983, **3**:539-550.
190. Alison M, Chaudry Z, Baker J, Lauder I, Pringle H: **Liver regeneration: a comparison of in situ hybridization for histone mRNA with bromodeoxyuridine labeling for the detection of S-phase cells.** *J Histochem Cytochem* 1994, **42**:1603-1608.
191. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB: **Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA.** *J Histochem Cytochem* 2003, **51**:1681-1688.
192. Gratzner HG: **Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.** *Science* 1982, **218**:474-475.
193. Kao GD, McKenna WG, Yen TJ: **Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells.** *Oncogene* 2001, **20**:3486-3496.
194. Matsuoka K, Nomura K, Hoshino T: **Mutagenic effects of brief exposure to bromodeoxyuridine on mouse FM3A cells.** *Cell Tissue Kinet* 1990, **23**:495-503.
195. Marmé D, Fusenig N: **Tumor Angiogenesis.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008.
196. Hennekeuser HH: **Histochemical demonstration of naphthol-AS-D-Chloroacetate-esterase activity in methacrylate embedded tissue sections.** *Klin Wochenschr* 1972, **50**:213-214.
197. Mellor AL, Munn DH: **Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:74-80.
198. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK: **Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic**

- cells enhances tumor-induced immune suppression.** *Semin Cancer Biol* 2012, **22**:275-281.
199. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase, Hans: **Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:4709-4717.
200. Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, Mayaud C, Milleron B, Baud L, Cadranel J: **Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome.** *Am J Pathol* 1998, **152**:83-92.
201. Houghton AM: **The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances.** *Cell Cycle* 2010, **9**:1732-1737.
202. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE: **The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:618-631.
203. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D: **Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:12493-12498.
204. Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P: **The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions.** *Blood* 2001, **97**:339-345.
205. Rosevear HM, Lightfoot AJ, O'Donnell MA, Griffith TS: **The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder.** *Cancer metastasis Rev* 2009, **28**:345-353.
206. Lemmer B, Brune K, Füllgraf G, Palm D: **Pharmakotherapie: klinische Pharmakologie**. 14., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer; 2010
207. Hamed SS, Straubinger RM, Jusko WJ: **Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2013, **72**:553-563.
208. Schwarz RE, McCarty TM, Peralta EA, Diamond DJ, Ellenhorn JD: **An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer.** *Surgery* 1999, **126**:562-567.

209. Liu H, Zhang Q, Li Z, Zhang Q, Lu L: **Efficacy and safety of gemcitabine-based chemotherapies in biliary tract cancer: a meta-analysis** *World J Gastroenterol* 2014, **20**:18001-18012.
210. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, Lolkema MP, Buchholz M, Olive KP, Gress TM, Tuveson DA: **Stromal biology and therapy in pancreatic cancer**. *Gut* 2011, **60**:861-868.
211. Apte MV, Wilson JS: **Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells**. *J Gastroenterol Hepatol* 2012, **27 Suppl 2**:69-74.
212. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: **Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture**. *Gut* 1998, **43**:128-133.
213. Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, Weidenauer C, Hagmann W, Michl P, Heuchel RL, Haas SL, Löhr J: **Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer**. *Cancers* 2014, **6**:2137-2154.
214. Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert AC, Partecke LI, Vollmar B: **Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer**. *BMC Cancer* 2015 **15**:51.
215. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G: **Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells**. *Gastroenterology* 2005, **128**:907-921.
216. Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, Biankin AV, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV: **Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis**. *Am J Pathol* 2010, **177**:2585-2596.
217. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T: **Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells**. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **403**:380-384.
218. Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T: **Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells**. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **421**:349-354.

219. Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE: **Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells.** *Ann Surg Oncol* 2007, **14**:3629-3637.
220. Burney S, Khawaja KI, Saif MW, Masud F: **Chemotherapy and Metformin in Pancreatic Adenocarcinoma and Neuroendocrine Tumors.** *JOP.* 2014, **15**:313-6
221. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF: **Drug resistance and the solid tumor microenvironment.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**:1441-1454.
222. Kuehn R, Lelkes PI, Bloechle C, Niendorf A, Izbicki JR: **Angiogenesis, angiogenic growth factors, and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic diseases: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer.** *Pancreas* 1999, **18**:96-103.
223. Barău A, Ruiz-Sauri A, Valencia G, Gómez-Mateo, Maria Del Carmen, Sabater L, Ferrandez A, Llombart-Bosch A: **High microvessel density in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with high grade.** *Virchows Arch* 2013, **462**:541-546.
224. Delrue L, Blanckaert P, Mertens D, van Meerbeeck S, Ceelen W, Duyck P: **Tissue perfusion in pathologies of the pancreas: assessment using 128-slice computed tomography.** *Abdom Imaging* 2012, **37**:595-601.
225. Komar G, Kauhanen S, Liukko K, Seppänen M, Kajander S, Ovaska J, Nuutila P, Minn H: **Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:5511-5517.
226. Klauss M, Stiller W, Fritz F, Kieser M, Werner J, Kauczor H, Grenacher L: **Computed tomography perfusion analysis of pancreatic carcinoma.** *J Comput Assist Tomogr* 2012, **36**:237-242.
227. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ: **Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer.** *Mol Cancer* 2003, **2**:12.
228. Provenzano PP, Hingorani SR: **Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer.** *Br J Cancer* 2013, **108**:1-8.
229. Grözinger G, Grözinger A, Horger M: **The role of volume perfusion CT in the diagnosis of pathologies of the pancreas.** *Rofo* 2014, **186**:1082-1093.
230. Park M, Klotz E, Kim M, Song SY, Park SW, Cha S, Lim JS, Seong J, Chung JB, Kim KW: **Perfusion CT: noninvasive surrogate marker for stratification**

