

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-,
Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Der anti-proliferative Effekt von Metformin bei humanen kolo-
rektalen Karzinomzelllinien**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Kristina Caroline Götz
aus Schweinfurt

Würzburg, Dezember 2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Koreferent: Prof. Dr. med. habil. Martin Faßnacht-Capeller

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Metformin	1
1.2	Anti-Tumor-Effekte von Metformin	3
1.3	Metformin und Proteinkinase AMPK	4
1.4	Ziele.....	6
2	Fragen	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Zelllinien.....	9
3.2	Zellkulturmedien, Pufferlösung und Stammlösungen.....	9
3.3	Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC ₅₀).....	12
3.4	Zellkulturbedingungen und Bestimmung der Zellverdopplungszeit.....	12
3.5	Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Kristallviolett-Assay)	13
3.6	Western Blot	14
3.7	Darstellung der Messwerte und statistische Auswertung.....	16
4	Ergebnisse	17
4.1	Anti-proliferativer Effekt von Metformin	17
4.2	Anti-proliferativer Effekt von Metformin in Kombination mit 5-FU bzw. Oxaliplatin	22
4.3	Anti-proliferativer Effekt von Metformin in Hypoxie	24
4.4	Glukose und anti-proliferativer Effekt von Metformin	24
4.5	Untersuchungen zur Metformin-AMPK-Interaktion.....	26
5	Beantwortung der Fragen	28
6	Diskussion	29
6.1	Glukosestoffwechsel und Hypoxie	30
6.2	Anti-Tumor-Effekt von Metformin <i>in vitro</i>	32
6.3	Metformin-AMPK-Achse	34
7	Ausblick	35
8	Zusammenfassung	36
9	Literaturverzeichnis	37
10	Appendix	43
11	Abbildungsverzeichnis	45
12	Tabellenverzeichnis	46
	Danksagung, Curriculum Vitae	

Abkürzungen

ADP	5'-Adenosindiphosphat
AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-Adenosinmonophosphat (AMP) – aktivierte Proteinkinase
ATP	5'-Adenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetales Kälberserum
5-FU	Fluoruracil
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
LKB1	Leberkinase B1
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin, früher: mammalian Target of Rapamycin
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom, häufigstes Malignom des Gastrointestinaltraktes, stellt die zweithäufigste Tumorerkrankung in Deutschland dar. Daten des Robert-Koch-Instituts (RKI) von 2014 zeigen, dass in Deutschland am kolorektalen Karzinom jährlich ca. 61 000 Patienten erkranken und ca. 25 500 versterben (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2017).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom liegt in Deutschland aktuell bei ca. 63 Prozent (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2017). Als Behandlung der Wahl bleibt die vollständige operative (R0) Resektion des tumortragenden Darmabschnittes und der Lymphknoten im zugehörigen Lymphabflussgebiet. Dies gilt auch im fortgeschrittenen Stadium (ab UICC II) oder bei Vorliegen von Metastasen. Beim lokal fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom folgt nach R0-Resektion eine auf 5-Fluoruracil (5-FU) basierte Mono- oder Kombinationstherapie (AWMF-Leitlinien, 2019). In den letzten Jahren haben zielgerichtete Biologika (*biologicals*), wie monoklonale Antikörper, bei der Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms an Bedeutung gewonnen (Brenner H et al., 2014).

Als Risikofaktoren gelten Übergewicht und Bewegungsmangel sowie eine ballaststoffarme, fettreiche Ernährung und übermäßiger Alkoholkonsum. Auch genetische Einflussfaktoren sind an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2010). Zudem erhöht eine metabolische Dysfunktion, wie sie bei Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) vorherrscht, das Risiko für maligne Erkrankungen (Rizos CV, Elisaf MS, 2013; Morales DR, Morris AD, 2014).

1.1 Metformin

Metformin (Abbildung 1.1), ein zur Wirkstoffklasse der Biguanide gehörendes orales Antidiabetikum, wird seit mehr als 60 Jahren zur Erstlinientherapie bei

T2DM eingesetzt, einer chronisch-endokrinen Erkrankung mit einem erhöhten Blutzuckerspiegel aufgrund einer Insulinresistenz der Körperzellen (King H et al., 1998). Mit Metformin werden weltweit jährlich ca. 150 Millionen Patienten mit T2DM behandelt (An H, He L, 2016).

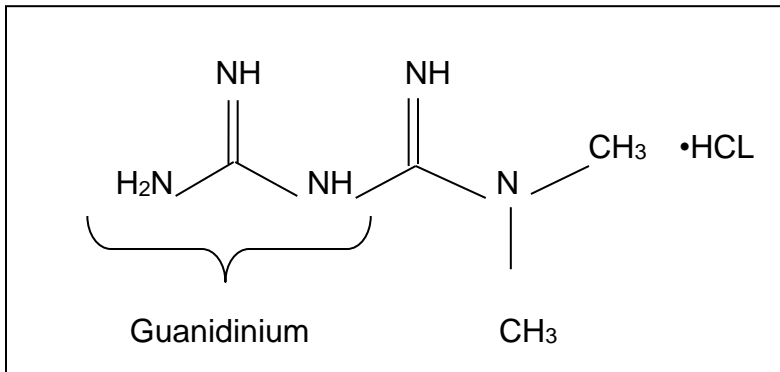


Abbildung 1.1: Strukturformel von Metformin. Metformin (1,1-Dimethylbiguanidhydrochlorid) wird zur Therapie des T2DM seit 1957 eingesetzt (Zhou G et al., 2001). Die Mechanismen des Glukose- und Lipid-reduzierenden Effektes von Metformin sind weiterhin noch wenig verstanden. Eigener Entwurf.

Der antihyperglykämische Effekt von Metformin basiert vor allem auf der Hemmung der hepatischen Glukoneogenese (An H, He L, 2016) und einer Erhöhung der peripheren Insulinsensitivität (Miller RA et al., 2013; Zhang Y et al., 2015; Yu H et al., 2015). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Metformin-Effekte sind zwar nicht vollständig verstanden, doch konnten Untersuchungen an Hepatozytenkulturen einen hemmenden Effekt von Metformin auf die NADH-Dehydrogenase (NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase), auch als Komplex I der mitochondrialen Atmungskette bekannt, zeigen. Eine Hemmung der NADH-Dehydrogenase reduziert den Elektronentransfer in die Atmungskette, was die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) einschränkt (Owen MR et al., 2000; Anwar MA et al., 2014; Zhuang Y et al., 2014; Cao et al., 2014). Ein Abfall des ATP-Spiegels, korrekter eine Änderung im ATP/AMP-Verhältnis (Kapitel 1.3), löst eine Aktivierung der hepatischen AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) aus, einem wichtigen Regulator des Energiestoffwechsels der Zelle bei Mangelbedingungen (Jeon SM, 2016). Eine aktivierte AMPK schränkt die Transkription von Enzymen der Glukoneogenese ein, insbesondere der beiden Schlüsselenzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-

Phosphatase¹ (Hardie DG, 2004(2); Towler MC, Hardie DG, 2007; An H, He L, 2016) (Abb. 1.2).

Ein weiteres Target der negativen Wirkung von Metformin wurde in der mitochondrialen Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (mGPD) identifiziert. mGPD bildet zusammen mit der zytosolischen GPD (cGPD) ein Shuttlesystem zum Transport von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH/H⁺ über die innere Mitochondrienmembran und bringt so Elektronen in die Atmungskette ein. Die Hemmung der mGPD durch Metformin verringert die Bildung von ATP an der Atmungskette und schränkt damit die Funktion der Glukoneogenese ein (An H, He L, 2016).

Als Konsequenz einer Hemmung der Atmungskette wird das in der Glykolyse durch Teiloxidation von Glukose gebildete Pyruvat vermehrt zu Laktat reduziert (Kapitel 6.1)², was eine Metformin-assoziierte Laktatazidose als mögliche Nebenwirkung von Metformin erklären kann (An H, He L, 2016).

1.2 Anti-Tumor-Effekte von Metformin

Metformin weist anti-Tumor-Effekte auf (Vallianou NG et al., 2013; Morales DR, Morris AD, 2014), die in mehreren epidemiologischen Studien zu Mamma-, Kolon-, Pankreas-, und Leberkarzinom zu einem verringerten krebsbedingten Sterberisiko führten bei deutlich verbesserter Prognose (Zhang ZJ, Li S, 2014; Liu Z et al., 2016 (1+2)). Die Auswertung von fünfzehn Studien zum kolorektalen Karzinom bei T2DM-Patienten hat gezeigt, dass die Behandlung mit Metformin die Inzidenz für ein Tumorgeschehen um ca. 10 % senkte (He XK et al., 2016). Ein anti-proliferativer Effekt von Metformin an Zellen verschiedener Tu-

¹ PEPCK katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat (C4-Körper) zu Phosphoenolpyruvat (C3-Körper) und Kohlendioxid. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Teilschritt der Glukoneogenese. Glukose-6-Phosphatase katalysiert den letzten Schritt der Glukoneogenese, nämlich die Dephosphorylierung von Glukose-6-phosphat zu Glukose.

² Die im Stoffwechsel (genauer: Glykolyse und Citratzyklus) anfallenden Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ (Glykolyse und Citratzyklus) und FADH₂ (Citratzyklus) übertragen ihre Elektronen an die Atmungskette. Ist diese gehemmt, können Reduktionsäquivalente nicht reoxidiert werden. Die in der Glykolyse anfallenden Reduktionsäquivalente werden dann auf andere Weise reoxidiert. Hierzu verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird selbst zum Akzeptor für Elektronen von NADH/H⁺. Dabei wird Pyruvat zu Milchsäure (Laktat) reduziert und reoxidiertes NAD⁺ steht erneut als Elektronenakzeptor zur Verfügung. Diese Reaktion (Milchsäuregärung) wird von der Laktatdehydrogenase katalysiert.

morentitäten wurde auch *in vitro* gezeigt (Segal E et al, 2011; Yu H et al., 2015); hierzu gehörten auch Zellen des kolorektalen Karzinoms (Cho SY et al., 2013).

Der im deutschsprachigen Raum nach dem Physiologen Otto Warburg benannte Effekt, der den Zusammenhang zwischen gesteigerter Glukolyse und Tumor (-entstehung)³ bzw. -wachstum beschreibt (Warburg O, 1924), findet seine Bestätigung auch im nicht-normoglykämischen Stoffwechsel von Diabetikern (Aljada A, Mousa SA, 2012). So erhöht T2DM Morbidität und Mortalität von malignen Erkrankungen (Rizos CV, Elisaf MS., 2013). Permanent erhöhte Spiegel an Glukose und Insulin haben sich als grundlegender Faktor für malignes Zellwachstum erwiesen (Kaaks R, Lukanova A, 2001; Birsoy K, Possemato R, 2014). Der hemmende Effekt von Metformin auf Glukoneogenese und Insulinsensitivität (Abbildung 1.2) führt dagegen zu abfallenden Blutspiegeln von Glukose und Insulin. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Metformin und dem Effekt auf die Krebserkrankung – sei es durch Limitierung von Tumorwachstum und Tumormetastasierung oder bei der Initiierung und Progression der Karzinogenese (Morales DR, Morris AD, 2014).

Eine mit Diabetes mellitus vergesellschaftete Tumorentität stellt das kolorektale Karzinom dar (Morales DR, Morris AD, 2014). Patienten mit Diabetes mellitus als Grunderkrankung weisen eine erhöhte Inzidenz auf, am kolorektalen Karzinom zu erkranken (Anwar MA et al., 2014; Vallianou NG et al., 2013), die mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht (Meyerhardt JA et al., 2003).

1.3 Metformin und Proteinkinase AMPK

Eine zentrale Wirkung von Metformin wird in der indirekten Aktivierung der AMPK gesehen, die über eine Hemmung von Komplex I der Atmungskette (Kapitel 1.1) und einer daraus resultierenden Änderung im ATP/AMP-Verhältnis (Owen MR et al., 2000) vermittelt wird. Die für den Energiestatus einer Zelle maßgebliche Messgröße stellt das Konzentrationsverhältnis von ATP zu ADP

³ Argumente, die einen Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und glykolytischem Phänotyp herstellen, werden von Gatenby und Gillies in ihrer Übersichtsarbeit von 2004 intensiv diskutiert (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004).

bzw. AMP⁴ dar (Tantama M et al., 2013). So liegt bei einem ausgeglichenen zellulären Energiehaushalt ein intrazelluläres Verhältnis von ATP zu ADP von typischerweise ca. 10:1 vor. Dieses Verhältnis wird von der Zelle nahezu konstant gehalten, da Synthese (Phosphorylierung von ADP) und Verbrauch (Dephosphorylierung von ATP) eng aufeinander abgestimmt sind. In der Situation, in der der ATP-Verbrauch ohne adäquate Bildung von ATP ansteigt, kommt es zum Abfall des ATP-Spiegels bei gleichzeitigem Anstieg von ADP, das durch die Adenylatkinase in AMP umgewandelt wird. Der Anstieg von AMP in Kombination mit einem Abfall an ATP aktiviert die AMPK (Hardie DG et al., 2004(2)). AMP bindet dabei an die regulatorische γ -Untereinheit der AMPK, wodurch diese zum Substrat der Leberkinase B1 (*liver kinase B1*, LKB1) wird. LKB1, eine Serin-Threonin-Kinase, phosphoryliert AMPK an Threonin 172 (Thre 172) in der katalytischen α -Untereinheit, dem sogenannten *activation loop*, wodurch diese nicht nur aktiviert wird (Hardie DG et al., 2004(2); Rizos CV et al., 2013), sondern sich die Aktivität der AMPK um das 50 bis 100-fache erhöht (allosterische Aktivierung) (Rizos CV et al., 2013). Eine aktive AMPK hemmt verschiedene Synthesewege wie Protein-, Cholesterin- und Fettsäuresynthese; dagegen wird die Fettsäureoxidation gesteigert (Hardie DG et al., 2004(2); Shaw RJ, 2006). Die AMPK erlaubt der Zelle eine Regulation ihres Energiehaushaltes in engen Grenzen und ermöglicht damit eine aktive Anpassung an wechselnde Versorgungsbedingungen (Hardie DG et al., 2004(2)) (Abb. 1.2).

Eine aktivierte AMPK führt zu einer Blockade des mTOR-Signalweges mit einer Limitierung der Proteinbiosynthese sowie Zellproliferation und abschließend zur Induktion von Apoptose (Hardie DG, 2004(2); Segal E et al., 2011; Rizos CV et al., 2013) (Abbildung 1.2). Als Hauptregulator zahlreicher Tumorsuppressor-beeinflußter Signalwege, wie beispielsweise der LKB1-kontrollierte Signalweg (Hardie DG, 2004(2); Shaw RJ, 2006; Hardie DG, 2015;) reagiert AMPK auf verschiedene Formen von zellulärem Stress mit ihrer Aktivierung, wie u. a. durch oxidativen Stress, osmotischen Schock, Hypoxie und Nährstoffmangel (Hardie DG, 2011). Auch mitochondriale Gifte wie Arsen und Oligomycin (Har-

⁴ ADP: Adenosindiphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat.

die DG et al., 2003), Muskelkontraktion, Adipozytokine (Leptin, Adiponektin) oder Ghrelin führen zu einer Aktivierung der AMPK (Hardie DG et al., 2004(1); Hardie DG, 2004(2); Vallianou NG et al., 2013).

