

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Liebold

Relevanz der AMP-aktivierten Proteinkinase als Biomarker in der
Therapie des
nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Juliane Grams geb. Wagner

aus Cottbus

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Johannes Merk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lars Bullinger

Datum der Promotion: 14.11.2014

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klinik und Diagnostik des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms	1
1.1.1 Therapie des frühen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms	4
1.1.2 Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ..	6
1.2 Biomarker	7
1.3 Predict – Projekt	9
1.4 AMPK	10
1.5 mTOR und p70S6K.....	11
1.6 AMP-aktivierte Proteinkinase und mTOR Signalwege	12
1.7 Zielstellung	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Auswertung der Patientendaten.....	15
2.2 Statistik.....	15
2.3 Ethische Grundlagen, Spender, Transplantation der Tumorproben	16
2.4 Materialien und Reagenzien	18
2.5 Zusammensetzung Puffer	20
2.6 Aufarbeitung der Tumorproben.....	21
2.7 Western Blot.....	22
2.8 RNA-Isolierung, Reverse Transkriptase Reaktion und Polymerase-Ketten- Reaktion	24
3. Ergebnisse	28
3.1 Auswertung der Patientendaten.....	28
3.2 Cetuximab-resistente Tumore	38
3.2.1 Tierversuche	38

3.2.2	Nachweis der m-RNA mittels PCR.....	38
3.2.3	Westernblot	40
3.3	Cetuximab-sensitive Tumore.....	41
3.3.1	Tierversuche	41
3.3.2	Nachweis der m-RNA mittels PCR.....	42
3.3.3	Westernblot	44
3.4	Dosis-Wirkungsversuch.....	45
4.	Diskussion.....	46
5.	Zusammenfassung	54
6.	Literaturverzeichnis	56
	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CBS	Cystation β Synthase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DFS	disease free survival, krankheitsfreies Überleben
DNA	= DNS, Desoxyribonukleinsäure
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	epidermal growth factor receptor - tyrosinkinase inhibitor
ELK	Evangelische Lungenklinik Berlin
EML4-ALK	Echinodermmikrotubuli - assoziiertes Protein-like4-Anaplastische Lymphomkinase
ERCC1	excision repair cross complement group 1
HRP	horseradish peroxidase
IASLC	international association for the study of lung cancer
IGF	insulin-like growth factor
K-ras	kirsten-rat sarcoma viral oncogene
LKB 1	liver-kinase B1
m-RNA	messenger-RNA = Boten-Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
NNK	nicotin-derived nitrosamine-ketone
NOD/SCID	non obese diabetic/ severe combined immunodeficiency
NSCLC	non small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OS	overall survival, Gesamtüberleben

PBS	phosphate buffered saline , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	=RNS, Ribonukleinsäure
RPPA	reverse phase protein array
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
SDS	sodium dodecyl sulfate
Taq-DNA-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	tris-buffered saline/tween, Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TDT	tumor doubling time, Tumorverdopplungszeit
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TNM	Tumorklassifikation mit Beurteilung des Tumors (T), der Lymphknoten (N) und der Metastasen (M)
TSC 1 + 2	tuberous sclerosis complex 1 + 2
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

Das Lungenkarzinom ist mit rund 44500 Fällen im Jahre 2012 die dritthäufigste Todesursache und die häufigste Krebstodesursache in der Bundesrepublik Deutschland [12]. Weltweit werden jährlich circa 1,5 Millionen neue Fälle mit Lungenkrebs diagnostiziert [37]. Im Jahr 2012 war Lungenkrebs beim Mann der häufigste Tumor und bei der Frau der zweithäufigste Tumor nach dem Mammakarzinom [12]. Ungefähr 80 % aller Lungenkarzinome sind nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC).

Trotz stetiger Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie der Erkrankung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten in den europäischen und nordamerikanischen Ländern nur in einem Bereich von 7,5 bis 15,7 % [2,7].

In Deutschland wird die altersstandardisierte Mortalität bei Männern um 50 / 100000 Einwohner und um 20 / 100000 Einwohner für Frauen angegeben (Daten 2008 – 2012) [22].

Aufgeschlüsselt nach dem Tumorstadium werden in den USA die 5-Jahres-Überlebensraten bei nur lokalem Befund mit 54 %, bei regionaler Lymphknotenbeteiligung mit 26,5 % und mit 4 % bei Fernmetastasierung angegeben.

Höheres Lebensalter und männliches Geschlecht wirken sich nachteilig auf die Inzidenz und Mortalität aus [1].

1.1 Klinik und Diagnostik des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Ungefähr 90 % aller Patienten mit Lungenkrebs weisen initial Krankheitssymptome auf. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Häufigkeit von Initialsymptomen bei Lungenkarzinom (modifiziert nach Spiro et al. 2007) [52]

Symptom bzw. klinisches Zeichen	Häufigkeit
Husten	8-75 %
Gewichtsverlust	0-68 %
Luftnot	3-60 %
Brustschmerzen	20-49 %
Hämoptyse	6-35-%
Knochenschmerzen	6-25 %
Trommelschlägelfinger	0-20 %
Fieber	0-20 %
Schwächegefühl	0-10 %
Obere Einflusstauung	0-4%
Schluckstörungen	0-2%
Stenose und Stridor	0-2%

Empfehlungen zu Vorsorgeuntersuchungen bei asymptomatischen Risikopatienten (Raucher, Asbestexposition) existieren derzeit nicht [24]. Zur Diagnostik des Lungenkarzinoms gilt das folgende Untersuchungsprogramm als Basisdiagnostik:

- Anamnese, klinische Untersuchung,
- Laboruntersuchung,
- Röntgen-Thorax in 2 Ebenen,
- Spiral-Computertomographie des Thorax (inkl. Oberbauch mit Nebennieren),
- Bronchoskopie,
- Sonographie Abdomen

Zum Ausschluss von Fernmetastasen wird die Magnetresonanztomographie des Schädels sowie ggf. eine Positronenemissionstomographie mit Fluor-18-Fluorodesoxyglucose empfohlen.

Für die Prognose des Patienten sind die lokale Tumorausdehnung, der Befall lokaler Lymphknoten und die Fernmetastasierung (TNM-Stadium), zusammengefasst in den Stadien I-IV nach UICC entscheidend. (Tabelle 2, Tabelle 3)

Tabelle 2: TNM Klassifikation des Lungenkarzinoms nach Wittekind, Meyer; 2010 [59]

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszerale Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus T1a Tumor < 2cm T1b Tumor 2-3 cm
T2	Tumor >3cm, aber nicht mehr als 7cm in größter Ausdehnung mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen -Tumor befällt Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Carina -Tumor infiltriert viszerale Pleura -assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der gesamten Lunge T2a >3 ≤ 5cm T2b > 5 ≤ 7cm
T3	Tumor > 7cm oder Tumor mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: -Brustwand (inklusive Sulcus superior-Tumoren) -Zwerchfell -Nervus phrenicus -mediastinale Pleura -parietales Perikard Oder Tumor im Hauptbronchus <2cm distal der Hauptcarina ohne Beteiligung der Hauptcarina oder Assoziation mit einer Atelektase oder obstruktiven Pneumonie der gesamten Lunge oder separate(r) Tumorknoten im gleichen Lappen
T4	Tumor jeglicher Größe, der eine der folgenden Strukturen infiltriert. -Mediastinum -Herz -große Gefäße -Trachea -Nervus laryngeus recurrens -Ösophagus -Wirbelkörper -Hauptkarina -oder separate (r) Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lappen
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N1	Metastase(n) in den ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und intrapulmonalen Lymphknoten inklusive eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärs
N2	Metastase(n) in den ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in den kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsilateralen oder kontralateralen Skalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Separate(r) Tumorknoten in einem kontralateralen Lappen: Tumor mit pleuralen Knoten oder malignem Pleura-(oder Perikard-) erguss
M1b	Fernmetastasen

Tabelle 3: Tumorstadien nach TNM-Klassifikation (nach IASLC (international association for the study of lung cancer) Lung Cancer Staging Project, 2009) [54]

	Tumorstadium						
Fernmetastasierung		M0	M0	M0	M0	M1a	M1b
Lymphknotenmetastasierung		N0	N1	N2	N3	N0-3	N0-3
	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV
	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV
	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	IV
	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IV	IV
	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IV	IV

1.1.1 Therapie des frühen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Aktueller Therapiestandard in Deutschland ist bei Patienten im Stadium I und II sowie IIIA nach UICC bei adäquater Lungenfunktion und fehlenden Kontraindikationen die radikale Resektion mit Lymphknotendisektion. Nach R0 Resektion und Lymphadenektomie sollte bei Patienten im Stadium II bzw. IIIA eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Diese sollte in einer cisplatinhaltigen Kombination durchgeführt werden [24].

Im Stadium IB wird eine individuelle Therapieentscheidung unter Berücksichtigung der Komorbidität, des Alters und der kardiopulmonalen Funktion empfohlen.

Zahlreiche Studien belegen den leichten Überlebensvorteil durch eine cisplatinhaltige adjuvante Chemotherapie. Andere Studien, wie zum Beispiel die ALPI-Studie [48] konnten keinen Überlebensvorteil durch eine adjuvante Chemotherapie nachweisen. Hier wurden zwischen 1994 und 1999 1209 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom im Stadium I-IIIa randomisiert und entweder einer adjuvanten Chemotherapie mit Mitomycin, Vindesin und Cisplatin zugeführt oder blieben ohne adjuvante Chemotherapie. Nur 69 % der Patienten beendeten die Behandlung, jedoch wurde bei der Hälfte der Patienten

die Behandlung modifiziert. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen im Gesamtüberleben und im krankheitsfreien Überleben nachgewiesen werden.

In der internationalen IALT Studie [4,6] wurden von 1995 bis 2001 1867 Patienten im Tumorstadium I-III eingeschlossen und wurden entweder mit einer cisplatinbasierten Chemotherapie behandelt oder beobachtet. 67 % der Patienten im Chemotherapiearm erhielten mindestens 300 mg/m² Cisplatin, welches mit Etoposid, Vinorelbine, Vinblastine oder Vindesine kombiniert wurde. Das 5-Jahres-Überleben war in der Patientengruppe im Chemotherapiearm um 5 % und das krankheitsfreie Überleben ebenfalls nach 5 Jahren um 5 % höher, beides mal mit statistischer Signifikanz. Nach 90 Monaten war der Überlebensvorteil aufgrund von nicht auf den Krebs zurückzuführenden Todesfällen nicht mehr relevant.

In der ANITA Studie [15] wurden 840 Patienten aus 14 Ländern im Stadium IB bis IIIA postoperativ randomisiert und entweder nachbeobachtet oder adjuvant mit einer Kombination aus Cisplatin und Vinorelbine behandelt. Auch in dieser Studie zeigte sich ein Überlebensvorteil von ca. 8,5 % nach 5 und 7 Jahren zugunsten der Therapiegruppe. In der Subgruppenanalyse zeigte sich, dass der Überlebensvorteil nicht für Patienten im Stadium IB besteht.

In der LACE Metaanalyse 2008 [45] wurden die Daten der 5 größten Studien (BLT [56], ANITA [15], IALT [4,6], ALPI [48], JBR [57]) gepoolt. Es wurden die Daten von 4584 Patienten ausgewertet, die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 5,2 Jahre. Es zeigte sich ein 5-Jahres-Überlebensvorteil von 5,4 % bei den Patienten, welche eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben. Sowohl Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben hingen nicht vom Alter, Geschlecht, der Bestrahlung, der Cisplatinosis, der Histologie oder vom Resektionsausmaß ab. Der Effekt der Chemotherapie variierte nicht signifikant in Abhängigkeit vom Zweitmedikament. Ein besserer Performancestatus war mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie verbunden, der Performance Status wurde als Index zur Beurteilung der Lebensqualität bei onkologischen Erkrankungen nach den Kriterien der Eastern cooperative oncology group (ECOG) bestimmt [43].

2010 wurde eine Metaanalyse der NSCLC Metaanalyses Collaborative Group veröffentlicht, in der 24 Studien mit 8447 Patienten aus Nordamerika, Europa und Asien ausgewertet wurden [5]. Auch hier wurde ein 5-Jahres-Überlebensvorteil

von 4 % bei der Gruppe der Patienten mit Operation plus Chemotherapie im Vergleich zu Patienten ohne Chemotherapie nachgewiesen. Es konnte kein weiterer Vorteil durch eine zusätzliche postoperative Radiotherapie gezeigt werden. Es war auch kein Unterschied im Behandlungseffekt zu sehen, wenn das in Asien verwendete Tegafur und Uracil oder nur Tegafur eingesetzt wurde.

1.1.2 Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

In allen fortgeschrittenen Stadien ist mit Ausnahme von Einzelfällen ein multimodales Konzept bestehend aus Strahlentherapie, Chemotherapie und u.U. palliativen operativen Maßnahmen sinnvoll. In der First-line Chemotherapie werden ebenfalls platinhaltige Kombinations-Chemotherapieprotokolle empfohlen [24].

Cisplatin kombiniert mit Gemcitabin, Taxanen oder Vinorelbin führt zu einer signifikant höheren Überlebenszeit. Bei Nicht-Plattenepithelkarzinomen konnte durch die Kombination Cisplatin/Pemetrexed eine um 1,4 Monate verbesserte mediane Überlebenszeit nachgewiesen werden. Bei eingeschränkter Chemotherapiefähigkeit kann eine zytostatische Monotherapie erwogen werden. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Nicht-Plattenepithelkarzinom kann Bevacizumab (VEGF (vascular endothelial growth factor) - Antikörper) in der Erstlinientherapie zusätzlich zur platinhaltigen Kombinationschemotherapie gegeben werden. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch Ergänzung der Therapie mit einem monoklonalen VEGF-Antikörper vor allem bei Adenokarzinomen eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens erreicht wird [50].

Weiterhin empfohlen, jedoch bisher zur Behandlung des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms nicht zugelassen, ist Cetuximab (monoklonaler Antikörper des EGFR (epidermal growth factor receptor)).

EGFR ist bei 85 % der Plattenepithelkarzinome und bei 65 % der Adeno- und großzelligen Karzinome der Lunge überexprimiert, kommt jedoch im normalen Lungengewebe kaum vor. Wenn immunhistologisch EGFR vermehrt nachgewiesen wird, kann durch die Gabe von Cetuximab in Kombination mit einer platinhaltigen Doublette das Gesamtüberleben signifikant verbessert werden [46].

Bei nachgewiesenen aktivierenden Mutationen in der Thyrosinkinase-kodierenden Region des EGFR-Gens ist die Behandlung mit Thyrosinkinase-Inhibitoren in der Erstlinientherapie möglich.

1.2 Biomarker

Mehr als 60 % aller Patienten in frühen Tumorstadien entwickeln ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastasierung [24].

Basierend auf den großen Metaanalysen zeigt sich, dass durch die adjuvante Cisplatin-basierte Chemotherapie nur ein 5-Jahres-Überlebensvorteil von ca. 4-5 % zu erreichen ist. Möglicherweise lässt sich durch die Erforschung von Biomarkern eine bessere Selektion der Patienten erreichen, um eine maßgeschneiderte Therapie durchführen zu können.

Gegenwärtig werden unter anderem einige molekulare prädiktive Marker für die Chemotherapie beim frühen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom untersucht z.B. p53, ERCC1 (excision repair cross complement group 1), p27, RAS (rat sarcoma viral oncogene), EML4-ALK (Echinodermmikrotubuli-assoziiertes Protein-like-4-Anaplastische Lymphomkinase) oder EGFR.

Im Gegensatz zu prognostischen Markern, welche eine Vorhersage für den unbehandelten Verlauf einer Erkrankung treffen, sollen prädiktive Marker Subpopulationen herausfiltern, welche potentiell besser auf eine bestimmte Therapie ansprechen.

Im Rahmen der großen Studien zur adjuvanten Chemotherapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wurden einige mögliche „Kandidaten“ als prognostische und prädiktive Faktoren identifiziert.

In der JBR-10 Studie des National Cancer Institutes of Canada wurden Tumorproben auf Expression und Mutation von p53 und RAS untersucht.

P53 als Protein ist in der Lage den Zellzyklus zu regulieren, indem es die Aktivität einer gewissen Anzahl von Genen inhibiert. Es kann Apoptose induzieren und reguliert als Transkriptionsfaktor die Reparatur nach DNA (Desoxyribonukleinsäure) – Schädigung. 253 Tumorproben wurden immunhistochemisch auf die Expression von p53 untersucht. Patienten mit p53 - positiven Tumoren hatten ohne Chemotherapie eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten mit p53 - negativen Tumoren. Patienten mit p53 - positiven

Tumoren profitierten signifikant von der Behandlung mit Cisplatin und Vinorelbine verglichen mit Patienten, die nur operiert wurden. Patienten, bei denen im Tumor p53 nicht nachgewiesen wurde, profitierten von der adjuvanten Chemotherapie überhaupt nicht. Ein Zusammenhang zwischen Mutationsstatus des p53 und dem Überleben nach adjuvanter Chemotherapie konnte nicht nachgewiesen werden [53].

Das RAS (rat sarcoma viral oncogene) ist ein Enzym, welches im Prozess des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Es ist verantwortlich für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen zur Wachstumsstimulierung über Wachstumsfaktorrezeptoren einschließlich des epidermal growth factor receptors. Es existieren drei RAS-Gene, wovon das K-RAS (Kirsten-RAS) mehr als 90 % der nachweisbaren Mutationen in ungefähr 10 bis 25 % der NSCLC Proben enthält. RAS-Mutationen kommen gehäuft bei Adeno- und großzelligen sowie bei Frauen vor. Mutationen im RAS stellten keinen prognostischen Faktor für das Langzeitüberleben dar.

Es wurde jedoch nachgewiesen, dass das mediane Überleben bei Patienten nach kompletter Resektion im Stadium IB – IIB mit wild-type K-ras in der Chemotherapiegruppe signifikant länger war als in der Kontrollgruppe.

Für die Patienten mit Tumoren mit K-ras Mutation konnte kein Überlebensvorteil durch eine Chemotherapie gesehen werden [53].

P27 ist ein Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor, der die Zellteilung hemmen und die Zelle vor Apoptose schützen kann. Eine Überexpression von p27 könnte die Zelle vor der Zerstörung durch Cisplatin schützen und somit eine Resistenz induzieren.