- of pancreatic cancer response to concurrent chemo- and radiation therapy.** *Radiology* 2009, **250**:110-117.
231. Zhang X, Nie D, Chakrabarty S: **Growth factors in tumor microenvironment.** *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010, **15**:151-165.
232. Lin H, Kachingwe BH, Lin H, Cheng HW, Uang Y, Wang L: **Effects of metformin dose on cancer risk reduction in patients with type 2 diabetes mellitus: a 6-year follow-up study.** *Pharmacotherapy* 2014, **34**:36-45.
233. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberge P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F: **The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level.** *Oncogene* 2008, **27**:3576-3586.
234. Bonanni B, Puntoni M, Cazzaniga M, Pruneri G, Serrano D, Guerrieri-Gonzaga A, Gennari A, Trabacca MS, Galimberti V, Veronesi P, Johansson H, Aristarco V, Bassi F, Luini A, Lazzeroni M, Varricchio C, Viale G, Bruzzi P, Decensi A: **Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial.** *J Clin Oncol* 2012, **30**:2593-2600.
235. Cargnello M, Tcherkezian J, Roux PP: **The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation.** *Mutagenesis* 2015, **30**:169-176.
236. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA: **Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations.** *Drug Resist Updat* 2008, **11**:32-50.
237. Wolin EM: **PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in the therapy of pancreatic neuroendocrine tumors.** *Cancer Lett* 2013, **335**:1-8.
238. Mohan AL, Friedman MD, Ormond DR, Tobias M, Murali R, Jhanwar-Uniyal M: **PI3K/mTOR signaling pathways in medulloblastoma.** *Anticancer Res* 2012, **32**:3141-3146.
239. Kong B, Wu W, Cheng T, Schlitter AM, Qian C, Bruns P, Jian Z, Jäger C, Regel I, Raulefs S, Behler N, Irmeler M, Beckers J, Friess H, Erkan M, Siveke JT, Tannapfel A, Hahn SA, Theis FJ, Esposito I, Kleeff J, Michalski CW: **A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling.** *Gut* 2015 doi:10.1136/gutjnl-2014-307616.

240. Akeno N, Miller AL, Ma X, Wikenheiser-Brokamp KA: **p53 suppresses carcinoma progression by inhibiting mTOR pathway activation.** *Oncogene* 2015, **34**:589-599.
241. Feng Z, Levine AJ: **The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein.** *Trends Cell Biol* 2010, **20**:427-434.
242. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy, Shrikanth A G: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells.** *Oncogene* 2004, **23**:8571-8580.
243. Akinyeke T, Matsumura S, Wang X, Wu Y, Schalfer ED, Saxena A, Yan W, Logan SK, Li X: **Metformin targets c-MYC oncogene to prevent prostate cancer.** *Carcinogenesis* 2013, **34**:2823-2832.
244. Wang Y, Lin B, Wu J, Zhang H, Wu B: **Metformin inhibits the proliferation of A549/CDDP cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase.** *Oncol Lett* 2014, **8**:1269-1274.
245. Wu B, Li S, Sheng L, Zhu J, Gu L, Shen H, La D, Hambly BD, Bao S, Di W: **Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer.** *Oncol Rep* 2012, **28**:903-908.
246. Malki A, Youssef A: **Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling.** *Oncol Res* 2011, **19**:275-285.
247. Wang L, Li Z, Zou D, Jin Z, Gao J, Xu G: **Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**:7192-7198.
248. Chen G, Xu S, Renko K, Derwahl M: **Metformin inhibits growth of thyroid carcinoma cells, suppresses self-renewal of derived cancer stem cells, and potentiates the effect of chemotherapeutic agents.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2012, **97**:E510-20.
249. Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y, Kobara H, Mori H, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T: **The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**:549-560.
250. Kobayashi M, Kato K, Iwama H, Fujihara S, Nishiyama N, Mimura S, Toyota Y, Nomura T, Nomura K, Tani J, Miyoshi H, Kobara H, Mori H, Murao K, Masaki T:

