Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel

Prof. Dr. Bernhard O. Böhm

Die SNP Variante 1800054 im *ATM*-Gen und die Wirkung von Metformin auf den ATM/ AMPKα/ p53 Signalweg in einer B-Lymphoblastoiden Zelllinie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Ann-Kathrin Eininger

Nürtingen

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard O. Böhm

2. Berichterstatter: PD Dr. Burkhard Manfras

Tag der Promotion: 19. April 2018

Meinen Eltern
Heinz und Andrea
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1. Personalisierte Medizin 1
1.2. Diabetes mellitus 3
1.3. Metformin und seine pleiotropen Effekte 5
1.4. ATM und das Ansprechen auf Metformin 9
1.5. Der Tumorsuppressor p53 11
1.6. Zielsetzung 13

2. Material und Methoden 14

2.1. Das Patientenkollektiv 14
2.2. DNA-Sequenzierung 16
2.3. Zellbiologische Arbeitstechniken 16
2.4. Durchflusszytometrie 18
2.5. Westernblot 23
2.6. Statistische Auswertung 25
2.7. Übersicht 26

3. Ergebnisse 27

3.1. Ergebnisse der DNA-Sequenzierung 27
3.2. Metformin und die Apoptoseinduktion 28
3.3. Der Einfluss von Metformin auf den Zellzyklus 29
3.4. Metformin und die pAMPKα/ AMPKα 31
3.5. Die Wirkung von Metformin auf p53 40
3.6. Die Wirkung von Metformin auf p21 45
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse 48

4. Diskussion 49

4.1. ATM und das Metforminansprechen 49
4.2. Metforminansprechen und die zellzyklusmodulierende Wirkung/ Apoptoseinduktion 50
4.3. Metformin und die pAMPKα/ AMPKα 51
4.4. Metformin und der ATM/ AMPKα/ p53/ p21-Signalweg 52
4.5. Personalisierte Medizin beim T2D – ein Blick in die Zukunft 53

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis 57

Abbildungsverzeichnis 69

Tabellenverzeichnis 70

Danksagung 71

Lebenslauf 72

Abkürzungsverzeichnis

A	Therapieansprecher
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPKα/pAMPKα	AMP-aktivierte Proteinkinase α/ phosphorylierte AMPKα
ANDIS	All New Diabetics in Scania
APC	Allophycocyanin
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BÄK	Bundesärztekammer
B-LCL	B-lymphoblastoide Zelllinie
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzucker
CaMKK α/β	Calcium/ calmodulin- dependent protein kinase kinase α/β
CD19	Cluster of Differentiation 19
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CSA	Cyclosporin A
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EASD	European Association for the Study of Diabetes
EBV	Epstein Barr-Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GoDARTS	Genetics of Diabetes Audit and Research Tayside
GWA-Studie	Genomweite Assoziationsstudie

HbA1c	Glykohämoglobin
HNF1A	Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha- Mutation
KBV	Kassenärztliche Bundesvereinigung
LKB1	Liver Kinase B1
LPS	Lipopolysaccharide
MODY	Maturity onset diabetes of the young
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
OAD	Orales Antidiabetikum
OCT1/2	Organic cation transporter 1/ 2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS (-BSA)	Phosphatgepufferte Salzlösung (Bovine Serum Albumin)
PC7	Phycoerythrin-cyanin 7
PCO-Syndrom	Polycystisches Ovarialsyndrom
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping 2
PS	Phosphatidylserine
PVDF-Membran	Polyvinylidene difluoride- Membran
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STK11	Serine/Threonin Kinase 11
T1D	Typ 1 Diabetes
T1DGC	Type 1 Diabetes Genetics Consortium
T2D	Typ 2 Diabetes
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
Thr^{172}	$Threonin^{172}$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
V	Therapieversager
WHO	World Health Organization

Aus Gründen der Lesbarkeit wurde
neben der männlichen nicht auch die weibliche Bezeichnung aufgeführt.
Gemeint sind in allen Fällen sowohl Frauen als auch Männer.

1. Einleitung

1.1. Personalisierte Medizin

Personalisierte oder auch stratifizierte Medizin bezeichnet die Verbindung von Klinik und Pathologie mit Ergebnissen molekulargenetischer Verfahren. Sie dient dazu diagnostische, prognostische und therapeutische Strategien auf den jeweiligen Patienten anzupassen. Diese Form der sogenannten Präzisionsmedizin soll sicherstellen, dass Patienten die richtige Medikation in der richtigen Dosis, zum richtigen Zeitpunkt, mit minimalen Nebenwirkungen und maximaler Wirksamkeit erhalten (Mirnezami, Nicholson et al. 2012).

Die Entwicklung von Pharmaka und aktuelle Therapieleitlinien zielen basierend auf der Durchschnittsbevölkerung meist auf eine breite, gleichwohl somit recht heterogene Patientengruppe ab. Bei 30-60% der Patienten zeigen viele der wichtigen Medikamentenklassen keine klinisch signifikante Wirkung (Mirnezami, Nicholson et al. 2012). Die Erkrankung der Patienten wird somit nicht effektiv behandelt. Es entstehen unnötige Kosten und Risiken z.B. durch Nebenwirkungen der eingesetzten Therapeutika. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt das Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen auf dem vierten Rang der Hospitalisierungsgründe, ist für circa 100.000 Totesfälle pro Jahr verantwortlich und verursacht direkte Kosten von bis zu 150 Milliarden US Dollar (Piquette-Miller, Grant 2007).

Die großen Fortschritte in der Molekularbiologie (molekularen Medizin) der letzten Jahre haben zu neuen Erkenntnissen im Krankheitsverständnis geführt. Dieses Potenzial kann zur Verbesserung der Patientenversorgung genutzt werden (Mirnezami, Nicholson et al. 2012, Manolio, Fowler et al. 2017). Forscher in den Bereichen Pharmakogenetik, Pharmakogenomik, Proteomik und Metabolomik generieren täglich neue Informationen über die Abläufe im menschlichen Körper. Insbesondere die Pharmakogenomik mit ihren Hochdurchsatztechnologien erweitert das Wissen über genetische Zusammenhänge bei Pathogenese und -physiologie, Medikamentenmetabolismus und -transport. Genomweite Assoziationsstudien

(GWA-Studien) werden verstärkt genutzt, um die Variabilität der Patienten bezüglich ihrer Erkrankungsausprägung, aber auch der Wirksamkeit ihrer Therapie zu erklären (Giacomini, Brett et al. 2007). GWA-Studien haben hunderte von Krankheitsrisiko-Loci identifiziert (Hindorff, Sethupathy et al. 2009). Funktionelle Informationen über die vorliegenden biologischen Prozesse fehlen jedoch meist, unter anderem auch, weil die Mehrheit der beschriebenen Genvarianten nicht in kodierenden Sequenzen zu finden sind, sondern komplexe genomische Effekte ausüben können (Newgard, Attie 2010, Ipe, Swart et al. 2017). Die Lücke, die zwischen Grundlagenforschung und klinischer Forschung einerseits und der Anwendung in der klinischen Praxis andererseits entsteht, wird immer größer (Glauber, Rishe et al. 2014, Manolio, Fowler et al. 2017). Das grundlegende Problem, das Auseinanderdriften von Grundlagenforschung und klinischer Anwendung, wurde bereits erkannt und Förderungsmaßnahmen für die sogenannte Translationsmedizin wurden eingeführt. Dennoch ist dies ein langwieriger Prozess (Butler 2008). Diese Lücke zu schließen bietet großes Potenzial, denn die neu entdeckten Gene, Proteine und Signalwege repräsentieren mögliche neue Ansatzpunkte für Medikamente sowie für eine bessere Stratifzierung der eingesetzten Therapien (Hamburg, Collins 2010).

Das Informationsspektrum, das in der Diabetologie zu personalisierten Therapieentscheidungen führt, beinhaltet hauptsächlich individuelles Verhalten, den klinischen Phänotyp, Standard Laborparameter und bei monogenen Diabetesformen (MODY) inzwischen auch die Gensequenzierung (Malandrino, Smith 2011). Bei Patienten mit monogenem Diabetes hat die Gensequenzierung eine Relevanz für die Therapie. Beispielsweise zeigen Patienten mit einer Mutation im *HNF1A*-Gen eine fünffach erhöhte Sensitivität gegenüber Sulfonylharnstoffen als Patienten mit T2D (Pearson, Starkey et al. 2003). Ohne die genetische Information würde eine Ersttherapie gemäß allgemein gültiger Leitlinien mit Metformin erfolgen (Marathe, Gao et al. 2017).

In den letzten Jahren wurden mittels Kandidatengenanalyse und GWA-Studien einige Genloki identifiziert, die mit der Entstehung von Diabetes, bzw. dem Risiko der Entwicklung möglicher Komplikationen assoziiert werden (Malandrino, Smith 2011). Die GoDARTS und UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, in Zusammenarbeit mit dem Wellcome Trust Case Control Consortium 2 veröffentlichte 2011

erstmals eine GWA-Studie zum Ansprechen auf Metformin, dem Goldstandard in der Primärtherapie eines neu entdeckten Diabetes mellitus Typ 2 (GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. 2011).

Die umfangreichen Analysen können die Grundlage bilden für neue Erkenntnisse bezüglich komplexer Erkrankungen, dem Wirkmechanismus etablierter Medikamente und für die Entwicklung neuer Medikamente. Die Rolle genetischer Prädispositionen und deren Interaktion mit Umweltfaktoren in komplexen chronischen Erkrankungen zu verstehen ist der Schlüssel für die Prävention, die Diagnostik und die Entwicklung von sicheren und effizienten Therapien (Suhre, Shin et al. 2011). Dies wird zu einer verstärkten Stratifizierung komplexer Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes und arterieller Hypertonie, führen. Neben den Symptomkomplexen wird auch die intrinsische Biologie in die Klassifizierung aufgenommen werden (Mirnezami, Nicholson et al. 2012).

1.2. Diabetes mellitus

Weltweit sind rund 347 Millionen Menschen an der Volkskrankheit Diabetes mellitus erkrankt (Danaei, Finucane et al. 2011). 2004 starben nach Schätzungen der World Health Organization (WHO) 3,4 Millionen Menschen an den Folgen von zu hohen Blutzuckerwerten (World Health Organization 2009). Allein in Deutschland leben 7,3% der Bevölkerung, das heißt ungefähr 5 Millionen Erwachsene, mit einem ärztlich diagnostizierten Diabetes. Die Prävalenz steigt mit dem Alter (Robert Koch-Institut 2011, Boehme, Buechele et al. 2015)

Diabetes mellitus stellt eine große Herausforderung für die Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften dieser Welt dar. Jährlich entstehen allein in Deutschland 12,8 Milliarden Euro direkte Kosten durch Diabetes, davon werden 9,6 Milliarden Euro für die Behandlung der Folgeerkrankungen ausgegeben. Wenn 2020 tatsächlich die 10 Millionen Grenze überschritten wird, müssen mit Ausgaben von bis zu 25 Milliarden Euro für Diabetespatienten in unserem Gesundheitssystem gerechnet werden (Köster, von Ferber et al. 2005). Neben verstärkter Prävention ist eine frühzeitige medikamentöse und nicht-medikamentöse Intervention unerlässlich. Eine auf den Patienten zugeschnittenen Therapie verringert die Medikamentennebenwirkungen

und erhöht den Therapieerfolg. Dazu muss das Wissen über Ätiologie, Pathogenese aber auch die zur Verfügung stehenden Therapien erweitert werden.

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine heterogene, multifaktoriell bedingte Erkrankung des Glukosestoffwechsels. Gekennzeichnet durch eine chronische Hyperglykämie kann Diabetes mellitus verschiedene Ursachen haben. Sowohl die Insulinsekretion als auch die Insulinsensitivität können betroffen sein, häufig jedoch beide. Erhöhte Blutglukosewerte führen zu weiteren mikro- und/ oder makrovaskulären Komplikationen, wie der diabetischen Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie, sowie kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen. Die Ursachen für Diabetes sind vielfältig und immer noch nicht vollständig geklärt.

Bisher wurde die Mehrheit der Diabetes Patienten einer der folgenden zwei Gruppen zugeordnet: Typ 1 oder Typ 2 Diabetes. Bei circa 10% der Menschen mit Diabetes liegt ein Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) vor, eine Autoimmunerkrankung, die in der Regel vor dem 40. Lebensjahr auftritt (Hien, Böhm et al. 2013). Die Mehrheit der Diabetes Patienten (80-90%) wird im Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) zusammengefasst. Alter, Umwelteinflüsse, wie Lebensstil und Ernährungsweise, das metabolische Syndrom, aber auch genetische Faktoren führen zur Entwicklung eines T2D. Charakteristisch ist eine Insulinresistenz der Peripherie. Es kann im weiteren Verlauf zu einer β-Zelldysfunktion und zu einem relativen Insulinmangel kommen (Kumar, Abbas et al. 2012).

Die schwedische Studie ANDIS (All New Diabetics in Scania) wurde 2016 vorgestellt. Hierfür wurden 10,785 Patienten, bei denen erstmalig ein Diabetes mellitus diagnostiziert wurde untersucht. Es konnten fünf Subgruppen definiert werden, die den weiteren Krankheitsverlauf vorhersagen können. Die Klassifizierung in T1D und T2D deckt laut Storm nicht das ganze Spektrum des Diabetes mellitus ab. Diese Reklassifizierung ist jedoch von großer klinischer Bedeutung und wird sicher weiter fortschreiten, um eine optimale Therapie der Patienten zu gewährleisten und auch die Pharmakoentwicklung voranzutreiben (Storm, Rosengren et al. 2016). Eine optimale Therapie reduziert die Komplikationen des Diabetes mellitus. Bereits kurze hyperglykämische Episoden, bzw. eine konstant schlechte Einstellung der Blutzuckerwerte, können zu einem „vaskulären glykämischen Gedächtnis“ führen. Diese

pathologischen Blutzuckerwerte haben eine dauerhafte fortwährende Wirkung auf die kardiovaskulären Veränderungen, auch nach Rückkehr zu normalisierten Blutzuckerwerten (Berezin 2016).

Die Therapieleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) sehen zunächst eine Lebensstiländerung vor. Diese Basistherapie beinhaltet eine Schulung, Ernährungstherapie, Steigerung der körperlichen Aktivität und Raucherentwöhnung. Kann der HbA1c Wert innerhalb eines Zeitfensters von 3 bis 6 Monaten nicht unter 7,5% gesenkt werden, wird eine medikamentöse Monotherapie begonnen. Mittel der Wahl ist Metformin. Bei vorliegender Kontraindikation ist auch eine Monotherapie mit Sulfonylharnstoffen, Glibenclamid oder α-Glukosidasehemmern möglich. Gegebenenfalls muss im Laufe der Therapie ein zweites orales Antidiabetikum (OAD) oder auch Insulin hinzugefügt werden (Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) 2013).