Retrospektiv konnte im Rahmen der IALT- Studie gezeigt werden, dass Patienten mit p27 - negativen Tumoren von einer Chemotherapie mit längerem Gesamtüberleben profitierten, im Gegensatz zu Patienten, die nur operiert wurden. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen chemotherapierten und nicht chemotherapierten Patienten mit hoher p27 Expression in den Tumoren im Überleben [19].

ERCC1 ist ein DNA-Reparaturenzym, das DNA (Desoxyribonukleinsäure) Sequenzfehler erkennt und repariert. Dieser Reparaturmechanismus ist entscheidend für das Ansprechen auf Cisplatin, welches an die DNA bindet und durch Querverknüpfungen zweier benachbarter Guaninbasen die Replikation verhindert und damit durch Hemmung des Zellstoffwechsels zur Apoptose der

Zelle führt. In einer Metaanalyse von Hubner et al. 2011 wurden die Ergebnisse von 23 Studien mit insgesamt 2726 Patienten ausgewertet [29]. Es ist wahrscheinlich, dass eine hohe ERCC1 Expression mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der mit Cisplatin behandelten Patienten mit NSCLC assoziiert war. Für Patienten, welche nicht mit Cisplatin behandelt wurden, konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Als relevante Biomarker in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms etablieren sich zunehmend aktivierende Mutationen im EGFR-Gen sowie das onkogene Fusionsgen EML4-ALK. Bei Nachweis aktivierender Mutation in der Thyrosinkinase-kodierenden Region des EGFR – Gens kann der Thyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib oder Erlotinib eingesetzt werden. Als aktivierende Mutationen werden EGFR-Mutationen in den Exonen 18-21 bezeichnet, diese sind prädiktiv für Gefitinib und Erlotinib.

Bei Nachweis eines durch eine Mutation entstandenen EML4-ALK Fusionsproteins kann spezifisch mit dem TKI Crizotinib behandelt werden. In einer Phase I Studie von Camidge et al. konnten 149 ALK positive Patienten eingeschlossen werden. 87 von 143 Patienten zeigten ein objektives Ansprechen auf die Therapie bei relativ geringer Nebenwirkungsrate [13].

1.3 Predict – Projekt

Um ein individuelles Behandlungsregime für Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom entsprechend der komplexen biologischen Konstitution eines Tumors zu finden, wurde, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, ein systembiologischer Ansatz zur Untersuchung individualisierter Therapieregime beim NSCLC (Predict) entwickelt. Hierbei wurde durch die Forschungspartner Max Planck Institut für Molekulargenetik, Bayer Schering Pharma AG, Deutsches Krebsforschungszentrum, Evangelische Lungenklinik Berlin Buch und Experimentellen Pharmakologie und Onkologie ein Computermodell entworfen, um anhand von Patientendaten vor Beginn einer Chemotherapie die Verträglichkeit und Wirksamkeit zu testen, um dem Patienten ein individuelle, auf ihn zugeschnittene Therapie zukommen zu lassen.

Als ein Teilprojekt wurden Tumorproben aus intraoperativen Tumorpräparaten in Xenografts transplantiert [18,42]. Anschließend konnten dann aus den generierten

Xenografts Genexpressionsanalysen mit Affymetrixchips durchgeführt werden. Dadurch ließen sich Gene identifizieren, welche in den Tumorproben der Xenografts relevant überexprimiert wurden. Parallel wurden durch das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg RPPA (Reverse Phase Protein Array) Analysen der Xenografts durchgeführt. Mit RPPA Analysen kann eine Probe gleichzeitig mit sehr vielen Antikörpern auf das Vorhandensein verschiedener Proteine untersucht werden.

Um die Ansprechraten für verschiedene Chemotherapeutika zu ermitteln, wurden mit den Xenografts standardisierte Therapieversuche durchgeführt. Dabei kamen neben für das Lungenkarzinom zugelassenen Standardtherapeutika, auch neue Targettherapeutika (z.B. Cetuximab) zur Anwendung [47].

Die Datensätze aus den Genexpressionsstudien und den Proteinanalysen wurden anschließend miteinander abgeglichen mit dem Ziel, differenziell regulierte Gene oder Proteine in den eingeschlossenen Karzinomen zu identifizieren, gegen die im idealen Fall ein in Deutschland zugelassenes Medikament existiert.

Es gelang, Gruppen von Karzinomen zu identifizieren, die differenziell exprimierte mRNA (messengerRibonukleinsäure) und differenziell regulierte Proteine für Kandidatengene/proteine aufwiesen und eine Verbindung zum Ansprechen auf Chemotherapeutika zu zeigen. Eine Übereinstimmung auf beiden Expressionsniveaus wurde für die Pathways der AMP-aktivierten Proteinkinase gefunden. Dieses Protein wurde in den Cetuximab sensitiven Modellen erhöht exprimiert nachgewiesen.

1.4 AMPK

AMPK (Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase) ist ein heterotrimeres Enzym, bestehend aus den drei Untereinheiten α , β und γ . In Säugetieren wird die AMPK auf 7 unterschiedlichen Genen kodiert. Es existieren jeweils 2 Isoformen der Untereinheiten α und β und drei Isoformen der γ - Untereinheit, welche in allen möglichen Kombinationen existieren können. AMPK kommt in einer Vielzahl von Geweben vor, z.B. in der Leber, im Gehirn, in der Lunge oder im Skelettmuskel.

Die γ -Untereinheit enthält vier einzelne CBS (Cystathion β Synthase) Domänen, mit denen das Enzym Veränderungen im AMP/ATP (Adenosinmonophosphat/

Adenosintriphosphat) Haushalt detektiert. Die vier CBS Domänen bilden zwei Bindestellen für AMP, auch Bateman Domänen genannt.

Durch die Bindung von AMP an beide Bateman Domänen wird die katalytische Domäne der α -Untereinheit exponiert. AMPK kann dann durch Phosphorylierung durch die AMPK Kinase an der katalytischen Untereinheit an Threonin-172 aktiviert werden [28].

AMPK fungiert als Energie-Anzeiger der Zelle und hält den Energiehaushalt der Zelle im Gleichgewicht. Sie schützt die Zelle vor ATP Mangel durch Abschalten anaboler Stoffwechselwege wie z.B. der Fettsäuresynthese oder der Glykogensynthese. Gleichzeitig werden katabole Stoffwechselwege wie z.B. Glykolyse, oder Fettsäureoxidation aktiviert [25]. Die Aktivierung erfolgt durch einen Anstieg von AMP sowie ADP (Adenosindiphosphat) [27], ausgelöst durch metabolischen Stress bei z.B. Hitzeschock, Ischämie oder Hypoxie [26].

Extern zuführbare Aktivatoren für AMPK sind z.B. Metformin [61] Glitazone [21], Resveratrol (Wirkstoff in Rotwein) [8] oder Epigallocatechingallat (Wirkstoff in grünem Tee) [31].

1.5 mTOR und p70S6K

mTOR steht für mammalian target of rapamycin und wurde entdeckt bei der Suche nach Proteinen, an die Rapamycin (ein Immunsuppressivum) bindet.

m-TOR ist ein Enzym und Bestandteil eines Proteinkomplexes, der verschiedene Signalwege der Zelle integriert und durch Regulation der Translation Zellwachstum und Zellzyklus steuert. Es gehört zur Familie der Phosphoinositide 3-Kinase related Kinasen.

Die Serin-Threonin-Kinase mTOR existiert in zwei verschiedenen Komplexen (mTORC1 und mTORC2), die völlig unterschiedlich agieren. mTORC1 bestehend aus mTOR, MLST8, RPTOR, AKT1S1/PRAS40 und DEPTOR reguliert neben der Lipid- und Mitochondrienbiosynthese die Proteinsynthese durch Phosphorylierung von Schlüsselenzymen für die mRNA Translation und Ribosomensynthese. Dazu gehört unter anderem die Aktivierung des p70S6K, welches die Proteinsynthese durch Modulation des ribosomalen Proteins S6, des eukaryotic translation initiation factor EIF4B und PDCD4 hochreguliert.

mTOR als Teil des mTORC2 Komplexes zusammen mit MLST8, PRR5, RICTOR, MAPKAP1 und DEPTOR aktiviert AKT 1, welches wiederum die Aktivierung der Phosphoinositide 3 Kinase durch PDK1 erleichtert [16].

Liu et al. zeigten kürzlich, dass die Proteinexpression von mTOR/p-mTOR, p-AKT1, p70S6K und p-p70S6K in Tumorgewebe von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen verglichen mit dem normalen Lungengewebe signifikant erhöht waren. Das Gesamtüberleben der Patienten mit hohen Proteinleveln von p-mTOR, p-PDK1 und p-p70S6K war signifikant kürzer [39].

1.6 AMP-aktivierte Proteinkinase und mTOR Signalwege

Energiemangel in der Zelle führt über einen Abfall von ATP und einen Anstieg des AMP über die Aktivierung von LKB1 zur Aktivierung der AMP-Kinase, was wiederum zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von TSC 1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) /TSC 2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) führt. Dadurch kommt es zu einer Hemmung des m-TOR Signalweges. Somit kommt es bei Nährstoffmangel über den AMP-Kinase Signalweg zur negativen Rückkopplung mit dem mTOR Signalweg und damit zu einer Hemmung des Zellwachstums. [Abbildung 1]

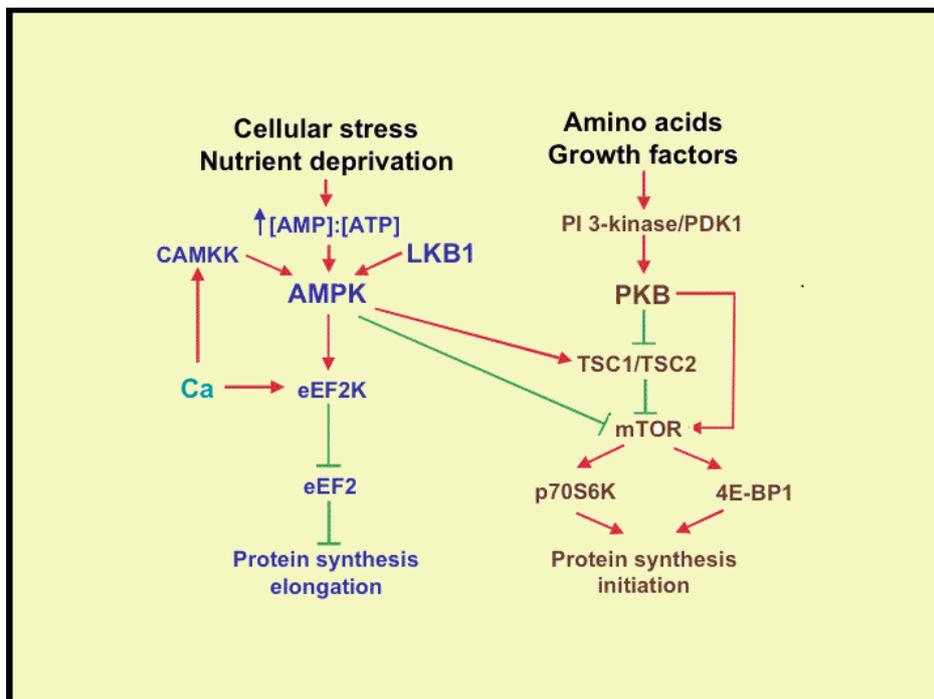


Abbildung 1: Übersicht über den AMP-aktivierte Proteinkinase und mTOR Signalweg [30]

1.7 Zielstellung

Im Rahmen der BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) MedSys geförderten Predict-Projekts wurden als Teilprojekt Xenografts aus intraoperativ gewonnenen Proben von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen etabliert. Mit diesen Xenografts wurden Therapieversuche durchgeführt, um die Wirkung bestimmter Chemotherapeutika zu testen. Zusätzlich wurden die Tumoren auf das Vorliegen von Mutationen des K-ras, p53 und EGFR untersucht. [Abbildung 2]

Pat. ID	TDT±SD (d)	Etoposid	Carboplatin	Gemcitabin	Paclitaxel	Vinorelbine	Cetuximab	Erlotinib	EGFR	K-ras	p53
7064	17,2±4,6	++	-	-	++	-	+++	++	wt	wt	162B;del13bp (frshift>STOP)
7126	12,1±4,2	-	-	+++	-	-	+++	++	wt	wt	wt
7166	19,5±18,5	++	++	+	-	-	-	-	wt	wt	wt
7177	9,5±1,7	-	++	+++	-	-	-	++	wt	wt	M246V
7187	11,1±2	-	++	+++	-	++	++	-	wt	G12C	wt
7198	19,2±1,6	-	+	+	+	+	-	-	IVS18+19;IVS 18+73	G12C	wt
7298	8,4±3,8	+	+	++	++	+	+	-	wt	wt	Y234C
7336	15±5,8	-	(+)	++	+++	n.t.	-	-	Q787Q;A836R	G12D	P190L
7343	9,1±1,4	-	+++	+++	++	-	-	-	wt	wt	wt
7387	8,9±1,8	-	-	+++	++++	+	-	-	wt	wt	wt
7406	10,4±1,9	+	+	+++	+++	-	-	-	wt	wt	P278T
7414	7,2±2,1	-	++	+++	+++	n.t.	+	+	wt	wt	wt
7433	11,7±6,2	-	+++	-	++++	n.t.	-	-	R836R silent	wt	258E>STOP
7462	5,2±0,3	-	+	++++	+++	n.t.	++++	+	wt	G12C	G245V
7466	5,8±1,5	-	-	++++	++++	-	++++	-	wt	wt	R196P
7506	10,7±3,7	-	++++	(+)	+++	n.t.	+	++++	wt	wt	190:del1bp
7530	8,4±1,9	++++	-	tox	+++	n.t.	-	++	wt	G12D, G13D	wt
7558	11,2±3	-	++++	+++	-	n.t.	+	-	Q787Q	wt	I232F
7612	9,7±1,6	-	++++	-	+++	n.t.	-	-	wt	wt	wt
7668	10,1±7,2	-	+++	tox	++++	n.t.	++++	-	wt	wt	wt
7700	14,1±5,1	-	-	++++	++	n.t.	-	-	wt	wt	H193Y
7747	9,5±2,5	-	++	-	++	n.t.	-	-	wt	wt	wt
7766	12,8±7,5	-	+++	+	++	n.t.	++	-	Q787Q silent	G12D, G13D	M246K
7860	20,4±6	+	-	++	+++	n.t.	-	-	Q787Q silent	wt	V153F
7913	7,8±1,9	-	+	(+)	+++	n.t.	+++	-	wt	wt	wt
Mutationsrate									6/25	6/25	13/25
TS		1/25	3/25	3/25	4/25	0/11	3/25	1/25			
STD		5/25	15/25	16/25	16/25	4/11	9/25	5/25			
RR		6/25	18/25	19/25	20/25	4/11	12/25	6/25			

Abbildung 2: Übersicht über bereits durchgeführte Therapiestudien der Xenografts sowie Untersuchung auf das Vorliegen von Mutationen des EGFR (Epidermal growth factor receptor-Gens, K-ras (kirsten-rat sarcoma viral oncogene) und p53 [18]

Legende zur Abbildung 2:

TDT	Tumorverdopplungszeit (tumor doubling time)
SD	Standardabweichung in Tagen
n. t.	Nicht getestet
(+)	Borderline (kaum Ansprechen)
Tumor response score	Ansprechrare -100-50 % T/C behandelte Tiere zu Kontrollen + 50-35 % T/C behandelte Tiere zu Kontrollen ++ 35-21 % T/C behandelte Tiere zu Kontrollen +++ 20-6 % T/C behandelte Tiere zu Kontrollen ++++ 5-0 % = komplette Tumorschrumpfung (TS)
RR	Ansprechrare (TS + STD)
Tox	>50 % der Tiere verstorben
TS	Tumorschrumpfung = Ansprechrare 5-0% T/C behandelte Tiere zu Kontrollen
STD	Stable disease = Ansprechrare 6-50% T/C behandelte Tiere zu Kontrollen
wt	Wildtyp (keine Mutation)

Aus den geschilderten Voruntersuchungen wurden, unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur zur AMP-Kinase und zum m-TOR-Pathway, die Arbeitshypothesen für die vorliegenden Untersuchungen abgeleitet:

Es zeigte sich in Vorversuchen, dass in Cetuximab sensitiven Xenograft-Modellen die AMP-aktivierte Proteinkinase höher exprimiert war als in den Cetuximab resistenten Modellen. Zudem ist aus der Literatur, wie oben beschrieben, bekannt, dass Metformin in diesen Pathway eingreift. Wenn es gelänge, durch Metformin die AMP-aktivierte Proteinkinase hoch zu regulieren, sollten resistente Modelle sensitiv gegenüber Cetuximab werden.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der AMPK-Expression auf Protein- und m-RNA-Ebene in den Tumorproben der Xenografts, um eine mögliche Beeinflussung der AMPK durch den Aktivator Metformin nachzuweisen.

Zusätzlich sollen die Tumorproben auf die Expression von p70S6K auf Proteinebene untersucht werden, um einen möglichen Einfluss der Metformingabe im Sinne einer negativen Rückkopplung auf den m-TOR-pathway nachzuweisen.

Weiterhin sollen im Rahmen dieser Arbeit die Verlaufsdaten der Patienten, aus denen Xenografts gewonnen wurden, ausgewertet werden, um zu untersuchen, ob es Korrelationen zwischen dem Krankheitsverlauf der Patienten und den im Xenograft gezeigten Effekten gibt.

2. Material und Methoden

2.1 Auswertung der Patientendaten

Zur Stadieneinteilung der Tumoren wurde die 6. Auflage der Klassifikation maligner Tumore verwendet [58]. Als Daten-Dead-Line bei der Auswertung der Patientendaten wurde der 15.01.2013 festgelegt.

2.2 Statistik

Die statistischen Analysen zur Auswertung der Patientendaten wurden mit dem Programm PASW/SPSS 18.0 durchgeführt.

Häufigkeitsverteilungen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Differenzen getestet. Mit dem Chi-Quadrat-Test wird die Hypothese überprüft, ob zwei Merkmale voneinander unabhängig sind. Da beim Chi-Quadrat-Test nur Häufigkeiten verglichen werden, ist es bei diesen Tests egal, was als unabhängige und was als abhängige Variable angesehen wird.