- Antitumor effect of metformin in esophageal cancer: in vitro study.** *Int J Oncol* 2013, **42**:517-524.
251. Pan J, Chen C, Jin Y, Fuentes-Mattei E, Velazquez-Tores G, Benito JM, Konopleva M, Andreeff M, Lee M, Yeung SJ: **Differential impact of structurally different anti-diabetic drugs on proliferation and chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells.** *Cell Cycle* 2012, **11**:2314-2326.
252. Zhang T, Guo P, Zhang Y, Xiong H, Yu X, Xu S, Wang X, He D, Jin X: **The antidiabetic drug metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells in vitro and in vivo.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**:24603-24618.
253. Liu J, Li M, Song B, Jia C, Zhang L, Bai X, Hu W: **Metformin inhibits renal cell carcinoma in vitro and in vivo xenograft.** *Urol Oncol* 2013, **31**:264-270.
254. Zi F, He J, Li Y, Wu C, Yang L, Yang Y, Wang L, He D, Zhao Y, Wu W, Zheng G, Han X, Huang H, Yi Q, Cai Z: **Metformin displays anti-myeloma activity and synergistic effect with dexamethasone in in vitro and in vivo xenograft models.** *Cancer Lett* 2015, **356**:443-453.
255. URL: <http://de.oddb.org/de/drugs/fachinfo/uid/35774/chapter/pharmacokinetics>. 15.01.2015
256. Smadja-Lamere N, Shum M, Deleris P, Roux PP, Abe J, Marette A: **Insulin activates RSK (p90 ribosomal S6 kinase) to trigger a new negative feedback loop that regulates insulin signaling for glucose metabolism.** *J Biol Chem* 2013, **288**:31165-31176.
257. O'Reilly KE, Rojo F, She Q, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N: **mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.** *Cancer Res* 2006, **66**:1500-1508.
258. Chen G, Nicula D, Renko K, Derwahl M: **Synergistic anti-proliferative effect of metformin and sorafenib on growth of anaplastic thyroid cancer cells and their stem cells.** *Oncol Rep* 2015, **33**:1994-2000.
259. Lin Y, Wu M, Wei T, Lin Y, Huang W, Huang L, Lin Y, Chen C: **Metformin sensitizes anticancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress.** *Oncotarget* 2014, **5**:298-308.
260. Lau YI, Du X, Rayannavar V, Hopkins B, Shaw J, Bessler E, Thomas T, Pires MM, Keniry M, Parsons RE, Cremers S, Szabolcs M, Maurer MA: **Metformin**

- and erlotinib synergize to inhibit basal breast cancer.** *Oncotarget* 2014, **5**:10503-10517.
261. Teixeira SF, Guimaraes, Isabella dos Santos, Madeira KP, Daltoe RD, Silva IV, Rangel, Leticia Batista Azevedo: **Metformin synergistically enhances anti-proliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells.** *J Bras Pneumol* 2013, **39**:644-649.
262. Erices R, Bravo ML, Gonzalez P, Oliva B, Racordon D, Garrido M, Ibañez C, Kato S, Brañes J, Pizarro J, Barriga MI, Barra A, Bravo E, Alonso C, Bustamente E, Cuello MA, Owen GI: **Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells.** *Reprod Sci* 2013, **20**:1433-1446.
263. Hanna RK, Zhou C, Malloy KM, Sun L, Zhong Y, Gehrig PA, Bae-Jump VL: **Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway.** *Gynecol Oncol* 2012, **125**:458-469.
264. Kawanami T, Takiguchi S, Ikeda N, Funakoshi A: **A humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody (R1507) and/or metformin enhance gemcitabine-induced apoptosis in pancreatic cancer cells.** *Oncol Rep* 2012, **27**:867-872.
265. Liu H, Scholz C, Zang C, Schefe JH, Habbel P, Regierer A, Schulz C, Possinger K, Eucker J: **Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro.** *Anticancer Res* 2012, **32**:1627-1637.
266. Ling S, Tian Y, Zhang H, Jia K, Feng T, Sun D, Gao Z, Xu F, Hou Z, Li Y, Wang L: **Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-fluorouracil cells.** *Mol Med Rep* 2014, **10**:2891-2897.
267. Luo G, Long J, Zhang B, Liu C, Xu J, Ni Q, Yu X: **Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: an interaction loop.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1826**:170-178.
268. Sinnott-Smith J, Kisfalvi K, Kui R, Rozengurt E: **Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **430**:352-357.