1.3. Metformin und seine pleiotropen Effekte

Metformin (1,1-Dimethylbiguanid) gilt als der Goldstandard in der medikamentösen Therapie des T2D. Laut aktueller Leitlinienempfehlung der American Diabetes Association (ADA) und der European Association for the Study of Diabetes (EASD) ist Metformin DAS Mittel der Wahl bei unzureichender Blutzuckereinstellung durch Lebensstiländerung (Marathe, Gao et al. 2017). Metformin senkt das Risiko diabetesbedingter Endpunkte bei übergewichtigen Patienten mit T2D (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998). Im Vergleich mit Insulin und Sulfonylharnstoffen führt Metformin nur in geringem Maße zu Hypoglykämien und ist gewichtsneutral. Außerdem reduziert Metformin im Vergleich zu anderen OAD die kardiovaskuläre Mortalität (Selvin, Bolen et al. 2008, Lamanna, Monami et al. 2011). Weltweit wird es mehr als 120 Millionen Menschen verschrieben (Viollet, Foretz 2013). Bereits in den 1950er Jahren klinisch eingeführt, ist seine Wirkungsweise bis heute nicht vollständig geklärt. Zusätzlich zum T2D kann Metformin auch zur Therapie des PCO-Syndroms bei übergewichtigen Frauen mit Insulinresistenz angewendet werden. Metformin verbessert den Schwangerschaftsverlauf klinisch, die Anzahl der Lebendgeburten wird nicht erhöht (Tang, Lord et al. 2012). Neben hauptsächlich gastrointestinalen Nebenwirkungen kann Metformin in Ausnahmefällen eine

Laktatazidose hervorrufen und ist daher bei Patienten mit Niereninsuffizienz und einer Glomerulären Filtrationsrate kleiner 30ml/min/1,73m² kontraindiziert (Crowley, Diamantidis et al. 2016).

Die antihyperglykämische Wirkung von Metformin beruht primär auf der Herabsetzung der hepatischen Glukoseproduktion, insbesondere durch Hemmung der Glukoneogenese (Hundal, Krssak et al. 2000). Metformin akkumuliert verstärkt in der Leber (Wilcock, Bailey 1994). Über den OCT1 (Organic cation transporter)- Transporter, der vorwiegend in Hepatozyten exprimiert wird, oder passive Diffusion gelangt Metformin in die Hepatozyten (Shu, Sheardown et al. 2007). Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert Metformin in der Matrix der Mitochondrien (Owen, Doran et al. 2000). Die apolare Kohlenwasserstoffkette begünstigt die Bindung an hydrophobe Strukturen, wie die Mitochondrienmembran (Schafer, Mainka et al. 1983, Viollet, Guigas et al. 2012). Man geht heute davon aus, dass Metformin insbesondere den Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien inhibiert (Owen, Doran et al. 2000, El-Mir, Nogueira et al. 2000). Der genaue Angriffspunkt ist jedoch unbekannt. Die ATP(Adenosintriphosphat)-Synthese wird reduziert. Der ADP (Adenosindiphosphat)- und AMP(Adenosinmonophosphat)- Gehalt der Zelle steigt. Es kommt zu einer akuten transkriptionsunabhängigen Hemmung der Glukoneogenese durch allosterische Regulation von Schlüsselenzymen (Miller, Birnbaum 2010). Ein in vitro Experiment zeigte, dass auch eine forcierte Expression von Genen der Glukoneogenese dieser Reduktion der hepatischen Glukoseproduktion nicht entgegenwirken kann und zu einer Depletion der Energiereserven führt (Foretz, Hebrard et al. 2010). Durch den Anstieg von zytosolischem AMP (Hawley, Ross et al. 2010) und die Abnahme des Energiegehalts der Zelle wird die AMP-aktivierte Proteinkinase alpha (AMPKα) aktiviert (Stephenne, Foretz et al. 2011).

Die AMPKα ist stark mit den pleiotropen Effekten von Metformin verknüpft (Zhou, Myers et al. 2001). Diese phylogenetisch konservierte Serin/Threonin-Proteinkinase, dient als Energiesensor des Körpers. Sie spiegelt den Energiestatus der Zelle und des organischen Systems wieder und schützt wichtige zelluläre Funktionen bei eingeschränkter Energiezufuhr (Hardie 2011). Das heterotrimere Protein besteht aus einer katalytischen α-Untereinheit und zwei regulatorischen Untereinheiten, der β- und der γ-Untereinheit (Hardie 2007). Steigt das intrazelluläre

AMP/ATP-Verhältnis an, wird die AMPKα aktiviert. AMP bindet an die regulatorische γ-Untereinheit. Es kommt zu einer Konformationsänderung der AMPKα (Davies, Helps et al. 1995). Zusätzlich wird die AMPKα von vorangeschalteten Kinasen, wie der STK11/LKB1 (Serin/Threonin Kinase 11/ Liver kinase B1) und der CaMKKα/β (Calcium/ calmodulin- dependent protein kinase kinase α/β), an Threonin^{172} (Thr^{172}) phosphoryliert (Shaw, Kosmatka et al. 2004, Woods, Johnstone et al. 2003, Woods, Dickerson et al. 2005). AMP schützt Thr^{172} vor der Dephosporylierung (Davies, Helps et al. 1995). Die aktivierte AMPKα fährt alle ATP-konsumierenden Synthese-wege zurück und stellt das Energiegleichgewicht wieder her. Die Zelle wechselt vom anabolen in einen katabolen Zustand (Abb.1). Durch die Phosphorylierung von Schlüsselenzymen, Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren durch die AMPKα werden die Glukose-, Lipid- und Proteinsynthese inhibiert. Das Zellwachstum wird heruntergefahren. Die Oxidation von Fettsäuren und die Glukoseaufnahme werden verstärkt (Viollet, Guigas et al. 2009).

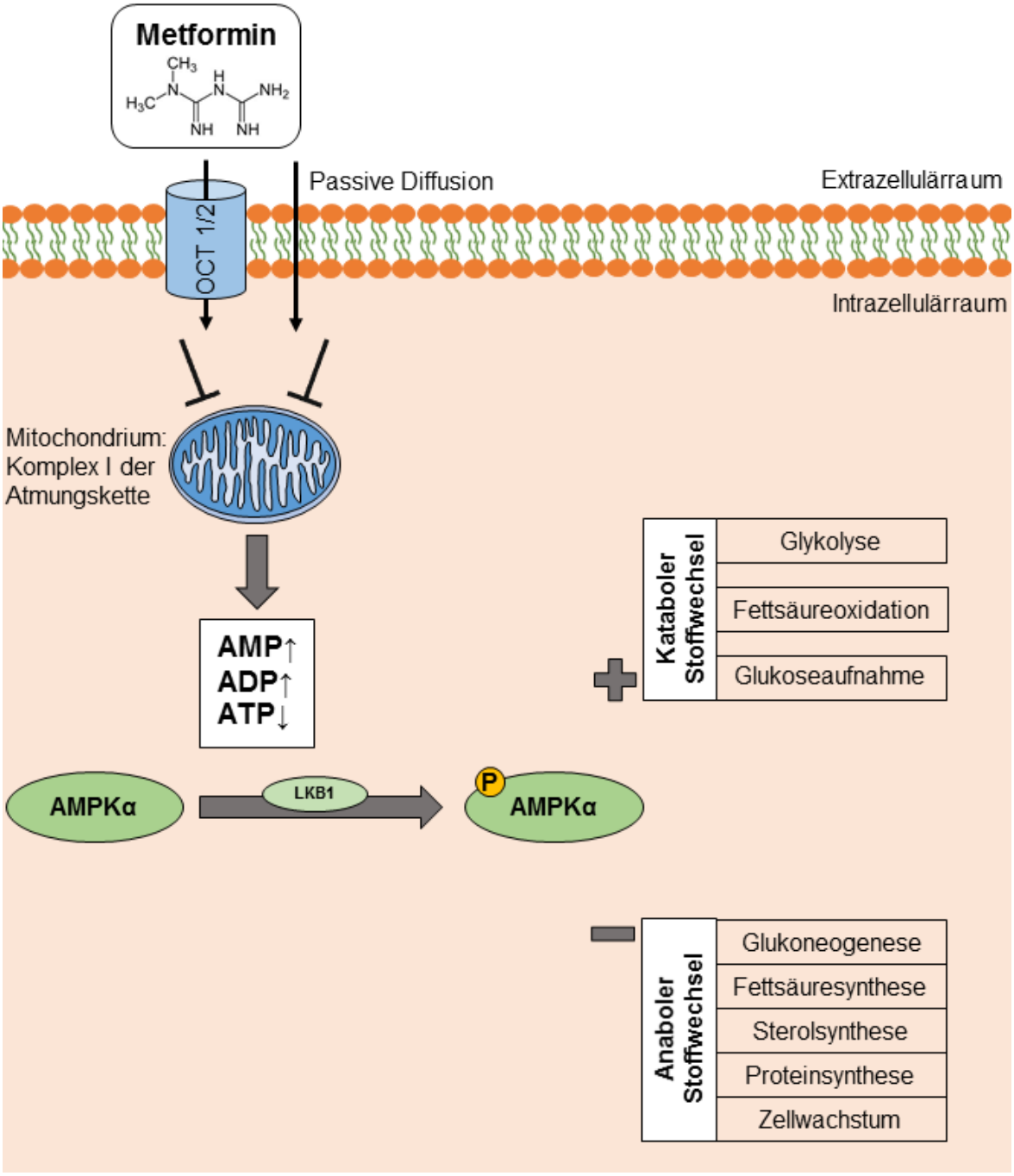


Abbildung 1: AMPKα und die pleiotropen Effekte von Metformin

Metformin gelangt über den OCT1/2 (Organic cation transporter 1/2) und passive Diffusion in die Zelle. Im Mitochondrium inhibiert Metformin den Komplex I der Atmungskette. In der Folge kommt es zu einem Anstieg des AMP/ATP Verhältnisses. Die AMPKα wird aktiviert und durch LKB1 (Liver Kinase B1) zusätzlich phosphoryliert. Die Zelle fährt die anabolen Stoffwechselwege herunter. Die Glukoseaufnahme und die Oxidation von Fettsäuren werden verstärkt (eigene Darstellung, in Anlehnung an Pernicova, Korbonits 2014). (p)AMPKα: (phosphorylierte) AMP-aktivierte Proteinkinase α; AMP: Adenosinmonophosphat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat.

T2D ist neben einem erhöhten kardiovaskulären Risiko mit einem erhöhten Risiko für Krebs, insbesondere für Brust-, Colon-, Nieren-, Pankreas-, und Prostata-Karzinomen assoziiert (Giovannucci, Harlan et al. 2010). Mögliche Ursachen hierfür liegen im wachstumsfördernden Effekt von chronisch-erhöhten Plasma(pro)insulinspiegeln (Jalving, Gietema et al. 2010) und im erhöhten Plasmaglukosespiegel (Currie, Poole et al. 2009). Metformin senkt das Risiko für Krebs. Es besteht eine Dosisabhängigkeit zwischen Dauer der Metformintherapie und Krebsinzidenz (Evans, Donnelly et al. 2005). In-vitro und in-vivo Studien in verschiedenen Krebszelllinien und Neoplasien in Tiermodellen zeigten eine antiproliferative Wirkung von Metformin (Viollet, Guigas et al. 2012). Eine mögliche Erklärung ist die Verbesserung der Blutglukose- und Plasma(pro)insulinspiegel in T2D Patienten unter Metformintherapie sowie direkte Effekte an den Tumorzellen (Goodwin, Pritchard et al. 2008).

Metformin verfügt zusätzlich über eine insulinunabhängige direkte Wirkung auf das Tumorwachstum. In vitro und in vivo inhibiert Metformin über den LKB-1/ AMPKα-Signalweg die zelluläre Proliferation und die Proteinsynthese (Viollet, Guigas et al. 2012). Auch der positive Effekt von Metformin auf chronische Entzündungsprozesse könnte eine Erklärung für die antikanzerogene Wirkung von Metformin sein (Grisouard, Dembinski et al. 2011). AMPKα kann Entzündungsreaktionen inhibieren und so gegebenenfalls die Entzündung in der Umgebung von Tumoren bekämpfen, was bestenfalls zu einer Reduktion der Tumormasse führt (Salminen, Hyttinen et al. 2011, Viollet, Guigas et al. 2012).

1.4. *ATM* und das Ansprechen auf Metformin

Zhou et al veröffentlichten 2011 die Ergebnisse der ersten GWA-Studie zum Ansprechen von T2D Patienten auf die Therapie mit Metformin. Das C-Allel im Single Nukleodid Polymorphismus (SNP) rs11212617 ist mit einem circa 1,5 fach besseren Ansprechen assoziiert. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Kohorten repliziert werden (van Leeuwen, Nijpels et al. 2012). In diesem Lokus liegt unter anderem das *ataxia teleangiectasia mutated (ATM)*-Gen (GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. 2011). Eine Loss-of-Function Mutation im *ATM*-Gen führt zu Ataxia teleangiectasia,

einer neurodegenerativen Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch eine progressive Ataxie, einen Verlust der Muskelkoordination, Strahlensensitivität, Immundefizienz und eine Prädisposition für bösartige Erkrankungen (Boder 1985). Viele Patienten weisen zusätzlich eine Insulinresistenz und ein erhöhtes Risiko auf, an einem Diabetes zu erkranken (Schalch, McFarlin et al. 1970, Bar, Levis et al. 1978). Das *ATM*-Gen kodiert die Serin/Threonin-Proteinkinase ATM. Diese wird durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert, induziert einen Zellzyklusarrest und ermöglicht die DNA-Reparatur (Lavin 2008). Die Inhibition der ATM-Kinase in Hepatomzellen von Ratten mittels KU-55933, einem selektiven ATM-Inhibitor, reduziert die AMPKα -Aktivierung durch Metformin. Zhou et al schlossen daraus, dass die ATM-Kinase der AMPK vorgeschaltet ist und den Effekt von Metformin vermittelt (GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. 2011).