Zur Berechnung der Überlebenskurven wurde die Kaplan-Meier-Überlebensfunktion genutzt. Die Kaplan-Meier-Funktion dient zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt. Es handelt sich um eine nichtparametrische Schätzung der Überlebensfunktion im Rahmen der Ereigniszeitanalyse. Diese Methode wurde 1958 von Edward Kaplan und Paul Meier entwickelt.

Für Gruppenvergleiche im Rahmen der Auswertung der Patientendaten wurde der Log-Rank-Test verwendet. Der Log-Rank Test testet, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Überlebensfunktionen gibt.

Als Signifikanzniveau wurde für alle obengenannten Tests 5 % festgelegt, das heißt Ergebnisse mit p-Werten kleiner 0,05 gelten statistisch als signifikant.

Das Overall Survival (OS) als Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt ist definiert für die Zeitspanne vom OP-Datum bis zum Tod des Patienten, wobei Todesfälle jeglicher Art als Ereignisse zählen. Nicht verstorbene Patienten werden zum Zeitpunkt ihres letzten Überlebennachweises zensiert.

Das Disease Free Survival (DFS) ist die Wahrscheinlichkeit für das erkrankungsfreie Überleben. Als Ereignisse gehen Progression, Rezidive und Metastasen in die Berechnungen ein. Die Beobachtungszeit ist die Zeitspanne zwischen dem OP-Datum und Ereignis. Patienten ohne Ereignis werden zum Zeitpunkt ihrer letzten ärztlichen Untersuchung bzw. Bestätigung der Tumorfreiheit zensiert.

Zum Vergleich der Tumorverdopplungszeit mit Überlebenszeiten wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Beim Korrelationskoeffizienten nach Pearson handelt es sich um ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander ab.

Die Auswertung der Westernblots erfolgte visuell.

Die RT-PCR Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes Graph PAD als one-way ANOVA Analyse durchgeführt.

Bei der einfaktoriellen ANOVA wird eine Hypothese bei unabhängigen Stichproben überprüft, nach der die Mittelwerte einer Variablen in verschiedenen Fallgruppen in der Grundgesamtheit gleich groß sind. Voraussetzung für die one-way ANOVA ist eine sogenannte Nullhypothese, welche besagt, dass alle miteinander verglichenen Gruppenmittelwerte der Testvariablen in der Grundgesamtheit identisch seien. Auch hier gilt, dass Ergebnisse mit p-Werten kleiner $0,05$ statistisch als signifikant zu werten sind.

2.3 Ethische Grundlagen, Spender, Transplantation der Tumorproben

Grundlage der vorliegenden Studie sind bereits etablierte Xenografts von Lungentumoren der Firma Epo des Max Delbrück Centrums für Molekulare Medizin Berlin.

Zwischen 04/2004 und 01/2007 wurden Proben von 89 Lungenresektionen bei Vorliegen oder Verdacht auf nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom in NOD/SCID (non-obese diabetic / severe combined immunodeficient) Mäuse subkutan

transplantiert. Von diesen 89 Tumoren erwiesen sich 25 als passagierbare Tumoren [18].

Die gesamte Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Berlin begutachtet und genehmigt. Alle Patienten, die als Gewebespende in Frage kamen, wurden im Rahmen des chirurgischen Aufklärungsgesprächs am Vortag der Lungenresektion aufgeklärt und dies schriftlich dokumentiert.

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie den „UKCCR regulations for the welfare of animals“ durchgeführt. Außerdem wurde die Genehmigung der örtlichen Tierschutzbehörde eingeholt und dies regelmäßig aktualisiert.

Im Operationssaal wurde nach der anatomischen Entfernung des tumortragenden Lungenteils unter sterilen Kautelen ein ca. 1cm³ großes Stück Tumorgewebe und ein gleichgroßes Stück gesundes Lungengewebe in ein Transportmedium gegeben und innerhalb von 30 Minuten im Tierlabor zerkleinert und bei immundefizienten, zum Patienten gleichgeschlechtlichen Mäusen subkutan transplantiert.

Für Therapiestudien mit Metformin und Cetuximab wurden 6 NSCLC-Xenograft-Modelle mit einem unterschiedlichen Ansprechen gegen über Cetuximab ausgewählt.

Um den Effekt einer Metformingabe auf das Tumorstadium und die Aktivierung der AMPK zu testen, wurde die Behandlung mit Cetuximab, Metformin und der Kombination beider Medikamente durchgeführt. Insgesamt wurden 6 Modelle von Lungenkarzinomen untersucht, dabei waren 3 Gruppen Cetuximab Responder und 3 Gruppen Cetuximab Non-Responder.

Die Behandlung erfolgte für 2 Wochen jeweils von Montag bis Freitag. Jeweils 3 Tiere erhielten 24 Stunden vor der Tötung noch eine Behandlung (im folgenden als KZB (Kurzzeitbehandlung) bezeichnet). Nach 30-60 Tagen in Abhängigkeit von der Größe des Tumors wurden die Mäuse abgetötet, die Tumoren entnommen und bei -80°C eingefroren.

2.4 Materialien und Reagenzien

Tabelle 4: Geräte und Materialien

Gerät bzw. Material	Artikelnummer	Firmensitz
Amersham Hyperfilm ECL	28-9068-36	München, D
Applied Biosystems Micro Amp Reaction Tubes	N801-0933	Carlsbad, USA
Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700	N8050200	Carlsbad, USA
Applied Biosystems MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	4346906	Carlsbad, USA
Applied Biosystems MicroAmp® Optical Adhesive Film	4311971	Carlsbad, USA
Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System	4376357	Carlsbad, USA
Bender und Hobein Vortex Genie 2		Zürich, Schweiz
Biometra 10-Taschen Gelkamm	010-011	Göttingen, D
Biometra 28-Taschen Gelkamm	010-019	Göttingen, D
Biometra Clips	010-007	Göttingen, D
Biometra Glasplatten Außen	010-001	Göttingen, D
Biometra Glasplatten innen	010-003	Göttingen, D
Biometra Minigel- Tw in	010 - 100	Göttingen, D
Biometra Silikongummis	010-005	Göttingen, D
Bio-Rad Pow erPac HC	170-3848	München, D
Bio-Rad Trans-Blot SD	170-3848	München, D
Bio-Rad, Nitrocellulose-Membran	162-0112	München, D
Blockthermostat	BT 200 Kleinfeld	Gerden, D
Consort EV265		Turnhout, Belgien
Eppendorf BioPhotometer	6131 000.012	Hamburg, D
Eppendorf Thermodrucker DPU 414	6131 011.006	Hamburg, D
Eppendorf Uvette	0030 106.318	Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge	5403	Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge	5415D	Wesseling-Berzdorf, D
Peqlab Biotechnologie GmbH Nanodrop ND 1000	91-ND-2000	Erlangen, D
Qiagen QIAshredder	79656	Hilden, D
Qiagen Rneasy mini Kit	74104	Hilden, D
Qiagen Tissuelyser	85300	Hilden, D

Tabelle 5: Reagenzien

Reagenz	Firma	Artikelnummer	Firmensitz
0,5 M Tris-HCL Buffer pH 6,8	Bio-Rad	161-0799	München, D
1,5 M Tris-HCL Buffer pH 8,8	Bio-Rad	161-0798	München, D
30% Acrylamid/Bis Solution 29:1	Bio-Rad	161-0156	München, D
Albumin bovine Fraction V	Serva	11924	Heidelberg, D
Ammonium Peroxidsulfat	Roth	9592.3	Karlsruhe, D
Benchmark Prestained Protein Ladder	Invitrogen	10748-010	Darmstadt, D
ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Life Science	RPN2132	Freiburg, D
Essigsäure	Roth	3738.1	Karlsruhe, D
Ethanol	Serva	11093.01	Heidelberg, D
Glycin	Roth	3908.3	Karlsruhe, D
HCL	Roth	4625.2	Karlsruhe, D
Lämmli-Puffer	AppliChem	A 1415,1000	Darmstadt, D
Lysis Puffer	Cell Signaling	9803	Frankfurt, D
Magermilchpulver	Saliter		Obergünzburg, D
Methanol	Merck	UN 1230	Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth	3957.2	Karlsruhe, D
PBS	Gibco	14287-080	Karlsruhe, D
Phosphataseinhibitorcocktail II	Sigma	P5726	Steinheim, D
Phosphataseinhibitorcocktail I	Sigma	P2850	Steinheim, D
Ponceau S, practical grade	Sigma	P3504	Steinheim, D
Primärantikörper Phospho-AMPK α	Cell Signaling	2535	Frankfurt, D
Primärantikörper AMPK α	Cell Signaling	2532	Frankfurt, D
Primärantikörper p70S6K	Cell Signaling	9202	Frankfurt, D
Primärantikörper Phospho-p70S6K	Cell Signaling	9205	Frankfurt, D
Primer Actin Beta	Applied Biosystems	Hs99999903_m1 ACTB	Foster City, USA
Primer AMPK	Applied Biosystems	Hs00178903_m1 PRKAA2	Foster City, USA
Primer AMPK	Applied Biosystems	Hs01562308_m1 PRKAA1	Foster City, USA
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma	P8340	Steinheim, D
Protein-Assay	Bio-Rad	500-0006	München, D
Re-Blot plus mild Solution 10x	Millipore	2502	Temecula, USA
Rinder-Serum-Albumin	Sigma	A6003	Deisenhofen, D
RNA freies Wasser	Sigma	95284	Steinheim, D
RNAse free DNase Set	Qiagen	79254	Hilden, D
SDS ultra pure	Roth	2326.2	Karlsruhe, D
Sekundärantikörper Biotin –SP konjug. Goat anti Rabbit IgG	Jackson Research Immuno	111-065-045	West Grove, USA
Sekundärantikörper Peroxidase-konjug. Streptavidin	Jackson Research Immuno	016-030-084	West Grove, USA
TAQman Fast Uni-versal PCR MasterMix	Applied Biosystems	4352042	Foster City, USA
TAQman Reverse Transcriptase Reagents	Life Technologies	N808-0234	Darmstadt, D
Temed	Bio-Rad	161-0800	München, D
Tris	Roth	4855.2	Karlsruhe, D
Tw een 20	Roth	9127.2	Karlsruhe, D

2.5 Zusammensetzung Puffer

Lysispuffer

Cell Lysis Puffer 1/10, Proteaseinhibitorcocktail I und Phosphataseinhibitorcocktail I und II je 1/500

Transferpuffer 10 fach

30,285 g Tris

144,17 g Glycin

mit konzentrierter HCl pH auf 8,3 einstellen und auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

Blotpuffer

25 ml Transferpuffer 10 fach

175 ml Aqua dest.

50 ml Methanol

Trispuffer pH 7,6; 20 fach (TBS, tris-buffered saline)

48 g Tris

160 g NaCl

mit konzentrierter HCl pH auf 7,6 einstellen und auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

Waschpuffer (TBST, tris-buffered saline/tween)

250 ml 20faches TBS

4750 ml Aqua dest.

5 ml Tween 20

Laufpuffer 10 fach

30,285 g Tris

144,17 g Glycin

1 g SDS

mit konzentrierter HCl pH auf 8,3 einstellen und auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen.

Ponceau S Solution:

100 mg Ponceau S / 100ml 5 % Essigsäure

Primärantikörper (Angaben für die Inkubation von 2 Membranen):

20 ml TBST

1 g BSA

20 µl Primärantikörper

Sekundärantikörper (Angaben für die Inkubation von 2 Membranen):

20 ml TBST

2 µl Sekundärantikörper

2.6 Aufarbeitung der Tumorproben

Durchführung

Die Bradfordmethode beruht prinzipiell auf der sogenannten Biuretreaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung mit Proteinen einen blauvioletten Komplex bilden, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden kann. Um die Proteinkonzentration im Tumorgewebe messen zu können, musste zuerst ein verdünntes Homogenisat aus Gewebe und Puffer hergestellt werden. Dafür wurde jeweils ca. 20 µg Tumorgewebe in ein Eppendorf-Tube vorgelegt und anschließend wurden jeweils ca. 100 bis 150 µl Cell Lysis Puffer hinzugegeben. Die Proben wurden dreimal eingefroren und wieder aufgetaut, anschließend manuell homogenisiert und ca. 12 Stunden bei 4 °C gelagert. Mit der Zentrifuge wurde anschließend das Lysat bei 4°C und 40000 G für 5 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Mittels der BCA (Bicinchoninsäure)-Messung erfolgte nun die Einstellung aller Proben auf die gleiche Proteinkonzentration. Hierfür wurden die Proben nach dem Auftauen zunächst im Verhältnis 1:15 mit PBS (phosphat buffered saline) verdünnt. Zusätzlich wurde der BCA-Standard in einer Verdünnungsreihe von 5 Proben mit den Konzentrationen 600 µg/ml, 500 µg/ml, 400 µg/ml, 300 µg/ml und 200 µg/ml angesetzt. Es wurden 490 µl Bio-Rad Protein Assay pro Probe in eine Küvette vorgelegt und jeweils 10 µl der verdünnten Proben, der Standardproben und eines Leermediums (PBS) zugegeben. Danach konnte mit dem Fotometer die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bei 550 nm gemessen werden. Durch gegebenenfalls weitere Verdünnung wurden anschließend alle Proben auf eine Proteinkonzentration von 30 µg/8 µl eingestellt.

2.7 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach der Molekülgröße. Hierbei werden die aufgetrennten Proteingemische aus einer Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel liegendes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Proteinnachweis mittels eines spezifischen Antikörpers, dem Primärantikörper. Dieser wird dann durch einen zweiten Antikörper, dem Sekundärantikörper, detektiert. Inkubiert man die Membran für etwa 1 Minute mit einer Entwicklersubstanz, so kann man anschließend die Banden auf einem Röntgenfilm darstellen. Die Zusammensetzung des Laufgels richtete sich hierbei nach der Größe des zu untersuchenden Proteins.

Durchführung - Westernblot

Die Auftrennung der Proteinprobe erfolgte mittels eines diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgels mit Gelen der Größe (8,6 x 7,7 x 0,1) cm. Der Gehalt an Acrylamid ist abhängig von der Molekülmasse des zu untersuchenden Antigens und lag in dieser Arbeit bei 8 %. (Tabelle 6)

Tabelle 6: Zusammensetzung des Laufs- und Sammelgels

Laufgel (8%)		Sammelgel	
30 % Acrylamid	1,6 ml	30 % Acrylamid	0,2 ml
Trenngelpuffer	4,4 ml	Sammelgelpuffer	1,7 ml
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	40 µl	APS (Ammoniumperoxidsulfat)	30 µl
Temed	4 µl	Temed	3,75 µl

Entsprechend der gemessenen Proteinkonzentrationen in den hergestellten Proteinlysaten wurden 30 µg der Probe mit Lämmli-puffer 2:1 gemischt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Dadurch wird eine Denaturierung der Proteine erreicht.

Die Gele wurden in den Puffertank eingespannt und der Puffertank mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach dem Spülen der Geltaschen mit Laufpuffer wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 160 V, 200 A, und 150 W für ungefähr 90 Minuten durchgeführt.

Anschließend wurden die Proteine nach dem Prinzip des Semi-Dry-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Nun wurde der Erfolg des Proteintransfers mit Hilfe von 5 % Ponceaulösung kontrolliert.

Nach einer einstündigen Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine mit in TBST (tris buffered saline/tween) verdünntem Milchpulver (5%) folgte über Nacht die Inkubation der Membranen mit einem spezifischen verdünntem Primärantikörper bei 4°C. Dieser Primärantikörper ist gegen das zu untersuchende Protein gerichtet und reagiert mit Proteinen auf der Nitrocellulose-Membran. Nach gründlicher Waschung der Membranen mit TBST für 3 mal 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem 1. Sekundärantikörper für eine Stunde. Nach erneutem Waschvorgang wurde dann die Membran für 45 Minuten mit HRP (horseradish peroxidase)-konjugiertem Streptavidin inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation mit dem 2. Sekundärantikörper erfolgte erneut eine gründliche Waschung für 3 mal 10 Minuten mit TBST und die Detektion mittels ECL (enhanced-chemiluminescence) - Detection-Kit durch Chemilumineszenz, die auf dem Prinzip der Lichtemission beruht. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird die Oxidation des Farbstoffs Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert und bringt damit das Luminol in seinen angeregten Zustand.

Durch Lichtemission erreicht das Luminol wieder ein niedrigeres Energieniveau und damit seinen Grundzustand, was zu einer Schwärzung auf dem Röntgenfilm führt. Die Expositionszeit des Luminols mit dem Röntgenfilm betrug einige Sekunden.

Nach der Entwicklung wurden die Membranen mittels eines Reblot-Reagenz gestriipt, um anschließend den β -actin-Nachweis vorzunehmen. Hierfür wurden die Membran zunächst eine Stunde in dem verdünnten Primärantikörper und nach einem kurzem Waschgang für 90 Minuten in dem verdünnten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend erfolgte erneut die Detektion mit dem ECL-Detection-Kit und die Entwicklung in der Dunkelkammer.

2.8 RNA-Isolierung, Reverse Transkriptase Reaktion und Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) ist eine Methode, mit der man auch aus winzigen Spuren eines Ausgangsmaterials DNA-Fragmente nachweisen kann. Die Methode wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt. Die Amplifikation wird mit Hilfe einer DNA abhängigen Polymerase, Desoxyribonukleotiden und zwei Oligonukleotiden (Primer), welche gegenläufig an dem zu untersuchenden Bereich der DNA binden, durchgeführt.

Für die Real-time PCR wird zunächst aus dem zu untersuchenden Gewebe die Gesamt-RNA isoliert und mittels einer reversen Transkriptase zu cDNA (complementary DNA) umgewandelt. Dabei wird in unserem Fall ein Oligo-d(T)-Primer verwendet. Hierbei handelt es sich um mehrere Thymin-Basen, welche komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3`Ende der mRNA sind. m-RNA ist bereits modifiziert und Intron-frei, das heißt durch die Messung der m-RNA kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um ein aktives Gen handelt. Somit lässt sich über die RT-PCR gezielt eine Aussage über die Genexpression treffen.