269. Ekim B, Magnuson B, Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Feener EP, Fingar DC: **mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression.** *Mol Cell Biol* 2011, **31**:2787-2801.
270. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J: **mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:200-216.
271. Queiroz, Eveline A I F, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ, Barbosa AM, Dekker, Robert F H, Fortes ZB, Khaper N: **Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells.** *PloS one* 2014, **9**:e98207.
272. Johnson SA: **Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies.** *Expert Opin Pharmacother* 2001, **2**: 929-43
273. Janjetovic K, Vucicevic L, Misirkic M, Vilimanovich U, Tovilovic G, Zogovic N, Nikolic Z, Jovanovic S, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L: **Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt.** *Eur J Pharmacol* 2011, **651**:41-50.
274. Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A: **Evaluation of Antagonistic Effects of Metformin with Cisplatin in Gastric Cancer Cells.** *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2014, **8**:12-19.
275. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell* 1997, **91**:231-241.
276. Jin Z, El-Deiry WS: **Overview of cell death signaling pathways.** *Cancer Biol Ther* 2014, **4**:147-171.
277. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**:1318-1321.
278. Gstraunthaler G, Lindl T: **Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen.** 7. vollst. überarb. Aufl. edn. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013
279. Rehman G, Shehzad A, Khan AL, Hamayun M: **Role of AMP-activated protein kinase in cancer therapy.** *Arch Pharm (Weinheim)* 2014, **347**:457-468.

280. Wu CL, Qiang L, Han W, Ming M, Viollet B, He YY: **Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control.** *Oncogene* 2013, **32**:2682-2689.
281. Xie B, Zhao H, Yao S, Zhuo D, Jin B, Lv D, Wu C, Ma D, Gao C, Shu X, Ai Z: **Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells.** *Int J Mol Med* 2011, **27**:599-606.
282. Miyoshi H, Kato K, Iwama H, Maeda E, Sakamoto T, Fujita K, Toyota Y, Tani J, Nomura T, Mimura S, Kobayashi M, Morishita A, Kobara H, Mori H, Yoneyama H, Deguchi A, Himoto T, Kurokohchi K, Okano K, Suzuki Y, Murao K, Masaki T: **Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo.** *Int J Oncol* 2014, **45**:322-332.
283. Iglesias DA, Yates MS, van der Hoeven, Dharini, Rodkey TL, Zhang Q, Co NN, Burzawa J, Chigurupati S, Celestino J, Bowser J, Broaddus R, Hancock JF, Schmandt R, Lu KH: **Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**:2847-2856.
284. Kisfalvi K, Moro A, Sinnott-Smith J, Eibl G, Rozengurt E: **Metformin inhibits the growth of human pancreatic cancer xenografts.** *Pancreas* 2013, **42**:781-785.
285. Nair V, Pathi S, Jutooru I, Sreevalsan S, Basha R, Abdelrahim M, Samudio I, Safe S: **Metformin inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth and downregulates Sp transcription factors.** *Carcinogenesis* 2013, **34**:2870-2879.
286. Lonardo E, Cioffi M, Sancho P, Sanchez-Ripoll Y, Trabulo SM, Dorado J, Balic A, Hidalgo M, Heeschen C: **Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells.** *PLoS one* 2013, **8**:e76518.
287. Mohammed A, Janakiram NB, Brewer M, Ritchie RL, Marya A, Lightfoot S, Steele VE, Rao CV: **Antidiabetic Drug Metformin Prevents Progression of Pancreatic Cancer by Targeting in Part Cancer Stem Cells and mTOR Signaling.** *Transl Oncol* 2013, **6**:649-659.
288. Suzuki K, Takeuchi O, Osaku M, Yamada: **Combination effect of metformin with gemcitabine for gemcitabine-resistant pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2014, **74**: 3122.
289. Bailey CJ, Turner RC: **Metformin.** *N Engl J Med* 1996, **334**:574-579.