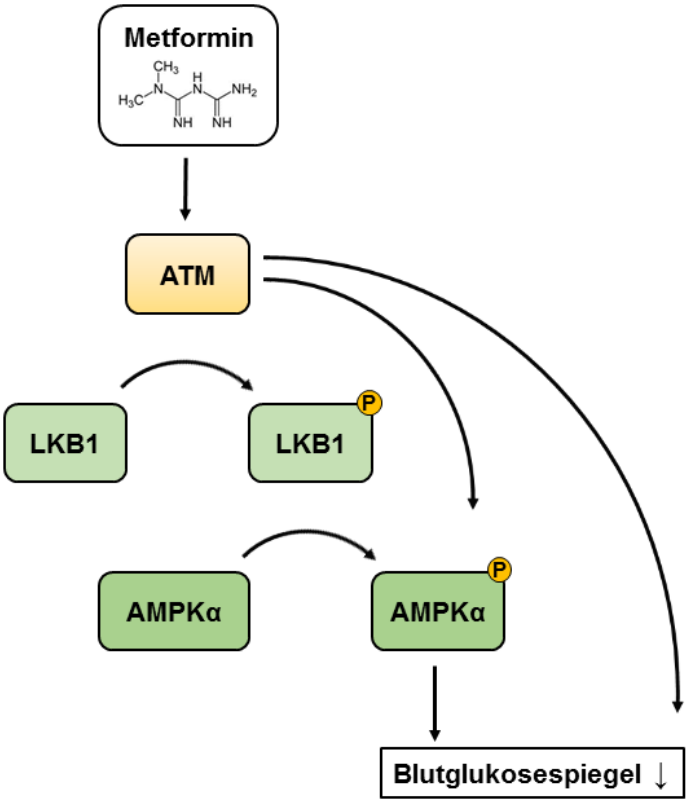


Abbildung 2: Metformin und die antidiabetische Wirkung der ATM-Kinase

Mögliche Mechanismen: 1. ATM (Ataxia teleangiectasia mutated)- Kinase aktiviert und phosphoryliert (p) direkt oder über die Phosphorylierung von LKB1 (Liver Kinase B1) die AMPKα (AMP-aktivierte Proteinkinase α) und der Blutglukosespiegel wird gesenkt. 2. Der Blutglukosespiegel wird AMPK-unabhängig gesenkt (eigene Darstellung, in Anlehnung an Birnbaum, Shaw 2011).

Frühere Berichte unterstützen ebenfalls die Annahme, dass ATM in die Aktivierung von AMPKα durch Metformin und andere Stimuli direkt involviert ist (Sun, Connors et al. 2007, Fu, Wan et al. 2008, Sanli, Rashid et al. 2010). Weiterhin ist es denkbar, dass ATM auch AMPKα- unabhängig Zielstrukturen beeinflusst, die den Metabolismus kontrollieren. Möglicherweise werden via ATM die Proteine der nachgeschalteten DNA-Reparatur und Tumorsuppression durch Metformin aktiviert. Weitere Untersuchungen dieser Signalwege sind notwendig, um die Verbindung zwischen der antidiabetogenen und der antikanzerogenen Wirkung besser zu verstehen (Birnbaum, Shaw 2011).

1.5. Der Tumorsuppressor p53

Das hoch konservierte Phosphoprotein p53 spielt als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle und der Reparatur von DNA-Schäden. Mehr als die Hälfte aller Tumoren exprimiert ein mutiertes p53 Protein. Als stressinduzierter Transkriptionsfaktor unterdrückt p53 eine Reihe an Genen, die das Zellwachstum stimulieren und induziert einen Zellzyklusarrest. Zusätzlich greift p53 in verschiedene Stoffwechselwege, unter anderem in den Glukosestoffwechsel ein (Cheung, Vousden 2010). Sowohl die ATM-Kinase als auch AMPKα phosphorylieren p53 an Ser-15 (Canman, Lim et al. 1998, Banin, Moyal et al. 1998, Imamura, Ogura et al. 2001, Jones, Plas et al. 2005).

P53 hat zwei Funktionen. Auf der einen Seite unterstützt es das Überleben der Zelle, kann aber auch, wenn notwendig, den Zelltod begünstigen. Leichter Zellstress führt präventiv oder zur Reparatur von DNA-Schäden über p53 zu einem Zyklusarrest. Die Phosphorylierung von p53 führt zu einem Anstieg von p21 und der Expression antioxidanter Gene. Erhöhter Zellstress hingegen führt zu einem Anstieg des zytosolischen p53 Level und aktiviert prooxidante Gene. Dies führt zu einem Anstieg der freien Sauerstoffradikalen (ROS) und letztlich zur Zellalterung beziehungsweise zum Zelltod (Bensaad, Vousden 2007).

Unter niedrigen Glukosespiegeln und bei Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses phosphoryliert die aktivierte AMPKα p53. Ein G_1/S-Phasenarrest wird induziert und die Zelle vor der Apoptose geschützt (Imamura, Ogura et al. 2001, Jones, Plas et

al. 2005, Feng, Zhang et al. 2005). Bei länger andauerndem Glukosemangel fördert die AMPKα die p53 abhängige Zellalterung (Jones, Plas et al. 2005).

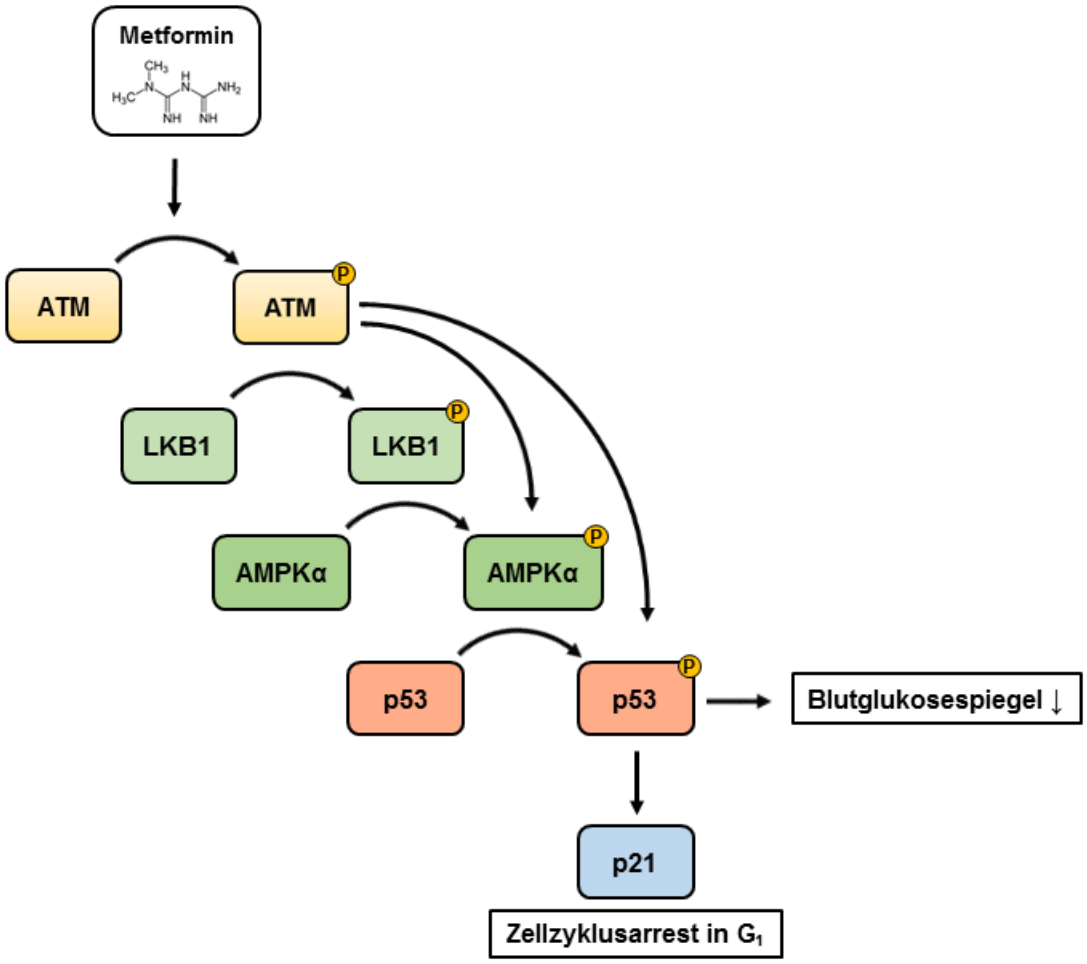


Abbildung 3: Aktivierung von p53 durch Metformin

Es ist eine Aktivierung der ATM (Ataxia teleangiectasia mutated)- Kinase nachgeschalteten Signalwege durch Metformin denkbar. P53 als Tumorsuppressor und Regulator des Gleichgewichts von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse könnte einen Wirkungsarm von Metformin darstellen. Die Phosphorylierung der ATM-Kinase würde letztlich direkt oder über die Phosphorylierung von LKB1 (Liver Kinase B1) und/oder der AMPKα (AMP-aktivierte Proteinkinase α) zur Phosphorylierung von p53 an Serin15 führen. Es käme zu einem Zellzyklusarrest durch den Anstieg von p21 oder eine Senkung des Blutglukosespiegels (eigene Darstellung, in Anlehnung an Birnbaum, Shaw 2011).

Eine Aktivierung von p53 über ATM und/oder AMPKα könnte eine Erklärung für die antikanzerogene und antiproliferative Wirkung von Metformin sein. Da p53 auch im Glukosestoffwechsel eine Rolle spielt, ist auch eine antidiabetogene Wirkung von p53 möglich (Abb. 3). Dies gilt es in den folgenden Versuchen zu untersuchen.

1.6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, das Wissen über die pleiotropen Effekte von Metformin zu erweitern und den Einfluss von Metformin auf den Tumorsuppressor p53 in B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCLs), einer prototypischen Surrogatzelllinie, von Patienten mit T2D zu untersuchen. T2D Patienten, die erfolgreich mit Metformin behandelt werden konnten, wurden dabei Therapieversagern gegenübergestellt, die zur Stoffwechselkontrolle orale Antidiabetika oder Insulin benötigten. In der Versuchsreihe wurde die DNA dieser T2D Patienten sequenziert und hinsichtlich genetischer SNP-Varianten analysiert. Es fanden sich bei den Versagern verschiedene SNP-Varianten im *ATM*-Gen.

Hieraus ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

1. Können Unterschiede bei den in vitro Versuchen zwischen Versagern mit und Ansprechern ohne Mutation im *ATM*-Gen gesehen werden?
2. Welchen Einfluss haben verschiedene Expositionen, insbesondere mit Metformin
    a. auf den Zellzyklus in einer B-LCL?
    b. auf die Apoptoserate in einer B-LCL?
    c. auf die pAMPKα/AMPKα-Konzentrationen?
    d. auf die p53-Konzentrationen, sowie die Konzentration des nachgeschalteten Phosphoproteins p21?

2. Material und Methoden

2.1. Das Patientenkollektiv

Es liegt ein positives Ethikvotum der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg (Aktenzeichen 133-02) vor. Dem Patientenkollektiv gehörten ausschließlich Patienten mit T2D an. Die Patienten wurden zwei Gruppen zugeteilt; zu den Ansprechern (A) zählten Patienten mit T2D, deren Blutzucker (BZ) mittels Metformin optimal eingestellt werden konnte (HbA1c kleiner 7,5% für die Dauer von mindestens 3 Jahren). Ihnen wurden „Therapieversager“ (V) gegenübergestellt, deren T2D bereits nach kurzer Zeit neben Metformin mit weiteren oralen Antidiabetika und/oder Insulin behandelt werden musste.

Die DNA-Sequenzierung wurde an einem Pool von 80 Probanden aus Ulm durchgeführt. Für die Zellversuche wurden aus diesem Pool 24 Probanden (Versager n=12, Ansprecher n=12) nach dem Zufallsverfahren ausgewählt. Zu den Versagern gehörten 5 männliche und 7 weibliche Probanden. Bei den Ansprechern war die Geschlechterverteilung ausgeglichen mit 6 weiblichen und 6 männlichen Probanden (Abb. 4a). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung lag bei der Gruppe der Versager bei 42,83 Jahren und bei der Gruppe der Ansprecher bei 50,83 Jahren (Abb. 4b). Der Body-Mass-Index (BMI) betrug im Durchschnitt 31,71 kg/m² bei den Ansprechern und 36,64.kg/m² bei den Versagern (Abb. 4c).

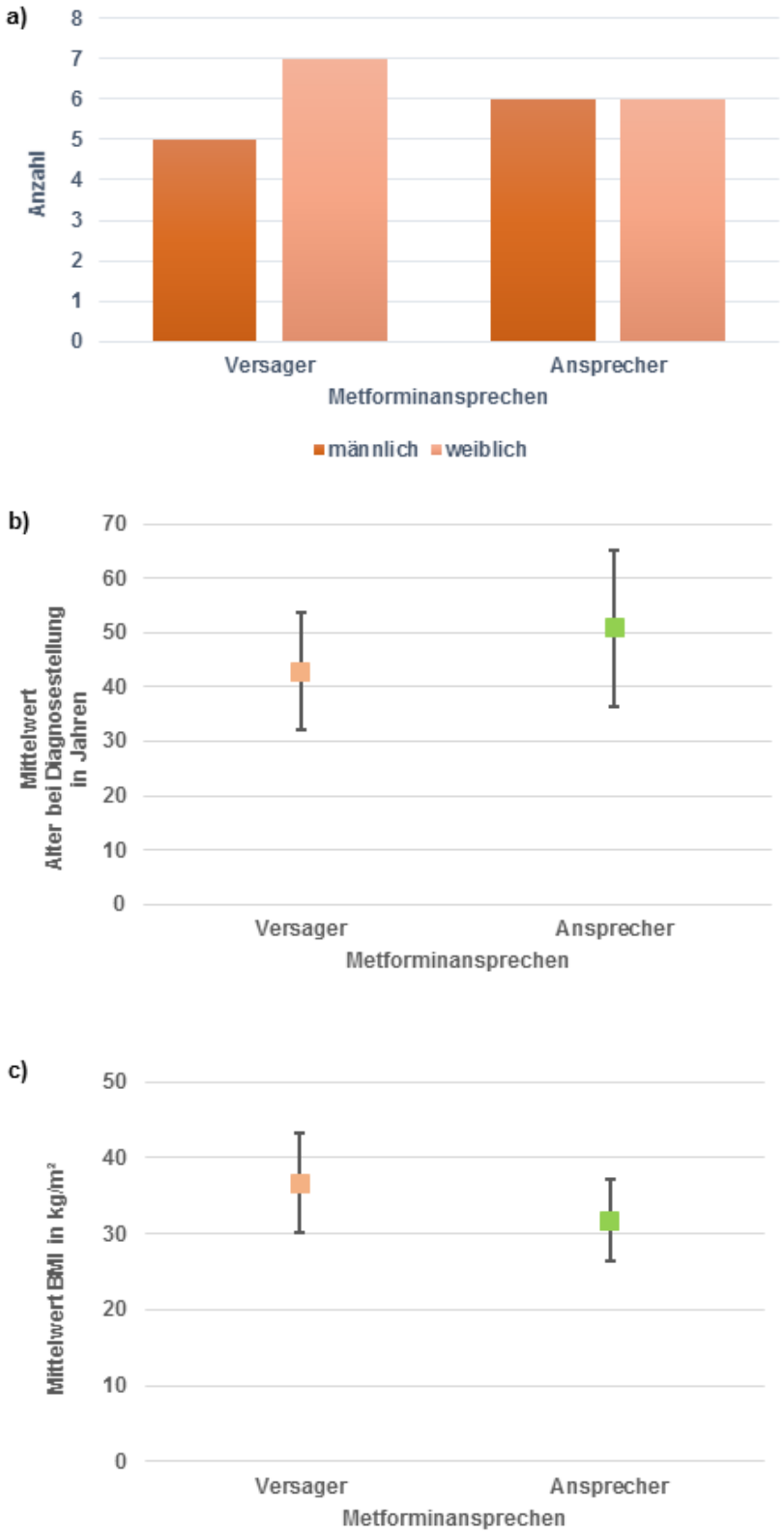


Abbildung 4: Das Patientenkollektiv

Patientenrekrutierung am Universitätsklinikum Ulm zwischen 2002 und 2011. Die Abbildung zeigt a) die Geschlechterverteilung; b) das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung mit Angabe der Standardabweichung und c) den durchschnittlichen Body-Mass-Index (BMI) mit Angabe der Standardabweichung bei Ansprechern und Versagern auf die Metformintherapie. Ansprechen = HbA1c kleiner 7,5% für die Dauer von mindestens 3 Jahren unter Metformintherapie; Versagen = HbA1c größer 7,5% und notwendige Therapieerweiterung.