Dann folgt die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion, die sich in drei Schritte gliedert. Als erstes werden die Doppelstränge denaturiert. Im nächsten Schritt, dem Annealing, werden die beiden Einzelstränge mit einem künstlichen Ansatzstück (Primer) für die Taq-DNA-Polymerase versehen. Die so vorbereiteten Einzelstränge werden dann durch die Taq-DNA-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*)

jeweils wieder zum Doppelstrang ergänzt. Diese Schritte werden in zahlreichen Zyklen durchlaufen, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung des Ausgangsmaterials kommt.

Es werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche an einen so genannten Reporter gebunden sind. Im Falle einer Amplifikation wird Licht emittiert. Einmal pro Zyklus wird die Zunahme der Fluoreszenz gemessen und somit Amplifikationskurven erstellt und der Ct-Wert (Cycle-Treshold) für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau ermittelt. Der Ct-Wert beschreibt den Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Als ΔCt wird die Differenz zwischen dem Ct Wert des untersuchten Gens und dem Ct-Wert des Housekeeping Gens, in unserem Fall β -Aktin, bezeichnet.

Durchführung - RNA Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden auf je 150 mg der kryokonservierten Gewebeproben 600µl Lyse-Puffer gegeben und anschließend mit dem Tissuelyser homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat in den Qiashredder gegeben und bei 8000 G 30 Sekunden zentrifugiert. Die weitere RNA Isolation erfolgte entsprechend dem Bench Protokoll des Rneasy Mini Kits. Am Ende wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert und im Spektrometer die Konzentration bestimmt (Absorptionsmaximum 260 nm).

Zusätzlich wurde noch die Ratio, das heißt der Quotient der Messwerte von 260 nm und 280 nm, bestimmt, um die Qualität der extrahierten RNA beurteilen zu können. Ein Quotient von 2 zeigt einen reinen RNA-Gehalt an, während es bei einer Ratio von < 1,2 zu Verunreinigungen mit Protein oder Phenolen gekommen ist.

Durchführung - Reverse Transkriptase Reaktion

Zunächst wurden die Proben mit RNA freiem Wasser auf eine Konzentration von 200ng/3µl eingestellt. Anschließend wurde ein Mastermix aus Wasser, RT-Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphaten, Magnesiumchlorid, Random Hexameren, Rnase Inhibitor und MultiScribeReverseTranskriptase hergestellt. (Tabelle 7)

Tabelle 7: Zusammensetzung Mastermix für Reverse Transkriptase Reaktion

Mastermix	1x in µl
Wasser	0,85
Reverse Transkriptase-Puffer 10x	1
dNTP´s (Nukleosidtriphosphate)	2
25mM MgCl ₂	2,2
Random Hexamere	0,5
Ribonuklease Inhibitor	0,2
MultiScribe Reverse Transkriptase	0,25
Σ	7
RNA * (Ribonukleinsäure)	3

Dann wurden je 3 µl RNA und 7 µl MasterMix in ein Micro Amp Reaction Tube pipettiert. Nach dem Zentrifugieren der Lösung wurden die Proben in den

Thermocycler gegeben und zunächst für 10 Minuten bei 25 °C, dann für 30 Minuten bei 48°C und anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf 5 °C heruntergekühlt und dann bei –20°C aufbewahrt.

Durchführung - Real-time PCR

Zunächst wurden die Proben in Gruppen zu je drei Proben gepoolt. Dafür wurden aus jeder Probe je 7 µl DNA in ein Eppendorf Tube überführt, so dass ein Pool aus 21 µl bestand.

Anschließend wurden die Proben auf eine 96 well Mikrotiterplatte nach dem folgenden Schema pipettiert. (Tabelle 8) Von jeder Probe wurden jeweils 2 µl in drei wells pro Primer aufgetragen. Für die Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

Tabelle 8: Pipettierschema für die PCR (Polymerasekettenreaktion)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	A1-3	Neg	Neg	
B	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	A4-6	Neg	Neg	
C	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	B1-3	Neg	Neg	
D	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6	B4-6			
E	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3	C1-3			
F	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6	C4-6			
G	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3	D1-3			
H	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6	D4-6			
	PRKAA1			PRKAA2			ACTB					

Als Housekeeping Gen wurde Aktin verwendet.

Anschließend wurde ein Mastermix für die PCR nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt. (Tabelle 9)

Tabelle 9: Zusammensetzung Mastermix für PCR (Polymerasekettenreaktion)

		1x
Wasser	µl	7
Universal Master Mix	µl	10
Primer/Mix	µl	1
cDNA aus RT (Komplementär-Desoxyribonukleinsäure aus Reverse-Transkriptase-Reaktion)	µl	2

Von dem entstandenen Mastermix wurden dann 18 µl pro well aufgetragen. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für 1 Minute bei 200 rpm zentrifugiert und in den Step One Plus gelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Patientendaten

Insgesamt konnten von 89 entnommenen Lungentumoren 25 Tumore im Xenograft etabliert werden. Die Geschlechterverteilung bei den 25 Patienten, bei denen ein Xenograft etabliert werden konnte (Gruppe Xeno+) war annähernd gleich mit 12 Männern und 13 Frauen. 21 der Patienten haben geraucht mit einem Nikotinabusus von 10 – 80 Packungsjahren. Bei zwei Patienten ist der Raucherstatus unbekannt, zwei waren Nieraucher. Es wurden die Patientencharakteristika der Patienten, bei denen ein Xenograft etabliert wurde mit den Patienten verglichen, bei denen es nicht gelang, aus dem Tumor ein stabiles Xenograft zu etablieren (Gruppe Xeno-).

Es wurde für alle Variablen mittels Chi-Quadrat-Test geprüft. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechts-, Alters-, Histologie- oder Stadienverteilung zwischen der Xenograft- und der Gesamtgruppe. (Tabelle 10)

Weiterhin wurden die Patientencharakteristika der etablierbaren Tumoren (Gruppe Xeno+) mit der Gesamtmenge aller Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit einem Lungenkarzinom aus den Jahren 2004 bis 2008 (Gruppe ELK (Evangelische Lungenklinik)) verglichen. Hier ergeben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Histologie- und Stadienverteilungen. In der Gruppe der etablierten Xenografts fanden sich mehr Plattenepithel- (48 vs. 33,6%) und Pleomorphe (16 vs. 1,3%) Karzinome als in der Gesamtgruppe. Außerdem fanden sich aufgrund der vorherigen Selektion der nicht-kleinzelligen Karzinome in der Gruppe der Xenografts keine kleinzelligen Karzinome. (Tabelle 11)

Tabelle 10: Vergleich der Patientencharakteristika aller Patienten mit in der Evangelischen Lungenklinik entnommenen Tumorproben und der Patienten mit daraus etablierten Xenografts (Xeno+) von 04/2004 und 01/2007

	p-Wert (Chi ² -Test)	Alle Tumorproben		Xeno+	
Anzahl der Patienten		89	(100%)	25	(100%)
Geschlechterverteilung					
weiblich	0,44	35	(39%)	12	(48%)
männlich		54	(61%)	13	(52%)
Altersverteilung					
< 50 J.	0,35	8	(9%)	4	(16%)
50 bis < 60J.		19	(21%)	7	(28%)
60 bis < 70J.		34	(38%)	5	(20%)
≥70J.		28	(32%)	9	(36%)
Histologieverteilung					
Plattenepithelkarzinom	0,34	38	(43%)	12	(48%)
Adenokarzinom		35	(39%)	6	(24%)
Bronchoalveoläres Karzinom		5	(6%)	0	(0%)
Pleomorphes Karzinom		4	(5%)	4	(16%)
Großzelliges Karzinom		3	(3%)	1	(4%)
Kleinzelliges Lungenkarzinom		2	(2%)	1	(4%)
Typisches Lungenkarzinoid		1	(1%)	0	(0%)
Entdifferenziertes Lungenkarzinom		1	(1%)	1	(4%)
Stadienverteilung					
IA	0,37	9	(10%)	2	(8%)
IB		21	(24%)	3	(12%)
IIA		3	(3%)	0	(0%)
IIB		14	(16%)	9	(36%)
IIIA		25	(28%)	6	(24%)
IIIB		9	(10%)	2	(8%)
IV		8	(9%)	3	(12%)

Tabelle 11: Vergleich der Patientencharakteristika der Patienten mit von 04/2004 – 01/2007 etablierten Xenografts (Xeno+) mit allen Patienten mit Lungenkarzinomen aus den Diagnosejahren 2004-2008 (Gruppe ELK (Evangelische Lungenklinik))

	p-Wert (Chi²-Test)	Gruppe ELK (Evangelische Lungenklinik)	Xeno+ (im Xenograft etablierbar)
Anzahl der Patienten		3097 (100%)	25 (100%)
Geschlechterverteilung			
weiblich	0,053	933 (30,1%)	12 (48%)
männlich		2164 (69,9%)	13 (52%)
Altersverteilung			
< 50 J.	0,073	226 (7,3%)	4 (16,0%)
50 bis < 60J.		496 (16,0%)	7 (28,0%)
60 bis < 70J.		1184 (38,2%)	5 (20,0%)
≥70J.		1194 (38,5%)	9 (36,0%)
Histologieverteilung			
Plattenepithelkarzinom	<0,0001	1041 (33,6%)	12 (48,0%)
Adenokarzinom		978 (31,6%)	6 (24,0%)
Bronchoalveoläres Karzinom		47 (1,5%)	0 (0,0%)
Pleomorphes Karzinom		41 (1,3%)	4 (16,0%)
Großzelliges Karzinom		65 (2,1%)	1 (4,0%)
Nicht-kleinzellig Sonstige		259 (8,4%)	0 (0,0%)
Kleinzelliges Lungenkarzinom		490 (15,8%)	1 (4,0%)
Karzinoid		58 (1,9%)	0 (0,0%)
Entdifferenziertes Lungenkarzinom		7 (0,2%)	1 (4,0%)
Sonstige		7 (0,2%)	1 (4,0%)
Ohne histologische Sicherung		104 (3,4%)	1 (4,0%)
Stadienverteilung			(n=199 k.A.)
IA	<0,0001	274 (9,5%)	2 (8,0%)
IB		296 (10,1%)	2 (8,0%)
IIA		28 (1,0%)	0 (0,0%)
IIB		188 (6,5%)	9 (36,0%)
IIIA		317 (10,9%)	6 (24,0%)
IIIB		452 (15,6%)	2 (8,0%)
IV		1343 (46,3%)	4 (16,0%)

Zusätzlich wurde die Gesamtgruppe aller Patienten der ELK von 2004-2008 nach frühen Tumorstadien selektiert und mit den Xenograft-Patienten verglichen. Hier ist ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Stadienverteilung zu verzeichnen. (Tabelle 12)

Tabelle 12: Vergleich der Stadienverteilung der Gruppe der Patienten mit von 04/2004 – 01/2007 etablierten Xenografts (Gruppe Xeno+) mit allen Patienten der evangelischen Lungenklinik aus den Diagnosejahren 2004-2008 (Gruppe ELK), nur frühe Stadien

Stadienverteilung	p-Wert (Chi ² -Test)	Nur Stadium I-III A	Nur Stadium I-III A
		Gruppe ELK (Evangelische Lungenklinik)	Gruppe Xeno+ (im Xenograft etablierbar)
IA	0,008	274 (24,8%)	2 (10,5%)
IB		296 (26,8%)	2 (10,5%)
IIA		28 (2,5%)	0 (0%)
IIB		188 (17,0%)	9 (47,4%)
IIIA		317 (28,7%)	6 (31,6%)

Im Vergleich der Tumorverdopplungszeiten mit Gesamtüberleben, dem krankheitsfreien Überleben sowie dem Alter der Patienten ergeben sich keine Korrelationen. (Tabelle 13)

Tabelle 13: Vergleich der Tumorverdopplungszeiten im Xenograft mit dem Gesamtüberleben, dem krankheitsfreien Überleben und dem Alter der entsprechenden Patienten der Evangelischen Lungenklinik im Zeitraum 04/2004- 01/2013 (Korrelationskoeffizient nach Pearson)

Variable 1	Variable 2	Korrelationskoeffizient
Tumorverdopplungszeit (TDT)	Overall Survival [Jahre]	0,136
Tumorverdopplungszeit (TDT)	Disease Free Survival [Jahre]	-0,039
Tumorverdopplungszeit (TDT)	Alter [Jahre]	0,254

Die Patienten der 25 etablierbaren Xenografts, die 89 Patienten von denen versucht wurde, ein Xenograft zu etablieren sowie alle 3097 Patienten mit Lungenkrebs der ELK von 2004 bis 2008 wurden bezüglich des medianen Alters untersucht. Es zeigt sich dass das mediane Alter mit rund 64 Jahren in allen drei Gruppen vergleichbar ist. Zusätzlich wurde die Länge der medianen

Beobachtungszeiten angegeben. Im Vergleich zur Gesamtpatientenkohorte können wir bei unserem Patientenpanel ein gutes follow up nachweisen mit einer medianen Beobachtungszeit für das Overall survival von 3,86 / 2,70 Jahren zu 0,99 Jahren bzw. für das Disease free survival von 1,36 / 1,04 Jahren zu 0,41 Jahren. (Tabelle 14)

Tabelle 14: Übersicht über medianes Alter und die medianen Beobachtungszeiten für das Overall Survival (OS) und Disease Free Survival (DFS) aller Patienten mit entnommenen Tumorproben des Zeitraums 04/2004-01/2007, der Patienten mit im Xenograft etablierbaren Tumorproben (Xeno+) des Zeitraums 04/2004-01/2007 und aller Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit Lungenkrebs von 2004 – 2008 (Gruppe ELK)

	Pat. mit entnommenen Tumorproben, 89 Tumoren	Pat. mit etabliertem Xenograft, 25 Tumoren	Gesamt - Gruppe (Evangelische Lungenklinik), 3097 Patienten
Medianes Alter	64,7 (min 38,2, max 81,9)	64,5 (min 38,2, max 79,4)	67,7 (min 25,1, max 92,5)
Mediane Beobachtungszeit für das OS in Jahren	3,86 (min 0,11, max 8,11)	2,70 (min 0,14, max 7,39)	0,99 (min 0, max 8,41)
Mediane Beobachtungszeit für das DFS in Jahren	1,36 Jahre (min 0, max 8,11)	1,04 (min 0,02, max 7,09)	0,41 (min 0, max 8,13)

Das 5-Jahres-Überleben der Patienten mit Tumorproben, welche nicht im Xenograft etablierbar waren, betrug $43,2 \pm 6,2$ %, für die Patienten mit etablierten Xenografts $40,0 \pm 9,8$ %. Von den 64 Patienten, deren Tumorproben nicht im Xenograft etablierbar waren, sind zum Endpunkt 41 (64%) Patienten verstorben, von den 25 etablierten Xenograft-Patienten sind 17 (68 %) verstorben. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist nicht signifikant. [Abbildung 3]

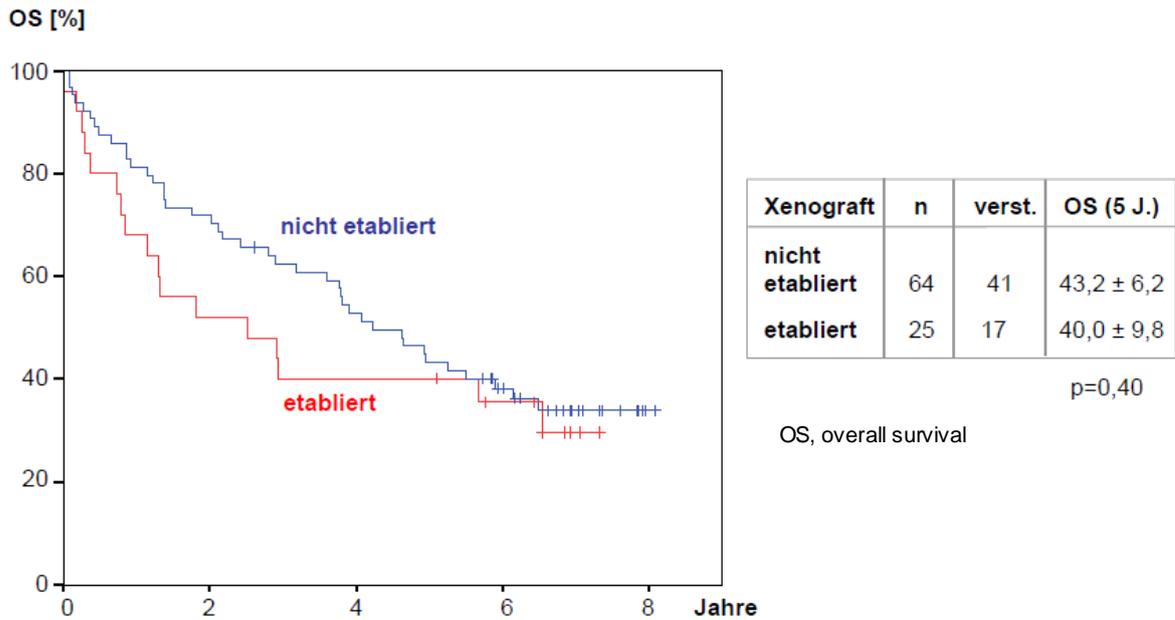


Abbildung 3: Overall Survival der Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit im Xenograft etablierten Tumoren und der Patienten mit nicht im Xenograft etablierbaren Tumoren des Zeitraums 04/2004-01/2007

Der Vergleich der Patienten mit etablierten Xenografts zur Gesamtgruppe aller Patienten mit Lungenkrebs zeigt hingegen signifikante Unterschiede (5-Jahres-OS: etabliert 40,0 ± 9,8 % vs. Alle 17,0 ± 0,01 %, p = 0,013) wobei zum Endpunkt der Studie in der Gesamtgruppe von 3097 Patienten 2510 (81,1 %) verstorben sind. [Abbildung 4]