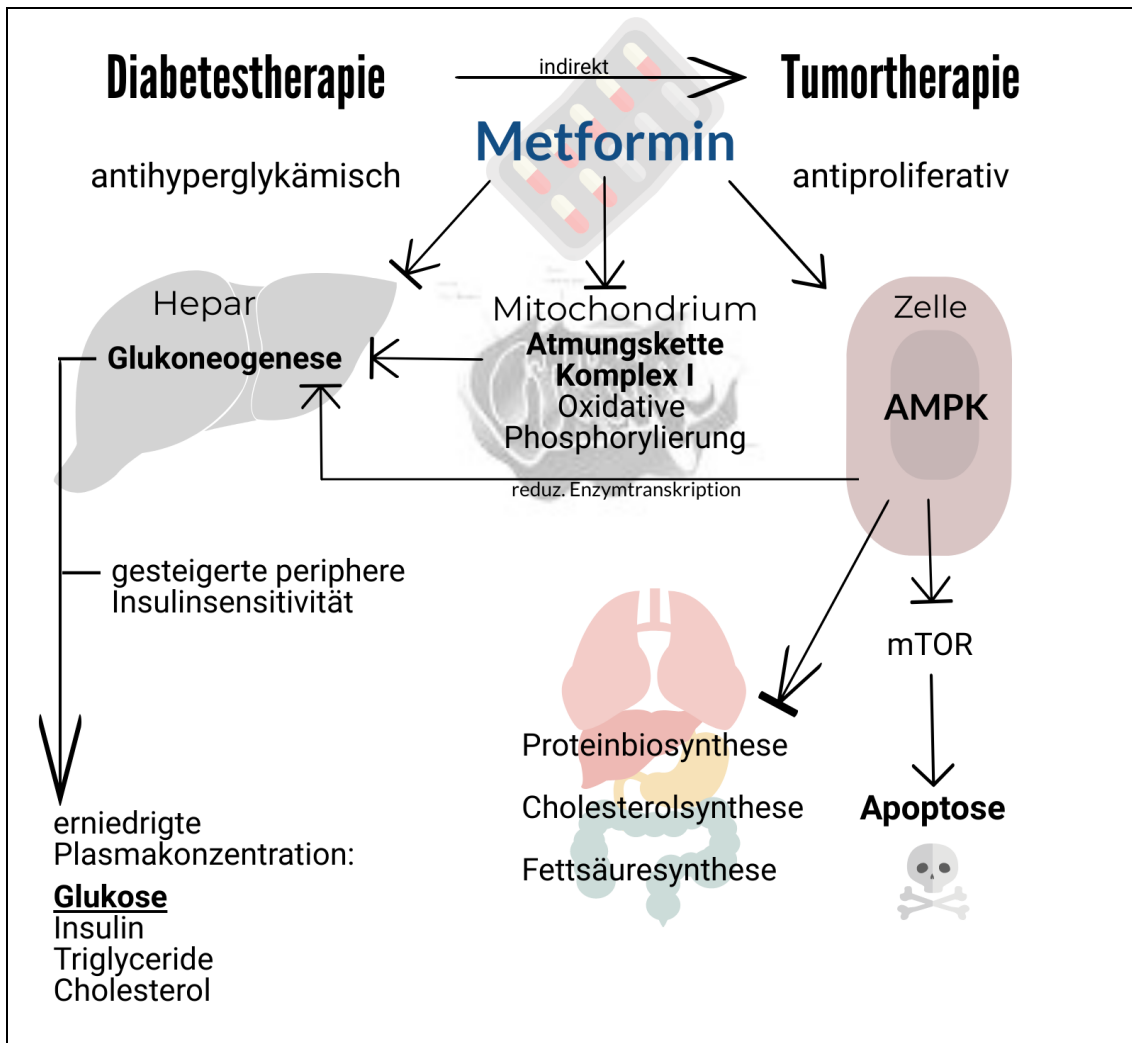


Abbildung 1.2: Übersicht zu systemischen und lokalen Effekten von Metformin. Die Wirkung von Metformin zeigt sich wie folgt: (i) Limitierung der Protein-/Cholesterol-/Fettsäuresynthese (Hardie DG 2004(2); Shaw RJ, 2006); (ii) Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mit eingeschränkter Bildung von ATP (Owen MR et al., 2000; Anwar MA et al., 2014; Zhuang Y et al., 2014; Cao et al., 2014); (iii) Aktivierung der AMPK (Kapitel 1.1) über ein verringertes ATP/AMP-Verhältnis (Kapitel 1.3); (iv) AMPK-vermittelte Beschränkung der hepatischen Glukoneogenese (An H, He L, 2016); (v) AMPK-vermittelte Hemmung der Serin-/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of Rapamycin*); (vi) Induktion eines antiproliferativen und pro-apoptotischen Phänotyps (Hardie DG, 2004(2); Segal E et al., 2011; Rizos CV et al., 2013). Eigener Entwurf erstellt mit ©Piktochart (www.piktochart.com) nach Literaturangaben.

1.4 Ziele

Zahlreiche epidemiologische Studien belegen anti-Tumor-Effekte für Metformin (s. auch Kapitel 1.2), die auch bereits für verschiedene Tumorzelllinien *in vitro* bestätigt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde der anti-proliferative Effekt von Metformin an sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien (Colo678, Colo741, HT29, HCT116, LS174T, RKO) untersucht.

Ein zentrales Target der durch Metformin induzierten Vorgänge in der Zelle wird in der Aktivierung der AMPK gesehen, die über Änderungen im Konzentrationsverhältnis von ATP zu AMP vermittelt wird (Zhou G et al., 2001 und Kapitel 1.3). Untersuchungen hierzu führten Zhou et al. an Hepatozyten aus Rattenlebern durch. In der vorliegenden Arbeit sollte an humanen Tumorzellen untersucht werden, ob und wie Metformin die Aktivität der AMPK in diesen Zellen reguliert.

Zur Untersuchung physiologisch-relevanter Bedingungen *in vitro*, die *in vivo* auf Zellen eines soliden Tumors wirken können, wurden die Tumorzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose kultiviert. Zusätzlich zur optimierten Zellkulturbedingung mit 11 mmol/L Glukose – repräsentativ für hyperglykämische Blutzuckerspiegel *in vivo* – wurden auch Konzentrationen von 5 und 2,5 mmol/L Glukose getestet, um folgende physiologisch-relevante Situationen abzubilden: 5 mmol/L repräsentativ für normoglykämische Blutzuckerspiegel (dieser bewegt sich im Bereich von ca. 5,5 mmol/L) und 2,5 mmol/L repräsentativ für hypoglykämische Blutzuckerspiegel nach kurzzeitigem Fasten (zwischen ca. 2,8-3,3 mmol/L)⁵.

Auch die Sauerstoffkonzentration als ein weiterer wichtiger Parameter wurde für die Untersuchungen angepasst. Die Kultivierung von Tumorzellen *in vitro* erfolgt in aller Regel bei 21 % Sauerstoff und damit bei einer für solide Tumoren unphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen (Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertout JA et al., 2008; Solaini G et al., 2010; Mathonnet M et al., 2014). So war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Untersuchungen *in vitro* bei für das kolorektale Kar-

⁵ nach: <https://www.diabetesdaily.com> [abgerufen am: 27.08.2019].

zinom tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 1 % durchzuführen (Vaupel P, Mayer A, 2007). Inwieweit Hypoxie den antiproliferativen Effekt von Metformin beeinflusst, ist nicht bekannt. Auch ist die Bedeutung von Hypoxie für die Aktivierung der AMPK nicht eindeutig geklärt (Hardie DG, 2011; Garofalo C et al, 2013). Somit könnte sich tatsächlich der anti-proliferative Effekt von Metformin bei Hypoxie und Normoxie deutlich unterscheiden.

2 Fragen

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Bei welchen Konzentrationen an Metformin waren anti-proliferative Effekte bei kolorektalen Karzinomzellen nachzuweisen?
2. Wie wurde der anti-proliferative Effekt von Metformin durch veränderte Sauerstoff- oder Glukosekonzentrationen beeinflusst?
3. Verstärkten die Chemotherapeutika 5-FU und Oxaliplatin den anti-proliferativen Effekt von Metformin?
4. Wurde für den AMPK-Inhibitor Compound C (Dorsomorphin) ein positiver Effekt auf die durch Metformin gehemmte Tumorzellproliferation nachgewiesen?

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Kolorektale Karzinomzellen und nicht-transformierte Kontrollzellen (Fibroblasten und HUVEC-Zellen) wurden von kommerziellen Anbietern bezogen (Tabelle 3.1). Die adhärent wachsenden Zellen waren frei von Mykoplasmen.

Tabelle 3.1: Kolorektale Karzinomzelllinien und Kontrollzellen.

Zelllinie	Gewebe/Zelltyp	Bezugsquelle
Colo678	Kolon	DSMZ, Katalog Nr.: ACC 194
Colo741	Kolon	ECACC, Katalog Nr.: 93052621
HCT116	Kolon	DSMZ, Katalog Nr.: ACC 357
HT29	Kolon	DSMZ, Katalog Nr.: ACC 299
LS174T	Rektum	ATCC, Katalog Nr.: CL - 188
RKO	Kolon	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martin Eilers ⁵⁾
NHDF-C ¹⁾	Fibroblasten ³⁾	Promo Cell, Katalog Nr.: C-12302
HUVEC ²⁾	Endothelzellen ⁴⁾	Promo Cell Katalog Nr.: C-12203

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (www.dsmz.de); ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury/UK (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.jsp>); ATCC: American type culture collection, Wesel (www.atcc.org). ¹⁾ Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF-C, PromoCell, Heidelberg; ²⁾ Human Umbilical Vein Endothelial Cells, PromoCell, Heidelberg; ³⁾ aus der Vorhaut isoliert; ⁴⁾ aus der Nabelschnur isoliert; ⁵⁾ Universität Würzburg, Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie, Biozentrum Am Hubland.

3.2 Zellkulturmedien, Pufferlösung und Stammlösungen

Die Zellen (Tabelle 3.1) wurden in der Erhaltungskultur in ihrem empfohlenen Medium (Tabelle 3.2) mit folgenden Reagenzien (in Klammern die Endkonzentration) kultiviert: Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), L-Glutamin (2 mmol/L), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), nicht-essentielle Aminosäuren (1x) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum. Für die Durchführung der Versuche wurden die Tumorzelllinien in RPMI 1640-Medium (*Dutch modification*) mit den oben aufgeführten Zusätzen kultiviert. Sämtliche Reagenzien waren von Gibco, Thermo Fisher Scientific.

NHDF-C und HUVEC (Tabelle 3.1) wurden ebenfalls in dem für sie empfohlenen Medium (Tabelle 3.2) als Erhaltungskultur kultiviert; hierin wurden auch die Versuche durchgeführt.

Medium für humane Fibroblasten („Fibroblast Growth“-Medium 2) mit Glukose (8 mmol/L), Penicillin (1 %), Streptomycin (1 %) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (2 %) und den beiden rekombinanten Wachstumsfaktoren Insulin (5 µg/ml) und 1 ng/mL Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*).

Medium für humane Endothelzellen („Endothelial Cell Growth“-Medium 2) mit Ascorbinsäure (1 µg/mL), Heparin (22,5 µg/mL), Hydrocortison (0,2 µg/mL), Penicillin (1 %), Streptomycin (1 %), hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (2 %) und folgenden rekombinanten Wachstumsfaktoren: epidermaler Wachstumsfaktor EGF (5 ng/mL), humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/ml), insulinähnlicher Wachstumsfaktor IGF-1 (20 ng/mL) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 165 (0,5 ng/mL).

Tabelle 3.2: Zellkulturmedien.

Zelllinie	Zellkulturmedium	Bezugsquelle
Colo 678, Colo741, LS174T, RKO	RPMI 1640	Gibco (Katalog Nr.: 22409-031)
HCT116, HT29	McCoy's	Gibco (Katalog Nr.: 26600-080)
NHDF-C	FGM 2	PromoCell (Katalog Nr.: C-23020)
HUVEC	ECGM 2	PromoCell (Katalog Nr.: C-22011)

Gibco: Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/gibco.html>). PromoCell: PromoCell GmbH, Heidelberg (<http://www.promocell.com>). RPMI: Roswell Park Memorial Institute. FGM 2: "Fibroblast Growth"-Medium 2. ECGM 2: "Endothelial Cell Growth"-Medium 2.

Glukosemangelmedium. RPMI 1640-Medium in *Dutch modification* (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr.: 11879020), mit (D+)-Glukose, Merk, Millipore) in den Konzentrationen 2,5 mmol/L und 5,0 mmol/L (und 11 mmol/L als Kontrolle).

PBS (*Phosphate buffered saline*). Steriles 10-fach Konzentrat von Gibco, (Thermo Fisher Scientific Katalog Nr.: 70013065) ohne Calcium und Magnesium wurde vor Verwendung 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt. Die Endkonzentration der physiologischen Salzlösung betrug: Natriumchlorid (155 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,5 mmol/L).

Metformin-Stammlösung (100 mmol/L). Metformin-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, Katalog Nr.: PHR1084, 165,62 g/mol) wurde in RPMI 1640-Medium gelöst und anschließend steril filtriert (0,2 µm). Die Stammlösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Der anti-proliferative Effekt von Metformin wurde bei Sauerstoffkonzentrationen von 21 % und 1 % (Kapitel 3.4) untersucht. Acht Konzentrationen an Metformin zwischen 1 und 100 mmol/L wurden getestet (1, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100 mmol/L) und der Anteil vitaler Zellen wurde nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden mit dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.4) bestimmt.

Tabelle 3.3: Bewertung des anti-proliferativen Effektes von Metformin.

Metformin (mmol/l)	Anti-proliferativer Effekt von Metformin
1,0	Kein bis geringer Effekt (Abnahme vitaler Zellen <10 %)
zw. 5 u. ca. 25	Zytostatischer Effekt
>25-100	Zytotoxischer Effekt (Anteil der vitalen Zellen unter der Aussaat)

Compound C (Dorsomorphin)-Stammlösung (1 mmol/L). Compound C (Sigma Aldrich, Katalog-Nr.: P5499), ein AMPK-Inhibitor, wurde zuerst vollständig in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, Katalog Nr.: D5879) gelöst (Stammlösung) und RPMI 1640-Medium zugegeben, bis die DMSO-Konzentration auf 20 % verringert war. Diese Lösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Compound C wurde in einer Endkonzentration von 5 µmol/L eingesetzt (Zhuang Y et al., 2015). Bei dieser Konzentration an Compound C verringerte sich die Konzentration an DMSO auf 0,1 %. Ein möglicher Einfluss dieser DMSO-Konzentration auf die Zellvitalität wurde in Vorversuchen ausgeschlossen (nicht gezeigt).

Fluoruracil (5-FU) und Oxaliplatin. Beide Chemotherapeutika wurden von der Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg bezogen: 5-FU: 50 mg/mL bzw. 0,38 mol/L (130,08 g x mol⁻¹) und Oxaliplatin: 1 mg/mL bzw. 0,0025 mol/L (397,29 g x mol⁻¹). Die Arbeitskonzentration an 5-FU betrug 5 µmol/L und an Oxaliplatin 1 µmol/L und führten zu einer Abnahme vitaler Zellen um ca. 50 %. Beide Chemotherapeutika wurden mit Metformin kombiniert, die Zellen bis zu 72 Stunden inkubiert und der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Hierzu wurde Metformin im Bereich der jeweiligen IC₅₀-Konzentration (Kapitel 3.3) für jede Zelllinie (Tabelle 3.1) eingesetzt.

3.3 Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀)

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration oder IC₅₀ gibt die Konzentration eines Wirkstoffs an, bei der 50 % der maximalen Wirkstärke erreicht wird. Der IC₅₀ für Metformin, Compound C, 5-FU und Oxaliplatin (Kapitel 3.2) wurde mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism 6.0 bestimmt basierend auf Daten aus dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.5).

3.4 Zellkulturbedingungen und Bestimmung der Zellverdopplungszeit

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen „mittlerer“ Größe (T75, Greiner Bio-One GmbH) bei 37°C und 5 % CO₂ (in wasserdampfgesättigter Atmosphäre) in einem Inkubator (NU-5500, NuAire, USA) bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Die maximale Anzahl an Zellpassagen betrug 15. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 5 mL Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,22 % in PBS) für 5-7 Minuten inkubiert und mit 40 mL PBS zentrifugiert (250 xg für 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit ca. 5 mL Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Katalog NrT8154) gefärbt und die vitalen, nicht Trypanblau-gefärbten Zellen gezählt.

Eine verringerte Sauerstoffkonzentration von 1 % wurde mit einer Hypoxiekammer (Coy Laboratory Products, Michigan/USA, Vertrieb über Toepffer Laborsysteme Göppingen) eingestellt. Hierzu wurden die Zelllinien in ihrem Zellkulturmedium (Tabelle 3.2) ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Am Folgetag wurde das zellspezifische Medium gegen RPMI 1640-Medium ausgetauscht und die Kulturschalen in die Hypoxiekammer (Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg) überführt.