2.2. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit dem Genome Centre des Scripps Research Institut, La Jolla, California und war Teil einer Fall-Kontroll-Studie mit insgesamt 6800 Individuen. Hierbei ging es darum Varianten zu identifizieren, die das individuelle Risiko, einen T2D zu entwickeln, erhöhen. Es erfolgte eine Targetsequenzierung mittels Illumina HiSeq, einer Next-Generation Technologie. Die Proben wurden in möglichst homogenen Gruppen sequenziert. Hierbei wurden unter anderem das Alter bei Diagnosestellung, das Alter bei Probenentnahme (Kontrollen) und der BMI berücksichtigt.

2.3. Zellbiologische Arbeitstechniken

2.3.1. Zelllinie und Zellkultur

2.3.1.1. Gewinnung von PBMCs

Zur Gewinnung der PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurde das Verfahren des Type 1 Diabetes Genetics Consortiums (T1DGC) eingesetzt um mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus heparinisierten Blutproben zu gewinnen (Rosinger, Nutland et al. 2010).

2.3.1.2. EBV-Transformation

Die Epstein-Barr-Virus (EBV)- Überstände zur EBV-Transformation wurden aus der lymphoblastoiden Marmosettenzelllinie B 95-8 gewonnen. Durch die Transformation mit EBV konnte eine unbegrenzte Proliferation der humanen B-Zellen erzielt werden.

Nach der Zentrifugation von bis zu 4 x 10^6 PBMC bei 1200 rpm für 10 min bei RT wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1,25 ml Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,2% Normocin™ in RPMI 1640 + GlutaMAX™-I) resuspendiert. Nach Zugabe von 1,25 ml EBV-Überstand und 2-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 erfolgte die Überführung des EBV-Ansatzes in Zellkulturflaschen unter Hinzugabe von 2,5 ml Cyclosporin A (CSA)-Medium. Nach dreiwöchiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 konnten Blasten in Form von aggregatbildenden

großen klaren Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen unter mehrmaligem Mediumwechsel. Sobald eine Zellzahl von ca. 5 Mio. Zellen erreicht wurde, konnten die Zellen bis zum Gebrauch in 1 ml Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

2.3.2. Exposition der Zellen

Materialien:

- Methyl-(5-[2-Thienylcarbonyl]-1H-Benzimidazol-2-YL) Carbamate (Synonym: Nocodazole, Sigma Aldrich)
- 1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride 97% (Synonym: Metformin, D150959 Sigma Aldrich)
- Lipopolysaccharide(LPS) (Sigma Aldrich)
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- 1X phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Zellzahlen abhängig vom Experiment:

- Apoptose/AnnexinV FACS: $0{,}5 \cdot 10^6$ Zellen pro Well
- Zellzyklusanalyse: $2{,}5\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well
- Westernblot pAMPKα/ AMPKα: $15 \cdot 10^6$ Zellen pro Stimulans
- p53/p21 FACS: $2{,}5\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well

Versuchsdurchführung:

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Das Medium bestand aus 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,2% NormocinTM in RPMI 1640 + GlutaMAXTM-I. Das Zellmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Ein Tag vor Exposition wurde das Zellmedium erneuert. Die Zellexposition fand stets um 9 Uhr morgens statt. Die Zellsuspension wurde in ein Falkon überführt und 10min bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 5ml Medium (37°C) wiederaufgenommen. Für die Zellzählung wurde ein Aliquot (10µl) der Zellsuspension mit 90µl Trypanblau gemischt. Anschließend konnte die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop in der Neubauerschen Zählkammer bestimmt werden. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellsupension mit Medium aufgefüllt bis eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml vorlag. Bei der Nocodazole-

Stimulation musste, aufgrund der Toxizität des DMSO, bereits im Vorfeld der Exposition das Nocodazole mit dem Medium gemischt werden, bevor die Zellsuspension darin aufgenommen wurde. Der DMSO-Gehalt lag somit unter 0,1 %. Die Konzentration von Nocodazole betrug 200ng/ml.

Die für die Westernblots präparierte Zellsuspension wurde unbehandelt, oder mit 1mM Metformin/ 10mM Metformin stimuliert und in Zellkulturflaschen 24h inkubiert.

Im Falle der FACS-Versuche (siehe 2.4; AnnexinV, Zellzyklusanalyse und p53/p21) wurden jeweils 3ml (Probe „Kein Stimulans“= Kontrolle/ base line), bzw. 2,5ml (1mM Metformin, 1mM Metformin +LPS, 10mM Metformin, 10mM Metformin + LPS, LPS, Bestrahlung mit 3,5 Gy/min für 2 min 50s (~10Gy)) auf die 6 Well-Platten pipettiert. Anschließend wurden die 6-Well-Platten wie folgt beimpft:

- Kein Stimulans
- Kein Stimulans
- 1mM Metformin
- 1mM Metformin +LPS
- 10mM Metformin
- 10mM Metformin + LPS
- LPS
- Bestrahlung mit 3,5 Gy/min für 2 min 50s (~10Gy)

Das LPS wurde 1h nach Exposition mit Metformin beigefügt.

2.4. Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie gelingt es, eine große Anzahl von Zellen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls auf verschiedene Eigenschaften hin zu untersuchen. Spezielle Antikörper, die mit Fluoreszenzen versehen sind, binden an die jeweilige Zellstruktur/ das Protein, das man nachweisen möchte. Wenn die Zellen nun einzeln einen Laserstrahl passieren, kann das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal von einem Detektor aufgenommen und ausgewertet werden.

2.4.1. Apoptose/Annexin V Durchflusszytometrie

In der frühen Apoptosephase von Zellen kommt es zu einem Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran. Das Membranphospholipid Phosphatidylserine (PS) translo-ziert von der Innenseite zur Außenseite der Membran. Annexin V, ein Calcium-abhängiges phospholipidbindendes Protein bindet mit hoher Affinität an PS. So können bereits frühapoptotische Zellen erkannt werden. Im weiteren Verlauf der Apoptose verliert die Zelle ihre Membranintegrität. Propidiumjodid (PI) kann sich in der spätapoptotischen, toten Zelle anreichern. Lebende Zellen sind folglich Annexin V und PI negativ (Abb. 5).

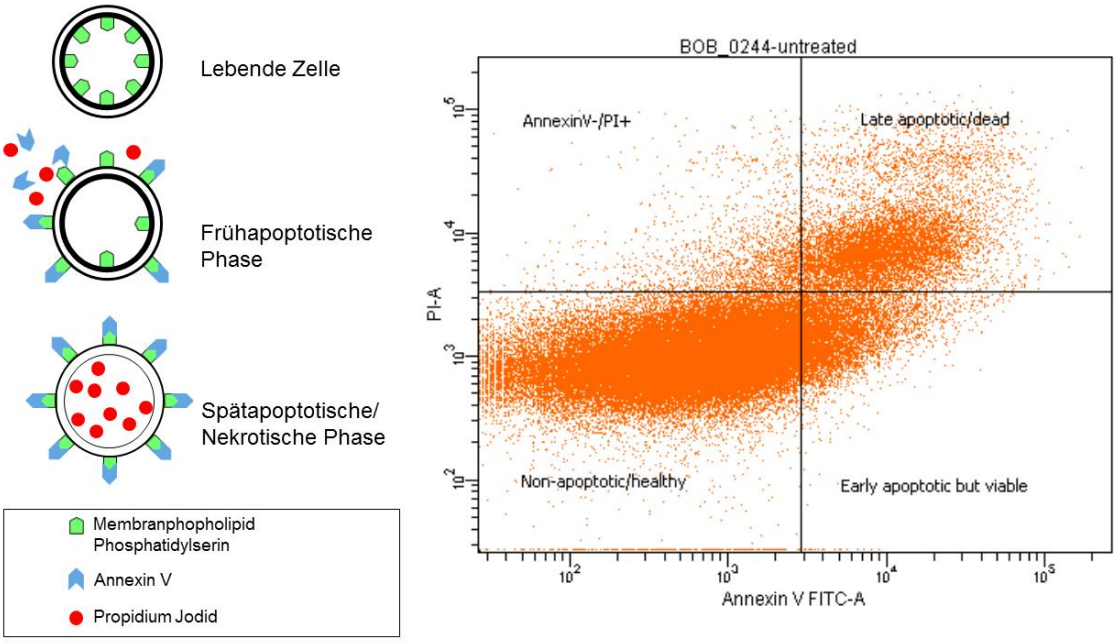


Abbildung 5: Das Prinzip der AnnexinV-/PI-Apoptose-Durchflusszytometrie

In der frühen Apoptosephase transloziert Phosphatidylserine (PS) von der Innenseite zur Außenseite der Membran. Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS. Nach dem Verlust der Membranintegrität kann sich Propidiumjodid (PI) in der spätapoptotischen, toten Zelle anreichern. Mittels der Durchflusszytometrie können nun die verschiedenen Phasen detektiert werden. Beispielhaft sieht man dies an der Probe BOB_0244. PI-A: PI-Area; AnnexinV FITC-A: AnnexinV- Fluorescein isothiocyanate-Area.

Materialien:

- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™)
- 1xPBS

Versuchsdurchführung:
Nach 24h Exposition erfolgte die Überführung von 300 µl der Zellsuspension in mit 2ml PBS gefüllte FACS-Röhrchen. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Nach Resuspension in 3ml einfachem PBS (Konzentration: 1x10^6 Zellen/ml) und anschließendem Vortexen wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Nach erneuter Zellen Resuspension im restlichen Überstand wurden jeweils 5µl FITC Annexin V und 5µl PI hinzugefügt. Die Proben wurden erneut gevortext und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. 250µl einfachen PBS wurde in jedes Röhrchen pipettiert und innerhalb von einer Stunde mittels Durchflusszytometrie (BD LSR II, BD Biosciences) analysiert.

2.4.2. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid

Während des Zellzyklus variiert der DNA-Gehalt der Zelle. In der G_0-Phase(Ruhe-Phase) beziehungsweise der G_1-Phase (Wachstumsphase) liegt ein diploider Chromosomensatz vor (2n). In der darauffolgenden Synthesephase (S-Phase) variiert der Chromosomensatz bis in der prämitotischen Phase (G_2-Phase) schließlich ein doppelter diploider Chromosomensatz vorliegt. Nach Permeabilisierung und Fixierung der Zelle mit Ethanol und Abbau der RNA durch die RNAse kann PI mit den Nukleinsäuren der DNA interkalieren. Ein höherer DNA-Gehalt korreliert mit einem erhöhten Fluoreszenzsignal in der Durchflusszytometrie (Abb.6).

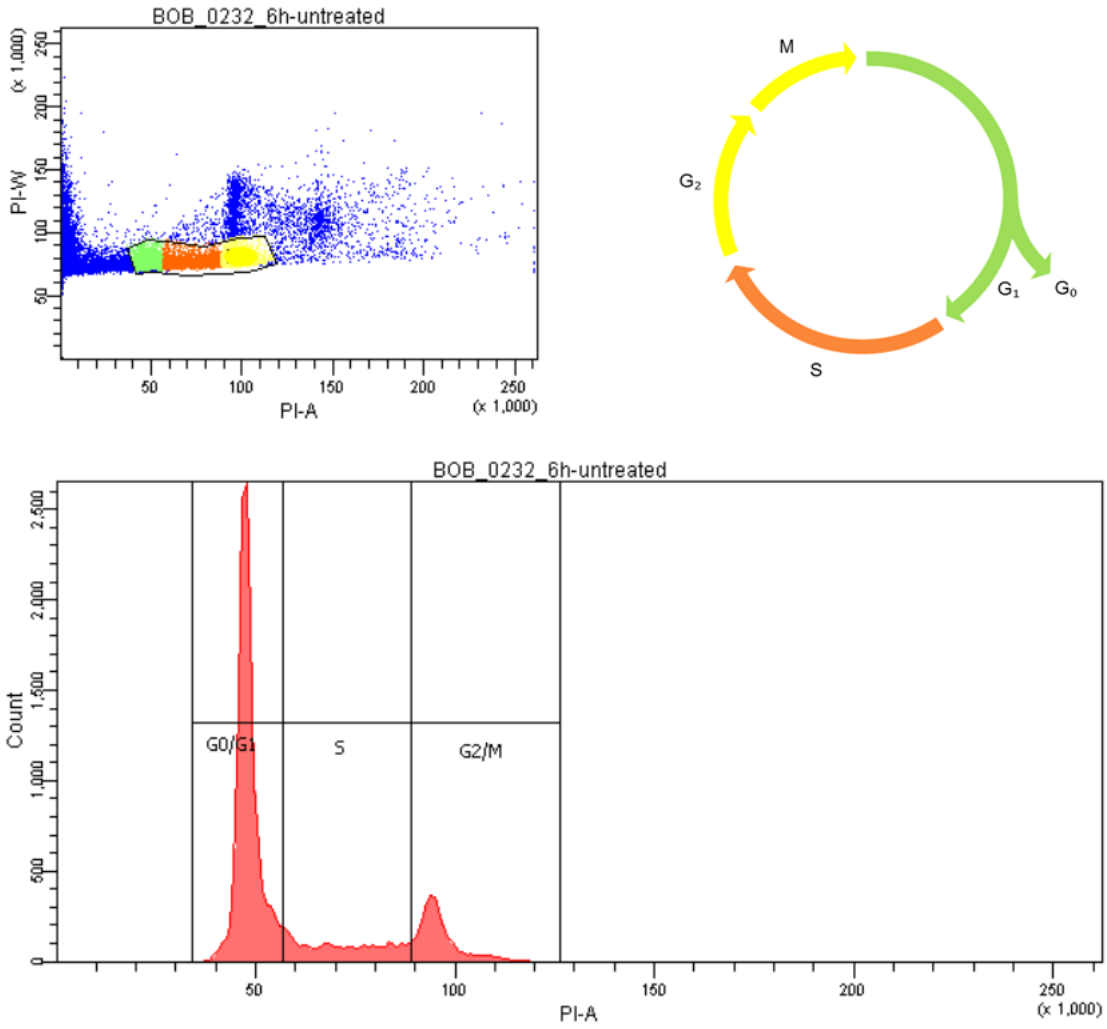


Abbildung 6: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Der DNA-Gehalt der Zelle variiert während des Zellzyklus (G_0-Phase(Ruhe-Phase) und G_1-Phase (Wachstumsphase): diploider Chromosomensatz (2n); Synthesephase (S-Phase): 2n-4n; prämitotischen Phase (G_2-Phase): doppelter diploider Chromosomensatz (4n)). Nach Permeabilisierung und Fixierung der Zelle interkaliert Propidiumjodid (PI) mit den Nukleinsäuren der DNA. In der Durchflusszytometrie zeigt sich bei höherem DNA-Gehalt ein erhöhtes Fluoreszenzsignal. Die Abbildung zeigt dies beispielhaft an der Probe BOB_0232.PI-A: PI-Area, PI-W: PI-Width

Materialien:

- RNAse A, Stocklösung: 100mg/ml (Quiagen)
- Propidiumjodid, Stocklösung: 1mg/ml (Sigma-Aldrich)
- 70% Ethanol
- 1xPBS

Versuchsdurchführung:
Es wurde 1ml der Zellsuspension (mit/ohne Nocodazole Synchronisierung) zu den verschiedenen Zeitpunkten (t_0= 0h, t_1 = 8h, t_2 = 24h) entnommen, abzentrifugiert und in 1ml eiskalten 70% Ethanol resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 250µl PBS resuspendiert. 1µl RNAse wurde jeder Probe beigefügt (Endkonzentration 0,4 mg/ml) und dann wurden die Proben bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 25µl PI hinzugegeben (Endkonzentration 50µg/ml) und es erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie (BD LSR II, BD Biosciences) innerhalb von einer Stunde.