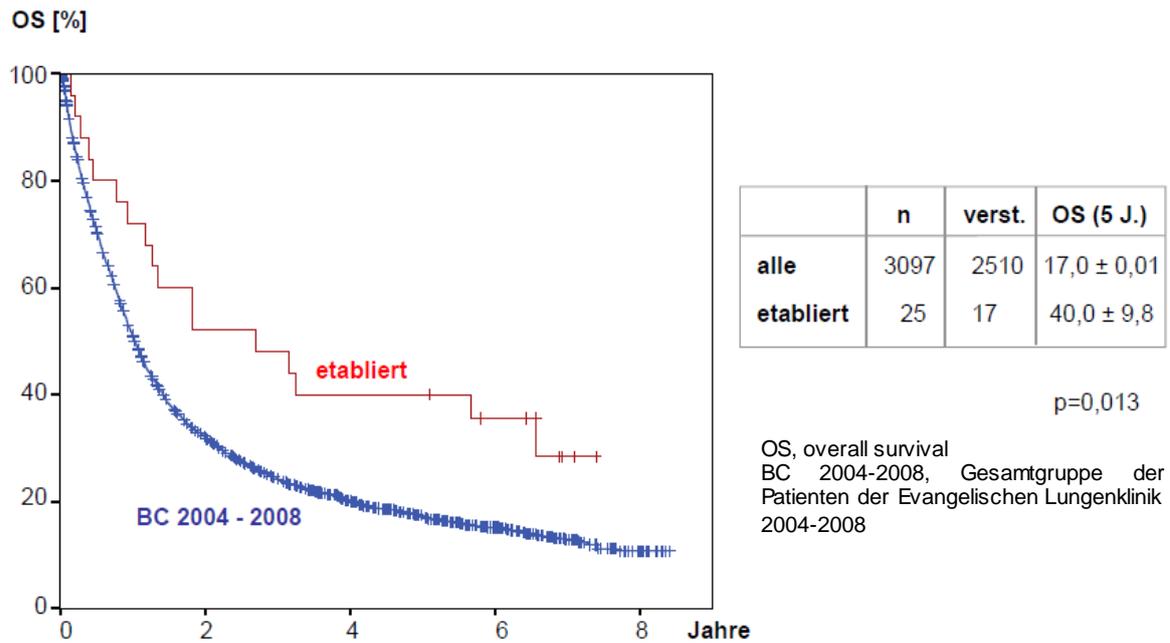


Abbildung 4: Overall Survival der Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit im Xenograft etablierten Tumoren des Zeitraums 04/2004-01/2007 und aller Lungenkrebs-Patienten der Evangelischen Lungenklinik von 2004 – 2008

Selektiert man wiederum alle Patienten nach frühen Tumorstadien (Stadium I-IIIa) ergibt sich ein 5-Jahres-OS der Gesamtgruppe von $39,7 \pm 1,6 \%$ im Vergleich zu den Patienten mit etablierten Xenografts mit $42,1 \pm 11,3 \%$ ($p=0,84$, keine Signifikanz). In der Gesamtgruppe sind zum Endpunkt von 1103 640 (58 %) Patienten verstorben, in der Gruppe der Xenograftpatienten sind von 19 13 (68 %) verstorben. [Abbildung 5]

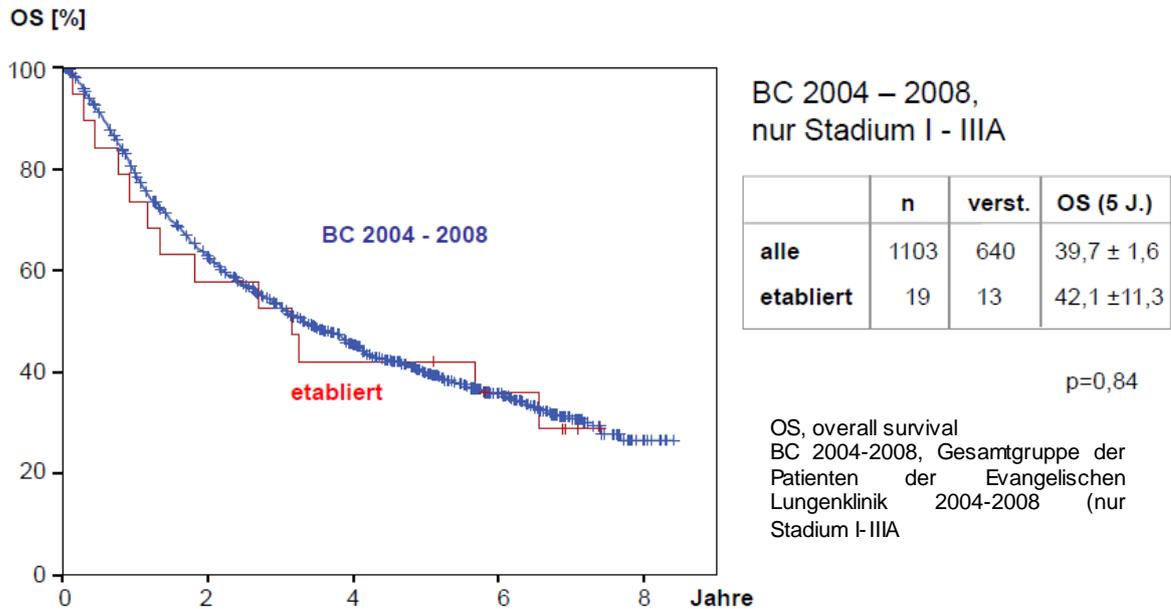


Abbildung 5: Overall Survival der Patienten mit im Xenograft etablierbaren Tumoren des Zeitraums 04/2004-01/2007 und der Gesamt-Gruppe der Evangelischen Lungenklinik von 2004 – 2008 (nur Stadium I-III A)

Zum Vergleich der 5-Jahres-Überlebensraten sowie des krankheitsfreien Überlebens hinsichtlich der Tumorverdopplungszeit wurden 3 Gruppen gebildet. Es wurden Tumoren mit einer Tumorverdopplungszeit < 9 Tage, zwischen 9 und 12 Tagen sowie mehr als 12 Tagen verglichen. Hinsichtlich OS und DFS ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6: <9 versus 9-12: p=0,35, <9 versus >12: p=0,78; 9-12 versus >12: p=0,48; Abbildung 7: <9 versus 9-12: p=0,38, <9 versus >12: p=0,49; 9-12 versus >12: P=0,78).

[Abbildung 6, Abbildung 7]

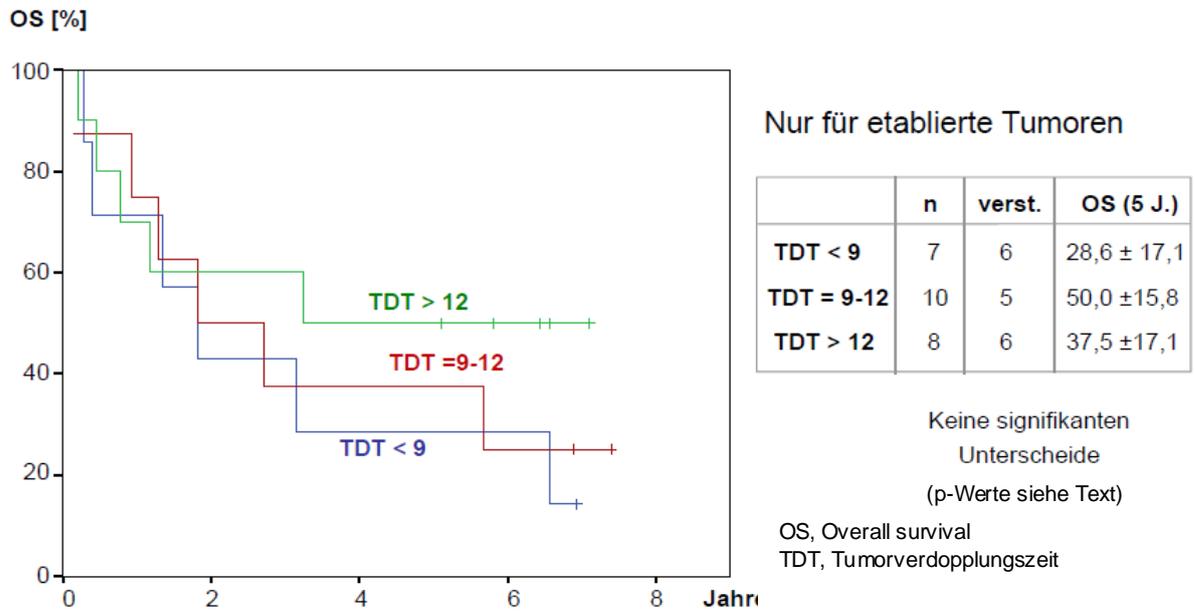


Abbildung 6: Vergleich des Overall Survival der Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit im Xenograft etablierbaren Tumoren (Xeno+) des Zeitraums 04/2004-01/2007 mit der Tumorverdopplungszeit im Xenograft

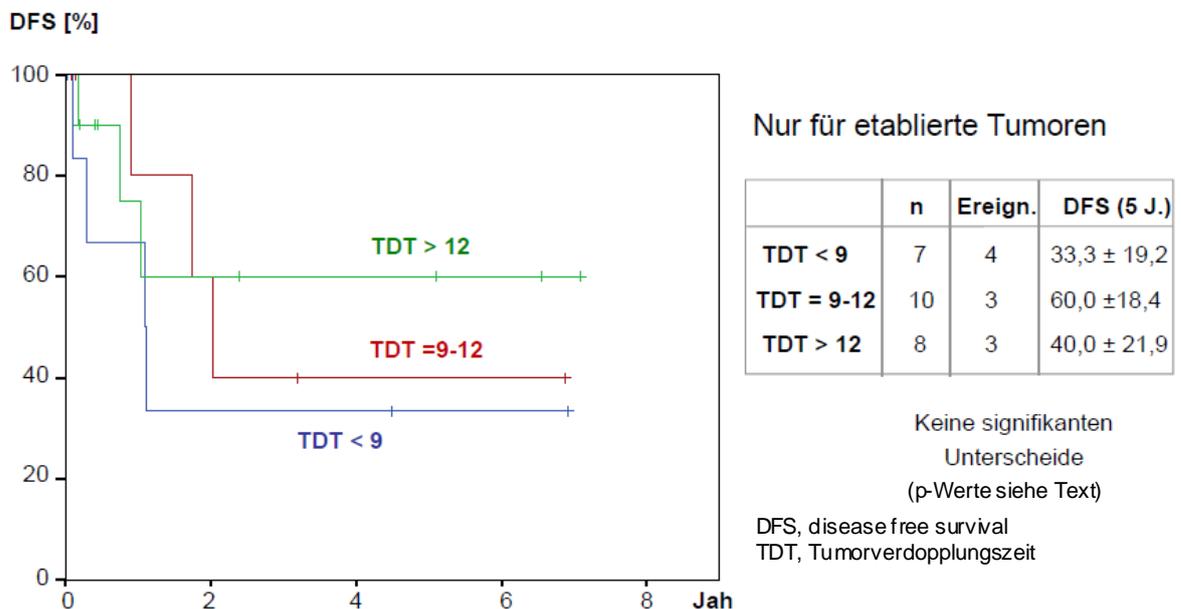


Abbildung 7: Vergleich des Disease Free Survival der Patienten der Evangelischen Lungenklinik mit im Xenograft etablierbaren Tumoren (Xeno+) des Zeitraums 04/2004-01/2007 mit der Tumorverdopplungszeit im Xenograft

Die Auswertung der Gesamtkohorte bezüglich des Gesamtüberlebens zeigt, dass die Plattenepithelkarzinome schlechter abschneiden, als die Adenokarzinome.
[Abbildung 8]

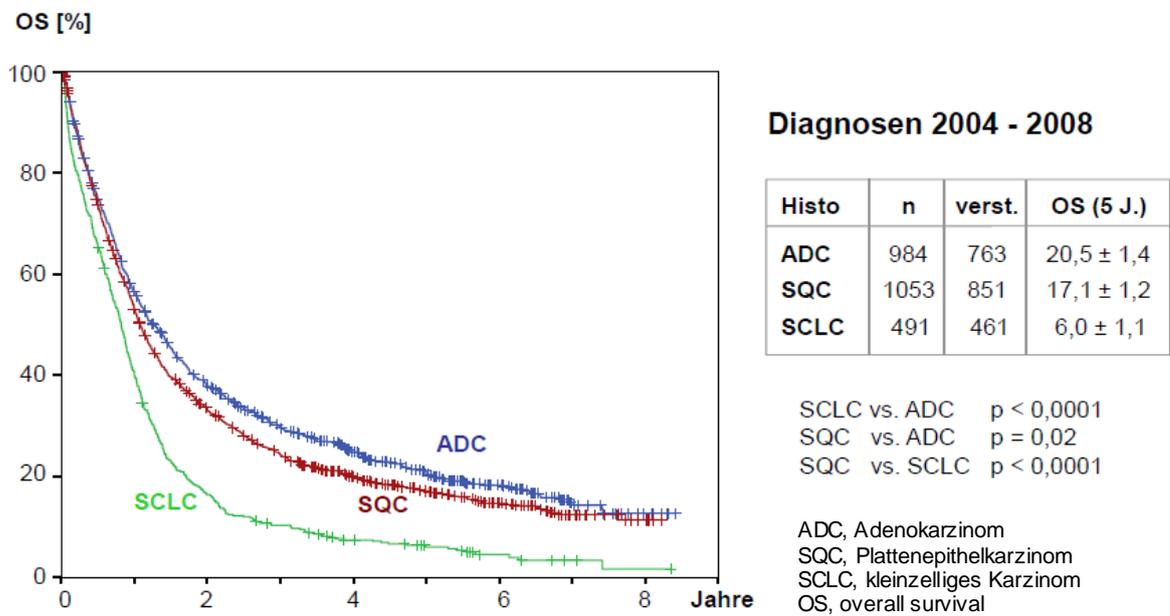


Abbildung 8: Overall Survival der Gesamtpatientenkohorte der Evangelischen Lungenklinik 2004-2008 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

3.2 Cetuximab-resistente Tumore

3.2.1 Tierversuche

Bei den abgebildeten Versuchen, welche in Kooperation mit der Fa. Experimental Pharmacology and Oncology Berlin-Buch durchgeführt worden sind, handelt es sich um Cetuximab-resistente Tumoren, bei denen durch die Metformingabe eine Verbesserung des Ansprechens auf die Chemotherapie erreicht werden sollte.

Bei keinem der Modelle konnte im Tierversuch eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums gezeigt werden. Lediglich bei Modell 7612 scheint das Wachstum durch Metformin oder Cetuximab etwas verlangsamt zu sein, jedoch konnte das Tumorwachstum durch eine Kombinationsbehandlung aus Metformin und Cetuximab nicht reguliert werden. [Abbildung 9]

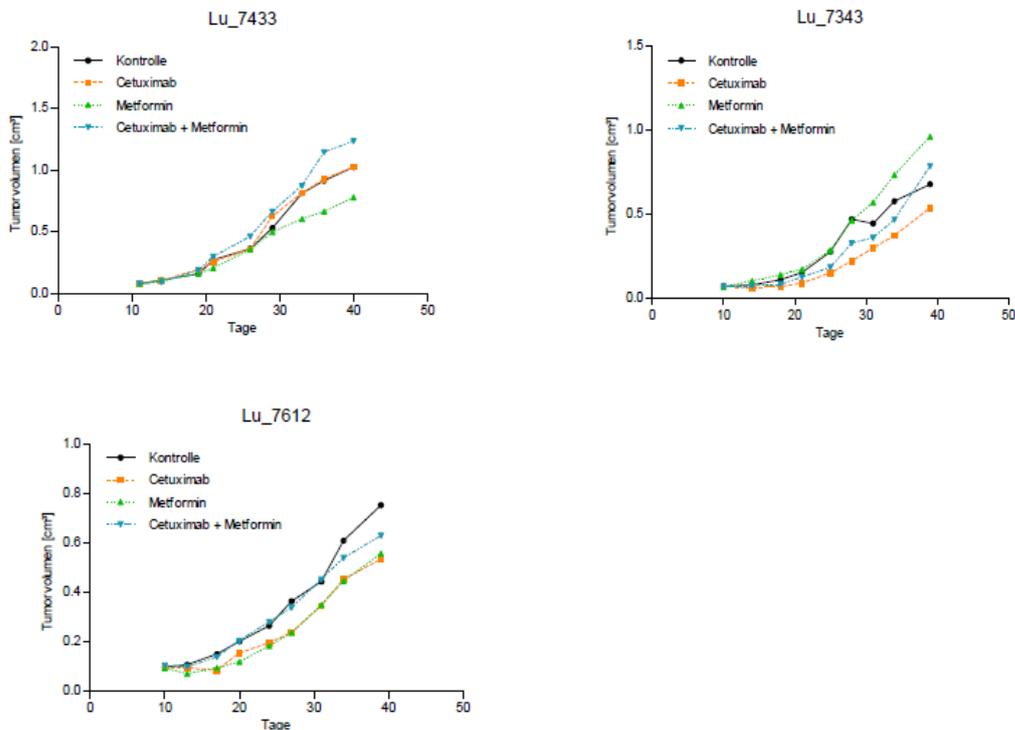


Abbildung 9: Tumorwachstum im Xenograft (etabliert aus 04/2004-01/2007 entnommenen Tumorproben von Patienten der Evangelischen Lungenklinik) bei Cetuximab-resistenten Xenografts

3.2.2 Nachweis der m-RNA mittels PCR

Bei der RT-PCR wird innerhalb der einzelnen Untergruppen mittels der Anova Varianzanalyse häufig ein signifikanter Unterschied in den ΔC_T -Werten nachgewiesen, eine Untergruppenanalyse ist jedoch aufgrund der gepoolten

Proben nicht möglich. Bei keinem der Modelle ergibt sich in der visuellen Analyse der Werte eine signifikante Regulation der AMP Kinase. [Abbildung 10]