Die Verdopplungszeit „g“ wurde mit folgender Formel berechnet: $g = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$

mit: Δt : Dauer der Zellen in Kultur; N_0 : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt t_0 ; N : Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt.

3.5 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Kristallviolett-Assay)

Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay photometrisch bestimmt. Kristallviolett (Sigma-Aldrich) bindet an die DNA fixierter Zellen und die Anzahl gebundener Farbstoffmoleküle ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Nicht-adhärente und somit tote Zellen werden mit dem Überstand entfernt. Die optische Dichte (OD) der mit Essigsäure in Lösung gebrachten Farbstofflösung wurde bei 570 nm photometrisch im ELISA-Reader gemessen. Pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen wurden jeweils 5×10^3 Zellen in einem Endvolumen von jeweils 200 μ L ausgesät. Von jeder Konzentration wurden bis zu 6 Parallelwerte (technische Replikate) angesetzt bei 3 unabhängige Versuchen (biologische Replikate). Zur Normalisierung der Anzahl vitaler Zellen auf die Ausgangszellzahl wurde die Aussaat nach 16 Stunden in Kultur mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

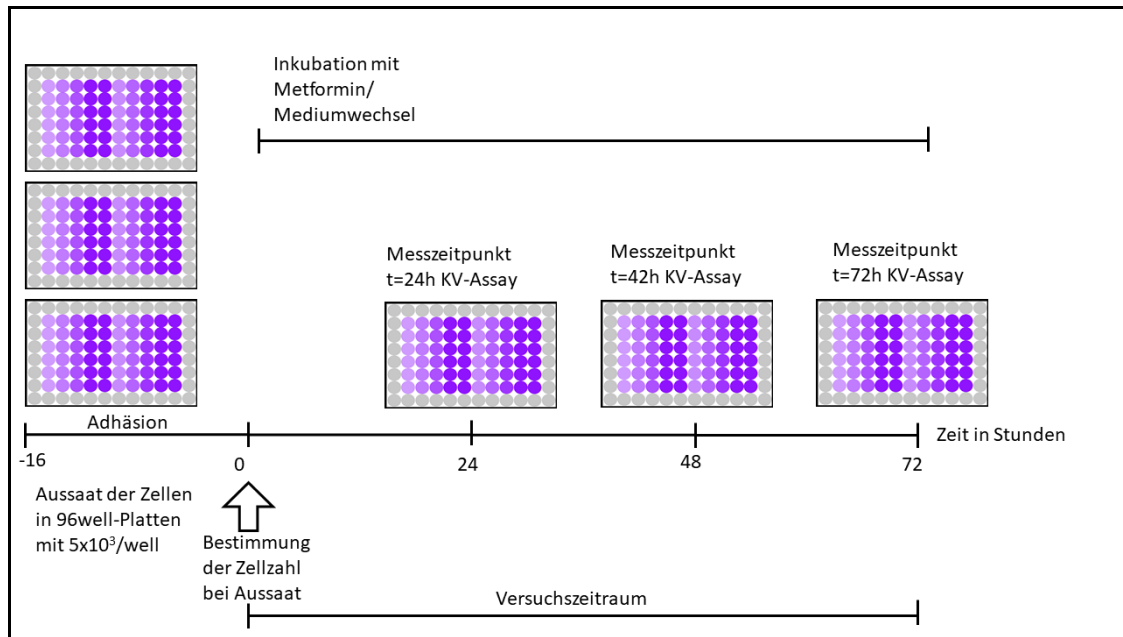


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau zum Nachweis des anti-proliferativen Effektes von Metformin. Nach ihrer Aussaat wurden die Zellen für 16 Stunden inkubiert, bevor der Zellkulturüberstand entfernt und durch frisches Medium mit Metformin (Kapitel 3.2) ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24, 48 oder 72 Stunden kultiviert. Eigener Entwurf erstellt mithilfe von ©Piktochart (www.piktochart.com).

3.6 Western Blot

Die Analysemethode Western Blot ermöglicht in Kombination mit der hochauflösenden Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) den spezifischen immunologischen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch. Eine Million Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Kat.-Nr.: 657 160) wurden 2-mal mit 200 µL PBS (Kapitel 3.4) gespült („gewaschen“) und mit 100 µL Lyse-Puffer (Tabelle 3.4) und einem Zellschaber (Sarstedt, Kat.-Nr.:83.1832) vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Das Lysat wurde mit einem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin Sonoplus HD 2070) bei einer Amplitude von 30 % zweimal für jeweils 30 Sekunden zum weiteren Zellaufschluss homogenisiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) bestimmt und jeweils 15 µg Protein wurden mit 10 µL Laemmli-Puffer (Tabelle 3.4) vermischt, bei 99°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf das Gel (Bio-Rad, Kat.-Nr.: 456-1084) aufgetragen. Zusätzlich wurden 3 µL vorgefärbter Proteinmarker (Protein Marker V, PeqLab VWR, Kat.-Nr.: 272210) für den Größenbereich von 10 bis 250 kDa aufgetragen. Die Proben wurden bei 100 V für

1 Stunde im Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) in Towbin-Puffer (Tabelle 3.4) übertragen (90 Minuten bei 170 mA). Die Membran wurde für 1 Stunde in TBS-T (Tris-buffered-saline with tween 20) (Tabelle 3.4) mit 5 % Milchpulver inkubiert und 3-mal mit TBS-T gewaschen.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme.

Puffer	Komponente	Endkonzentration (Volumen)
Lyse-Puffer (1 % SDS, pH 7,6)	HEPES ^{a)} (238,30 g/mol) EDTA ^{b)} (372,2 g/mol) NaF ^{c)} (41,99 g/mol) SDS ^{d)} (288,4 g/mol)	25 mmol/L 2 mmol/L 25 mmol/L 10 %
Auftragepuffer nach Laemmli (4x, pH 4,6)	Tris-HCl ^{e)} (0,5 mmol/L) SDS (10 %) 2-Mercaptoethanol (>99 %) Glycerol (99,5 %) Bromphenolblau (0,1 %)	0,125 mmol/L (0,25 mL) 4 % (0,4 mL) ca. 5 % (0,05 mL) 19,9 % (0,2 mL) 0,01 % (0,1 mL)
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	Tris (121,4 g/mol) (ultrapure, Sigma) Glycin (75,07 g/mol) SDS (288,4 g/mol)	3,1 g/L 14,4 g/L 1 g/L
Towbin-Puffer (pH 8,3)	Tris (ultrapure, Sigma) Glycin (75,07 g/mol) Methanol (>99,8 %)	25 mmol/L 152 mmol/L 20 %
TBS (10x)	Tris (ultrapure, Sigma) NaCl ^{f)} HCl ^{g)} (1 mol/L) nach Verdünnung Tween 20 zugeben	24,2 g/L 80 g/L 0,04 mol/L (38 mL/L) 0,05-1 %

^{a)} 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; ^{b)} Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner); ^{c)} Natriumfluorid (Natriumsalz der Fluorwasserstoffsäure); ^{d)} Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate), anionisches Tensid; ^{e)} Kurzbezeichnung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffersubstanz); ^{f)} Natriumchlorid (Kochsalz); ^{g)} Chlorwasserstoff (in Wasser gelöst: Salzsäure).

Die Primärantikörper (Tabelle 3.5) wurden abgedunkelt über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die Nitrocellulosemembran 1-mal mit TBS-T gewaschen, der in TBS-T gelöste Sekundärantikörper (Polyclonal-Goat-Anti-Rabbit-Immuoglobulin/HRP, Dako, Eching, Kat.-Nr.: E0432) in einer Verdünnung von 1:10 000 hinzugegeben und für 1 Stunde auf einem Wippschüttler abgedunkelt inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die mit TBS-T gewaschene Nitrocellulosemembran für jeweils 1 Minute in den ECL-Lösungen 1 und 2 (GE Healthcare Europe GmbH, Kat.-Nr.: 2232) inkubiert und die Chemolumineszenz mit einem „ECL Western Blot Imager“ detektiert (ChemiDo von Bio-Rad).

Tabelle 3.5: Die Western Blot Primärantikörper.

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung	Größe (kDa) ^{c)}
AMPK α	CST ^{b)}	#2532	1:1 000	62
Phospho-AMPK α	CST	#2535	1: 1 000	62
GAPDH-71.1 ^{a)}	Sigma-Aldrich	G9295	1:10 000	37

^{a)} Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Enzym der Glykolyse. ^{b)} Cell Signaling Technology. ^{c)} Molekulargewicht des detektierten Proteins.

3.7 Darstellung der Messwerte und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Excel, Vers. 2010, 2013 u. 2016, der Firma Microsoft. Aus den Einzelwerten wurden Mittelwert \pm Standardabweichung aus 2-3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Der mit dem Kristallviolett-Assay bestimmte Anteil vitaler Zellen wurde auf die Aussaat berechnet. Die statistische Auswertung sämtlicher Daten erfolgte mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) und Excel 2010, 2013 der Firma Microsoft, die Darstellung der Daten mit GraphPad Prism 6.0f und 7.0. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei 2 unabhängigen Versuchsgruppen der t-Test und bei mehr als 2 unabhängigen Versuchsgruppen ein ein-faktorieller ANOVA mit anschließender posthoc-Analyse nach Tukey angewandt. Unterschiede von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 6.0f und 7.0.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zum anti-proliferativen Effekt von Metformin bei humanen kolorektalen Kolonkarzinomzellen. Hierzu wurden die Zellen *in vitro* bei unterschiedlichen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen kultiviert, um den Einfluss relevanter physiologischer Bedingungen auf den anti-proliferativen Effekt von Metformin abschätzen zu können (Kapitel 1.4).

4.1 Anti-proliferativer Effekt von Metformin

Zur Bestimmung des anti-proliferativen Effektes von Metformin wurde ein Konzentrationsbereich von 1 bis 40 mmol/L Metformin gewählt, der sich an publizierten Daten orientierte (z. B. Ben Sahra I et al., 2008). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden war ein IC₅₀ für die kolorektalen Karzinomzelllinien bestimmbar (Tabelle 4.1). Für die Kontrollzellen HUVEC (Epithelzellen) und NDHF-C (Fibroblasten) war zu keinem Zeitpunkt ein IC₅₀ bestimmbar, da dieser über der höchsten getesteten Konzentration von 40 mmol/L lag (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Die IC₅₀-Werte von Metformin (mmol/L) für kolorektale Karzinomzelllinien und Kontrollzellen. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (11 mmol/L Glukose) bei verschiedenen Konzentrationen an Metformin (1, 5, 10, 20, 40 mmol/L) bei 21 % Sauerstoff kultiviert (s. auch Abbildung 4.2). Angegeben ist der Mittelwert mit dem 95 % Konfidenzintervall (in Klammern) von drei unabhängigen Versuchen. Bei Angabe von „>40“ lag der IC₅₀ oberhalb der getesteten Konzentration an Metformin. (---) nicht durchgeführt.

Zelllinie	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Colo678	>40	>40	15,0 (6,0-36)
Colo741	>40	---	12,0 (6,0-23)
HCT116	---	---	9,0 (6,0-14,0)
HT29	>40	---	7,2 (1,0-49)
LS174T	>40	>40	11,0 (7,0-17)
RKO	>40	>40	14,0 (10-21)
HUVEC	>40	>40	>40
NDHF-C	>40	>40	>40

Der anti-proliferative Effekt von Metformin für verschiedene Konzentrationen (5, 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{mol/L}$ Metformin) ist in Abbildung 4.1 (sowie Abbildung 10.1 und 10.2 im Anhang) gezeigt.

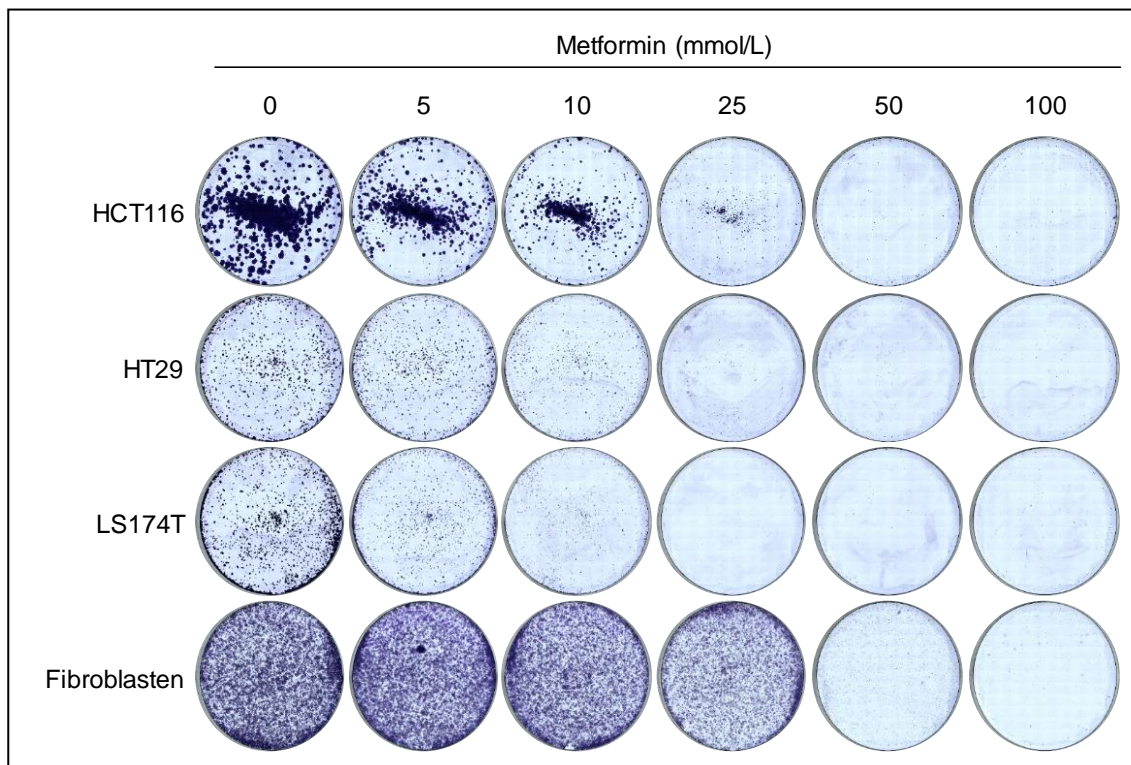


Abbildung 4.1: Der anti-proliferative Effekt von Metformin im Kolonie-Assay. Viertausend Zellen wurden pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen ausgesät und nach zwei Tagen in Kultur mit Metformin (5-100 mmol/L) für weitere sechs Tage kultiviert. Die Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt und fotografiert (Pathologisches Institut der Universität Würzburg). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen einer Auswahl an Zelllinien. Ein zytoreduktiver Effekt bei Fibroblasten war ab einer Metformin-Konzentration von 25 mmol/L nachweisbar, bei kolorektale Karzinomzellen ab 5 bzw. 10 mmol/L Metformin.

Durch Normalisierung der Primärdaten (hierbei handelt es sich um die im ELISA-Reader gemessene optische Dichte) auf die Aussaat bestand die Möglichkeit, den anti-proliferativen Effekt von Metformin als Zytostase bzw. Zelltoxizität zu differenzieren (Abbildung 4.2). So waren für 40 mmol/L Metformin bei allen Tumorzelllinien geringe zelltoxische Effekte (Abnahme der Zellzahl um weniger als 20 % der Aussaat) bis deutliche zelltoxische Effekte (Abnahme der Zellzahl um ca. 50 % der Aussaat) nachweisbar. An den Kontrollzellen waren keine bzw. geringe zelltoxischen Effekte durch Metformin zu finden (Abbildung 4.2).