290. Kay JP, Alemzadeh R, Langley G, D'Angelo L, Smith P, Holshouser S: **Beneficial effects of metformin in normoglycemic morbidly obese adolescents.** *Metabolism* 2001, **50**:1457-1461.
291. Boyd DB: **Insulin and cancer.** *Integr Cancer Ther* 2003, **2**:315-329.
292. Malaguarnera R, Belfiore A: **The insulin receptor: a new target for cancer therapy.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011, **2**:93.
293. Fisher WE, Boros LG, Schirmer WJ: **Insulin Promotes Pancreatic Cancer: Evidence for Endocrine Influence on Exocrine Pancreatic Tumors.** *J Surg Res* 1996, **63**:310-313.
294. Kolb S, Fritsch R, Saur D, Reichert M, Schmid RM, Schneider G: **HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**:4679-4686.
295. Hakam A, Fang Q, Karl R, Coppola D: **Coexpression of IGF-1R and c-Src proteins in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Dig Dis Sci* 2003, **48**:1972-1978.
296. Dong X, Javle M, Hess KR, Shroff R, Abbruzzese JL, Li D: **Insulin-like growth factor axis gene polymorphisms and clinical outcomes in pancreatic cancer.** *Gastroenterology* 2010, **139**:464-73, 473.e1-3.
297. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE: **The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.** *Endocr Rev* 2000, **21**:215-244.
298. Ohmura E, Okada M, Onoda N, Kamiya Y, Murakami H, Tsushima T, Shizume K: **Insulin-like growth factor I and transforming growth factor alpha as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth.** *Cancer Res* 1990, **50**:103-107.
299. Beltran PJ, Mitchell P, Chung Y, Cajulis E, Lu J, Belmontes B, Ho J, Tsai MM, Zhu M, Vonderfecht S, Baserga R, Kendall R, Radinsky R, Calzone FJ: **AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:1095-1105.
300. Bergmann U, Funatomi H, Kornmann M, Beger HG, Korc M: **Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **220**:886-890.

301. Kornmann M, Maruyama H, Bergmann U, Tangvoranuntakul P, Beger HG, White MF, Korc M: **Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer.** *Cancer Res* 1998, **58**:4250-4254.
302. Mossner J, Logsdon CD, Goldfine ID, Williams JA: **Do insulin and the insulin like growth factors (IGFs) stimulate growth of the exocrine pancreas?** *Gut* 1987, **28 Suppl**:51-55.
303. Butler AE, Galasso R, Matveyenko A, Rizza RA, Dry S, Butler PC: **Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans.** *Diabetologia* 2010, **53**:21-26.
304. Takeda Y, Escribano MJ: **Effects of insulin and somatostatin on the growth and the colony formation of two human pancreatic cancer cell lines.** *J Cancer Res Clin Oncol* 1991, **117**:416-420.
305. Liehr RM, Melnykovych G, Solomon TE: **Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2.** *Gastroenterology* 1990, **98**:1666-1674.
306. Beauchamp RD, Lyons RM, Yang EY, Coffey, R J Jr, Moses HL: **Expression of and response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines.** *Pancreas* 1990, **5**:369-380.
307. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR: **Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:85-96.
308. Belfiore A: **The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer.** *Curr Pharm Des* 2007, **13**:671-686.
309. Conover CA, Lee PD, Kanaley JA, Clarkson JT, Jensen MD: **Insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in obese and nonobese humans.** *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **74**:1355-1360.
310. Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Kisfalvi K: **Crosstalk between insulin/insulin-like growth factor-1 receptors and G protein-coupled receptor signaling systems: a novel target for the antidiabetic drug metformin in pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**:2505-2511.
311. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:489-501.
312. Godsland IF: **Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer.** *Clin Sci (Lond)* 2010, **118**:315-332.

313. Warburg O: **Origin of cancer cells.** *Oncologia* 1956, **9**:75-83.
314. Kim J, Dang CV: **Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect.** *Cancer Res* 2006, **66**:8927-8930.
315. Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, Xu Q, Zhou S, Wu E: **High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR.** *PloS one* 2011, **6**:e27074.
316. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, Bierhaus A, Lotze MT, Zeh HJ: **The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival.** *Cell Death Differ* 2010, **17**:666-676.
317. Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh HJ: **AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics through the IL6-pSTAT3 pathway.** *Autophagy* 2012, **8**:989-991.
318. Van Kruijsdijk, Rob C M, van der Wall, Elsken, Visseren, Frank L J: **Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**:2569-2578.
319. Zitzmann S, Reimann IR, Schmechel H: **Severe hypoglycemia in an elderly patient treated with metformin.** *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002, **40**:108-110.
320. Al-Abri SA, Hayashi S, Thoren KL, Olson KR: **Metformin overdose-induced hypoglycemia in the absence of other antidiabetic drugs.** *Clin Toxicol (Phila)* 2013, **51**:444-447.
321. Hadad SM, Coates P, Jordan LB, Dowling, Ryan J O, Chang MC, Done SJ, Purdie CA, Goodwin PJ, Stambolic V, Moulder-Thompson S, Thompson AM: **Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: biomarker analysis in a pre-operative window of opportunity randomized trial.** *Breast Cancer Res Treat* 2015, **150**:149-155.
322. Nair V, Sreevalsan S, Basha R, Abdelrahim M, Abudayyeh A, Rodrigues Hoffman A, Safe S: **Mechanism of metformin-dependent inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Ras activity in pancreatic cancer: role of specificity protein (Sp) transcription factors.** *J Biol Chem* 2014, **289**:27692-27701.
323. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R: **TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression.** *Curr Opin Oncol.* 2013, **25**:76-84.