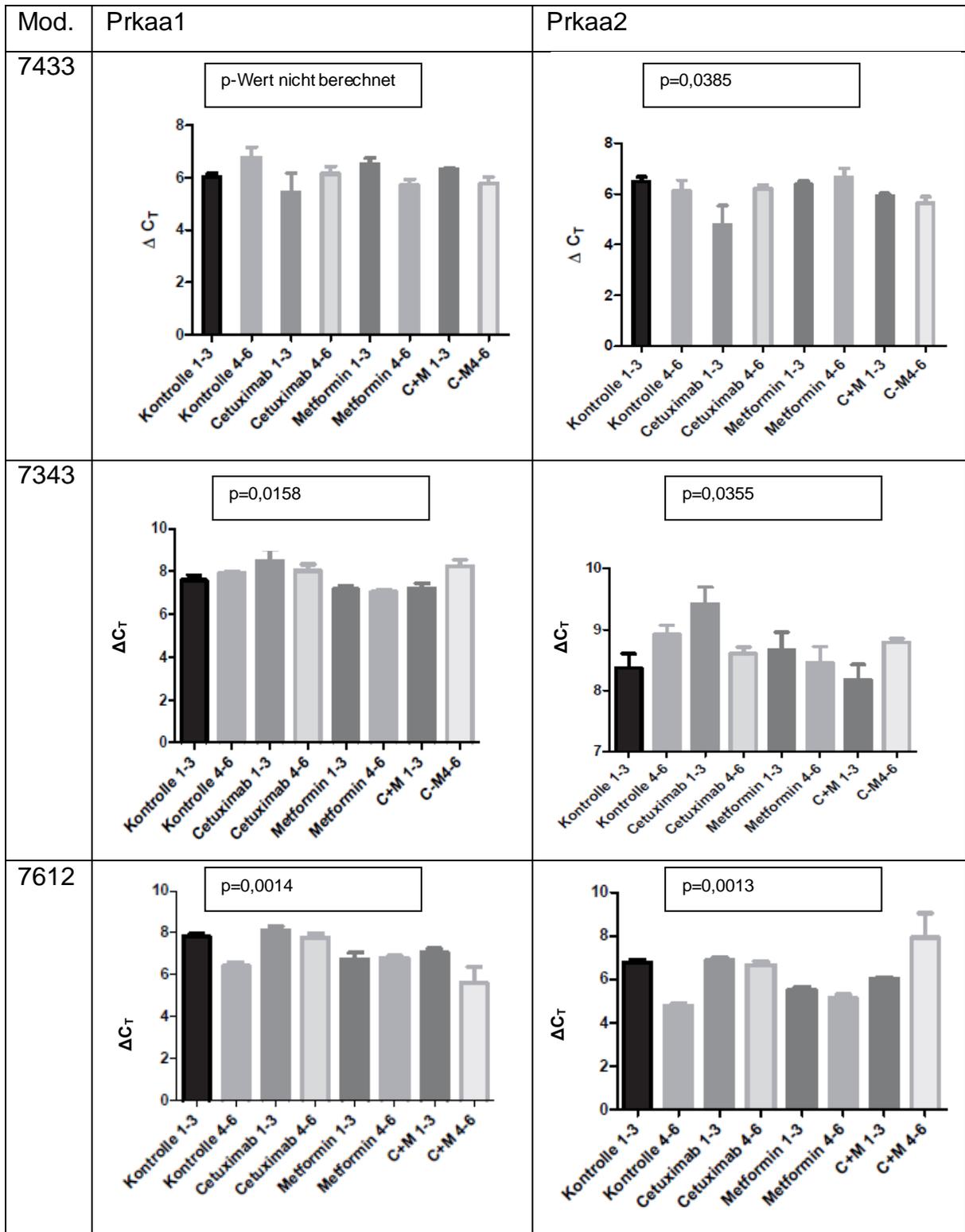


Abbildung 10: Nachweis der RNA (Ribonukleinsäure) mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion) bei Cetuximab-Non-Respondern

3.2.3 Westernblot

Im Westernblot konnte auf Proteinebene bei Modell 7433 keine Aktivierung von AMPK α , phospho AMPK α , p70S6k oder phospho p70S6k gesehen werden.

Bei Modell 7343 könnte eine Aktivierung für die AMPK α vorliegen. Im Westernblot bei Modell 7612 ließ sich lediglich bei den Cetuximab resistenten Tiermodellen eine verminderte Expression von phospho-AMPK α in den Cetuximab behandelten Tieren nachweisen. [Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13]

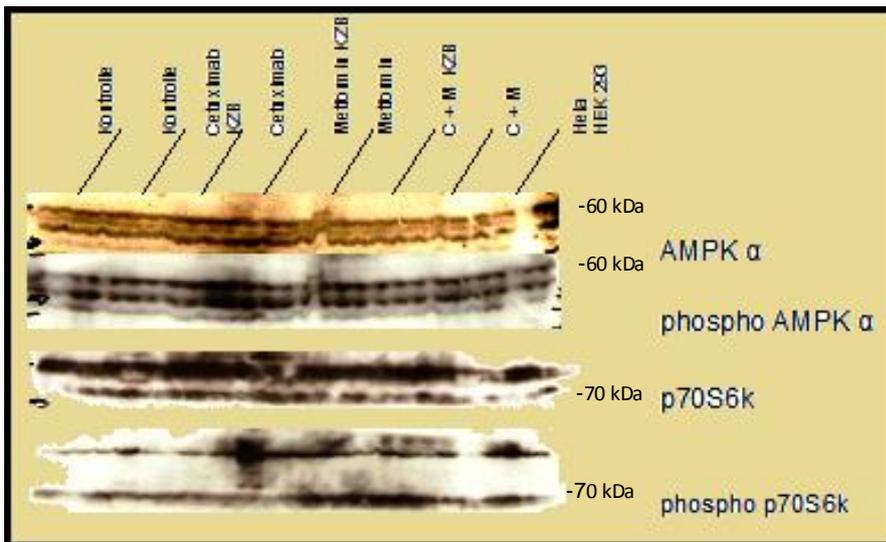


Abbildung 11: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7433

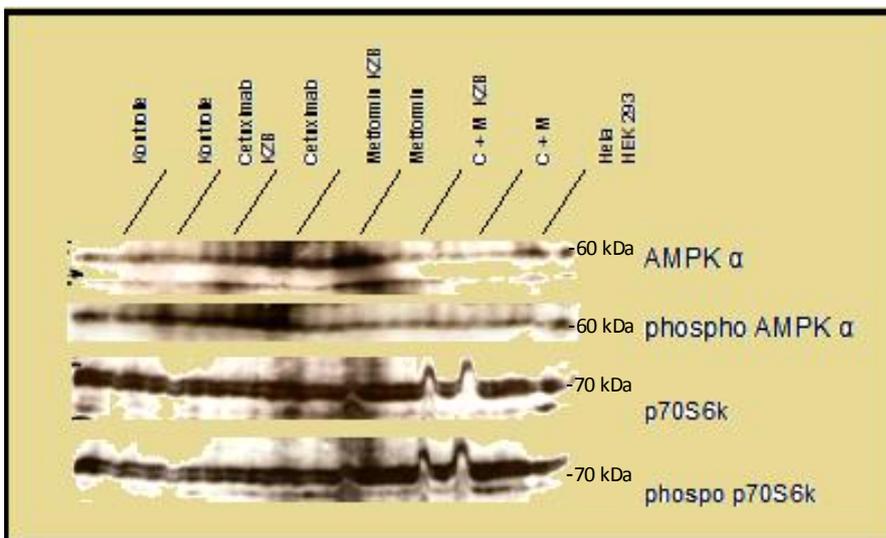


Abbildung 12: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7343

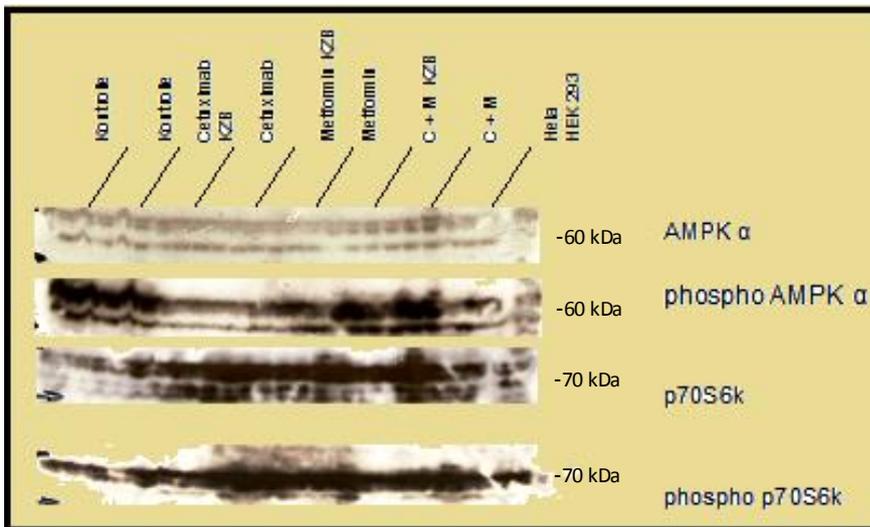


Abbildung 13: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7612

3.3 Cetuximab-sensitive Tumore

3.3.1 Tierversuche

Im Tierversuch wurde das Tumorwachstum bei Modell 7477 durch die Metforminmedikation sogar noch beschleunigt, während Cetuximab und die Kombination aus Cetuximab und Metformin das Tumorwachstum verlangsamt.

Im Vergleich zu den Kontrollen wurde das Tumorwachstum bei Modell 7860 durch alle Behandlungsformen etwas verlangsamt.

Bei Modell 7558 ist das Tumorwachstum bei diesem Modell durch jegliche Behandlungsform verlangsamt worden. [Abbildung 14]

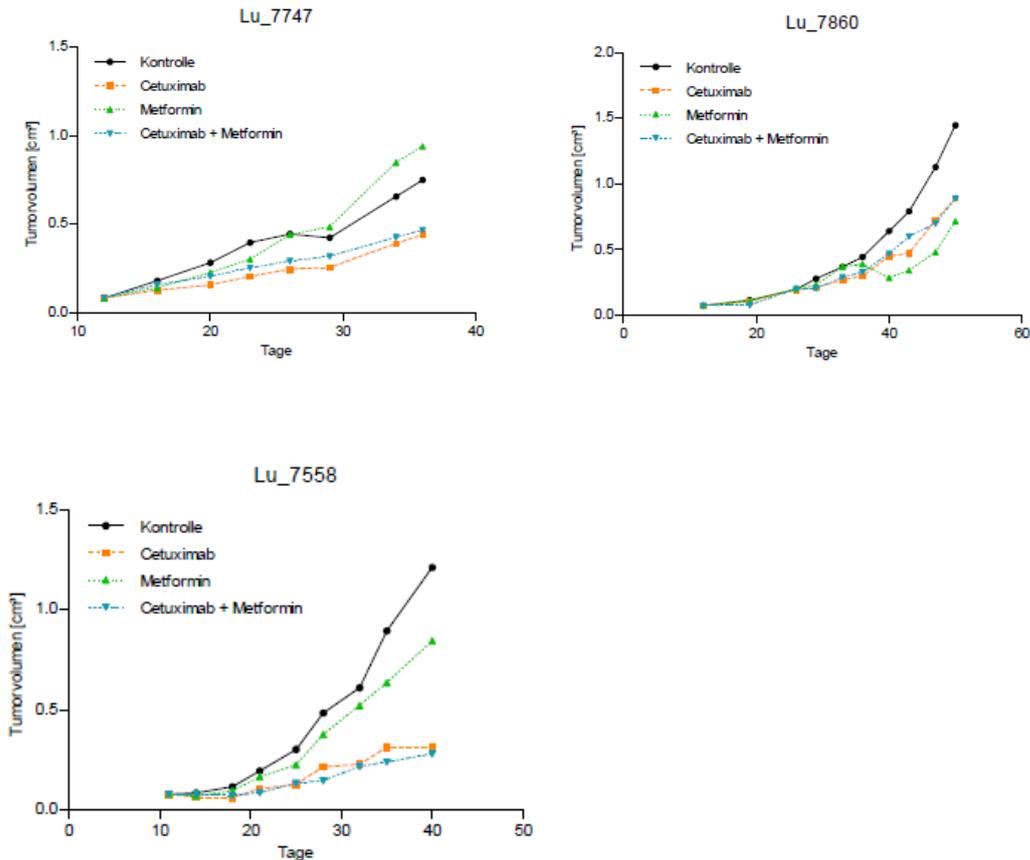


Abbildung 14: Tumorwachstum im Xenograft (etabliert aus 04/2004-01/2007 entnommenen Tumorproben der Patienten der Evangelischen Lungenklinik) bei Cetuximab-sensiblen Xenografts

3.3.2 Nachweis der m-RNA mittels PCR

Im Modell 7747 schlug die PCR bei den Kontrollen mit Aktin fehl, so dass hier eine Auswertung kaum möglich ist. Im Vergleich zu den Kontrollen der vorausgegangenen PCR's scheint jedoch auch hier keine Regulation von *prkaa1* oder *prkaa2* durch die Therapie mit Cetuximab oder Metformin stattgefunden zu haben.

Bei Modell 7860 ist auf RNA-Ebene keine Beeinflussung der Expression der AMP-Kinase durch Metformin nachzuvollziehen.

Im Modell 7558 ist tendenziell im Vergleich zu den Kontrollen durch jede Behandlungsform eine vermehrte Expression der AMP α Kinase nachweisbar. Innerhalb der einzelnen Untergruppen wurde erneut mittels der Anova Varianzanalyse häufig ein signifikanter Unterschied in den ΔC_T -Werten nachgewiesen, eine Untergruppenanalyse ist jedoch auch hier aufgrund der gepoolten Proben nicht möglich. [Abbildung 15]

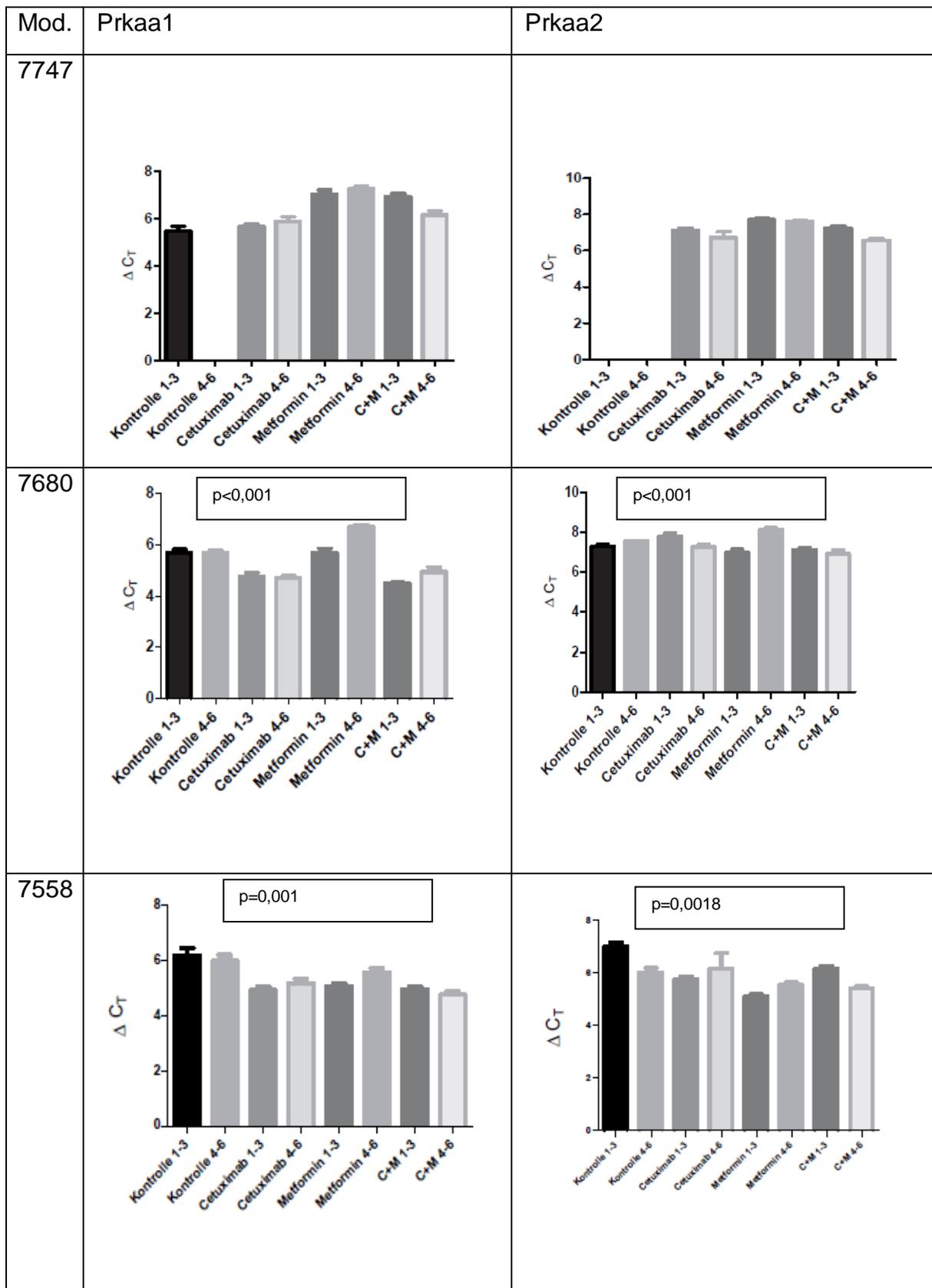


Abbildung 15: Nachweis der RNA (Ribonukleinsäure) mittels RT-PCR (Reverse Transkripta se Polymerasekettenreaktion) bei Cetuximab-Respondern

3.3.3 Westernblot

Im Westernblot scheint die phospho-AMPK bei Modell 7747 durch die Kombinationsbehandlung aus Cetuximab und Metformin vermehrt exprimiert worden zu sein.