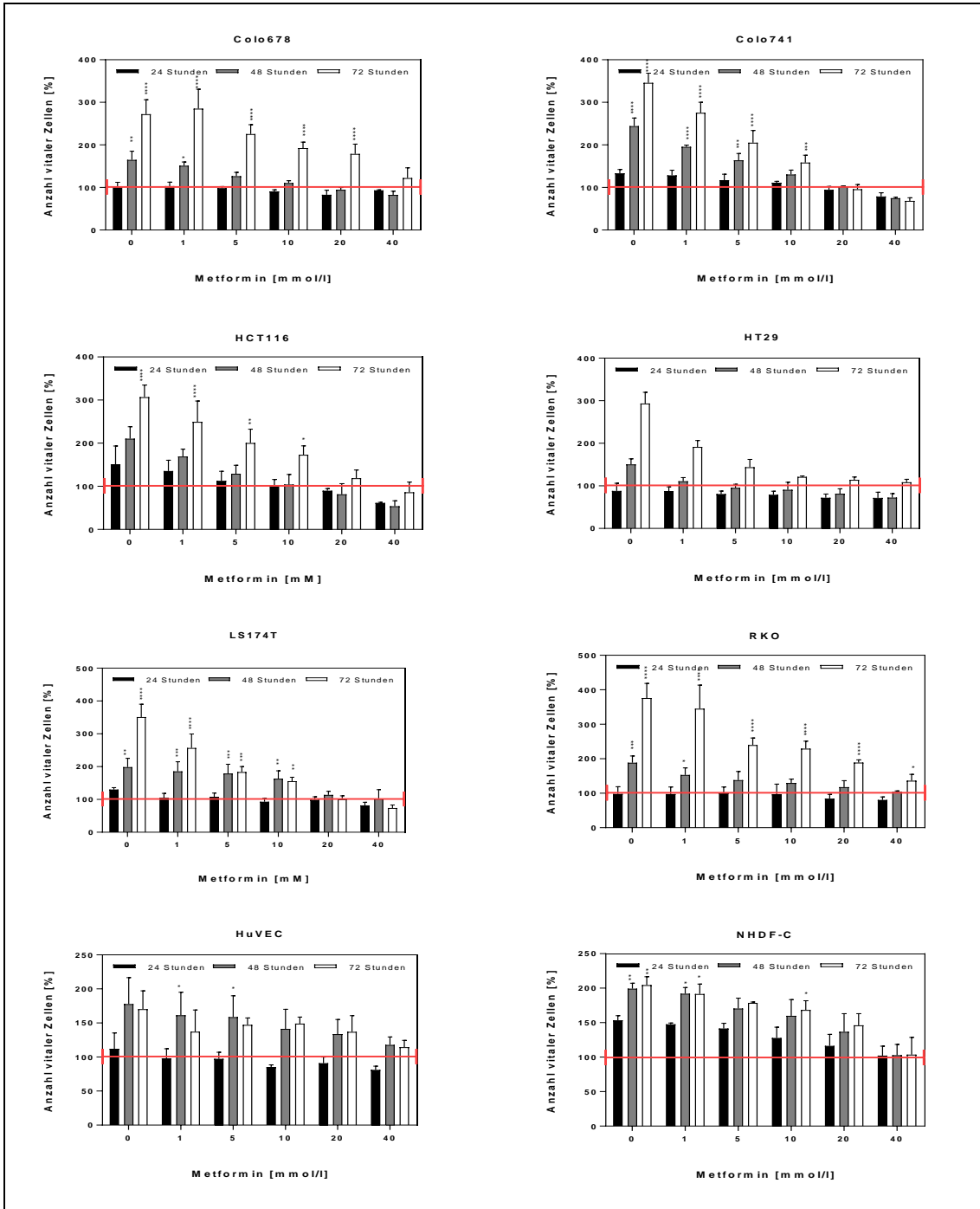


Abbildung 4.2: Der anti-proliferative Effekt von Metformin. Der anti-proliferative Effekt von Metformin wurde für einen Konzentrationsbereich von 1 bis 40 mmol/L bestimmt. Der Anteil vitaler Zellen wurde auf die Aussaat normalisiert (Querstrich). ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05 im Vergleich zur Nullkontrolle. Zwei-Weg-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

Die Verdoppelungszeit als Maß für die Zunahme an vitalen Zellen wurde mit und ohne Metformin bestimmt. Aus diesen Daten wird ebenfalls ein anti-proliferativen Effekt von Metformin erkennbar (Tabelle 4.2). So führte die Inkubation der Tumorzellen mit Metformin zu einer Verlängerung der Verdopplungszeiten um den Faktor 1,4 (Colo678) bis 2,9 (RKO). Die Verdopplungszeiten für die Kontrollzellen (HUVEC und NHDF-C) wurden durch Metformin nicht (HUVEC) bzw. unwesentlich (NHDF-C) verlängert (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zellverdoppelungszeiten mit und ohne Metformin. Die Verdopplungszeiten in Stunden (mit 95%-Konfidenzintervall in Klammern) wurden berechnet wie beschrieben (Kapitel 3.4). Die Bestimmung der Verdopplungszeiten erfolgt bei 21 % Sauerstoff nach einer Inkubationszeit von 72h bei der entsprechenden IC₅₀-Konzentration (Tabelle 4.1). Zu den Zelllinien s. Tabelle 3.1.

Zelllinie	ohne Metformin	mit Metformin
Colo678	35,2 (32,0-38,4)	48,3 (15,5-80,7)
Colo741	36,6 (31,9-41,3)	94,8 (20,1-169,4)
HCT116	42,9 (36,3-49,4)	78,1 (38,8-117,5)
HT29	32,8 (30,2-35,4)	73,3 (56,2-90,3)
LS174T	34,6 (31,4-37,9)	65,0 (38,6-91,5)
RKO	25,3 (23,1-27,6)	72,0 (55,0-88,9)
HUVEC	73,6 (50,1-97,1)	61,4 (32,7-90,2)
NHDF-C	107,3 (92,3-122,4)	126,5 (83,6-169,4)

Als nächstes wurde untersucht, ob die Tumorzellen nach Inkubation mit Metformin erneut in einen proliferativen Phänotyp wechseln, wenn sie in Metformin-freiem Medium weiter kultiviert werden. Dazu wurden die Zellen mit einer Konzentration an Metformin (zwischen 5 und 50 µmol/L) für 48 Stunden inkubiert, die sich an IC₅₀-Werten aus Tabelle 4.1 orientierten, um anschließend ohne Metformin für bis zu 192 Stunden (8 Tage) weiter kultiviert zu werden (Abbildung 4.3). Diese Zellen zeigten mit zunehmender Kulturdauer in Metformin-freiem Medium eine Zunahme ihrer Proliferation. Dagegen führte die Vorinkubation der Tumorzellen mit 100 µmol/L Metformin für 48 Stunden zu einem irreversiblen anti-proliferativen Effekt (Abbildung 4.3).

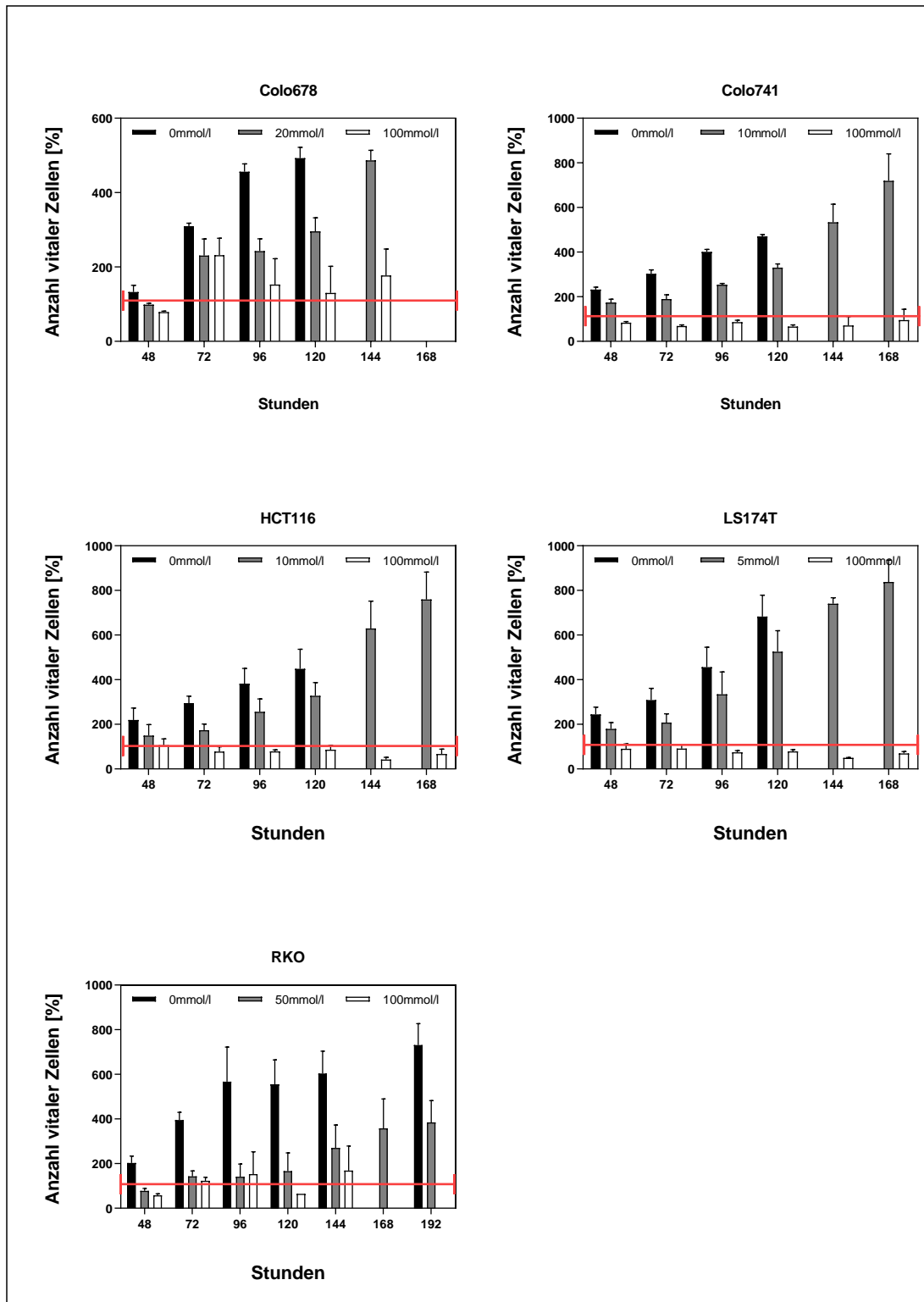


Abbildung 4.3: Der durch Metformin induzierte anti-proliferative Effekt ist reversibel. Kolorektale Zellen wurden in RPMI 1640-Kulturmedium für 48 Stunden mit Konzentration an Metformin (zwischen 5 und 50 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert, die sich an IC_{50} -Werten aus Tabelle 4.1 orientierten. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen ohne Metformin bis zu 192 Stunden (8 Tage) weiter kultiviert. Die Zellzahl wurde im Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (rote Linie) normalisiert. Gezeigt ist der Anteil vitaler Zellen in Abhängigkeit der Konzentration an Metformin während der 48-Stunden-Kultur.

Metformin in einer Konzentration von 100 mmol/L induzierte bei den untersuchten Tumorzelllinien irreversible zytotoxische Effekte nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Metformin in einer Konzentration zwischen 5 und 50 mmol/L induzierte reversible zytostatische Effekte (Abbildung 4.3). Die in diesem Kapitel gezeigten Daten belegen in ihrer Gesamtheit einen antiproliferativen Effekt von Metformin bei kolorektalen Karzinomzellen.

4.2 Anti-proliferativer Effekt von Metformin in Kombination mit 5-FU bzw. Oxaliplatin

Nangia-Makker et al. konnten einen synergistischen Effekt zwischen Metformin und 5-FU sowie zwischen Metformin und Oxaliplatin nachweisen (Nangia-Makker P et al., 2014). Die Wirksamkeit dieser interessanten therapeutischen Option sollte auch an kolorektalen Karzinomzellen überprüft werden. Für diese Untersuchungen wurde Metformin in einer Konzentration von 10 mmol/L – bei dieser Konzentration waren zytostatische Effekte nachzuweisen (Abbildung 4.2) – mit 5-FU oder Oxaliplatin kombiniert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

Die gewählten Konzentrationen an 5-FU (5 mmol/L) und Oxaliplatin (1 μ mol/L) verringerten den Anteil vitaler Zellen nicht unter 50 %, sodass in den Kombinationsansätzen eine mögliche Steigerung beim anti-proliferativen Effekt nachzuweisen gewesen wäre – und zwar durch eine weitere Abnahme vitaler Zellen. Die Ergebnisse der Kombinationsversuche zeigen eindeutig, dass für die gewählten Konzentrationen an Metformin, 5-FU und Oxaliplatin eine Zunahme des anti-proliferativen Effektes der Chemotherapeutika in den Kombinationsansätzen nicht erreicht wurde (Abbildung 4.4).

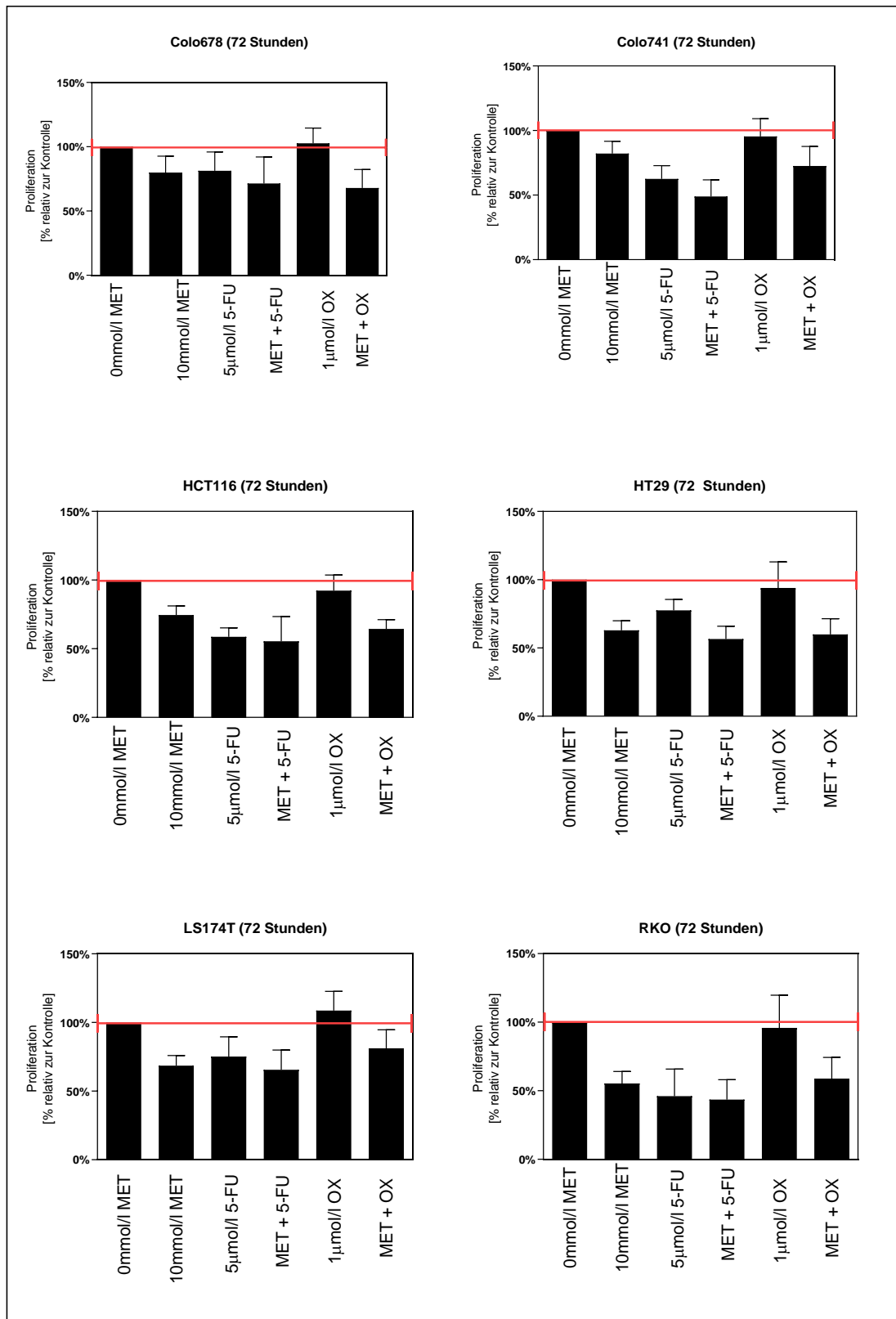


Abbildung 4.4: Die Kombination aus Metformin (MET) und 5-FU sowie Metformin und Oxalplation (OX) verstärkt nicht den anti-proliferativen Effekt der Chemotherapeutika. Der Anteil vitaler Zellen wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert (rote Linie).