324. Lu J, Shi J, Li M, Gui B, Fu R, Yao G, Duan Z, Lv Z, Yang Y, Chen Z, Jia L, Tian L: **Activation of AMPK by metformin inhibits TGF- β -induced collagen production in mouse renal fibroblasts.** *Life Sci* 2015, **127**:59-65.
325. Park I, Um J, Hong S, Cho J, Lee SH, Lee SH, Lee H: **Metformin reduces TGF- β 1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014, **150**:148-153.
326. Zhang J, Shen C, Wang L, Ma Q, Xia P, Qi M, Yang M, Han B: **Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells: involvement of the tumor suppressor miR30a and its target gene SOX4.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **452**:746-752.
327. Seyfried TN, Shelton LM: **Cancer as a metabolic disease.** *Nutr Metab (Lond)* 2010, **7**:7.
328. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W: **Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells.** *Tumour Biol* 2013, **34**:1523-1530.
329. James AD, Chan A, Erice O, Siriwardena AK, Bruce, Jason I E: **Glycolytic ATP fuels the plasma membrane calcium pump critical for pancreatic cancer cell survival.** *J Biol Chem* 2013, **288**:36007-36019.
330. Cui J, Shi M, Xie D, Wei D, Jia Z, Zheng S, Gao Y, Huang S, Xie K: **FOXM1 promotes the warburg effect and pancreatic cancer progression via trans-activation of LDHA expression.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**:2595-2606.
331. Hardie DG: **Metabolic control: A new solution to an old problem.** *Curr Biol* 2000, **10**:R757.
332. Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Howell A, Tykocinski ML, Nagajyothi F, Machado FS, Tanowitz HB, Sotgia F, Lisanti MP: **Energy transfer in "parasitic" cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells.** *Cell Cycle* 2011, **10**:4208-4216.
333. Salem AF, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Martinez-Outschoorn UE, Tanowitz HB, Al-Zoubi MS, Howell A, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP: **Two-compartment tumor metabolism: autophagy in the tumor microenvironment and oxidative mitochondrial metabolism (OXPHOS) in cancer cells.** *Cell Cycle* 2012, **11**:2545-2556.

334. Romero IL, Mukherjee A, Kenny HA, Litchfield LM, Lengyel E: **Molecular pathways: trafficking of metabolic resources in the tumor microenvironment.** *Clin Cancer Res* 2015, **21**:680-686.
335. Yu M, Zhou Q, Zhou Y, Fu Z, Tan L, Ye X, Zeng B, Gao W, Zhou J, Liu Y, Li Z, Lin Y, Lin Q, Chen R: **Metabolic phenotypes in pancreatic cancer.** *PloS one* 2015, **10**:e0115153.
336. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsiichlis PN, Struhl K: **Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission.** *Cancer Res* 2009, **69**:7507-7511.
337. Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Banerjee S, Kong D, Li Y, Thakur S, Sarkar FH: **Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2012, **5**:355-364.
338. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, Carugo A, Green T, Seth S, Giuliani V, Kost-Alimova M, Muller F, Colla S, Nezi L, Genovese G, Deem AK, Kapoor A, Yao W, Brunetto E, Kang Y, Yuan M, Asara JM, Wang YA, Heffernan TP, Kimmelman AC, Wang H, Fleming JB, Cantley LC, Depinho RA, Draetta GF: **Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function.** *Nature* 2014, **514**:628-632.
339. Tanase CP, Neagu AI, Necula LG, Mambet C, Enciu A, Calenic B, Cruceru ML, Albuлесcu R: **Cancer stem cells: involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**:10790-10801.
340. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C: **Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer.** *Cell Stem Cell* 2007, **1**:313-323.
341. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM: **Pancreatic cancer stem cells.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:2806-2812.
342. Kim H, Yoo S, Kim K, Park J, Kim H, Kim J: **Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance.** *Int J Clin Exp Pathol* 2012, **5**:754-761.
343. Lin W, Rajbhandari N, Liu C, Sakamoto K, Zhang Q, Triplett AA, Batra SK, Opavsky R, Felsner DW, DiMaio DJ, Hollingsworth MA, Morris JP, Hebrok M,