2.4.3. p53/p21 FACS

Materialien:

- APC Mouse-Anti-Human CD19 (BD Pharmingen™)
- PE Mouse Anti-p53 Antibody Set (BD Pharmingen™)
- Normal Mouse-IgG, FITC conjugate (Millipore)
- Anti-$p21^{Waf1}$ (58-77) Mouse mAb (EA10) FITC (Calbiochem)
- Permeabilisierungsmedium (Reagens B) aus dem Fixierungs-und Permeabilisierungskit Fix &Perm® (ADG)
- 1xPBS
- PBS-BSA 1%
- PFA 2%
- 70% Ethanol

Versuchsdurchführung:
Zu verschiedenen Zeitpunkten t_x (t_0= 0h, t_1 = 3h, t_2 = 6h, t_3=12h. t_4 = 24h) wurden 500µl der Zellsuspension entnommen. Nach zwei Waschschritten mit PBS (4°C) wurden die Zellen im Überstand resuspendiert und mit 10µl CD19-PC7 Antikörper für 15min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das FACS-Röhrchen mit 1ml PFA 2% (-20°C) aufgefüllt und die Zellen 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 darauffolgenden Waschschritten mit PBS-BSA 1% wurden die Zellen in 70% Ethanol über Nacht bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die FACS-Röhrchen zentrifugiert. Im Anschluss folgten erneut zwei Waschschritte mit 1% PBS-BSA. Der Überstand wurde komplett verworfen und die Zellen wurden mit 100µl Permeabilisationsreagenz B für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die FACS-Röhrchen wurden danach mit 2ml 1%PBS-BSA aufgefüllt, aber nicht gevortext. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgeschüttet und die Zellen mit folgenden Antikörpern beimpft: Negativkontrolle „Kein Stimulans“: 20µl Mouse IgG-PE + 3µl Mouse IgG-FITC; die restlichen: 15µl p53-PE + 0,5µl p21-FITC. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 1% PBS-BSA gewaschen, abzentrifugiert und in 250µl 1%PBS-BSA resuspendiert und innerhalb von einer Stunde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.5. Westernblot

Der Westernblot wurde zum quantitativen Vergleich von Proteinmengen zwischen einzelnen Proben eingesetzt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Primärantikörper binden spezifisch an das nachzuweisende Protein, die Phospho-AMPKα, bzw. die AMPKα, und mittels eines Sekundärantikörpers und einer anschließenden Peroxidasereaktion mit dem Detektionsreagenz können die spezifischen Banden sichtbar gemacht werden.

2.5.1. Zelllyse und Bradford-Assay

Materialien:

- Loading Buffer 4x
- Lysepuffer:
- 150mM NaCL
- 50mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), pH 8,0
- 1% NP40 (IGEPAL)
- 1x PhosStop
- 1x Complete Mini
- dH_2O

Versuchsdurchführung:

Das Zellpellet wurde in dem 150µl Lysepuffer aufgenommen und 15-20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20min bei 12000rpm abzentrifugiert und

der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. 1µl Probe wurde mit 4µl Bradford-Lösung in einer Küvette gemischt und anschließend im Biophotometer 6131 (Eppendorf) analysiert.

2.5.2. Westernblot

Materialien:

- Mini-Protean® 3Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ (Bio-Rad Labaratories, Inc.)
- iBlot (invitrogen)
- Lösungen und Puffer:
    - Tris-Glycin-Buffer 1x
        - Tris-Glycin-10x Buffer
        - ddH_2O
    - 10xTBST (1Liter):
        - 200mM Tris
        - 1,5M NaCl
        - 1%Tween 20
        - ddH_2O
        - pH mit 37% HCl auf 7,5 titrieren
        - für 1xTBST mit ddH_2O weiter verdünnen
- Blockierungspuffer:
    - Amersham ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare)
    - TBST 1x
- Primärantikörper:

  Der Primärantikörper wurde nach Herstelleranweisung in 1xTBST, 5%BSA pH7.0 (SERVA Electrophoresis GmbH) gelöst (Konzentration 1:1000).
    - Phospho-AMPKα (Thr172) Antibody (Cell Signaling Technology®)
    - AMPKα Antibody (Cell Signaling Technology®)
    - β-Aktin
- Sekundärantikörper:

  Der Sekundärantikörper wurde in 20ml TBST und 1ml Roti®Block gelöst (Konzentration 1:5000).

    - Amersham ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey) (GE Healthcare
- Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (#RPN2232, GE Healthcare)
- Restore™Plus Western Blot Stripping Buffer (#46430, Thermo Scientific)
- Hyperfilm ECL GE Healthcare,

Versuchsdurchführung:
Gele wurden nach Herstelleranweisung (Bio-Rad) gegossen und in die Westernblotkammern eingebaut. Die bereits vorbereiteten Proben und der Proteinstandard wurden gevortext und 25µl in die Geltaschen eines 12% Gels aufgetragen. Dann liefen die Proben bei einer Spannung von 80mV in das Gel. Nach ungefähr 20min konnte die Spannung auf 110mV erhöht werden. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele auf die PVDF-Membran geblottet (iBlot™ Transfer Stack, Regular (Nitrocellulose), invitrogen). Das Blotten erfolgte mit dem iBlot (invitrogen) 7min lang bei Programm 3. Bei dem i-blot handelt es sich um ein dry-blot-Verfahren. Die Membran wurde beschriftet und in Blocking-Lösung für mindestens 1h unter ständiger Bewegung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST abgespült und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschzyklus (4x 5min in TBST). Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei RT unter ständiger Bewegung und einem erneuten Waschzyklus wurde das Detektionsreagenz auf die PVDF-Membran pipettiert. Nach 4 min ließ man die Flüssigkeit ablaufen und legte die PVDF zwischen zwei Folien in die Röntgenkassette. Die Filmentwicklung erfolgte manuell in der Dunkelkammer. Die Belichtungszeit wurde individuell bestimmt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels ImageJ Program.

2.6. Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Software SPSS 21 (IBM). Es wurden eine unifaktorielle Varianzanalyse, sowie eine Multivariatanalyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0.05$. Die Graphiken wurden mit Microsoft Excel und Microsoft Power Point erstellt.

2.7. Übersicht

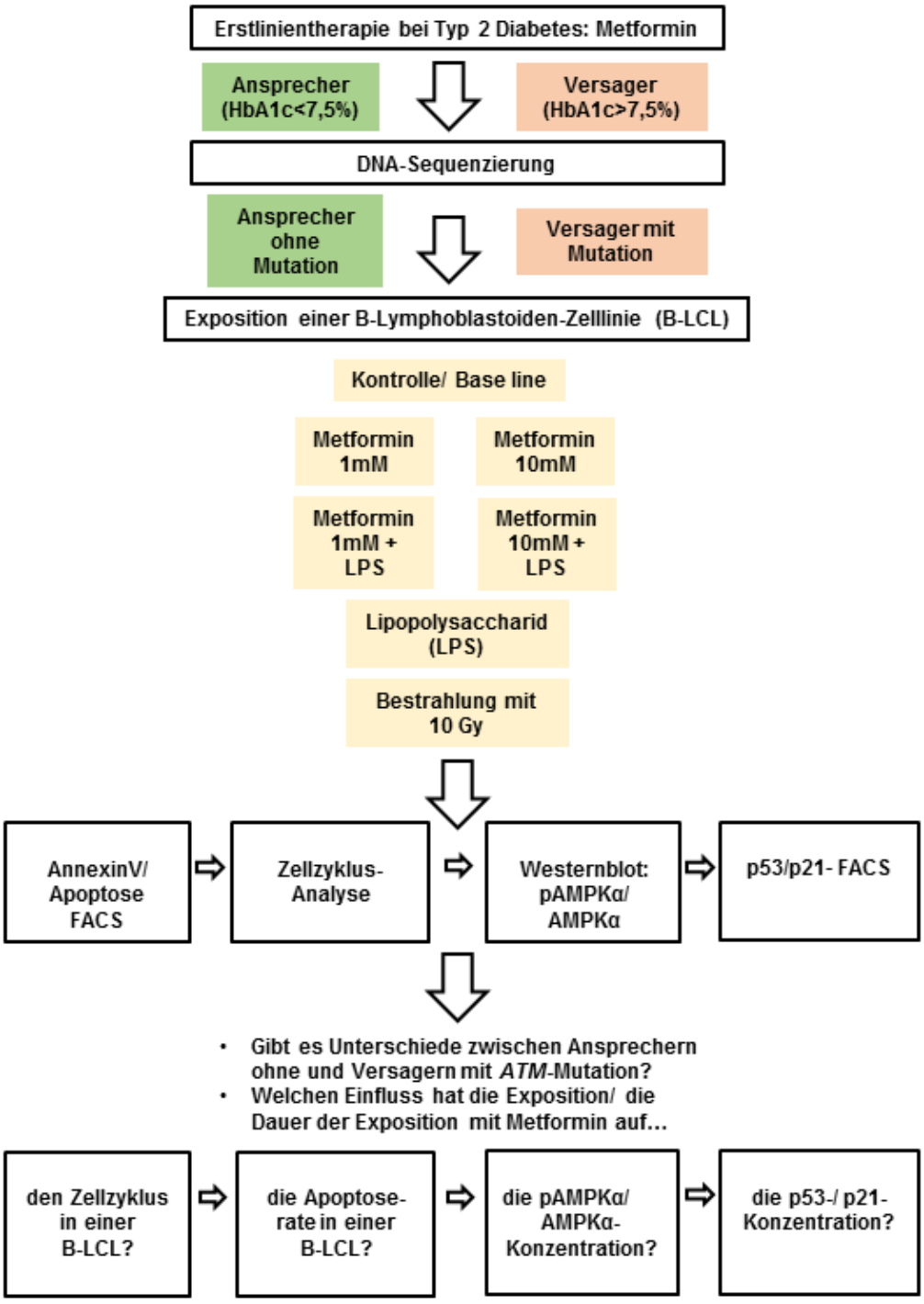


Abbildung 7: Der Versuchsablauf

Versuchsablauf am zwischen 2002 und 2011 gewonnenen Patientenkollektiv aus Ulm. Nach Einteilung in therapieversager und -ansprecher erfolgte eine DNA-Sequenzierung. Hier konnte eine Mutation im *ATM* (Ataxia teleangiectasia mutated)- Gen bei Therapieversagern nachgewiesen werden. Anschließend erfolgten weitere Untersuchungen um die Wirkung von Metformin und den Unterschied zwischen Therapieversagern und- ansprechern näher zu untersuchen. (p)AMPKα: (phosphorylierte) AMP-aktivierte Proteinkinase α; FACS: Fluorescence-activated cell sorting.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Bei der DNA-Sequenzierung wurden ausschließlich exonische Veränderungen ausgewählt. Es konnte eine hohe Qualität bei der eingesetzten DNA-Analysetechnik erreicht werden. Für alle untersuchten Personen lagen auswertbare Datensätze vor. Die „Call rate“, oder auch Genotypisierungsrate, betrug 100%. Insgesamt erwies sich der SNP rs1800054 auf Chromosom 11, auch als S49C bekannt, im *ATM*-Gen im Vergleich zwischen Metformin Ansprechern und Nicht-Ansprechen in einer Population von 1880 Probanden als signifikant different. Im Gegensatz zum üblichen Standard (30fach) lag die Sequenz mehr als 60-80x pro untersuchter Person vor.

Der PolyPhen2- Wert sagt die Wahrscheinlichkeit einer Funktionsbeeinträchtigung durch eine DNA- Variation (- Mutation) voraus. Dabei bedeutet 1, eine 100%-ige Proteinschädigung nach dem Vorhersagemodell, 0.995 eine 99%-ige Vorhersagewahrscheinlichkeit für einen funktionellen Schaden. Die Wahrscheinlichkeit für eine strukturelle und damit funktionelle Veränderung des Proteins lag zwischen 50% und 99,9%. In Tab.1 sind die einzelnen Mutationen detailliert aufgezeigt.

Tabelle 1: Übersicht SNP im Bereich *ATM* bei Therapieversagern auf Metformin

SNP-Nummer	Chromosom	Position	Gen	Exon/ Intron	Referenz	Variante	Polymorphism Phenotyping v2-score/ Vorhersage
1	11	108098576	*ATM*	Exon	C	G	0.413/ Possibly Damaging
2	11	108098354	*ATM*	Exon	G	A	0.999/ Probably Damaging
3	11	108098545	*ATM*	Exon	A	G	0.946/ Probably Damaging
4	11	108160488	*ATM*	Exon	C	G	0.945/ Probably Damaging

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; *ATM*: Ataxia teleangiectasia mutated- Gen.

3.2. Metformin und die Apoptoseinduktion

Wie bei den folgenden Versuchen wurden die Zellen im Voraus Metformin 1mM, M1+LPS, Metformin 10mM, M10+LPS, LPS und 10Gy-Bestrahlung (Positivkontrolle) exponiert und nach 24h mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mittels AnnexinV-Apoptose-FACS konnten die Zellen in 4 verschiedene Gruppen: lebende, frühapoptotische, spätapoptotische und tote Zellen eingeteilt werden.