4.3 Anti-proliferativer Effekt von Metformin in Hypoxie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, den anti-proliferativen Effekt von Metformin auch bei Tumor-physiologischen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen (Kapitel 1.4). Hierzu wurden Kolonkarzinomzellen bei 1 % und 21 % Sauerstoff (Kontrolle) mit und ohne Metformin für 72 Stunden inkubiert und die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} , Kapitel 3.3) bestimmt.

Tabelle 4.3: Vergleich der IC_{50} Werte (mmol/L) von Metformin bei 21 % und 1 % Sauerstoff. Die Zellen wurden für drei Tage mit 11 mmol/L Glukose inkubiert. 95 % Konfidenzintervall in Klammern angegeben. Die Zellen wurden für 3 Tage inkubiert.

Zelllinie	1 % Sauerstoff	21 % Sauerstoff
Colo678	32 (13-79)	15 (6-36)
Colo741	27 (8-95)	12 (6-23)
HCT116	20 (10-39)	9,0 (6-14)
HT29	6,9 (4-12)	7,2 (1-49)
LS174T	12 (7-21)	11 (7-17)
RKO	68 (27-170)	14 (10-21)

Im Vergleich zu 21 % Sauerstoff verdoppelte sich bei 1 % Sauerstoff der IC_{50} -Wert für Metformin bei drei der sechs kolorektalen Karzinomzellen (Colo678, Colo741, HCT116); bei RKO vervierfachte sich der IC_{50} -Wert und bei zwei Zelllinien (LS174T, RKO) blieb der IC_{50} -Wert nahezu unverändert.

4.4 Glukose und anti-proliferativer Effekt von Metformin

Die Hyperproliferation von Tumorzellen basiert auf einer gesteigerten Glykolyse (Kapitel 1.2 u. 6.1). Ziel der Untersuchungen zu diesem Thema war, den anti-proliferativen Effekt von Metformin an Tumorzellen zu untersuchen, die mit physiologisch relevanten Glukosekonzentrationen inkubiert wurden: 2,5 mmol/L (hypoglykämische Stoffwechselsituation), 5 mmol/L (normoglykämische Stoffwechselsituation) und 11 mmol/L (hyperglykämische Stoffwechselsituation) (s. Kapitel 1.4). Der anti-proliferative Effekt von Metformin war tendenziell am stärksten bei 5 und 11 mmol/L Glukose (Abbildung 4.5) – besonders gut für Colo678 bei 50 mmol/L Metformin zu sehen.

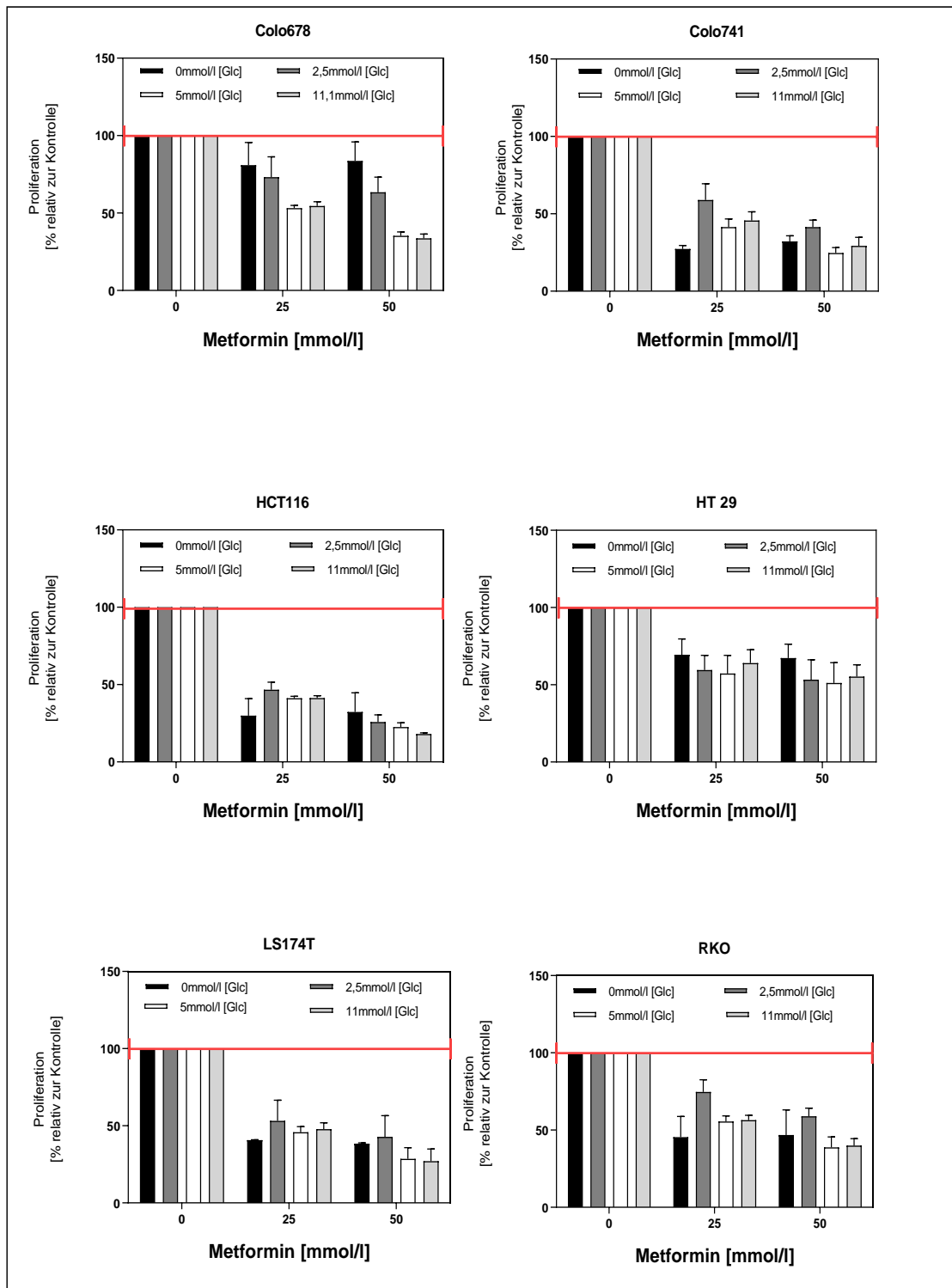


Abbildung 4.5: Der anti-proliferative Effekt von Metformin in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration. Glukosekonzentrationen wie angegeben. Metformin wurde in Konzentrationen von 25 und 50 mmol/L eingesetzt. Der Anteil vitaler Zellen wurde nach 72 Stunden in Normoxie mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (0) normiert.

4.5 Untersuchungen zur Metformin-AMPK-Interaktion

Als zentrales Target der Metformin-Wirkung gilt AMPK (Kapitel 1.3). Diese Aussage basiert auf Untersuchungen an Hepatozyten und beschreibt vermutlich auch die Situation für kolorektale Karzinomzellen. Hierzu wurden als erstes AMPK und Phospho-AMPK, die aktive Form der AMPK, in den Zellen erfolgreich nachgewiesen (Abbildung 10.3). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Metformin die Phosphorylierung der AMPK induziert (Abbildung 4.6).

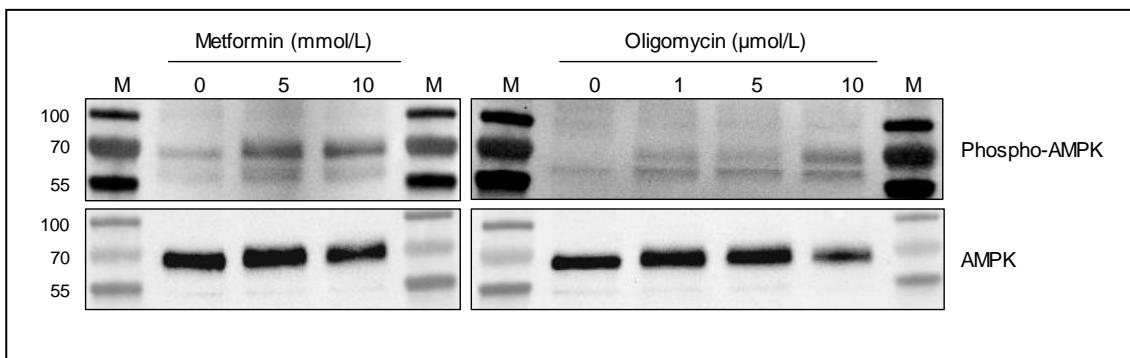


Abbildung 4.6: Nachweis der durch Metformin induzierten aktiven Form der AMPK (Phospho-AMPK) in Tumorzellen. Hierzu wurden LS174T-Zellen mit 5 und 10 mmol/L Metformin für 24 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Oligomycin für 6 Stunden inkubiert (Abbildung 10.4). (M): Proteinmarker in kDa (Kapitel 3.6). AMPK und Phospho-AMPK (62 kDa) auf Höhe des 70 kDa Markers. Repräsentatives Ergebnis mit LS174T-Zellen.

Dorsomorphin, auch als Compound C bekannt, gilt als selektiver Inhibitor der AMPK, was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 10.5). Die Bestätigung der Funktion von Compound C in kolorektalen Karzinomzellen erlaubte in einem zweiten Schritt zu prüfen, ob sich der anti-proliferative Effekt von Metformin durch Compound C tatsächlich aufheben bzw. beeinflussen lässt (Abbildung 4.7). Compound C wurde in einer Konzentration von 5 µmol/L eingesetzt (Zhuang Y et al., 2014). Hierzu wurden die Zellen zuerst mit Compound C für 6 Stunden inkubiert und anschließend mit Metformin in einer Konzentration von 25 und 50 mmol/L für 48 bzw. für 72 Stunden weiter kultiviert (Abbildung 4.7). Beide Versuchsansätze führten zu keiner Hemmung des anti-proliferativen Effektes von Metformin.

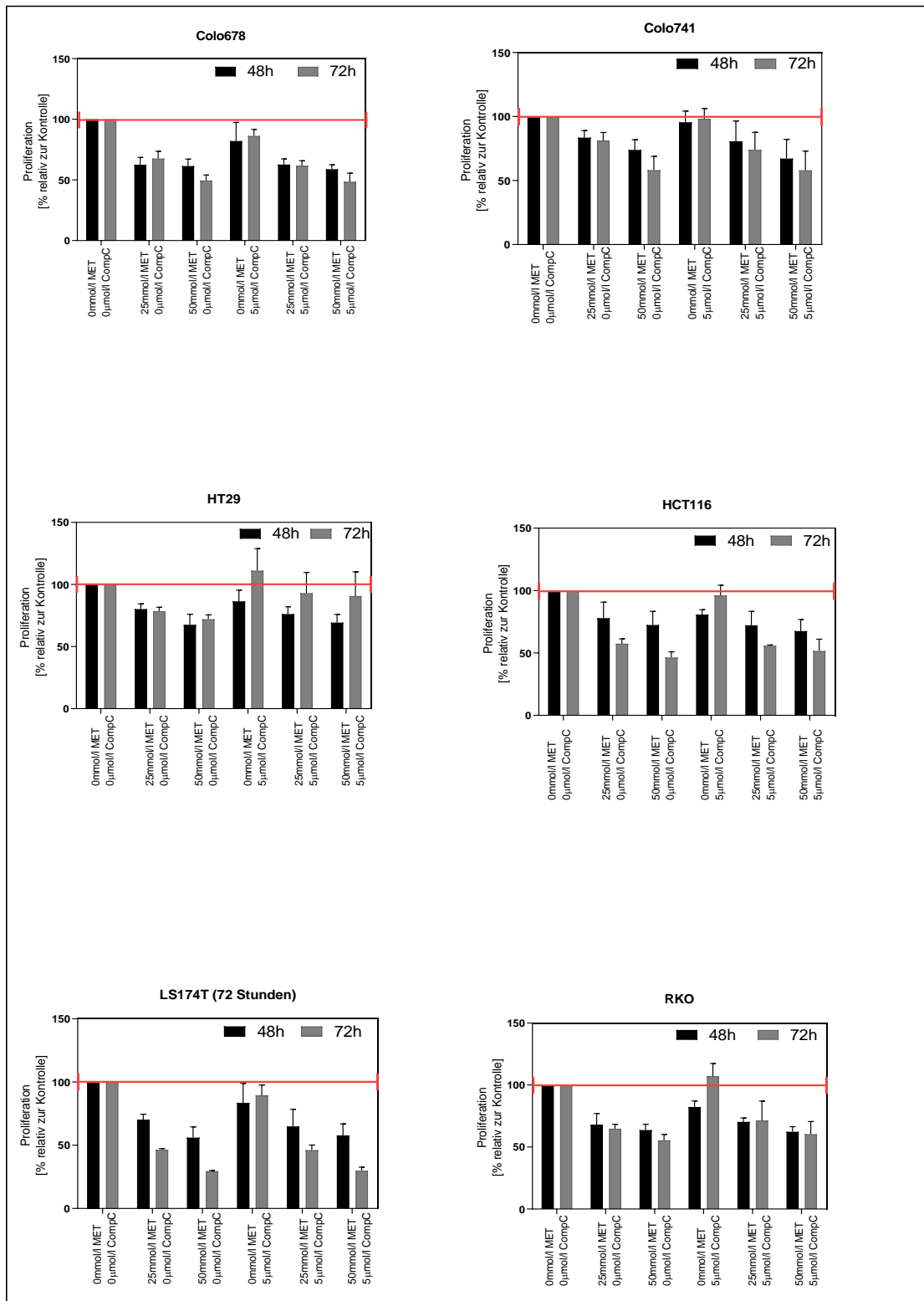


Abbildung 4.7: AMPK Inhibitor Compound C (CompC) hemmt nicht den anti-proliferativen Effekt von Metformin (MET). Compound C (5 μmol/L) wurde mit 25 und 50 mmol/L Metformin kombiniert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde auf die Null-Kontrolle normalisiert.

5 Beantwortung der Fragen

1. Bei welchen Konzentrationen an Metformin waren anti-proliferative Effekte bei kolorektalen Karzinomzellen nachzuweisen?

Anti-proliferative Effekte von Metformin waren zwischen 1 und 40 mmol/L als Zytostase nachzuweisen. Bei einer Konzentration von 100 mmol/L Metformin zeigte der anti-proliferative Effekt von Metformin zytotoxische Eigenschaften.

2. Wie wurde der anti-proliferative Effekt von Metformin durch veränderte Sauerstoff- oder Glukosekonzentrationen beeinflusst?

Der anti-proliferative Effekt von Metformin in Normoxie war nahezu unabhängig von der Glukosekonzentration (2,5; 5,0; 11 mmol/L). Dagegen nahm der anti-proliferative Effekt von Metformin bei 4 von 6 Tumorzelllinien in Hypoxie bei 11 mmol/L Glukose im Vergleich zur Normoxie um mehr als das Doppelte ab.

3. Verstärkten die Chemotherapeutika 5-FU und Oxaliplatin den anti-proliferativen Effekt von Metformin?

Die Kombinationen von Metformin und 5-FU oder Metformin und Oxaliplatin führte zu keiner Steigerung des anti-proliferativen Effektes im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

4. Wurde für den AMPK-Inhibitor Compound C (Dorsomorphin) ein positiver Effekt auf die durch Metformin gehemmte Tumorzellproliferation nachgewiesen?