- Witkiewicz AK, Brody JR, Rui H, Wagner K: **Dormant cancer cells contribute to residual disease in a model of reversible pancreatic cancer.** *Cancer Res* 2013, **73**:1821-1830.
344. Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ: **Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors.** *Cancer* 2002, **94**:2552-2560.
345. Wachsmann MB, Pop LM, Vitetta ES: **Pancreatic ductal adenocarcinoma: a review of immunologic aspects.** *J Investig Med* 2012, **60**:643-663.
346. Vonderheide RH, Bayne LJ: **Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma.** *Curr Opin Immunol* 2013, **25**:200-205.
347. Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, Goebel L, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Altevogt P, Schumacher U, Schäfer H, Sebens S: **L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression.** *Mol Oncol* 2014, **8**:982-997.
348. Tang D, Gao J, Wang S, Yuan Z, Ye N, Chong Y, Xu C, Jiang X, Li B, Yin W, Miao Y, Wang D, Jiang K: **Apoptosis and anergy of T cell induced by pancreatic stellate cells-derived galectin-1 in pancreatic cancer.** *Tumor Biol* 2015
349. Wherry EJ: **T cell exhaustion.** *Nat Immunol* 2011, **12**:492-499.
350. Speiser DE: **A molecular profile of T-cell exhaustion in cancer.** *Oncoimmunology* 2012, **1**:369-371.
351. Wang S, Fouquet S, Chapon M, Salmon H, Regnier F, Labroquère K, Badoual C, Damotte D, Validire P, Maubec E, Delongchamps NB, Cazes A, Gibault L, Garcette M, Dieu-Nosjean M, Zerbib M, Avril M, Prévost-Blondel A, Randriamampita C, Trautmann A, Bercovici N: **Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors.** *PloS one* 2011, **6**:e17621.
352. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udonno H: **Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:1809-1814.
353. Coussens LM, Werb Z: **Inflammation and cancer.** *Nature* 2002, **420**:860-867.

354. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH: **Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion.** *Immunol Cell Biol* 2014, **92**:543-552.
355. Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Vazquez-Martin A, Menendez OJ, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA: **Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation.** *Cell Cycle* 2012, **11**:865-870.
356. La Rocca R, Tallerico R, Talib Hassan A, Das G, Tadepally L, Matteucci M, Liberale C, Mesuraca M, Scumaci D, Gentile F, Cojoc G, Perozziello G, Amendolia A, Gallo A, Kärre K, Cuda G, Candeloro P, Di Fabrizio E, Carbone E: **Mechanical Stress Downregulates MHC Class I Expression on Human Cancer Cell Membrane.** *PLoS One* 2014, **9**.
357. Cazzaniga M, DeCensi A, Pruneri G, Puntoni M, Bottiglieri L, Varricchio C, Guerrieri-Gonzaga A, Gentilini OD, Pagani G, Dell'Orto P, Lazzeroni M, Serrano D, Viale G, Bonanni B: **The effect of metformin on apoptosis in a breast cancer presurgical trial.** *Br J Cancer* 2013, **109**:2792-2797.
358. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, Scheithauer W, Siena S, Tabernero J, Teixeira L, Tortora G, van Laethem J, Young R, Penenberg DN, Lu B, Romano A, Von Hoff, Daniel D: **nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial.** *J Natl Cancer Inst.* 2015, **107**
359. Choi Y, Kim T, Oh D, Lee K, Han S, Im S, Kim T, Bang Y: **The Impact of Diabetes Mellitus and Metformin Treatment on Survival of Patients with Advanced Pancreatic Cancer Undergoing Chemotherapy.** *Cancer Res Treat* 2015.
360. Kordes S, Pollak MN, Zwinderman AH, Mathôt RA, Weterman MJ, Beeker A, Punt CJ, Richel DJ, Wilmink JW: **Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial.** *Lancet Oncol* 2015, **16**:839-847.
361. Burney S, Khawaja KI, Saif MW, Masud F: **Chemotherapy and metformin in pancreatic adenocarcinoma and neuroendocrine tumors.** *JOP.* 2014, **15**:313-316.
362. Cui Y, Andersen DK: **Pancreatogenic diabetes: special considerations for management.** *Pancreatology* 2011, **11**:279-294.

363. Al-Hajeili M, Azmi AS, Choi M: **Nab-paclitaxel: potential for the treatment of advanced pancreatic cancer.** *OncoTargets and therapy* 2014, **7**:187-192.
364. Appleyard MV, Murray KE, Coates PJ, Wullschleger S, Bray SE, Kernohan NM, Fleming S, Alessi DR, Thompson AM: **Phenformin as prophylaxis and therapy in breast cancer xenografts.** *Br J Cancer* 2012 **106**:1117-1122
365. Segal ED, Yasmeeen A, Beauchamp MC, Rosenblatt J, Pollak M, Gottlieb WH: **Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **414**:694-9

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Frau Professorin Brigitte Vollmar, die mir die Möglichkeit eröffnete am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie zu promovieren. Auch für ihre Unterstützung bei der Gestaltung der Dissertationsschrift sowie für die Ermutigung zu Kongressbeiträgen möchte ich mich bedanken.