Es zeigte sich in der anschließend durchgeführten Multivariatanalyse, dass die Anzahl der Zellen in dem jeweiligen Zellstadium zwischen den einzelnen in vitro Behandlungen sich nicht signifikant unterschieden. Über 80% der Zellen waren zum Versuchszeitpunkt lebend, allenfalls frühapoptotisch. Lediglich im Anschluss an die Bestrahlung mit 10Gy kam es zu einer signifikant erhöhten Zellzahl der spätapoptotischen Zellen (Abb.8). Zudem zeigte sich kein Unterschied zwischen Ansprechern ohne Mutation (N=4) und Versagern mit Mutation (N=4). Weder die *ATM*-Mutation noch die Exposition (ausgenommen die Positivkontrolle) zeigen hier eine Wirkung auf den Anteil der (spät-)apoptotischen Zellen.

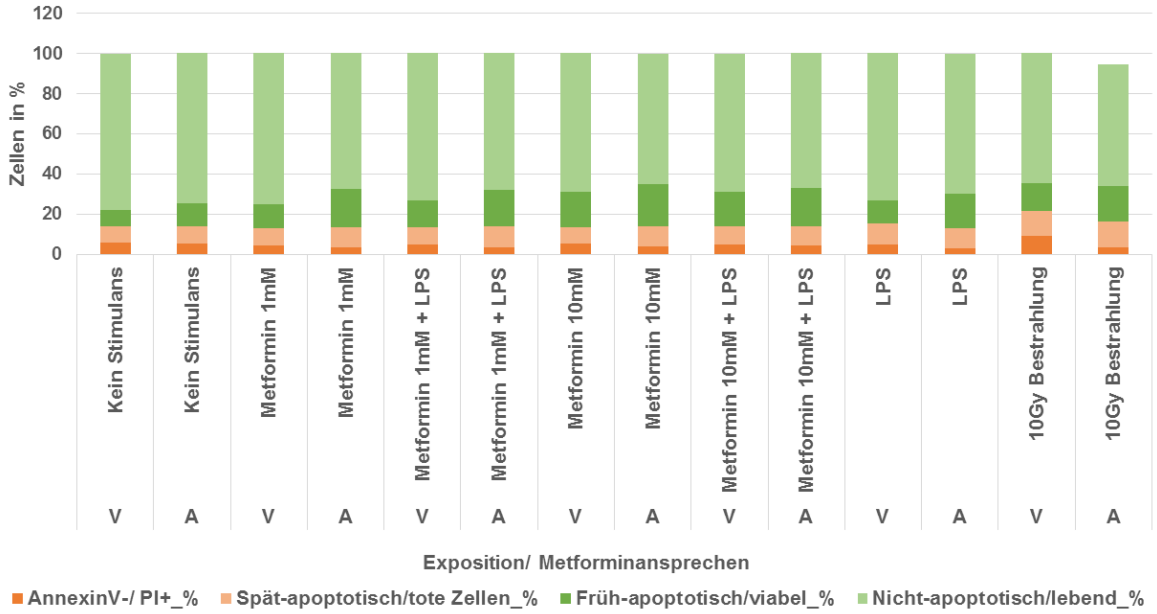


Abbildung 8: Deskriptive Auswertung der AnnexinV-/PI-Apoptose Durchflusszytometrie

Anteil der B-Lymphoblastoiden Zellen im jeweiligen Apoptosestadium (spätapoptotisch/tot, frühapoptotisch/viabel, nicht-apoptotisch lebend) in Abhängigkeit von der jeweiligen Exposition und dem Metforminansprechen (N (Versager)=4; N(Ansprecher)=4). Die Darstellung zeigt in der Farbe Grün den Anteil lebender Zellen. In den Farben orange/ rot sind die apoptotischen/ toten Zellen dargestellt. Unterschiede zwischen Ansprechern (A) und Versagern (V) sind nicht zu erkennen. Bei der Mehrzahl der Zellen (>80%) handelte es sich um lebende/ frühapoptotische Zellen. LPS: Lipopolysaccharide.

3.3. Der Einfluss von Metformin auf den Zellzyklus

Zentrale Fragestellung für diesen Versuch war, ob es einen Unterschied gibt, in welcher Zellzyklusphase Metformin auf die Zelle einwirkt, und ob die Exposition gegenüber Metformin die Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase arretiert. Um dies näher zu beleuchten wurde eine FACS-basierte Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Zellen wurden analog zu den anderen Versuchsansätzen wie folgt exponiert: „Kein Stimulans“, Metformin 1mM (+LPS), Metformin 10mM (+LPS), LPS und 10Gy Bestrahlung. Um auch einen möglichen Fehler durch die unterschiedliche Verteilung der Zellen auf verschiedene Zellzyklsphasen auszuschließen, wurde zunächst eine Versuchsreihe bei unbehandelten Zellen durchgeführt, als auch eine Versuchsreihe bei Zellen, die vorher mittels dem Zytoskelett-Inhibitor Nocodazole in der G2/M-Phase arretiert wurden.

Bei der Versuchsreihe mit unbehandelten Zellen zeigten die verschiedenen Expositionen keine signifikante Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung in der Multivariatanalyse (Abb. 9) und auch kein signifikanter Unterschied zwischen Versagern und Ansprechern (Abb.9 a-b).

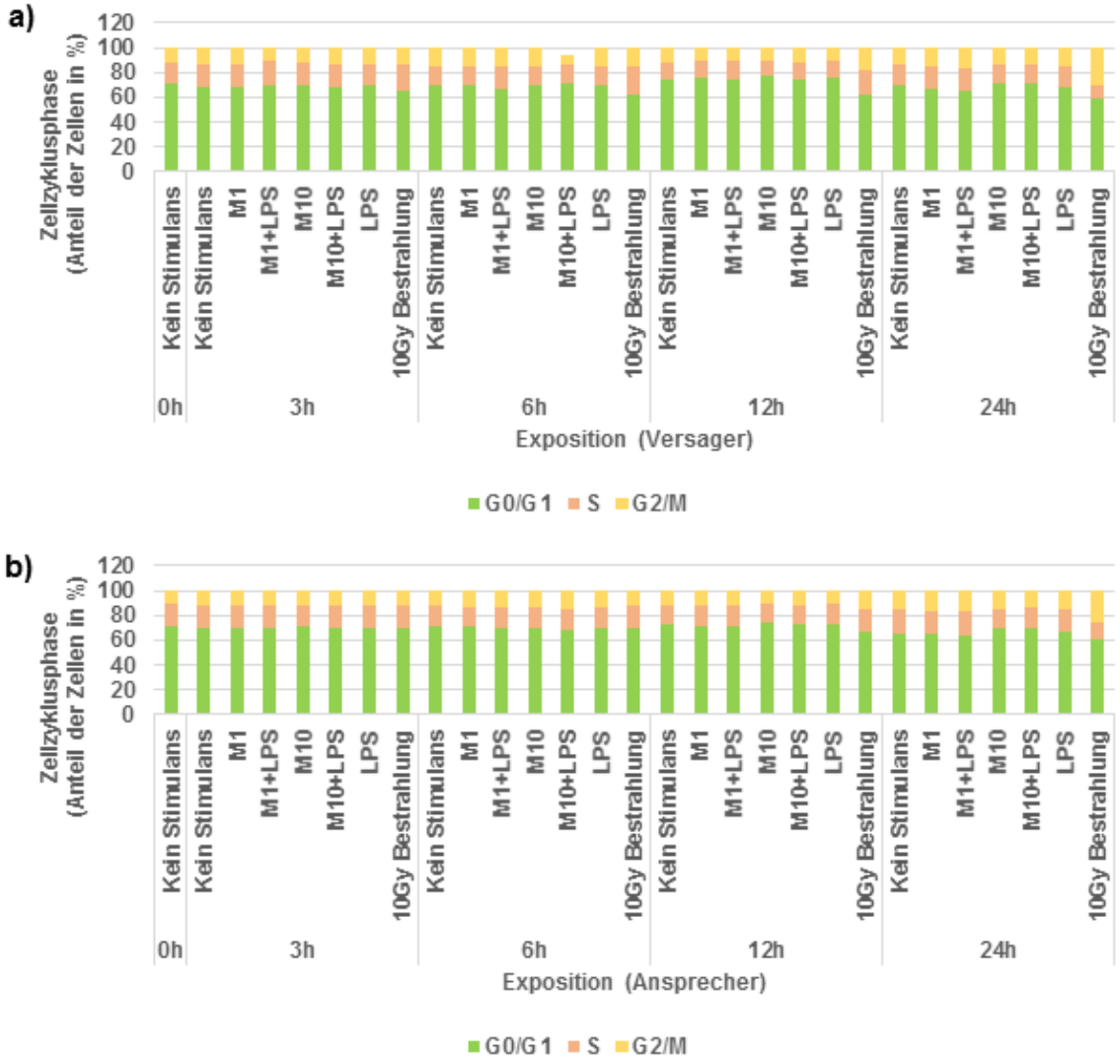


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse ohne Nocodazole

a) - b) Deskriptive Darstellung der Zellanteile in der jeweiligen Zellzyklusphase (Mittelwert) nach Exposition der B-Lymphoblastoiden Zellen mit Metformin 1mM (M1), Metformin 10mM (M10), M1+LPS, M10+LPS, LPS (Lipopolysaccharide), und nach Bestrahlung mit 10Gy bei Ansprechern (A) und Versagern (V) auf eine Metformintherapie. N=4; N(V)=2, N(A)=2. G_0/G_1: Ruhe-/ Wachstumsphase; S: Synthesephase; G_2: prämitotische Phase.

Auch nach Nocodazole-Gabe zeigten die verschiedenen Expositionen keine signifikante Veränderung in der Zellzyklusphasenverteilung (Abb. 10). Insbesondere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Versagern und Ansprechern der Metformintherapie (Abb. 10 a-b).

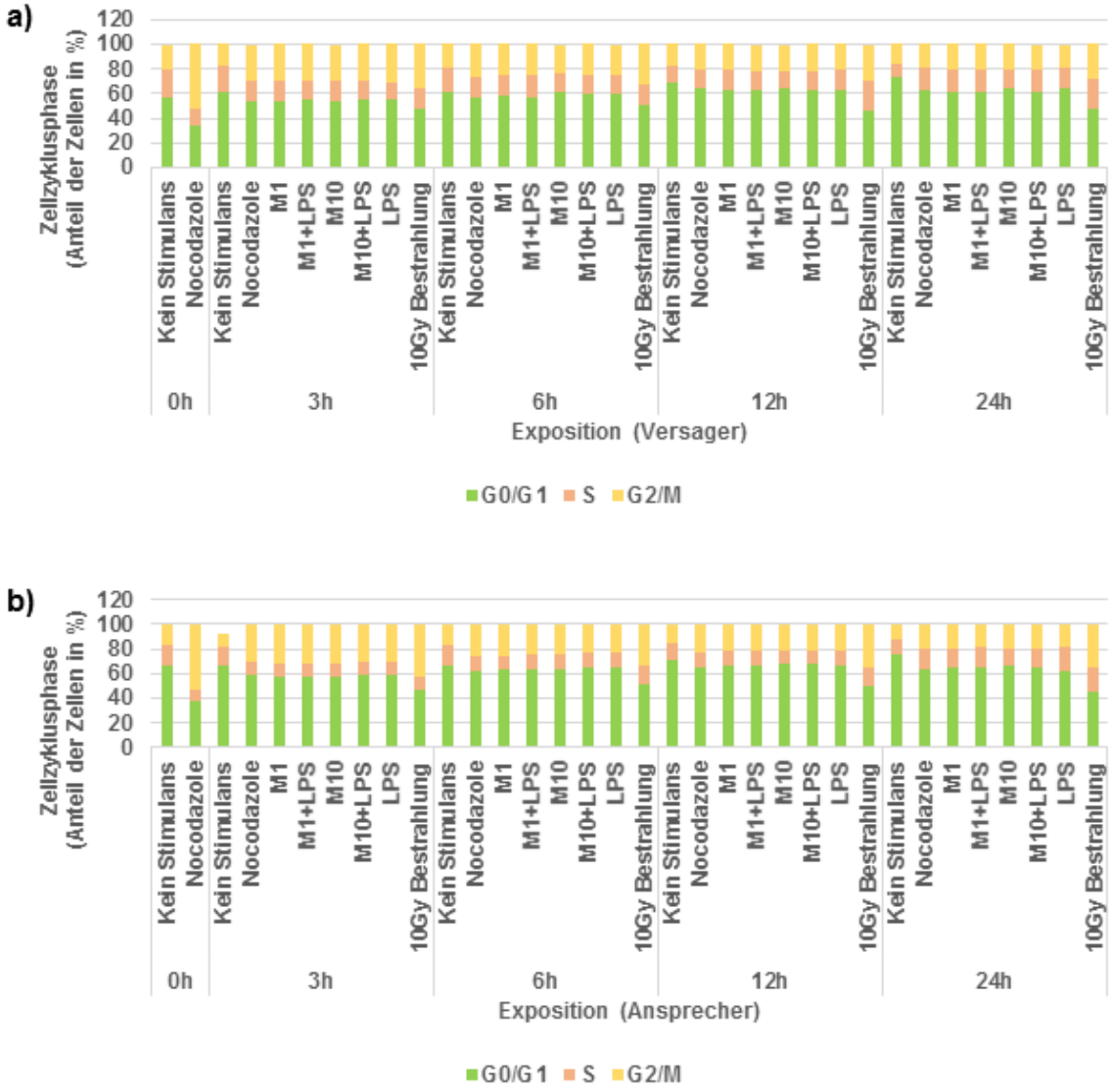


Abbildung 10: Zellzyklusanalyse mit Nocodazole

a) - b) Deskriptive Darstellung der Zellanteile in der jeweiligen Zellzyklusphase (Mittelwert) nach Stimulation der B-Lymphoblastoiden Zellen mit Nocodazole (bis auf die Proben „Kein Stimulans“) und anschließender Exposition mit Metformin 1mM (M1), Metformin 10mM (M10), M1+LPS, M10+LPS, LPS (Lipopolysaccharide) und nach Bestrahlung mit 10Gy bei Ansprechern (A) und Versagern (V) auf eine Metformintherapie. N=4; N(V)=2, N(A)=2. G_0/G_1: Ruhe-/ Wachstumsphase; S: Synthesephase; G_2: prämitotische Phase.

3.4. Metformin und die pAMPKα/ AMPKα

Mittels Westernblotanalyse wurden die pAMPKα und AMPKα Konzentrationen nach Exposition mit „Kein Stimulans“, Metformin 1mM und Metformin 10mM bestimmt, um zum einen den Einfluss der Exposition und zum anderen den Unterschied zwischen Versagern mit und Ansprechern ohne Mutation im *ATM*-Gen zu quantifizieren.

Im ersten Teil der Westernblotversuche ging es um den Vergleich zwischen Ansprechern und Versagern. Hierfür wurden 8 ausgewählte Proben, 4 aus jeder Gruppe auf ein Gel aufgetragen. Jedes Gel wurde sowohl mit pAMPKα- als auch AMPKα-Antikörpern untersucht. Die Banden wurden anschließend mittels ImageJ quantifiziert.

Die Färbung mit pAMPKα -Antikörpern zeigte in der Univariatanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen Versagern und Ansprechern, weder bei den Proben „Kein Stimulans“, noch bei den Probegruppen nach Exposition mit 1mM Metformin und 10mM Metformin (Abb. 11 a-d).