Als zentrales Target der Metformin-Wirkung auch in Tumorzellen wird die AMPK gesehen. Die aktive / phosphorylierte Form der AMPK wurde in den kolorektalen Karzinomzelllinien nachgewiesen. Der anti-proliferative Effekt von Metformin ließ sich aber nicht durch den AMPK-Inhibitor Compound C aufheben. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration an Compound C optimiert werden müsste bzw. der anti-proliferative Effekt von Metformin nicht bzw. nicht ausschließlich über eine Aktivierung der AMPK vermittelt wird. Dieser Aspekt ist in der Literatur ebenfalls nicht abschließend geklärt.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war der Nachweis eines anti-proliferativen Effektes für das orale Diabetesmedikament Metformin bei kolorektalen Karzinomzellen *in vitro*. Dazu wurden unterschiedliche Glukosekonzentrationen untersucht, die physiologisch relevante Situationen abbilden (Kapitel 1.4): 5 mmol/L für normoglykämische Blutzuckerspiegel (zwischen ca. 3,8-5,5 mmol/L), 2,5 mmol/L für hypoglykämische Blutzuckerspiegel nach kurzzeitigem Fasten von ca. 72 Stunden (zwischen ca. 2,8-3,3 mmol/L) und 11 mmol/L für hyperglykämische Blutzuckerspiegel. Zusätzlich wurde eine für das kolorektale Karzinom tumorphysiologische Sauerstoffkonzentration von 1 % untersucht (Kapitel 1.4).

6.1 Glukosestoffwechsel und Hypoxie

Beim onkologischen Patienten stellt die durch den Tumor verursachte systemische hypermetabole Stoffwechselsituation (Stumvoll M et al., 1995; Gatenby RA, Gillies RJ., 2004; Shaw RJ., 2006; Pernicova I, Korbonits M., 2014) den relevanten Auslöser für Tumorkachexie dar und damit für eine Vielzahl onkologisch-bedingter Todesfälle (Al-Zoughbi W et al., 2014).

Der Tumorstoffwechsel, charakteristisch für eine überschießende Milchsäurebildung, ermöglicht malignen Zellen ihren Stoffwechsel an hypoxische Bedingungen anzupassen (Gatenby RA, Gillies RJ., 2004; Shaw RJ., 2006). In Hypoxie wird das in der Glykolyse durch partielle Oxidation⁶ aus Glukose gebildete Pyruvat in den Mitochondrien nicht weiter zu Kohlendioxid oxidiert – anders bei Normoxie. Da der Hauptanteil der in Glukose befindlichen chemischen Energie erst an der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung in die Bildung von ATP mündet (30 Moleküle versus 2 Moleküle ATP aus der Glykolyse pro Molekül Glukose), weisen Zellen in Normoxie einen geringeren Glukoseumsatz auf als in Hypoxie. Dieser Zusammenhang zwischen Glukoseverbrauch und Sauerstoffversorgung wird als Pasteur-Effekt bezeichnet, der darauf zurückzuführen ist, dass bei Sauerstoffmangel eine weitere Oxidation von Pyruvat an der mito-

⁶ Chemisch exakter handelt es sich hierbei um eine Dehydrierung, da die Oxidationsvorgänge in der Glykolyse keinen Sauerstoff als Elektronenakzeptor benötigen.

chondrialen Atmungskette nicht mehr stattfindet (Shaw RJ., 2006). In malignen Zellen ist der Pasteur-Effekt ausgesetzt und so wird auch in Gegenwart von Sauerstoff der Großteil des Pyruvats zu Laktat reduziert und – wenn überhaupt – nur ein geringer Anteil des Pyruvats noch in den Mitochondrien zu Kohlendioxid oxidiert (Fernandez-de-Cossio-Diaz J, Vazquez A, 2017). Diese Eigenschaft maligner Zellen, auch bei aeroben Bedingungen Laktat zu bilden, wurde bereits 1923 von Otto Warburg an Tumorgewebeschnitten nachgewiesen (Warburg O et al., 1923) und ist in der Literatur als „Warburg-Effekt“ oder „aerobe Glykolyse“ bekannt (Shaw RJ., 2006). So weisen Tumorzellen eine 20- bis 30-fach erhöhte Glukoseaufnahme auf als nicht-transformierte Zellen (Holm E et al., 1995). Der veränderte Glukosestoffwechsel von Tumorzellen wird bei der Positronen-Emissionstomographie (PET) mit ¹⁸F-Fluordesoxyglukose (FDG) zur bildgebenden Diagnose von malignem Gewebe genutzt (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004).

Als wesentliche Ursache für eine geringe Oxygenierung von Tumorgewebe, allgemein als Tumorhypoxie bezeichnet, wird das starke Wachstum von Tumoren gesehen (Brown JM, 2007), mit der die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen nicht mehr nachkommt. Hinzu kommt, dass die vom Tumor neugebildeten Gefäße häufig strukturelle und funktionelle Anomalitäten aufweisen (Vaupel P, Mayer A, 2007), sich hierdurch der Blutfluss in den Gefäßen verringert und die verminderte Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff noch verstärkt (Chaplin DJ et al., 1986). Die Anpassung des Tumorstoffwechsels an hypoxische Bedingungen und damit das Überleben von Tumorzellen in Hypoxie erfolgt durch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor 1 oder HIF-1 (Semenza GL, 2012; Cho SY et al., 2013; Garolfalo C et al., 2013). Bei HIF-1 handelt es sich um ein heterodimeres Protein, das aus einer α - und β -Untereinheit besteht. Bei Normoxie, nicht aber Hypoxie, wird die α -Untereinheit proteosomal abgebaut, sodass nur in Hypoxie das Heterodimer seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnehmen kann und die Transkription zahlreicher Gene induziert – unter anderem auch solche, die die für die Enzyme der Glykolyse kodieren. Dies führt zu einer Steigerung der Umsatzrate der Glykolyse (Williams AC

et al., 1999). Ein solcher glykolytischer Phänotyp trägt dazu bei, die Wirksamkeit von Radio- und Chemotherapien zu verringern bis hin zu einem kompletten Verlust der Wirksamkeit (Brown JM, 2007). Zusätzlich wird vermutet, dass HIF-1 α auch unabhängig von seiner Aktivierung bei Sauerstoffmangel durch mutierte Tumorsuppressorgene aktiviert werden kann (Shaw RJ., 2006). Wheaton et al. konnten zeigen, dass Metformin die Stabilisierung von HIF-1 α in Hypoxie vermindert und die Expression HIF-abhängiger Gene abnimmt. Da zu diesen abhängigen Genen auch solche gehören, die für Enzyme der Glykolyse kodieren (s. o.), kommt es zu einer Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels, was den anti-proliferativen Effekt von Metformin in Hypoxie mit erklären kann (Wheaton WW et al., 2014). Andererseits finden Garofalo et al. einen aktivierenden Effekt von Metformin auf die AMPK bei Normoxie, nicht aber Hypoxie (Garofalo C et al., 2013).

Aufgrund der in diesem Kapitel beschriebenen Zusammenhänge wurde in der vorliegenden Arbeit der anti-proliferative Effekt von Metformin auch in Hypoxie untersucht. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte für Metformin in Normoxie (21 % Sauerstoff) und Hypoxie (1 % Sauerstoff) als Maß für die Stärke des antiproliferativen Effektes, zeigte kein einheitliches Bild: So verdoppelte sich im Vergleich zu 21 % Sauerstoff bei 1 % Sauerstoff der IC₅₀-Wert für Metformin bei drei der sechs kolorektalen Karzinomzellen, bei RKO vervierfachte sich der IC₅₀-Wert und bei zwei Zelllinien blieb dieser nahezu unverändert (Kapitel 4.3).

Ob schwankende Blutzuckerspiegel den antiproliferativen Effekt von Metformin beeinflussen können, wurde bisher noch nicht untersucht. Die klinischen Daten lassen dies aber vermuten. So erhöht T2DM Morbidität und Mortalität von malignen Erkrankungen (Rizos CV, Elisaf MS., 2013) und ein permanent erhöhter Blutzuckerspiegel hat sich als grundlegender Faktor (neben einem erhöhten Insulinspiegel) für malignes Zellwachstum erwiesen (Kaaks R, Lukanova A, 2001; Birsoy K, Possemato R, 2014). Zur Untersuchung physiologisch-relevanter Bedingungen *in vitro*, die *in vivo* auf Zellen eines soliden Tumors wirken können, wurden die Tumorzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen an

Glukose kultiviert (Kapitel 1.4): 11 mmol/L Glukose, repräsentativ für hyperglykämische Blutzuckerspiegel; 5 mmol/L Glukose, für normoglykämische Blutzuckerspiegel, und 2,5 mmol/L Glukose für hypoglykämische Blutzuckerspiegel. Die Annahme, dass verringerte Blutzuckerspiegel den antiproliferativen Effekt verstärken, konnte mit dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Im Gegenteil, die Daten lassen einen umgekehrten Effekt bei einigen Tumorzelllinien erkennen (Kapitel 4.4). Danach wäre der antiproliferative Effekt von Metformin bei guter Versorgung der Zelle mit Glukose stärker als bei einer schlechteren Versorgung.

6.2 Anti-Tumor-Effekt von Metformin *in vitro*

Nangia-Makker et al. konnten einen synergistischen Effekt für die Kombination aus Metformin und 5-FU sowie Metformin und Oxaliplatin bei chemoresistenten kolorektalen Karzinomzelllinien nachweisen (Nangia-Makker P et al., 2014). Eine im gleichen Jahr erschienene Arbeit von Lesan et al. beschreibt einen antagonistischen Effekt für Metformin in Kombination mit Cisplatin (Lesan V et al., 2014). Auch in dieser Arbeit konnte für die Kombinationen aus Metformin und 5-FU sowie Metformin und Oxaliplatin keine Zunahme des anti-proliferativen Effektes gezeigt werden. Dagegen waren stärkere antiproliferative Effekte für andere Chemotherapeutika in Kombination mit Metformin beschrieben wie z. B. Vincristin (Garofalo C et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte im Transport von Wirkstoffen über die Plasmamembran liegen.

Biologische Transportsysteme sind von elementarer Bedeutung für Zellen, Gewebe und Organe und damit für den Organismus. So vermittelt der organische Kationentransporter (*organic cation transporter*) OCT1 die Aufnahme einer Vielzahl unterschiedlicher Kationen endogener Metabolite so auch Metformin (Segal E et al., 2011; Iglesias DA et al., 2013; Anwar MA et al., 2014). OCT1 wird auch von Tumorzellen exprimiert und Segal et al. konnten an Zellen mit einem Knockdown von OCT1 einen abnehmenden antiproliferativen Effekt von Metformin zeigen (Segal E et al., 2011). Nach Zhang et al. stellt die Expression von OCT1 auch für die Wirkung von Oxaliplatin eine wesentliche Vorausset-

zung dar (Zhang S et al., 2006). Zudem konnten die Autoren an allen getesteten Kolonkarzinomproben eine Expression von OCT1 nachweisen. Das ist erwähnenswert, da das zytotoxische Potential klassischer Chemotherapeutika eher mit Transmembranproteinen aus der Familie der ABC-Transporter wie das *Multidrug resistance*-Protein 1 (MRP1) in Verbindung gebracht werden. Therapeutische Bedeutung erlangten ABC-Transporter durch ihre Beteiligung an der Bildung von Chemoresistenz bei Tumoren (Cui H et al., 2015). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Stärke der Expression von OCT1 und dem anti-proliferativen Effekt von Metformin wurde in dieser Arbeit nicht untersucht; auch nicht, ob die OCT1-Expression einen geeigneten Marker für die Stärke des anti-proliferativen Effektes von Metformin darstellt.

Eine weitere Erklärung für die oben beschriebenen unterschiedlichen Ergebnisse zu Metformin könnten die sehr unterschiedlichen Konzentrationen an Metformin sein, die für die Untersuchungen *in vitro* verwendet wurden. Bei der Mehrzahl der Experimente *in vitro* wurde Metformin in Konzentrationen von 1 bis 40 mmol/L eingesetzt, was 165-6.600 mg/L entspricht⁷. So war für Konzentrationen von Metformin bis 10 mmol/L bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms ein geringer anti-proliferativer Effekt und bei Zellen des Lungen-, Magen- und Endometriumkarzinoms ein stärkerer anti-proliferativer Effekt zu beobachten (Rizos CV et al., 2013). Interessanterweise sprechen Tumorstammzellen auf Metformin bereits bei einer Konzentration zwischen 0,1-0,3 mmol/L an und zeigen sich damit wesentlich empfindlicher als Tumorzellen (Hirsch HA et al., 2009). Für die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzellen war ein anti-proliferativer Effekt von Metformin zwischen 1 und ca. 25 mmol/L als Zytostase nachzuweisen. Ab einer Konzentration von >25 mmol/L Metformin zeigte der anti-proliferative Effekt von Metformin zytotoxische Eigenschaften.

⁷ Dass diese *in vitro* eingesetzten Konzentrationen an Metformin weit über dem therapeutisch empfohlenen Zielspiegel von 2,8 bis 15 µmol/L (0,47-2,5 mg/L) liegen, wird in der Literatur kritisch diskutiert (Stambolic V et al., 2009; Rizos CV et al., 2013; An H, He L., 2016). Die Limitation bei der Dosierung von Metformin wird als wichtiges Argument gegen Metformin als Komponente einer Tumorthherapie gesehen (Garofalo C et al., 2013). Andererseits deutet eine Vielzahl an klinischen Studien auf einen anti-Tumor-Effekt von Metformin hin (Kapitel 1.2). Erhöhte Konzentrationen an Metformin *in vitro* ist den optimierten unphysiologischen Konditionen geschuldet, die eine optimale Tumorzellproliferation sicherstellen. Zudem sind Zellen in Zellkulturen nicht den indirekten systemischen Effekten von Metformin ausgesetzt, die das Angebot an Glukose, Insulin und diversen Wachstumsfaktoren einschränken (Pollak MN, 2012).

6.3 Metformin-AMPK-Achse

Ein wesentlicher Wirkmechanismus von Metformin besteht in der Aktivierung der AMPK (Zhou G et al., 2001; Hardie DG et al., 2004(2)). Mit dem selektiven Inhibitor Compound C (Liu X et al., 2014) sollte der aktivierende Effekt von Metformin auf die AMPK verhindert werden. Hierzu wurde Compound C (Dorsomorphin) in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt (Zhuang Y et al., 2015). In dieser Konzentration verringerte Compound C zwar die Aktivierung der AMPK (Abbildung 10.5), die erwartete Reversibilität beim antiproliferativen Effekt von Metformin konnte aber nicht gezeigt werden (Kapitel 4.5). Ergebnisse hierzu aus der Literatur sind nicht eindeutig. Während einige Autoren AMPK als Haupttarget von Metformin sehen (Zhou G et al., 2001; Hawley SA et al., 2002; Musi N et al., 2002; Shaw RJ, 2006; Blandino G et al., 2012; Garofalo C et al., 2013), konnten andere Arbeiten dies nicht bestätigen (Liu X et al., 2014; Vucicevic L et al., 2016; Deschemin JC et al., 2017). Shaw et al. haben zeigen können, dass die Stärke der LKB1-Expression das Ansprechen von Tumorzellen auf Metformin beeinflusst (Shaw RJ et al., 2005). Andererseits ist auch eine von der Stärke der LKB1-Expression unabhängige Hemmung der Tumorzellproliferation durch Metformin beschrieben (Garofalo C et al., 2013).

Die Aktivierung der AMPK erfolgt über die Phosphorylierung von Threonin (Thr172) (Kapitel 1.3). Der Nachweis von Phospho-Thr172 in den in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzellen war erfolgreich, sodass im zweiten Schritt der inhibitorische Effekt von Compound C auf die AMPK untersucht werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nicht erkennen, dass Compound C den anti-proliferativen Effekt von Metformin hemmt.

Nach wie vor ist nicht abschließend geklärt, ob auch in Tumorzellen die AMPK ein wichtiges Target von Metformin darstellt.

7 Ausblick

Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Metformin in Hepatozyten haben gezeigt, dass Metformin über eine Hemmung von Komplex I der Atmungskette⁸ und einer hieraus resultierenden Änderung im ATP/AMP-Verhältnis die AMPK indirekt aktiviert (Owen MR et al., 2000). Eine aktivierte AMPK ihrerseits hemmt verschiedenste zelluläre anabole Stoffwechselwege (Kapitel 1.3). Dieser molekulare Zusammenhang wird in Frage gestellt, seit gezeigt werden konnte, dass Metformin den Blutzuckerspiegel von Mäusen mit einem leberspezifischen Knockdown von AMPK α oder LKB1 senkt (Foretz M et al., 2010).