Bei Modell 7860 konnte auch auf Proteinebene keine Regulation der AMPK-Kinase nachgewiesen werden. Im Modell 7558 ist tendenziell auch auf Proteinebene im Vergleich zu den Kontrollen durch jede Behandlungsform eine vermehrte Expression der AMP α Kinase nachweisbar. [Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18]

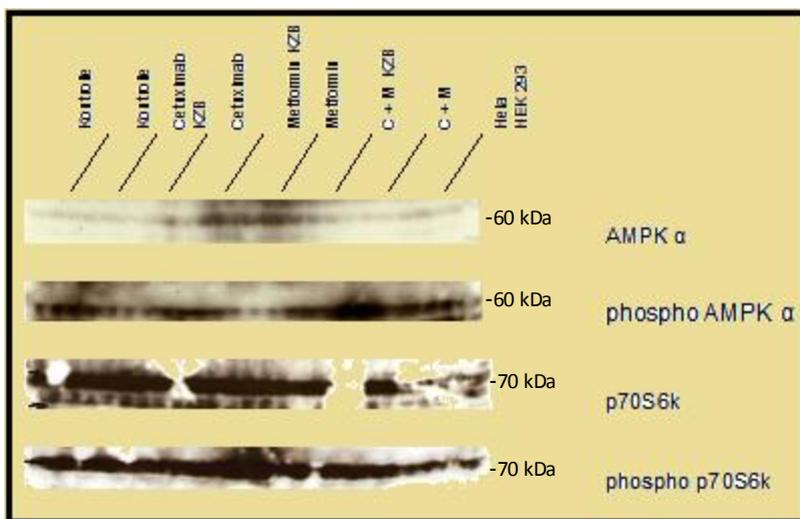


Abbildung 16: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7747

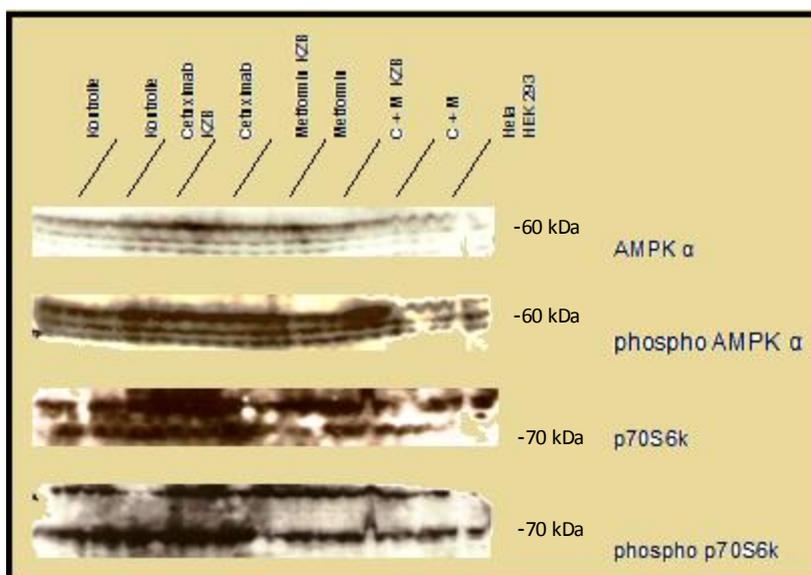


Abbildung 17: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7860

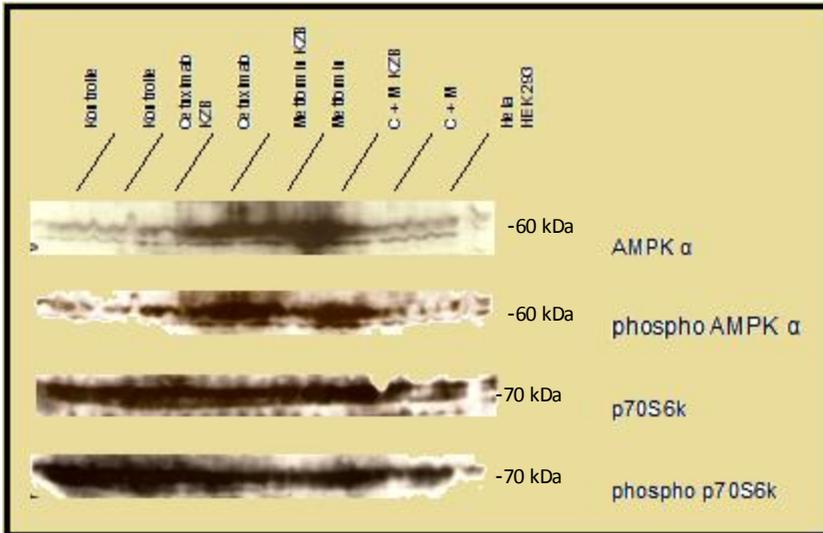


Abbildung 18: Nachweis von AMPK α , p-AMPK α , p70S6k und p-p70S6k mittels Westernblot bei Xenograft-Modell 7558

P70S6k und phospho- p70S6k sind in keiner Tumorprobe auf Proteinebene durch irgendeine Therapie beeinflusst worden.

3.4 Dosis-Wirkungsversuch

Vor Beginn der Therapieversuche wurde ein Dosis-Wirkungsversuch an einem Tiermodell durchgeführt. Es wurden Dosierungen von 100 – 500 mg/kg/d p.o. verabreicht. In keiner der genannten Dosierungen konnte eine Wirkung auf das Tumorstadium nachgewiesen werden. [Abbildung 19]

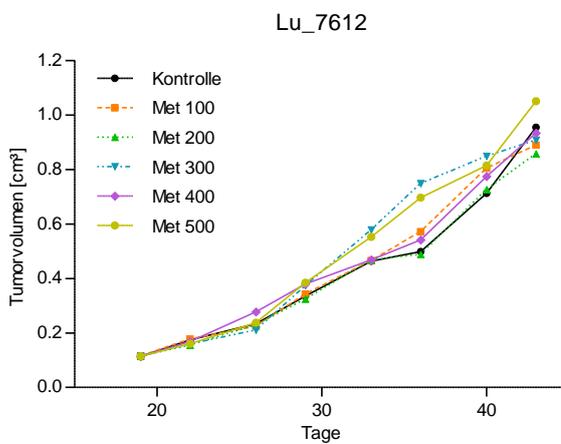


Abbildung 19: Dosis-Wirkungsversuch von Metformin im Tiermodell (Dosierungen von 100-500 mg /kg/d p.o.)

4. Diskussion

Das Lungenkarzinom ist eines der häufigsten Malignome und hat trotz intensiver Bemühungen zur Erforschung neuer Therapeutika nach wie vor eine schlechte Prognose.

Zur Erforschung neuer Therapieansätze werden in der präklinischen Forschung hauptsächlich Xenografts aus etablierten Tumorzelllinien verwendet, die sich in den Eigenschaften des Tumors doch teilweise erheblich vom Tumorwachstum im Menschen unterscheiden.

Sind Xenografts ein geeignetes Mittel zur Erforschung neuer Therapieoptionen?

Im Rahmen des Predict-Projektes ist es gelungen, ein Panel von Xenografts zu etablieren, was dem Auftreten von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs im Menschen sowohl in Geschlechts-, Alters- Histologie- oder Stadienverteilung sehr ähnlich ist.

Vergleicht man die Gruppe der Patienten, von denen ein Xenograftmodell etabliert werden konnte mit der Gesamtpatientengruppe der Evangelischen Lungenklinik von 2004-2008 ergeben sich durchaus signifikante Unterschiede in den Stadienverteilungen, welche aber dadurch leicht zu erklären sind, dass nur Patienten in frühen Tumorstadien überhaupt einer operativen Therapie zugeführt werden. Auch die signifikanten Unterschiede in der Histologieverteilung sind dadurch zu erklären, dass Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom nur in Ausnahmesituationen einer operativen Therapie im Sinne einer kurativen Resektion zugeführt werden. Diesbezüglich gilt aktuell die Empfehlung, dass bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom im Tumorstadium I und II und negativem mediastinalem Lymphknotenbefall und ohne Fernmetastasierung eine operative Resektion gerechtfertigt ist [24].

Genauso verhält es sich mit dem Gesamtüberleben und dem krankheitsfreien Überleben der Xenograft-Patienten verglichen mit der Gesamtkohorte von 2004-2008. Die deutlich längeren Zeiten lassen sich auf die Selektion der frühen Tumorstadien erklären.

Diese Unterschiede sind nach Ausschluss der fortgeschrittenen Tumorstadien nicht mehr auszumachen, so dass man davon ausgehen kann, dass unsere

Xenografts einen sehr repräsentativen Pool an Tumoren zur Durchführung von Medikamentenstudien bieten.

Vergleicht man die Patienten mit Tumoren, welche im Xenograft etabliert werden konnten mit denen, deren Tumoren nicht im Xenograft etabliert werden konnten, schneiden die Patienten mit entsprechenden Xenografts hinsichtlich des Gesamtüberlebens etwas schlechter ab. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier anteilig weniger sehr frühe Tumorstadien (I und IIA) einbezogen wurden. Ein weiterer Aspekt ist, dass ein wenig mehr Plattenepithelkarzinome in der Gruppen der etablierbaren Tumoren sind. Auch unsere Auswertung der Gesamtkohorte bezüglich des Gesamtüberlebens zeigt, dass die Plattenepithelkarzinome schlechter abschneiden, als die Adenokarzinome. Eine Bestätigung dieser Tatsache ließ sich in der Literatur nicht finden. Ein Grund dafür könnte sein, dass Plattenepithelkarzinome häufiger mit Nikotinabusus assoziiert sind und ein Nikotinabusus wiederum mit einer höheren Komorbidität für eine koronare Herzkrankheit, chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Pneumonien und andere maligne Erkrankungen einhergeht.

Man könnte mutmaßen, dass Plattenepithelkarzinome im Xenograft leichter zu etablieren sind als andere histologische Subtypen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms.

Es ließen sich keine Korrelationen zwischen der Tumorverdopplungszeit und somit dem Wachstumsverhalten in der Maus und dem krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben der Patienten nachweisen. Daraus ergibt sich die Frage, ob das Verhalten des Tumors im Tierversuch exakt dem Wachstumsverhalten des Tumors im Patienten ähnelt. Dies kann, aus unserer Sicht, nur an wesentlich größeren Kollektiven aus etablierten Xenografts untersucht werden.

Diabetes mellitus und Krebs

Bereits vor 100 Jahren wurde festgestellt, dass Patienten mit Diabetes mellitus auch häufiger an Krebserkrankungen litten [40]. 2009 wurde im Rahmen einer Konferenz der American Diabetes Association und der American Cancer Society ein Konsensreport veröffentlicht, in dem klar eine Verbindung von Diabetes mellitus mit einem erhöhten Krebserkrankungsrisiko für Leber, Pankreas-, Endometrium, Kolon- und Rektum, Mamma- und Blasentumoren gezeigt wurde.

Interessanterweise scheint das Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, nicht durch das Vorliegen eines Diabetes mellitus erhöht zu sein [23].

Es werden verschiedene Ursachen für die Verbindung von Diabetes und erhöhtem Krebsrisiko diskutiert. Eine Ursache für diesen Effekt könnten möglicherweise chronisch erhöhte Insulinplasmaspiegel bei Typ-2-Diabetikern sein.

Insulin und insulin-like growth factor (IGF) Rezeptoren existieren auf den meisten Krebszellen als Oberflächenrezeptoren und können neben ihrer eigentlichen metabolischen Funktion auch die Krebszellproliferation und Metastasenbildung vermitteln.

Auch eine persistierende Hyperglykämie kommt als Ursache eines erhöhten Krebsrisikos bei Diabetikern in Betracht. Bereits 1924 hatte Otto Warburg die Hypothese entwickelt, dass Krebszellen die notwendige Energie statt aus aerober Verwertung von Glucose in den Mitochondrien eher durch anaerobe Vergärung gewinnen.

Lange Zeit konnte diese sogenannte Warburg-Hypothese nicht bestätigt werden. 2006 zeigten Schulz et al., dass durch eine Induktion der aeroben Verbrennung von Sauerstoff durch Transfektion des Proteins Frataxin in Mitochondrien von Kolonkarzinomzellen sowohl in der Zellkultur als auch im Tierversuch eine Reduktion des Tumorstwachstums erreicht werden konnte [49].

Abgesehen von der diabetesinduzierten Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie könnte die häufig mit dem Diabetes einhergehende Adipositas ein Grund für das erhöhte Krebsrisiko sein. Fettgewebe ist ein aktives endokrines Organ, welches unter anderem in der Lage ist, Fettsäuren, Interleukin-6, vascular endothelial growth factor (VEGF), Plasminogen Aktivator-Inhibitor-1, Adiponectin, Leptin und Tumornekrose Faktor- α zu produzieren. Jeder einzelne dieser Faktoren kann eine Rolle bei der Tumorigenese spielen [55].

In der Literatur ließ sich kein Beweis für ein spezifisch erhöhtes Lungenkrebsrisiko bei Diabetes mellitus finden.

Metformin und Lungenkarzinom - Prävention

Aus all diesen Fakten ergibt sich nun die Frage, ob man durch eine antidiabetische Therapie auch das Risiko, an Krebs zu erkranken, senken kann.

2005 zeigten Evans et al. in einer retrospektiven Studie, dass Patienten mit Diabetes mellitus, die mit Metformin behandelt wurden, eine niedrigere Krebsinzidenz hatten. Hierbei wurde eine Kohorte von 983 Patienten mit Diabetes mellitus und einer Krebserkrankung in der Region Tayside, Schottland mit einer entsprechenden Kontrollgruppe von Diabetikern verglichen [17]. Dieses Erkenntnis wird unterstützt durch die retrospektiven Studien von Bowker et al. [11], Landman et al. [36] und Libby et al. [38]. Bei all diesen Studien wurde nicht zwischen verschiedenen Krebsarten differenziert.

2013 wurde eine Metaanalyse veröffentlicht, bei der die Ergebnisse von 53 Studien mit insgesamt 1.050.984 Patienten auf das Vorliegen einer protektiven Wirkung von Metformin auf das Krebsrisiko analysiert wurden. Dabei wurden 12 randomisierte Studien mit 21.595 Patienten und 41 Beobachtungsstudien mit 1.029.389 Patienten einbezogen. Bei der Auswertung der Beobachtungsstudien zeigte sich eine signifikante Reduktion des Krebsrisikos durch eine Behandlung mit Metformin in Bezug auf alle Krebsarten. Speziell für einzelne Krebsentitäten konnte dies für Leber-, Darm-, Pankreas- Magen- und Ösophaguskrebs nachgewiesen werden. In keiner randomisierten Studie konnte eine signifikante Reduktion des Krebsrisikos durch Metformin gezeigt werden. Auch konnte keine Assoziation von Metformineinnahme mit einem verminderten Risiko für Brust-, Lungen-, Eierstock-, Gebärmutter-, Prostata-, Blasen- oder Hautkrebs nachgewiesen werden [20].

Metformin wurde 1957 synthetisiert und ist seitdem als blutzuckersenkendes Medikament bei Typ 2 Diabetes im klinischen Einsatz. Das Biguanid Metformin senkt die hepatische Glucoseproduktion, steigert die Insulinsensitivität und die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen [10]. Es senkt den Blutzuckerspiegel ohne eine Hypoglykämie zu induzieren.

Zu Beginn dieses Jahrtausends wurde erstmalig durch Zhou et al. nachgewiesen, dass Metformin die AMP-aktivierten Proteinkinase in Hepatozyten aktiviert [61]. Der Mechanismus blieb jedoch ungeklärt.

2011 zeigten Stephenne et al., dass die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase durch Metformin in humanen Hepatozyten durch eine spezifische Hemmung des Komplexes I der Atmungskette mit konsekutivem Abfall des Energiestatus der Zelle erfolgt [52].

Unter der Behandlung mit Metformin sind relativ wenige Nebenwirkungen zu verzeichnen. Unter Metformin wird keine Gewichtszunahme beobachtet, im Gegensatz zur Therapie z.B. mit Insulin. Es beeinflusst den Fettstoffwechsel positiv. Die Gefahr einer Unterzuckerung ist praktisch nicht gegeben, da Metformin nur wenig Einfluss auf die Insulinsekretion aus den Betazellen der Bauchspeicheldrüse hat. Die einzig schwere bekannte Nebenwirkung ist das Risiko einer Laktatazidose mit ca. 5 Fällen / 100000 Patienten / Jahr, daher müssen die Kontraindikationen (Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz, bedingt Schwangerschaft) unbedingt beachtet werden.

Bisher gibt es keine randomisierten Studien, die beweisen, dass Metformin das Risiko für eine Lungenkrebserkrankung senken kann. 2012 wurde eine Fall-Kontroll-Studie von Bodmer et al. veröffentlicht, welche besagt, dass es keinerlei Beeinflussung des Erkrankungsrisikos für Lungenkrebs durch eine Langzeittherapie mit Metformin gibt. [9]

Im Gegensatz dazu zeigten Memmott et al. 2010, dass Metformin die Entwicklung von Nikotin-induziertem Lungenkrebs im Tiermodell wirksam hemmen konnte [41].

In dieser Studie wurden bei Mäusen Lungenkrebs mit NNK (nicotin-derived nitrosamine-ketone) induziert und die Mäuse mit Metformin oral und intraperitoneal behandelt. Es konnte eine Reduktion der Tumorlast von 53 % (p.o.) und 72 % (i.p.) gezeigt werden.

Ein Beweis für die Wirksamkeit von Metformin in der Prävention von Lungenkrebs beim Menschen steht aber weiterhin aus.

Metformin und Lungenkarzinom - Behandlung

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war nun: Ist es möglich, einen Ansatz für die Behandlung mit Metformin in der Krebstherapie zu finden?

Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Metformin als Aktivator der AMP-aktivierten Proteinkinase auf das Wachstumsverhalten von nicht-

kleinzelligen Lungenkarzinomen untersucht. Dies wurde sowohl im Tierversuch anhand von etablierten Xenografts mit Tumoren von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen als auch durch Untersuchung der Tumorproben auf Veränderung des Expressionsniveaus auf Protein und RNA-Ebene für die AMP-aktivierte Proteinkinase als Target von Metformin nach der Therapie durchgeführt.

Leider ließ sich keinerlei Beweis für die Wirksamkeit von Metformin als zusätzliches Therapeutikum in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms finden. Sowohl im Tierversuch konnte kein verringertes Tumorwachstum durch Comedikation mit Metformin erreicht werden, noch konnte eine Beeinflussung der AMPK oder p70S6k als Teil des mTOR-pathways auf Protein- oder RNA-Ebene nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen gibt es jedoch in anderen Studien deutliche Hinweise auf die Wirksamkeit von Metformin.

So wurde zum Beispiel ein klinischer Beweis für die Wirksamkeit von Metformin wurde durch Jiralerspong et al. erbracht. Sie untersuchten retrospektiv Patientinnen mit Brustkrebs und neoadjuvanter Therapie. Patientinnen mit Diabetes mellitus und Metforminbehandlung hatten ein signifikant besseres Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie als Diabetikerinnen ohne Metforminbehandlung [35].

Algire et al. bewiesen im Tierversuch an Mausxenografts mit Lungenkrebszelllinien, dass Metformin bei Tieren mit einer hochkalorischen Diät einen antiproliferativen Effekt hat, jedoch zeigte Metformin keinen Einfluss auf das Tumorwachstum bei normal ernährten Tieren [3].