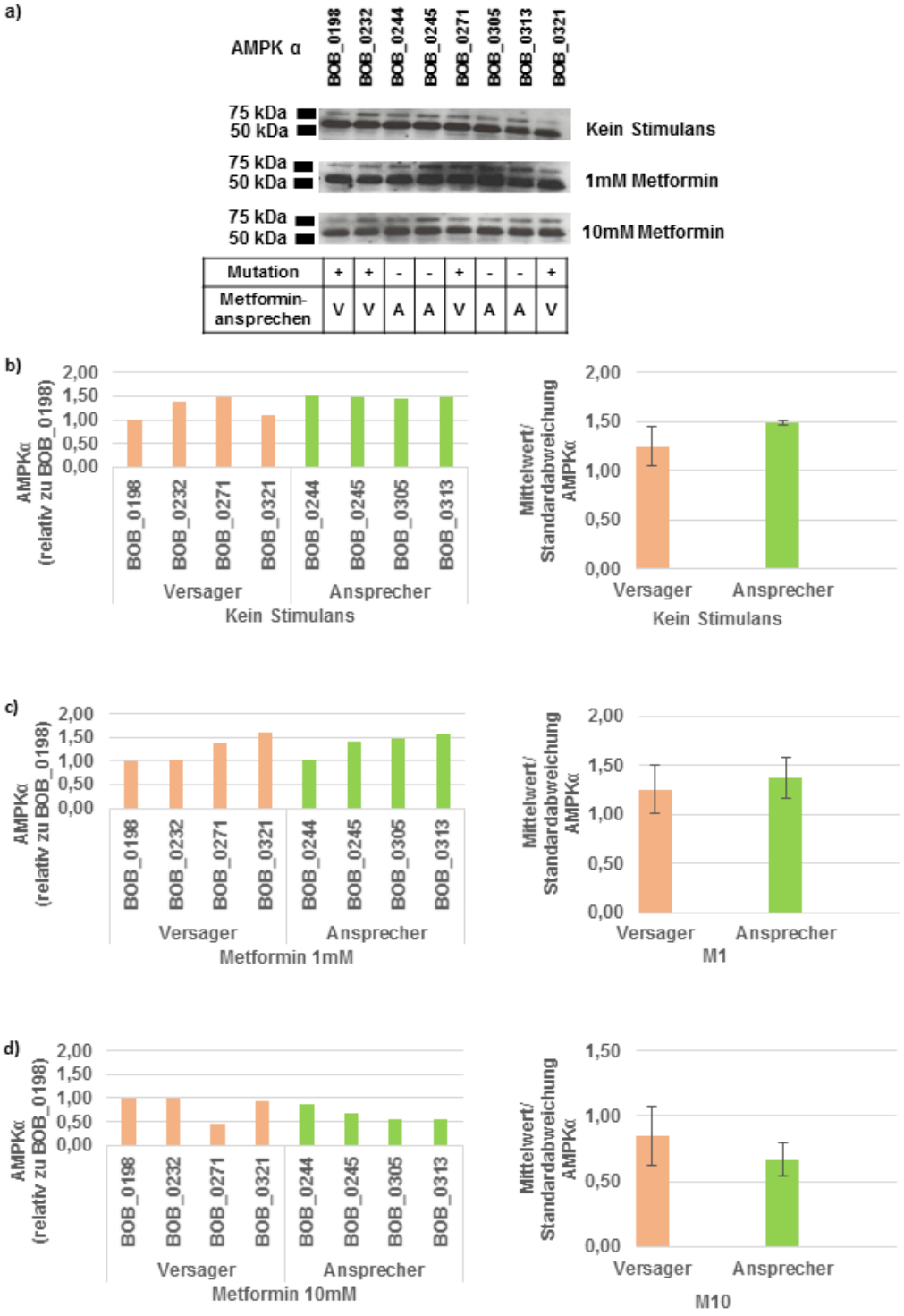


Abbildung 11: AMPKα – Unterschiede zwischen Versagern und Ansprechern

Westernblotanalyse mit AMPKα (AMP-aktivierte Proteinkinase α) - Antikörpern. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie wurde vor dem Versuch Metformin 1mM (M1) und 10mM (M10) exponiert. Zum Vergleich zwischen Metformin-Ansprechern (A) ohne und Versagern (V) mit *ATM (Ataxia teleangiectasia mutated* Gen) - Mutation (N(Gesamt)=8, N(V)=4, N(A)=4) wurden diese auf einem Gel nebeneinander aufgetragen und geblottet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die statistische Auswertung mittels Univariatanalyse. **a)** Westernblotergebnisse für „Kein Stimulans“, Metformin 1mM (M1) und Metformin 10mM (M10) **b)** ImageJ-Analyse „Kein Stimulans“ **c**) ImageJ-Analyse M1 **d)** ImageJ-Analyse M10

Die Färbung mittels pAMPKα -Antikörpern erfolgte bereits im Voraus. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung der pAMPKα gesehen werden, weder bei den Zellen „Kein Stimulans“ noch bei Metformin 1mM oder 10mM (Abb.12a-d).

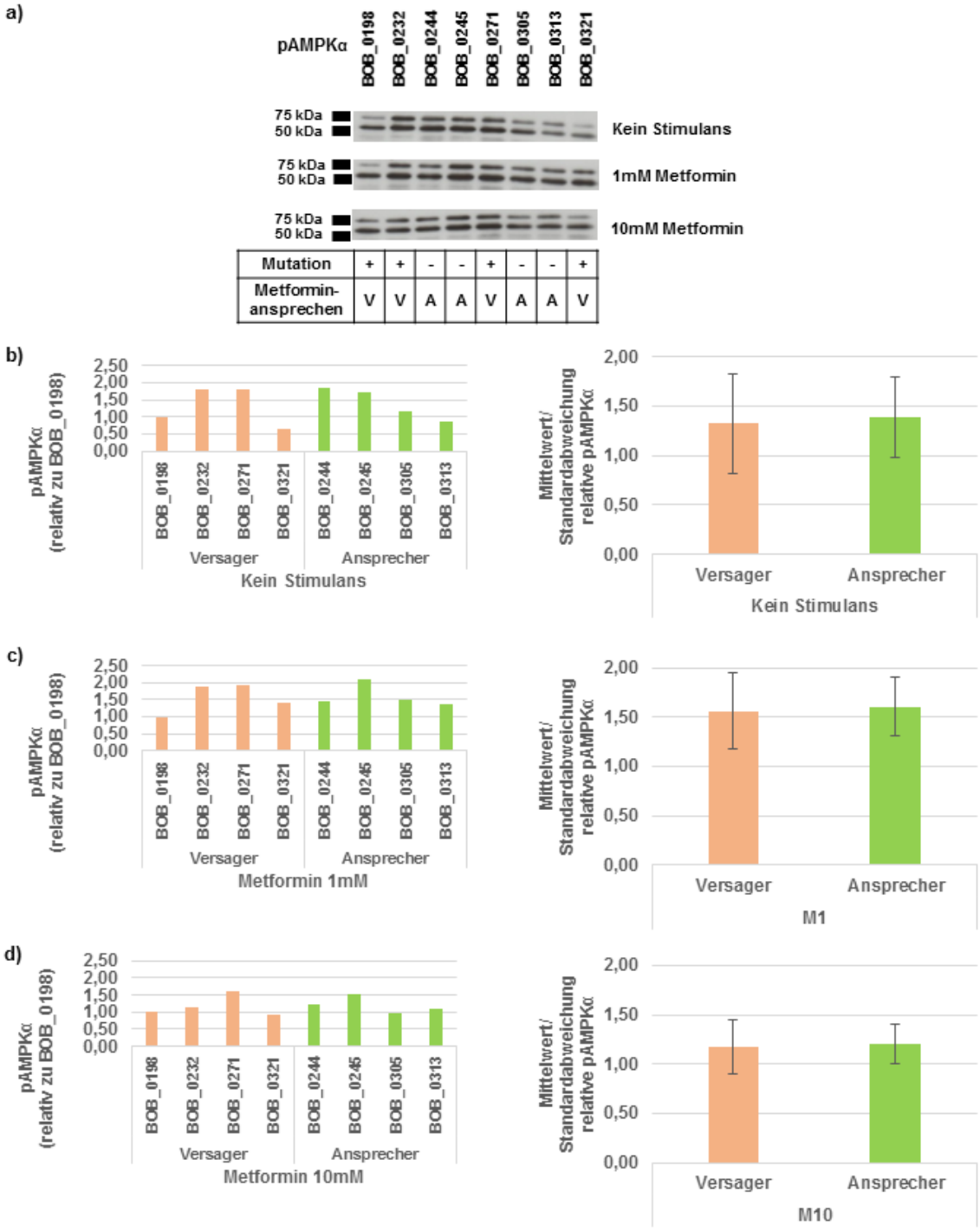


Abbildung 12: pAMPKα – Unterschiede zwischen Versagern und Ansprechern

Westernblotanalyse mit pAMPKα (phosphorylierte AMP-aktivierte Proteinkinase α) -Antikörpern. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie wurde vor dem Versuch Metformin 1mM (M1) und 10mM (M10) exponiert. Zum Vergleich zwischen Metformin-Ansprechern (A) ohne und Versagern (V) mit *ATM (Ataxia teleangiectasia mutated* Gen*)* -Mutation (N(Gesamt)=8, N(V)=4, N(A)=4) wurden diese auf einem Gel nebeneinander aufgetragen und geblottet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die statistische Auswertung mittels Univariatanalyse. **a)** Westernblotergebnisse für „Kein Stimulans“, Metformin 1mM und Metformin 10mM. **b)** ImageJ-Analyse „Kein Stimulans“ **c**) ImageJ-Analyse M1 **d)** ImageJ-Analyse M10

Auch beim internen Vergleich innerhalb der jeweiligen Probe zeigte sich keine signifikante Steigerung der pAMPKα- Konzentrationen (Abb. 13a-d). Tendenziell steigt die pAMPKα- Konzentration mit Zunahme der Metformin- Konzentration an (Abb. 13c-d).

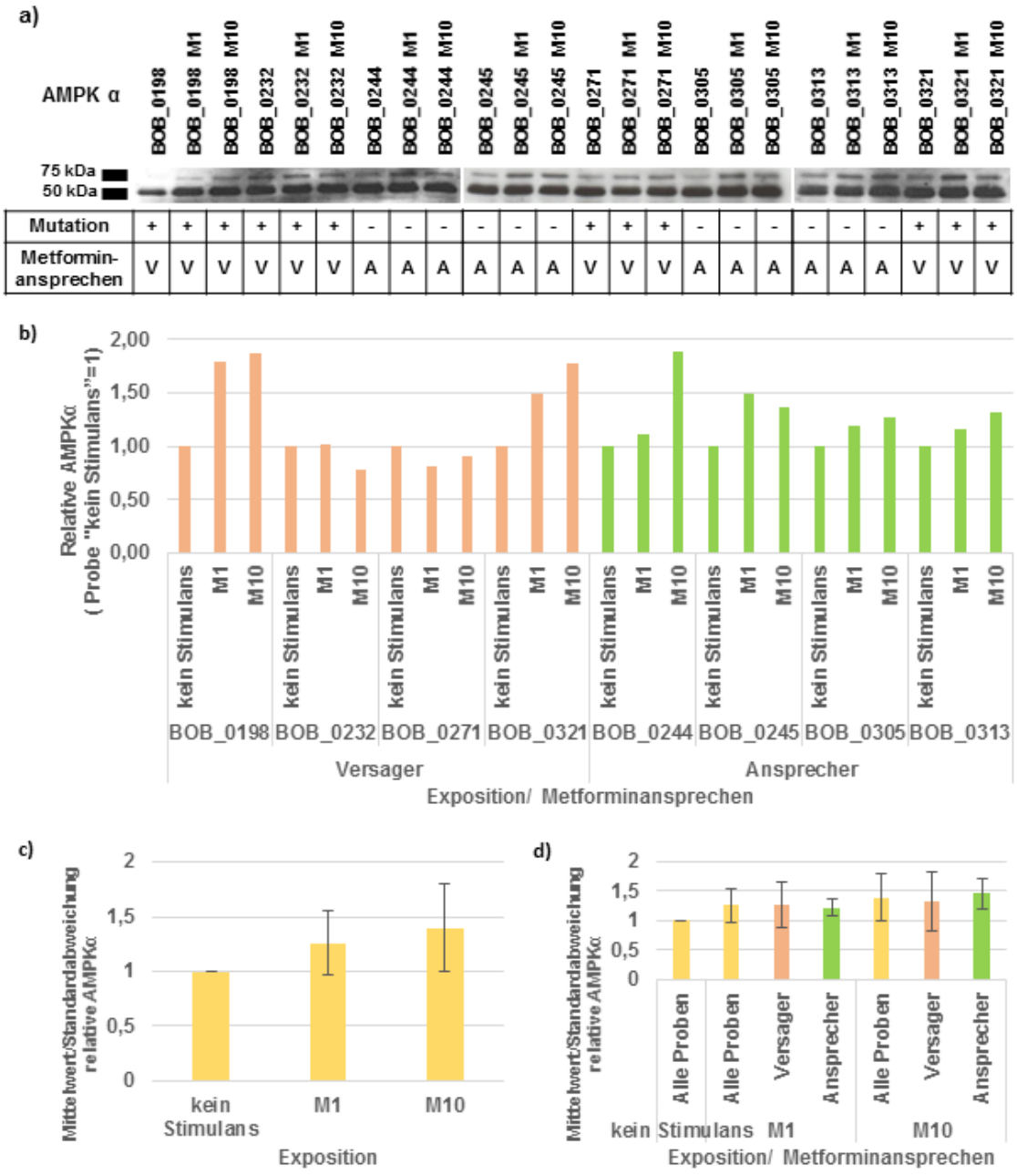


Abbildung 13: AMPKα – Einfluss der Exposition

Westernblotanalyse mit AMPKα (AMP-aktivierte Proteinkinaseα) - Antikörpern. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie wurde vor dem Versuch Metformin 1mM (M1) und 10mM (M10) exponiert. Um den Einfluss der Exposition zu untersuchen, wurde für jede Probe „Kein Stimulans“, M1 und M10 nebeneinander aufgetragen und geblottet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die statistische Auswertung mittels Univariatanalyse. **a)** Westernblotergebnisse für die verschiedenen Proben nach Exposition („Kein Stimulans“, M1, M10). Auch das Metforminansprechen ist aufgezeigt: A=Ansprecher ohne und V=Versager mit *ATM (Ataxia telean-giectasia mutated* Gen*)* - Mutation (N(Gesamt)=8, N(V)=4, N(A)=4) **b)** ImageJ-Analyse der Westernblotergebnisse aus a). **c**) Mittelwerte der relativen AMPKα-Konzentration bei „Kein Stimulans“, M1 und M10 **d)** Mittelwerte der relativen AMPKα-Konzentration bei den verschiedenen Expositionen gesplittet in Ansprecher und Versager.