Das wesentliche Target von Metformin in Tumorzellen wird ebenfalls in der AMPK gesehen. Aktive AMPK wurde in verschiedenen Tumorzelllinien wie in kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen (Garofalo C et al., 2013; u. auch diese Arbeit). Der anti-proliferative Effekt von Metformin war nicht durch den AMPK-Inhibitor Compound C zu hemmen, obwohl dessen Inhibitor-Funktion in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Um zu prüfen, ob der anti-proliferative Effekt von Metformin nicht bzw. nicht ausschließlich über die Aktivierung der AMPK vermittelt wird, sollte geprüft werden, ob effektive Aktivatoren der AMPK wie AICAR (Esfahanian N et al., 2012; Peyton KJ et al., 2012) in Tumorzellen tatsächlich antiproliferative Effekte auslösen.

Transportproteine wie der organische Kationentransporter OCT1 sind am Transport von Metformin in die Zelle beteiligt. Segal et al. konnten zeigen, dass ein Knockdown von OCT1 den antiproliferativen Effekt von Metformin mindert (Segal E et al., 2011). Für die beiden Zelllinien HCT116 und RKO gelang bereits der Nachweis von OCT1 (Zhang S et al., 2006), sodass angenommen werden kann, dass OCT1 auch bei kolorektalen Karzinomzellen an der Aufnahme von Metformin beteiligt ist. Dies sollte im Detail untersucht werden, um die Bedeutung von OCT1 für den antiproliferativen Effekt von Metformin bei kolorektalen Karzinomzellen besser zu verstehen.

⁸ Ein Verlust des Membranpotentials durch Metformin (5 und 10 mmol/L für 72 Stunden) war von uns in Vorarbeiten nicht nachzuweisen (Abbildung 10.6 im Anhang).

8 Zusammenfassung

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen für das Antidiabetikum Metformin anti-Tumor-Effekte, die bisher ansatzweise für verschiedene Tumorzelllinien *in vitro* bestätigt wurden. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den antiproliferativen Effekt von Metformin an sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien (Colo678, Colo741, HT29, HCT116, LS174T, RKO) zu untersuchen. Zur Identifizierung eines anti-proliferativen Effektes von Metformin bei kolorektalen Karzinomzellen wurde ein Konzentrationsbereich von 1 bis 100 mmol/L untersucht. Die für die Tumorzelllinien bestimmte halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Metformin reichte von 0,8 mmol/L (HT29) über 16 mmol/L (Colo678) bis >40 mmol/L (RKO). Der IC_{50} für die beiden nicht-transformierten Kontrollzellen lag ebenfalls über 40 mmol/L.

Um die Untersuchungen *in vitro* bei relevanten tumorphysiologischen Bedingungen durchführen zu können, die der Situation von Tumorzellen in einem soliden Tumor wie dem kolorektalen Karzinom möglichst nahekommt, wurden die Zellen bei unterschiedlichen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen kultiviert. Ein permanent erhöhter Blutzuckerspiegel hat sich als grundlegender Faktor für malignes Zellwachstum erwiesen. Der anti-proliferative Effekt von Metformin in Normoxie war nahezu unbeeinflusst von den untersuchten Glukosekonzentrationen (2,5; 5,0; 11 mmol/L). Dagegen nahm in Hypoxie im Vergleich zu Normoxie der antiproliferative Effekt von Metformin bei 4 von 6 Tumorzelllinien um mehr als das Doppelte ab. Ein zentrales Target der Metformin-Wirkung stellt die AMPK, ein wichtiges Enzym für den Energiestoffwechsel der Zelle, dar. Ihre phosphorylierte Form war in den Tumorzelllinien nachzuweisen, doch der antiproliferative Effekt von Metformin war nicht durch den AMPK-Inhibitor Compound C zu hemmen.

Ein antiproliferativer Effekt von Metformin war bei kolorektalen Karzinomzellen nachzuweisen, doch bleiben die durch Metformin ausgelösten molekularen Mechanismen in der Tumorzelle weiterhin wenig verstanden.

9 Literaturverzeichnis

- Aljada A, Mousa SA. Metformin and neoplasia: implications and indications. *Pharmacol Ther.* 2012; **133(1)**: 108-15.
- AWMF. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S3-Leitlinie: Kolorektales Karzinom. Langversion 2.1. Januar 2019. AWMF-Registernummer: 021/007OL. 09.01.2019 [zitiert am 11.01.2019]. URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene.* 2008; **27(25)**: 3576-86.
- Al-Zoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, Till H, Pichler M, Guertl-Lackner B, Hoefler G. Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol.* 2014; **41(2)**: 281-95.
- An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol.* 2016; **228(3)**: R97-R106.
- Anwar MA, Kheir WA, Eid S, Fares J, Liu X, Eid AH, Eid AA. Colorectal and Prostate Cancer Risk in Diabetes: Metformin, an Actor behind the Scene. *J Cancer.* 2014; **5**: 736-44.
- Blandino G, Valerio M, Ciocce M, Mori F, Casadei L, Pulito C, Sacconi A, Biagioni F, Cortese G, Galanti S, Manetti C, Citro G, Muti P, Strano S. Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nat Commun.* 2012; **3**: 865.
- Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014; **508(7494)**: 108-112.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014; **383(9927)**: 1490-1502.
- Brown JM. Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol.* 2007; **435**: 297-321.
- Cao J, Meng S, Chang E, et al. Low Concentrations of Metformin Suppress Glucose Production in Hepatocytes through AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J Biol Chem.* 2014; **289(30)**: 20435-20446.
- Chaplin DJ, Durand RE, Olive PL. Acute hypoxia in tumors: implications for modifiers of radiation effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1986; **12(8)**: 1279-82.
- Cheaib, B., Auguste, A. & Leary, A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer.* 2015; **34**, 4-16.
- Cho SY, Lee HJ, Lee HJ, Jung DB, Kim H, Sohn EJ, Kim B, Jung JH, Kwon BM, Kim SH. Activation of AMP-Activated Protein Kinase α and Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates CB-PIC-Induced Apoptosis in Hypoxic SW620 Colorectal Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; **2013**: 974313.
- Cui H, Zhang AJ, Chen M, Liu JJ. ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr Drug Targets* 2015; **16(12)**: 1356-71.

- Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; **3(11)**: 1451-61.
- Deschemin JC, Foretz M, Viollet B, Vaulont S. AMPK is not required for the effect of metformin on the inhibition of BMP6-induced hepcidin gene expression in hepatocytes. *Sci Rep*. 2017; **7(1)**: 12679.
- Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; **112(6)**: 1809-14.
- Esfahanian N, Shakiba Y, Nikbin B, Soraya H, Maleki-Dizaji N, Ghazi-Khansari M, Garjani A. Effect of metformin on the proliferation, migration, and MMP-2 and -9 expression of human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*. 2012; **5(4)**: 1068-74.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005; **330(7503)**: 1304-5.
- Fernandez-de-Cossio-Diaz J, Vazquez A. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. *Sci Rep*. 2017; **7(1)**: 13488.
- Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010; **120(7)**: 2355-69.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004; **4(11)**: 891-899.
- Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer*. 2007; **97(5)**: 646-53.
- Garofalo C, Capristo M, Manara MC, Mancarella C, Landuzzi L, Belfiore A, Lollini PL, Picci P, Scotlandi K. Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS ONE*. **2013**; 8(12): e83832.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; **144 (5)**: 646-74.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*. 2003; **546(1)**: 113-20.
- Hardie DG. (1) AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004; **5(2)**: 119-25.
- Hardie DG. (2) The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004; **117**: 5479-87.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*. 2011; **25(18)**: 1895-908.

- Hardie DG. Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer? *Clin Cancer Res.* 2015; **21(17)**: 3836-40.
- Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes.* 2002; **51(8)**: 2420-5.
- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2003; **2(4)**: 28.
- He XK, Su TT, Si JM, Sun LM. Metformin Is Associated with Slightly Reduced Risk of Colorectal Cancer and Moderate Survival Benefits in Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; **95(7)**: e2749.
- Holm E, Hagmüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res.* 1995; **55(6)**: 1373-8.
- Iglesias DA, Yates MS, van der Hoeven D, Rodkey TL, Zhang Q, Co NN, Burzawa J, Chigurupati S, Celestino J, Bowser J, Broaddus R, Hancock JF, Schmandt R, Lu KH. Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy. *Mol Cancer Ther.* 2013; **12(12)**: 2847-56.
- Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med.* 2016; **48(7)**: e245.
- Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc.* 2001; **60(1)**: 91-106.
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; **21(9)**: 1414-31.
- Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* 2000; **49(6)**: 896-903.
- Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Evaluation of antagonistic effects of metformin with Cisplatin in gastric cancer cells. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014; **8(3)**: 12-9.
- Liu X, Chhipa RR, Nakano I, Dasgupta B. The AMPK inhibitor Compound C is a potent AMPK-independent anti-glioma agent. *Mol Cancer Ther.* 2014; **13(3)**: 596-605.
- Liu Z (1), Yokoyama NN, Blair CA, Li X, Avizonis D, Wu XR, Uchio E, Youssef R, McClelland M, Pollak M, Zi X. High Sensitivity of an Ha-RAS Transgenic Model of Superficial Bladder Cancer to Metformin Is Associated with ~240-Fold Higher Drug Concentration in Urine than Serum. *Mol Cancer Ther.* 2016; **15(3)**: 430-8.
- Liu Z (2), Qi S, Zhao X, Li M, Ding S, Lu J, Zhang H. Metformin inhibits 17 β -estradiol-induced epithelial-to-mesenchymal transition via β Klotho-related ERK1/2 signaling and AMPK α signaling in endometrial adenocarcinoma cells. *Oncotarget.* 2016; **7(16)**: 21315-31.

- Mathonnet M, Perraud A, Christou N, et al. Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol*. 2014; **20(15)**: 4189-96.
- Meyerhardt JA, Catalano PJ, Haller DG, Mayer RJ, Macdonald JS, Benson 3rd AB, Fuchs CS. Impact of diabetes mellitus on outcomes in patients with colon cancer. *J Clin Oncol*. 2003; **21(3)**: 433-40.
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic gluca- gon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013; **494(7436)**: 256-60.
- Morales DR, Morris, AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med*. 2015; **66**: 17-29.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, William- son JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; **51(7)**: 2074-81.
- Nangia-Makker P, Yu Y, Vasudevan A, Farhana L, Rajendra SG, Levi E, Majumdar AP. Met- formin: a potential therapeutic agent for recurrent colon cancer. *PLoS One*. 2014; **9(1)**: e84369.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000; **348(3)**: 607-14.
- Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014; **10(3)**: 143-56.
- Peyton KJ, Liu X, Yu Y, Yates B, Durante W. Activation of AMP-Activated Protein Kinase inhib- its the proliferation of human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; **342(3)**: 827- 34.
- Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the begin- ning. *Cancer Discov*. 2012; **2(9)**: 778-90.
- Robert-Koch-Institut. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prä- valenzen zwischen 1990 und 2010. Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregister- daten am RKI. 2010.
- Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Gemeinsame Publikation des Zent- rums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. 11. Ausgabe. 2017. [zitiert am 11.01.19] https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile.
- Rizos CV, Elisaf MS. Metformin and cancer. *Eur J Pharmacol*. 2013; **705(1-3)**: 96-108.
- Saenz A, Fernandez-Esteban I, Mataix A, Ausejo M, Roque M, Moher D. Metformin monothera- py for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; **(3)**: CD002966.

- Segal ED, Yasmeen A, Beauchamp MC, Rosenblatt J, Pollak M, Gotlieb WH. Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; **414(4)**: 694-9.
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012; **148(3)**: 399-408.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005; **310(5754)**: 1642-6.
- Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec; **18(6)**: 598-608.
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010; **1797(6-7)**: 1171-7.
- Stambolic V, Woodgett JR, Fantus IG, Pritchard KI, Goodwin PJ. Utility of metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor? *Breast Cancer Res Treat*. 2009; **114(2)**: 387-9.
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995; **333(9)**: 550-4.
- Sui X, Xu Y, Yang J, et al. Use of Metformin alone is not associated with survival outcomes of colorectal cancer cell but AMPK activator AICAR sensitizes anticancer effect of 5-fluorouracil through AMPK activation. *PLoS One*. 2014; **9(5)**: e97781.
- Tantama M, Martínez-François JR, Mongeon R, Yellen G. Imaging energy status in liv cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to ADP ratio. *Nat Commun*. 2013; **4**:2550.
- Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007; **100(3)**: 328-41.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; **26(2)**: 225-39.
- Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kazazis C. Metformin and cancer. *Rev Diabet Stud*. 2013; **10(4)**: 228-35.
- Vucicevic L, Misirkic M, Janetovic K, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E, Prica M, Harhaji-Trajkovic L, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*. 2011, **7(1)**: 40-50.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927; **8(6)**: 519-30.
- Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, Glasauer A, Dufour E, Mutlu GM, Budigner GS, Chandel NS Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014; **3**: e02242.
- Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene*. 1999; **18(21)**: 3199-204.

- Yu H, Yin L, Jiang X et al. Effect of metformin on cancer risk and treatment outcome of prostate cancer: a meta-analysis of epidemiological observational studies. PLoS ONE. 2014; **9(12)**: e116327.
- Zhang Y, Li MX, Wang H, Zeng Z. Metformin Down-regulates Endometrial Carcinoma Cell Secretion of IGF-1 and Expression of IGF-1R. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2015; **16(1)**: 221-5.
- Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, et al. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. Cancer Res. 2006; **66(17)**: 8847-57.
- Zhang, ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, Kip, KE. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. Diabetes Care. 2011; **34(10)**: 2323-8.
- Zhang ZJ, Li S. The prognostic value of metformin for cancer patients with concurrent diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Obes Metab. 2014; **16(8)**: 707-10.
- 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. Journal of Clinical Investigation. 2001; **108(8)**: 1167-74.
- Zhuang Y, Chan DK, Haugrud AB, Miskimins WK. Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. PLoS One. 2014; **9(9)**: e108444.