Phoenix et al. zeigten ähnliche Ergebnisse anhand von Brustkrebszellen im Tierversuch. Auch hier hatte Metformin nur im Rahmen einer hochkalorischen Diät antiproliferative Effekte [44].

Mögliche Mechanismen für die Wirkungsweise des Metformins als Krebstherapeutikum könnten neben der Aktivierung der AMPK und dadurch einer Hemmung des Zellwachstums eine Beeinflussung des Insulin-like growth factor signalling-pathways, der Angiogenese, der Apoptose über Aktivierung von p53, Induktion eines Zellzyklus-Arrests oder Vitamin-B12 Mangel durch Dauereinnahme von Metformin sein [33].

Ein wichtiger Punkt für das Nichtansprechen der Xenografts könnte sein, dass es sich nicht um diabetische Mäuse handelte. Bisher konnte der krebshemmende Effekt von Metformin nur bei Diabetikern nachgewiesen werden.

Eine jüngst veröffentlichte Studie aus Japan zeigt, dass der antiproliferative Effekt des Metformins bei normoglykämien Individuen (Tierversuche) durch eine Kombinationstherapie mit 2 – Deoxyglucose erreicht werden konnte.

Dabei wurden unter anderem ebenfalls in vivo Versuche mit Xenograft Mausmodellen durchgeführt. Es wurden jedoch Xenografts mit Zelllinien eines Mammakarzinoms und eines Speiseröhrenkarzinoms behandelt und nicht, wie in unseren Versuchen mit Original-Tumoren von Patienten [14]. Hier zeigte sich, dass eine kombinierte Behandlung mit Metformin und 2 Deoxyglucose eine deutliche Verminderung des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte.

2 Deoxyglucose ist ein Glucosemolekül, bei dem die Hydroxylgruppe an Position 2 durch ein Wasserstoffatom ersetzt worden ist und somit keiner Glykolyse unterzogen werden kann. Dadurch entsteht in der Zelle ein Glucosemangel und somit eine verminderte Produktion von ATP.

In diesem Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK durch Metformin oder Glucosemangel in der Zelle durch 2 Deoxyglucose jeweils für sich allein nicht ausreicht, um eine Hemmung des Krebszellwachstums zu erreichen, jedoch die Kombination dieser Effekte bei der Hemmung des Energie-Stoffwechsels zum Zelltod führen kann.

In allen Versuchen, die von uns durchgeführt wurden, ließ sich keine nachvollziehbare Wirkung des Metformins auf das Tumorwachstum, die AMPK-Kinase oder den m-TOR-pathway (p70S6K) nachweisen.

Möglicherweise liegt das an einer zu falschen Dosierung des Metformin. In der bisher veröffentlichten Literatur sind Metformindosierungen von 15 mg/Kg/d [32] bis 250 mg/kg/d p.o. [60] verabreicht worden. Unsere Versuche wurden mit Dosierungen von 500mg/kg/d durchgeführt, wobei vor Beginn der Untersuchung eine Dosis-Wirkungs-Testung mit Dosierungen von 100 – 500 mg/kg/d durchgeführt worden ist. Beim Menschen wird Metformin in Dosierungen von 1000-3000 mg/d verordnet. Ein Monitoring der Wirkung des Metformins über z.B.

eine Blutzuckermessung ist nicht möglich, da das Medikament bei nicht-Diabetikern keine Hypoglykämie verursacht.

Ein weiterer Grund dafür, warum in unseren Versuchen keine positiven Resultate erzielt worden sind, könnte sein, dass AMPK hauptsächlich intrahepatisch durch Metformin aktiviert wird und m-Tor in der Lunge nur indirekt reguliert wird [41].

Ein weiterer zu beachtender Faktor ist, dass das in den Versuchen verwendete Cetuximab sehr selten in der Anwendung im klinischen Alltag in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich anhand unserer Untersuchungen ein therapeutischer Effekt des Metformins in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms nicht beweisen lässt. Möglicherweise liegen die Stärken des Medikaments eher im karzinopräventiven Bereich.

Fazit ist, dass Xenografts grundsätzlich ein gutes Mittel sind, um präklinisch die Wirksamkeit bestimmter Therapeutika zu testen. Die Xenografts gleichen dem entsprechenden Patientengut in Histologie, Tumorstadium und Altersverteilung.

Weitere Untersuchungen an größeren Panels von Xenografts mit gleichzeitiger Simulation eines Diabetes mellitus sind nötig, um die Wirkung des Metformins zu klären.

5. Zusammenfassung

Patientennahe Xenografts sind eine gute Möglichkeit, präklinisch die Wirksamkeit neuer und auch etablierter Medikamente zu testen. Die Untersuchungen zu dieser Arbeit beruhen auf patientennahen Xenografts von Patienten mit operablen Lungenkarzinomen, die auf Nacktmäuse transplantiert wurden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte durch den Vergleich der experimentellen Daten mit epidemiologischen Daten von Tumorpatienten eine gute Übereinstimmung zwischen Spenderpatienten und Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) gezeigt werden, so dass sich die etablierten, patientennahen Xenografts für komplexe präklinische Studien bei NSCLC qualifizieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde aufbauend auf diesen Xenografts ein experimenteller Ansatz zur Therapieoptimierung erarbeitet und überprüft.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Metformin eine präventive Wirkung in der Krebsentstehung hat, jedoch ist es bisher nicht gelungen, sich diesen Effekt für die Therapie der Erkrankung zu Nutzen zu machen.

Studien haben gezeigt, dass das Antidiabetikum Metformin ein Aktivator der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) ist, ein Enzym, welches im Stoffwechsel von Tumoren erhöht ist. So konnten wir in früheren Therapiestudien mit den etablierten Xenograftmodellen der Maus nachweisen, dass die AMPK bei in einer Subgruppe (Cetuximab Responder) sowohl auf messenger-RNA (mRNA) -Ebene als auch auf Proteinebene vermehrt exprimiert wird. Nach diesen Untersuchungen und unter Berücksichtigung der bisher veröffentlichten Studien sollte die Gabe von Metformin in der Subgruppe der Cetuximab Non-Responder (mit niedriger AMPK auf mRNA-Ebene) eine Erhöhung der Expression der AMPK bewirken. Dies sollte im zweiten Schritt zu einer Sensibilisierung für die Therapie mit epidermal growth factor receptor (EGFR) - Antikörpern (Cetuximab) führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Behandlung mit Metformin in Kombination mit Cetuximab im Xenograft-Mausmodell getestet.

Es wurden insgesamt 6 Gruppen à 24 Xenografts mit Metformin, Cetuximab oder der Kombination aus Metformin und Cetuximab behandelt und anschließend die

AMPK mit Hilfe von Westernblots auf Proteinebene und mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf Ribonukleinsäure (RNA) Ebene untersucht. Insgesamt wurden in die 6 Gruppen 6 verschiedene Lungenkarzinome eingeschleust, von denen 3 Lungenkarzinome Cetuximab Responder und 3 Lungenkarzinome Cetuximab Non-Responder waren.

Metformin allein hatte keinen Einfluss auf das Tumorwachstum oder die Regulation der AMPK. Im Tumorgewebe der Xenografts wurde die AMPK durch die Metformingabe weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene hochreguliert. Somit konnten durch die Gabe von Metformin Cetuximab-Non-Responder nicht in Cetuximab-Responder überführt und damit eine Sensibilisierung für die Therapie mit EGFR-Antikörpern (Cetuximab) erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Surveillance Epidemiology and End Results, Online Database, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html> (07.05.2014)
- 2 Alberg AJ, Ford JG, Samet JM, American College of Chest Physicians: Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132 (3 Suppl): 29-55 (2007)
- 3 Algire C, Zakikhani M, Blouin MJ, Shuai JH, Pollak M: Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocr Relat Cancer*, 15: 833–839 (2008)
- 4 Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J, International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group: Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 350: 351–360 (2004)
- 5 Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, Le Pechoux C, Parmar MK, Pignon JP, Souhami RL, Stephens RJ, Stewart LA, Tierney JF, Tribodet H, van Meerbeeck J, NSCLC Meta-analyses Collaborative Group: Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet*, 375:1267–1277 (2010)
- 6 Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, Kozłowski M, Le Péchoux C, Pirker R, Sathler Pinel MI, Tarayre M, Le Chevalier T: Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol*, 28: 35–42 (2010)
- 7 Baldwin DR: Improving outcomes in lung cancer patients. *Practitioner*, 255: 19-22 (2011)
- 8 Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistel PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, De Cabo R,

- Sinclair DA: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444: 337–342 (2006)
- 9 Bodmer M, Becker C, Jick SS, Meier CR: Metformin does not alter the risk of lung cancer: a case-control analysis. *Lung Cancer*, 78, 133-137 (2012)
 - 10 Bost F, Sahra IB, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF: Metformin and cancer therapy. *Curr Opin Oncol*, 24: 103–108 (2012)
 - 11 Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, Johnson JA: Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. *Diabetologia*, 53: 1631–1637 (2010)
 - 12 Bundesamt S. Todesursachenstatistik: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=54495899&nummer=517&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=11286485, (07.05.2014)
 - 13 Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, Riely GJ, Solomon B, Ou SHI, Kim DW, Salgia R, Fidias P, Engelman JA, Gandhi L, Jänne PA, Costa DB, Shapiro GI, LoRusso P, Ruffner K, Stephenson P, Tang Y, Wilner K, Clark JW, Shaw AT: Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*, 13: 1011–1019 (2012)
 - 14 Cheong JH, Park ES, Liang J, Dennison JB, Tsavachidou D, Nguyen-Charles C, Wa Cheng K, Hall H, Zhang D, Lu Y, Ravoori M, Kundra V, Ajani J, Lee JS, Hong WK, Mills GB: Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther*, 10: 2350–2362 (2011)
 - 15 Douillard JY, Rosell R, Lena M de, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL, Grodzki T, Pereira JR, Le Groumellec A, Lorusso V, Clary C, Torres AJ, Dahabreh J, Souquet PJ, Astudillo J, Fournel P, Artal-Cortes A, Jassem J, Koubkova L, His P, Riggi M, Hurteloup P: Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 7: 719–727 (2006)

- 16 EMBL-EBI UK, SIB S, PIR US. UniProt.,
<http://www.uniprot.org/uniprot/P42345>, (18.08.2013)
- 17 Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*, 330: 1304–1305 (2005)
- 18 Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, Becker M, Merk J: Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res*, 14: 6456–6468 (2008)
- 19 Filipits M, Pirker R, Dunant A, Lantuejoul S, Schmid K, Huynh A, Haddad V, André F, Stahel R, Pignon JP, Soria JC, Popper HH, Le Chevalier T, Brambilla E: Cell cycle regulators and outcome of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer: the International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *J Clin Oncol*, 25: 2735–2740 (2007)
- 20 Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GFM, Pellegrini F, Nicolucci A: Metformin Therapy and Risk of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: Systematic Review. *PLoS One*, 8: e71583 (2013)
- 21 Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D: The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, 277: 25226–25232 (2002)
- 22 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). Krebs in Deutschland 2007/2008 - Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V: http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Atlas/CurrentVersion/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=MORTALITY_EU&ICD10=C33-C34&Year_from=2008&Year_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on (23.04.2014)
- 23 Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D: Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*, 33: 1674–1685 (2010)

- 24 Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rübe C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H; German Respiratory Society; German Cancer Society: Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer. Interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society-abridged version. *Pneumologie*, 65: 51-75 (2011)
- 25 Hardie DG, Carling D: The AMP-Activated Protein Kinase. Fuel Gauge of the Mammalian Cell? *Eur J Biochem*, 246: 259–273 (1997)
- 26 Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, 117: 5479–5487 (2004)
- 27 Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ: AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem Sci*, 36: 470–477 (2011)
- 28 Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Hardie DG: Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271: 27879–27887 (1996)
- 29 Hubner RA, Riley RD, Billingham LJ, Popat S: Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) status and lung cancer outcomes: a meta-analysis of published studies and recommendations. *PLoS One*, 6, e25164 (2011)

- 30 Hue L. Cross talk between the insulin/PKB/mTOR and AMPK signalling pathways with respect to the control of protein synthesis: <http://www.icp.be/horm2/research.htm>. (24.04.2014)
- 31 Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ: Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett*, 247: 115–121 (2007)
- 32 Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K: Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res*, 71: 3196–3201 (2011)
- 33 Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AKL, Gans ROB, de Vries EGE: Metformin: Taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer*, 46: 2369–2380 (2010)
- 34 Jassem J, Skokowski J, Dziadziuszko R, Jassem E, Szymanowska A, Rzyman W, Roszkiewicz A: Results of surgical treatment of non-small cell lung cancer: validation of the new postoperative pathologic TNM classification. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 119: 1141–1146 (2000)
- 35 Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM: Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 27: 3297–3302 (2009)
- 36 Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ: Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care*, 33: 322–326 (2010)
- 37 Le Chevalier T: Adjuvant chemotherapy for resectable non-small-cell lung cancer: where is it going? *Ann Oncol*, 21: 196-198 (2010)
- 38 Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM: New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32:1620–1625 (2009)
- 39 Liu D, Huang Y, Chen B, Zeng J, Guo N, Zhang S, Liu L, Xu H, Mo X, Li W: Activation of mammalian target of rapamycin pathway confers adverse outcome in non small cell lung carcinoma. *Cancer*, 117: 3763–3773 (2011)

- 40 Maynard GD: A Statistical Study in Cancer Death-Rates. *Biometrika*, 7: 276–304 (1910)
- 41 Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA: Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3: 1066–1076 (2010)
- 42 Merk J, Rolff J, Becker M, Leschber G, Fichtner I: Patient-derived xenografts of non-small-cell lung cancer: a pre-clinical model to evaluate adjuvant chemotherapy? *Eur J Cardiothorac Surg*, 36: 454–459 (2009)
- 43 Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, Mc Fadden ET, Corbone PP: Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5: 649–655 (1982)
- 44 Phoenix KN, Vumbaca F, Fox MM, Evans R, Claffey KP: Dietary energy availability affects primary and metastatic breast cancer and metformin efficacy. *Breast Cancer Res Treat*, 123: 333–344 (2010)
- 45 Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L, Spiro SG, Rolland E, Fossati R, Aubert D, Ding K, Waller D, Le Chevalier T: Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*, 26: 3552–3559 (2008)
- 46 Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Vynnychenko I, Park K, Yu CT, Ganul V, Roh JK, Bajetta E, O`Byrne K, de Marinis F, Eberhardt W, Goddemeier T, Emig M, Gatzemeier U; FLEX Study Team: Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*, 373: 1525–1531 (2009)
- 47 Rolff J, Dorn C, Merk J, Fichtner I: Response of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts to Classical and Targeted Therapies Is Not Related to Multidrug Resistance Markers. *J Oncol*, Article ID 814140, 6 pages (2009)
- 48 Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, Crinò L, Giaccone G, Silvano G, Martelli M, Clerici M, Cognetti F, Tonato M: Randomized study of adjuvant chemotherapy

- for completely resected stage I, II, or IIIA non-small-cell Lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1453–1461 (2003)
- 49 Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner BH, Steinberg P, Pfeiffer AFH, Ristow M: Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem*, 281, 977–981 (2006)
- 50 Soria JC, Mauguen A, Reck M, Sandler AB, Saijo N, Johnson DH, Burcoveanu D, Fukuoka M, Besse B, Pignon JP on behalf of the meta-analysis of bevacizumab in advanced NSCLC collaborative group: Systematic review and meta-analysis of randomized, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.*, 24: 20-30 (2013)
- 51 Spiro SG, Gould MK, Colice GL: Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132: 149-160 (2007)
- 52 Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B: Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*, 54: 3101–3110 (2011)
- 53 Tsao MS, Avel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, Whitehead M, Zhu CQ, Livingston R, Johnson DH, Rigas J, Seymour L, Winton T, Shepherd FA: Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25: 5240–5247 (2007)
- 54 Tsim S, O`Dowd CA, Milroy R, Davidson S: Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): A review. *Respiratory Medicine*: 1767-1774 (2010)
- 55 van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL: Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 2569-78 (2009)
- 56 Waller D, Peake MD, Stephens RJ, Gower NH, Milroy R, Parmar MKB, Rudd RM, Spiro SG: Chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer: the

- surgical setting of the Big Lung Trial. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26: 173–182 (2004)
- 57 Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Incullet R, Vallieres E, Fry W, Bethune D, Ayoub J, Ding K, Seymour L, Graham B, Tsao MS, Gandara D, Kesler K, Demmy T, Shepherd F: Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 352: 2589–2597 (2005)
- 58 Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Lungentumoren, S. 91-95 (2003)
- 59 Wittekind C, Meyer HJ: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Lungen- und Pleuratumoren, S. 129-135 (2010)
- 60 Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, Kiarash R, Mason J, Huang P, Sawyer SK, Fuerth B, Faubert B, Kalliomäki T, Elia A, Luo X, Nadeem V, Bungard D, Yalavarthi S, Growney JD, Wakeham A, Moolani Y, Silvester J, Ten AY, Bakker W, Tsuchihara K, Berger SL, Hill RP, Jones RG, Tsao M, Robinson MO, Thompson CB, Pan G, Mak TW: Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*, 25: 1041–1051 (2011)
- 61 Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108: 1167–1174 (2001)

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Juliane Grams geb.: Wagner

Geburtsdatum und –ort: 11. April 1978 in Cottbus

Schulbildung:

1984 - 1988 Polytechnische Oberschule Cottbus

1988 - 1992 1.Gesamtschule Strausberg

1992 - 1997 Gymnasium Strausberg, Abiturnote: 1,8

Studium:

10/1997 – 11/2003 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 3. Staatsexamen im November 2003 an der MLU Halle/Wittenberg, Gesamtnote: 2,66

Beruflicher Werdegang:

06/2004 – 01/2008 Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost Halle, davon

06/2004 - 03/2006 Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

04/2006 - 12/2006 Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

01/2007 - 12/2007 Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

02/2008 – 06/2009 Klinik für Chirurgie des Evangelisch-Freikirchlichen Krankenhauses Rüdersdorf

11/2009 Prüfung zum Facharzt für Chirurgie

07/2010 – 05/2011 Abteilung für Chirurgie des Evangelischen Krankenhauses Königin-Elisabeth-Herzberge Berlin

Seit 06/2011 Klinik für Thoraxchirurgie der Ev. Lungenklinik Berlin