Auch möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ich danke ihm herzlich für sein beispielloses Engagement bei der Betreuung seiner Doktoranden.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie für die freundliche Unterstützung in den letzten Jahren danken. Besonders danke ich Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski und Kathrin Sievert-Küchenmeiste für ihre Hilfe in der Zellkultur, der Histologie, Molekularbiologie und bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. habil. Lars Ivo Partecke für die Anleitung hinsichtlich der orthotopen Transplantation.

Nicht zuletzt möchte ich herzlich meiner Familie danken. Ohne ihre Unterstützung wären weder mein Studium noch diese Promotion möglich gewesen.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- Zechner D, Sempert K, Genz B, Timm F, Bürtin F, Kroemer T, Butschkau A, Kuhla A, Vollmar B : Impact of hyperglycemia and acute pancreatitis on the receptor for advanced glycation endproducts. Int J Clin Exp Pathol. 2013; 6:2021-9. IF: 1,8.
- Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert A, Partecke LI, Vollmar B: Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. BMC Cancer. 2015; 15:51. IF 3,3.
- Zechner D, Bürtin F, Amme J, Lindner T, Radecke T, Hadlich S, Kühn JP, Brigitte Vollmar B: Characterization of novel carcinoma cell lines for the analysis of therapeutical strategies fighting pancreatic cancer. Cell Biosci. 2015, 5:51. IF 3,6

Kongressbeiträge

- Bürtin F, Radecke T, Amme J, Zechner D, Vollmar B. Einfluss von Inflammation, Diabetes und Metformin auf die Pathophysiologie des duktaalen PaCa. 17. Chirurgische Forschungstage, Goethe-Universität Frankfurt am Main, 04-05.10.2013.
- Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert AC, Partecke LI, Vollmar B: Differential impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. 47th Annual meeting of the European Pancreatic Club 24-26.06.2015, Toledo, Spanien
- Radecke T, Bürtin F, Partecke LI, Zechner D, Vollmar B: Einfluss von Inflammation, Diabetes mellitus Typ II und Metformin auf die Pathophysiologie des duktaalen Pankreasadenokarzinoms. 35 Deutscher Pankreasclub, 22-24.01.2015, Rostock,

Zitierfähige Abstracts

- Radecke T, Bürtin F, Partecke I, Vollmar B, Zechner D. Characterisation of novel ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines in vitro as well as in diabetic mice. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 30.04.-03.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013. doi: 10.3205/13dgch684.

Preise und Auszeichnungen

- Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie.
Radecke T, Bürtin F, Partecke I, Vollmar B, Zechner D. Characterisation of novel ductal pancreatic adenocarcinoma cell lines in vitro as well as in diabetic mice. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 30.04.-03.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013. doi: 10.3205/13dgch684.

Thesen der Dissertation

- Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört trotz der Entwicklung multimodaler Therapiekonzepte und neuer Chemotherapieregime zu den Malignomen mit der fatalsten Prognose.
- Der überwiegende Teil der Patienten mit PDA wird in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung diagnostiziert und ist auf eine palliative Behandlung auf der Grundlage einer Chemotherapie angewiesen.
- Auch neuere Chemotherapieregime verlängern das Überleben bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinomen nur um wenige Monate.
- Epidemiologische Studien suggerieren einen protektiven Effekt von Metformin hinsichtlich des Erkrankungsrisikos für das Pankreaskarzinom.
- Ziel dieser Studie war es, einen möglichen antineoplastischen Effekt von Metformin auf die Pathophysiologie des duktales Adenokarzinoms, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zu evaluieren.
- Metformin antagonisiert den pro-apoptotischen Effekt des Chemotherapeutikums Gemcitabin *in vitro*.
- Metformin entfaltet einen antineoplastischen Effekt *in vivo* und reduziert das Tumorgewicht.
- Metformin zeigt zusammen mit Gemcitabin eine antineoplastische Synergie. Eine Kombinationstherapie mit Metformin und Gemcitabin führt zu einer starken Reduktion des Tumorgewichtes.
- Metformin könnte in Zukunft als Bestandteil der Chemotherapie zu einem verlängerten Überleben beim PDA beitragen

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur verwendeten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht. Ich bestätige, dass diese Arbeit an keiner anderen als der Universität Rostock zur Erlangung des Grades Doktor der Medizin vorgelegt wurde.

Rostock, im Oktober 2015

Florian Bürtin