10 Appendix

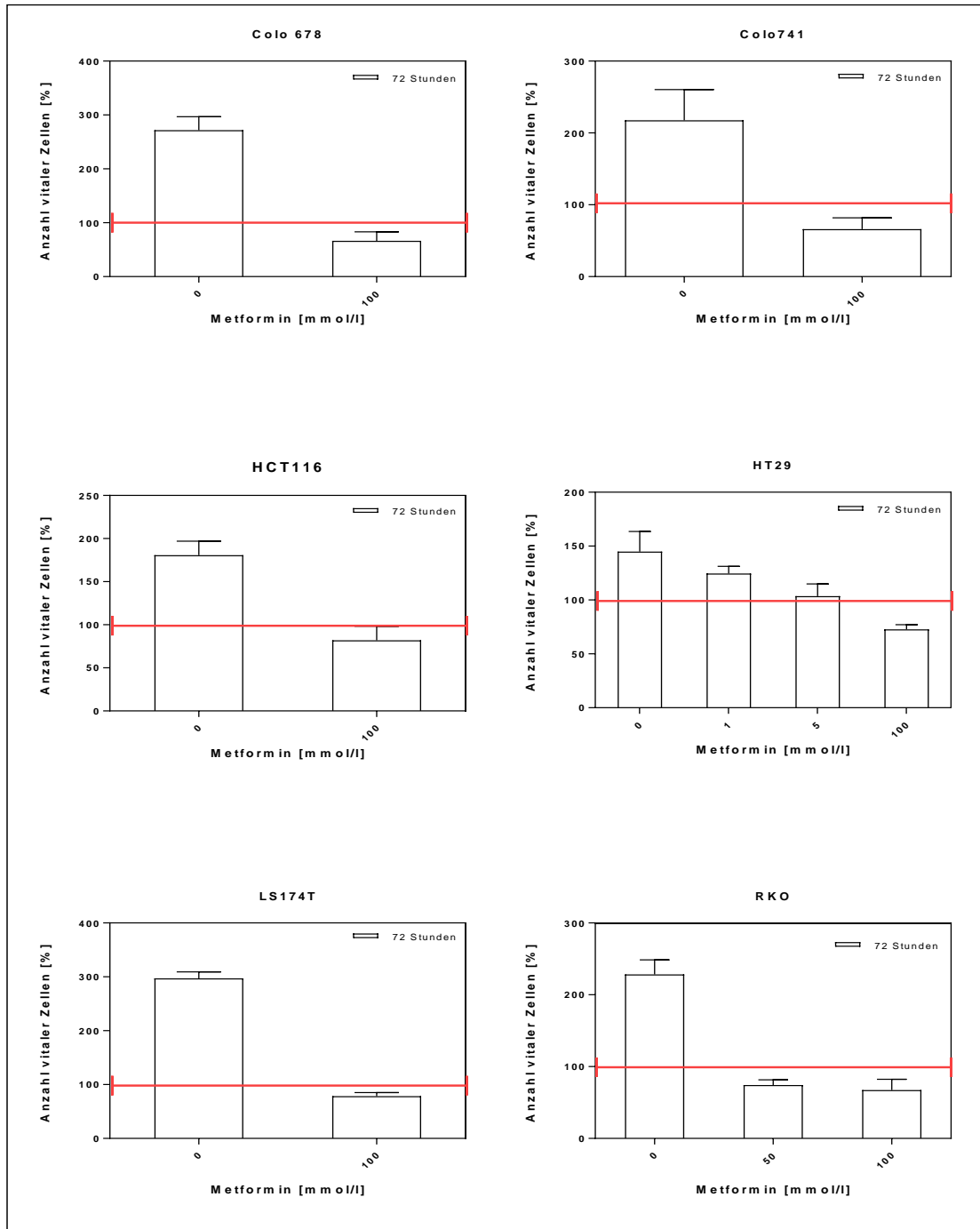


Abbildung 10.1: Der antiproliferative Effekt von 100 mmol/L Metformin. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Kulturmedium für 72 Stunden inkubiert und die Zellzahl mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

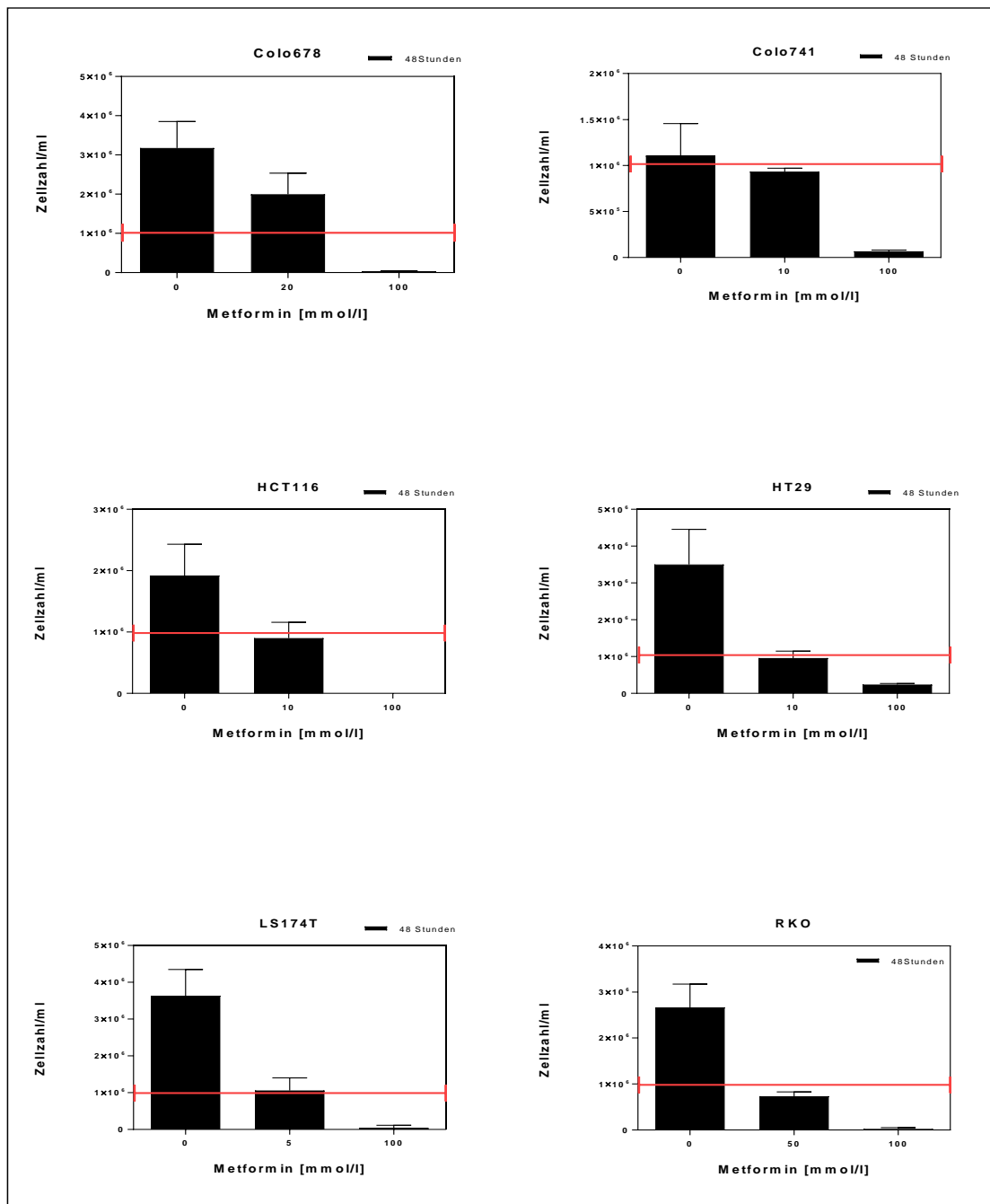


Abbildung 10.2: Der antiproliferative Effekt von Meformin. Zellzahlbestimmung in Neubaur Zählkammer zur Visualisierung des antiproliferativen Effektes. Die rote Markierung bildet die Marke bei 10⁶ vitalen Zellen ab.

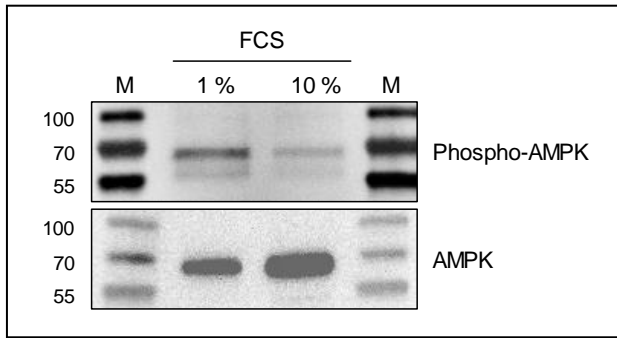


Abbildung 10.3: Nachweis von AMPK und Phospho-AMPK in kolorektalen Karzinomzellen. Aktivierung der AMPK durch Mangelbedingungen (1 % FCS). LS174T-Zellen wurden in Kulturmedium mit 1 % oder 10 % FCS für 24 Stunden kultiviert. (M): Proteinmarker in kDa (zum Marker siehe Kapitel 3.6). Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

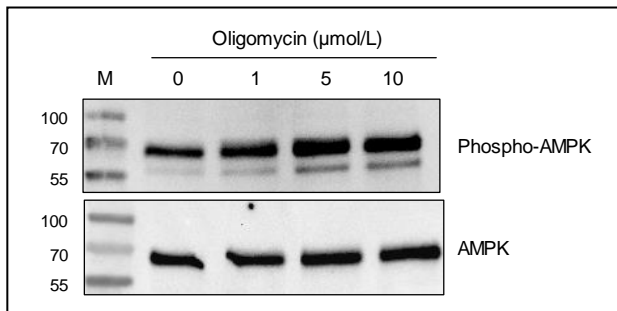


Abbildung 10.4: Oligomycin induziert die Aktivierung von AMPK. Oligomycin ist ein Inhibitor der ATP-Synthase. Der dadurch verringerte ATP-Spiegel führt zur Aktivierung der AMPK. HT29-Zellen wurden mit Oligomycin für 6 Stunden inkubiert. (M): Proteinmarker in kDa (Kapitel 3.6). AMPK und Phospho-AMPK (62 kDa) auf Höhe des 70 kDa Markers. Repräsentatives Ergebnis.

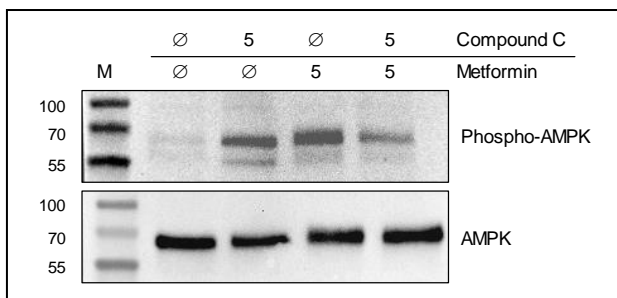


Abbildung 10.5: AMPK-Inhibitor Compound C hemmt die Metformin-vermittelte Aktivierung der AMPK. LS174T-Zellen wurden mit 5 $\mu\text{mol/L}$ Compound C (Zhuang Y et al., 2014) für 6 Stunden vorinkubiert, bevor 5 mmol/L Metformin (Abbildung 4.1) für 18 Stunden hinzugegeben wurden. Die Inkubation mit Compound C verringerte die Metformin-vermittelte AMPK-Aktivierung. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

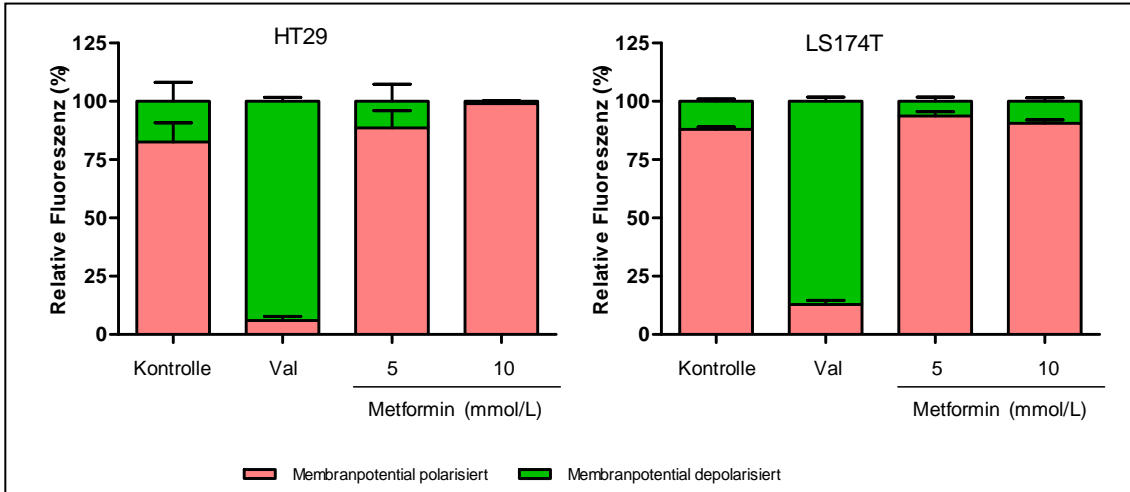


Abbildung 10.6: Metformin beeinflusst nicht das mitochondriale Membranpotential. Die Funktion der Atmungskette wurde mit dem kationischen, lipophilen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 überprüft (»Mitochondria Staining Kit«, Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. CS0390). JC-1 ist für die Mitochondrienmembran permeabel und JC-1 akkumuliert bei intakten Mitochondrien mit einem polarisierten Potentialgradienten in der Matrix der Mitochondrien und bildet dort rot-fluoreszierende J-Aggregate. Bei Mitochondrien mit einer defekten Atmungskette, hier ist das Membranpotential depolarisiert, bleibt die Bildung von J-Aggregaten aus und JC1 verbleibt im Zytosol als grün-fluoreszierende Monomere. Val: Valinomycin, führt zu einer Depolarisierung des Membranpotentials (=Positivkontrolle). Kontrolle: unbehandelte Zellen.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	2
Strukturformel von Metformin (1,1-Dimethylbiguanidhydrochlorid).	
Abbildung 1.2:	6
Systemische und lokale Effekte von Metformin in Organismus und Zelle.	
Abbildung 3.1:	14
Versuchsaufbau zum Nachweis des antiproliferativen Effektes von Metformin.	
Abbildung 4.1:	18
Der anti-proliferative Effekt von Metformin.	
Abbildung 4.2:	19
Der anti-proliferative Effekt von Metformin.	
Abbildung 4.3:	21
Der durch Inkubation mit Metformin induzierte anti-proliferative Effekt ist bei niedrigen Konzentrationen (5-50 mmol/L) reversibel.	
Abbildung 4.4:	23
Die Kombination aus Metformin (MET) und 5-FU sowie Metformin und Oxaliplatin (OX) verstärkt nicht den anti-proliferativen Effekt von Metformin	
Abbildung 4.5:	25
Der anti-proliferative Effekt von Metformin in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration	
Abbildung 4.6:	26
Nachweis der phosphorylierten (aktiven) Form der AMPK in Tumorzellen	
Abbildung 4.7:	27
AMPK Inhibitor Compound C (CompC) hemmt nicht den anti-proliferativen Effekt von Metformin (MET).	
Abbildung 10.1:	43
Der antiproliferative Effekt von 100 mmol/L Metformin.	
Abbildung 10.2:	44
Der antiproliferative Effekt von Metformin. Zellzahlbestimmung in Neubaur Zählkammer zur Visualisierung des antiproliferativen Effektes.	
Abbildung 10.3:	46
Nachweis von AMPK und Phospho-AMPK in kolorektalen Karzinomzellen.	
Abbildung 10.4:	46
Oligomycin induziert die Aktivierung von AMPK.	
Abbildung 10.5:	46
AMPK-Inhibitor Compound C hemmt die Metformin-vermittelte Aktivierung der AMPK.	
Abbildung 10.6:	47
Metformin beeinflusst nicht das mitochondriale Membranpotential.	

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	9
Kolorektale Karzinomzelllinien und Kontrollzellen.	
Tabelle 3.2:	10
Zellkulturmedien.	
Tabelle 3.3:	11
Bewertung des anti-proliferativen Effektes von Metformin.	
Tabelle 3.4:	15
Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme.	
Tabelle 3.5:	16
Die Western Blot Primäantikörper.	
Tabelle 4.1:	17
Die IC50-Werte von Metformin (mmol/L) für kolorektale Karzinomzelllinien und Kontroll-zellen.	
Tabelle 4.2:	20
Zellverdoppelungszeiten mit und ohne Metformin.	
Tabelle 4.3:	24
Vergleich der IC50 Werte (mmol/L) von Metformin bei 21 % und 1 % Sauerstoff.	

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung und Weiterentwicklung dieser Arbeit sowie für die stete Förderung während meiner Laborzeit und auch danach für die konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung und Auswertung.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Möglichkeit, die Promotionsarbeit an seiner Klinik zu erstellen, möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Chirurgische Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg bedanken.

Weiterhin danke ich Frau B. Mühling, Frau M. Hofmann, Frau M. Koospal und Frau S. Gahn, für die Einarbeitung in verschiedene experimentelle Arbeitsmethoden, stete Hilfestellungen bei Versuchsdurchführungen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer, Leiterin des Forschungsbereichs der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg, für die Bereitstellung ihres Forschungsbereichs. Frau M. Kapp danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Untersuchungen in der Hypoxiekammer.

Ein besonderer Dank geht an Herrn S. Luz, dessen Diskussionsfreude, stetige Unterstützung und Motivation bei Höhen und Tiefen des Studiums und der Doktorarbeit maßgeblich zur Vollendung der Arbeit beigetragen haben.

Auch Frau Dr. med. L. Löwer und Frau Dr. med. J. Kettler sei an dieser Stelle für die Zusammenarbeit und den hilfreichen und intensiven Gedankenaustausch in und außerhalb des Labors sehr herzlich gedankt.

Curriculum Vitae

Frankfurt a. Main, 02. Dezember 2019