Vergleichbar sind hier auch die Ergebnisse bei der pAMPKα. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen „Kein Stimulans“, „Metformin 1mM“ und „10mM Metformin“ gezeigt werden (Abb. 14a-d). Auch hier korreliert der Anstieg der Metforminkonzentration mit einem Anstieg der pAMPKα -Konzentration (Abb. 14c-d).

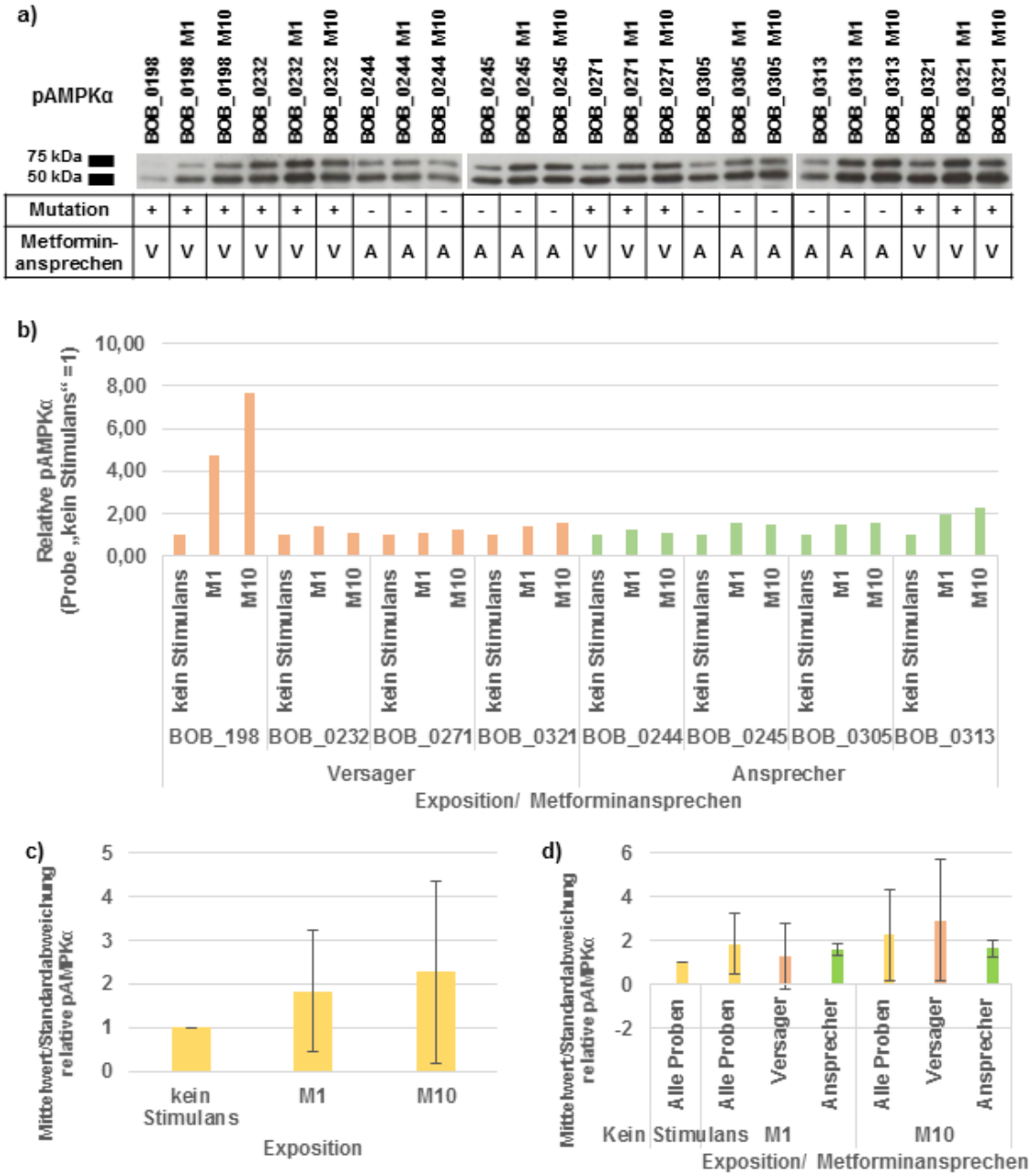


Abbildung 14: pAMPKα – Einfluss der Exposition

Westernblotanalyse mit pAMPKα (phosphorylierte AMP-aktivierte Proteinkinaseα) - Antikörpern. Die B-Lymphoblastoide Zelllinie wurde vor dem Versuch Metformin 1mM (M1) und 10mM (M10) exponiert. Um den Einfluss der Exposition zu untersuchen, wurde für jede Probe „Kein Stimulans", M1 und M10 nebeneinander aufgetragen und geblottet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die statistische Auswertung mittels Univariatanalyse. **a)** Westernblotergebnisse für die verschiedenen Proben nach Exposition („Kein Stimulans", M1, M10). Auch das Metforminansprechen ist aufgezeigt: A=Ansprecher ohne und V=Versager mit *ATM (Ataxia teleangiectasia mutated* Gen*)* - Mutation (N(Gesamt)=8, N(V)=4, N(A)=4) **b)** ImageJ-Analyse der Westernblotergebnisse aus a). **c**) Mittelwerte der relativen pAMPKα-Konzentration bei „Kein Stimulans", M1 und M10 **d)** Mittelwerte der relativen AMPKα-Konzentration bei den verschiedenen Expositionen gesplittet in Ansprecher und Versager.

3.5. Die Wirkung von Metformin auf p53

Um die Wirkung von Metformin auf die p53 Konzentration zu analysieren, wurden die B-LCLs verschiedenen Substanzen ausgesetzt („Kein Stimulans“, M1, M1+LPS, M10, M10+LPS, LPS, 10Gy-Bestrahlung) und im Anschluss mittels Duchflusszytometrie nach t= 0, 3, 6, 12 und 24h untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse mittels SPSS ausgewertet.

Vor der Betrachtung des Einflusses der Stimulation über verschiedene Messzeitpunkte und Versagern mit vorliegender Mutation und Ansprechern ohne Mutation, wurde zunächst überprüft, ob sich die p53 Produktion zwischen Versagern mit Mutation und ohne Mutation zum Zeitpunkt t=0h ohne jegliche Stimulation/ Exposition unterscheiden. Hierfür wurde eine Varianzanalyse mit dem Faktor „Ansprechen“ (Ansprechen vs. Versagen) durchgeführt. Es zeigte sich kein inferenzstatistisch bedeutsamer Effekt von Ansprechen/Versagen ($F(1,22) = 0.238$, $p = .631$, $\eta^2_{partial} = .011$). Es zeigten sich somit vor der Intervention keine Unterschiede in der Produktion von p53 zwischen Ansprechern und Versagern (Abb.15).

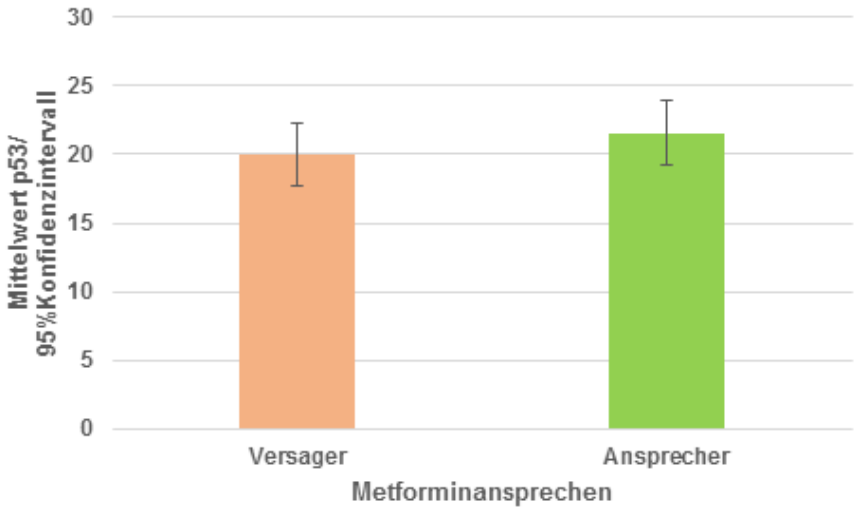


Abbildung 15: p53-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h abhängig vom Metforminansprechen

Mittelwert der p53-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h bei Versagern und Ansprechern. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der p53-Konzentration zwischen Versagern und Ansprechern zum Zeitpunkt t=0h.

Im Folgenden wurde der Effekt der Exposition, vor allem des Metformins auf die p53 Produktion von Ansprechern (ohne Mutation) und Versagern (mit Mutation) über einen zeitlichen Verlauf betrachtet. Es wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA) mit den Innersubjektfaktoren „Exposition“ („Kein Stimulans“, M1, M1+LPS, M10, M10+LPS, LPS, 10Gy-Bestrahlung) und „Messzeitpunkt“ (0h vs. 3h, 6h, 12h, 24h) und dem Zwischensubjektfaktor „Ansprechen“ (Ansprecher versus Versager) gerechnet.

Für das Ansprechen lag keine Signifikanz ($F(1,22)=1.009$, $p=0.326$, $\eta^2_{partial} =.044$) vor. Das heißt es gab keinen Unterschied zwischen Ansprechern und Versagern.

Die Analyse zeigte einen signifikanten Effekt des Messzeitpunkts ($F(3,20)= 44,729$, $p<0.001$, $\eta^2_{partial}=.870$). Die p53-Konzentration stieg linear mit der Dauer der Exposition an (Abb.16a).

Zudem konnte ein signifikanter Haupteffekt der Exposition ($F(6,17)= 142.126$, $p < .001$, $\eta^2_{partial} = .980$) nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die p53-Produktion insbesondere bei Metformin 10mM und Metformin 10mM/LPS signifikant höher liegt als bei der unbehandelten, der Metformin1mM und der Metformin 1mM/LPS exponierten Probe (Abb. 17c). Die Positivkontrolle, die mit 10Gy bestrahlt wurde, liegt sehr deutlich und signifikant über allen anderen Proben.

Die Interaktion zwischen Ansprecher und Messzeitpunkt ist marginal signifikant($F(3,20) = 2.551$, $p = .085$, $\eta^2_{partial} = .277$). Bei den Ansprechern nimmt die p53-Produktion nach 12h und 24h weiter linear zu, während bei den Versagern die p53-Produktion deutlich weniger ansteigt (Abb. 16b).

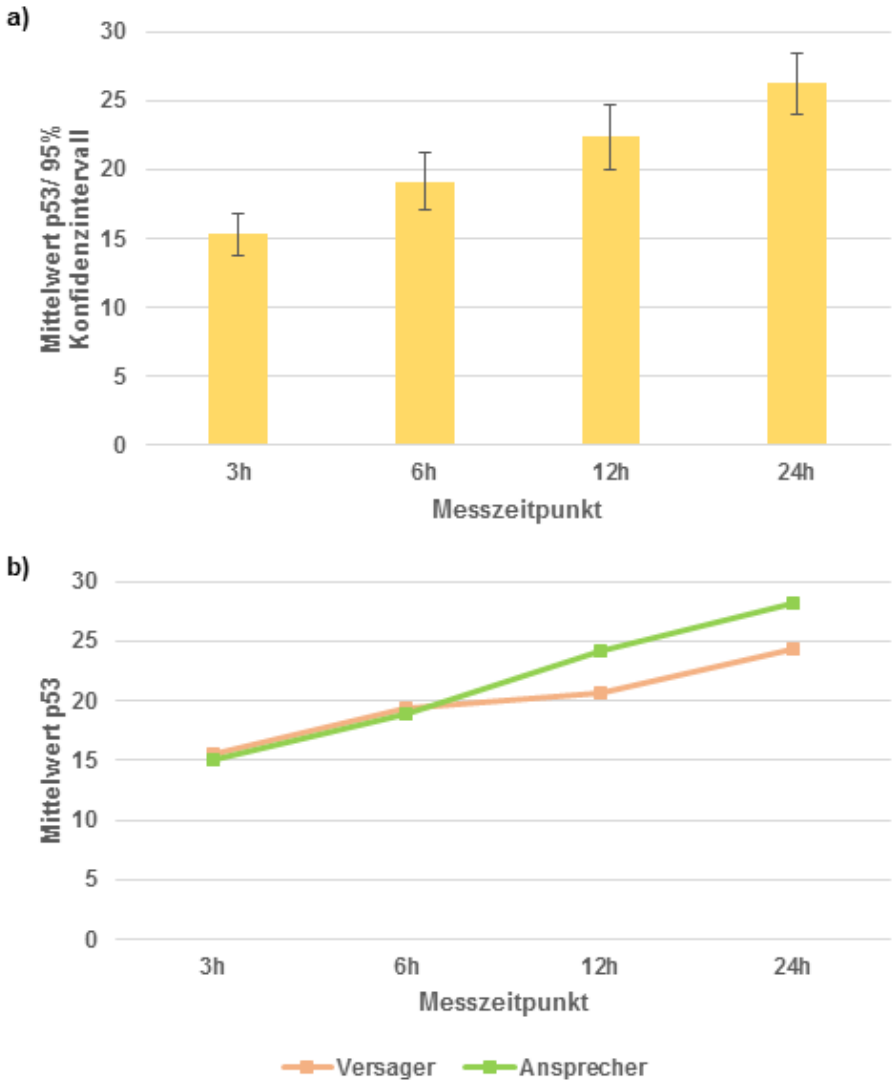


Abbildung 16: p53-Konzentration zu den Messzeitpunkten t=3/6/12/24h

a) Signifikante Zunahme der durchschnittlichen p53-Konzentration unabhängig vom Metforminansprechen in B-Lymphoblastoiden Zellen über die Messzeitpunkte t=3/6/12/24h

b) Bei den B-Lymphoblastoiden Zellen von Metformin-Ansprechern zeigt sich eine lineare Zunahme der p53-Konzentration bis t=24h, während bei denen der Metformin-Versager die Kurve der p53-Konzentration ab dem Zeitpunkt t=6h abflacht.

Auch die Interaktion zwischen Messzeitpunkt und Exposition($F(18,5)= 5.812$, $p=.030$, $\eta^2_{partial}=.954$) zeigte sich statistisch bedeutsam. Sowohl ohne Stimulans als auch durch die Metformin-Exposition steigt p53 kontinuierlich an, bei 10mM Metformin und 10mM Metformin/LPS mehr als bei den anderen Stimuli. Bei Bestrahlung jedoch steigt p53 nur kurzfristig an und fällt dann wieder ab (Abb.17).

Die Wechselwirkung zwischen Exposition und Ansprechen ($F(6,17) = 1.301$, $p = .309$, $\eta^2_{partial} = .315$), sowie die Dreifachinteraktion aus Exposition, Messzeitpunkt und Ansprechen stellte sich als nicht signifikant ($F(18,5) = 0.822$, $p = .658$, $\eta^2_{partial} = .748$) heraus.

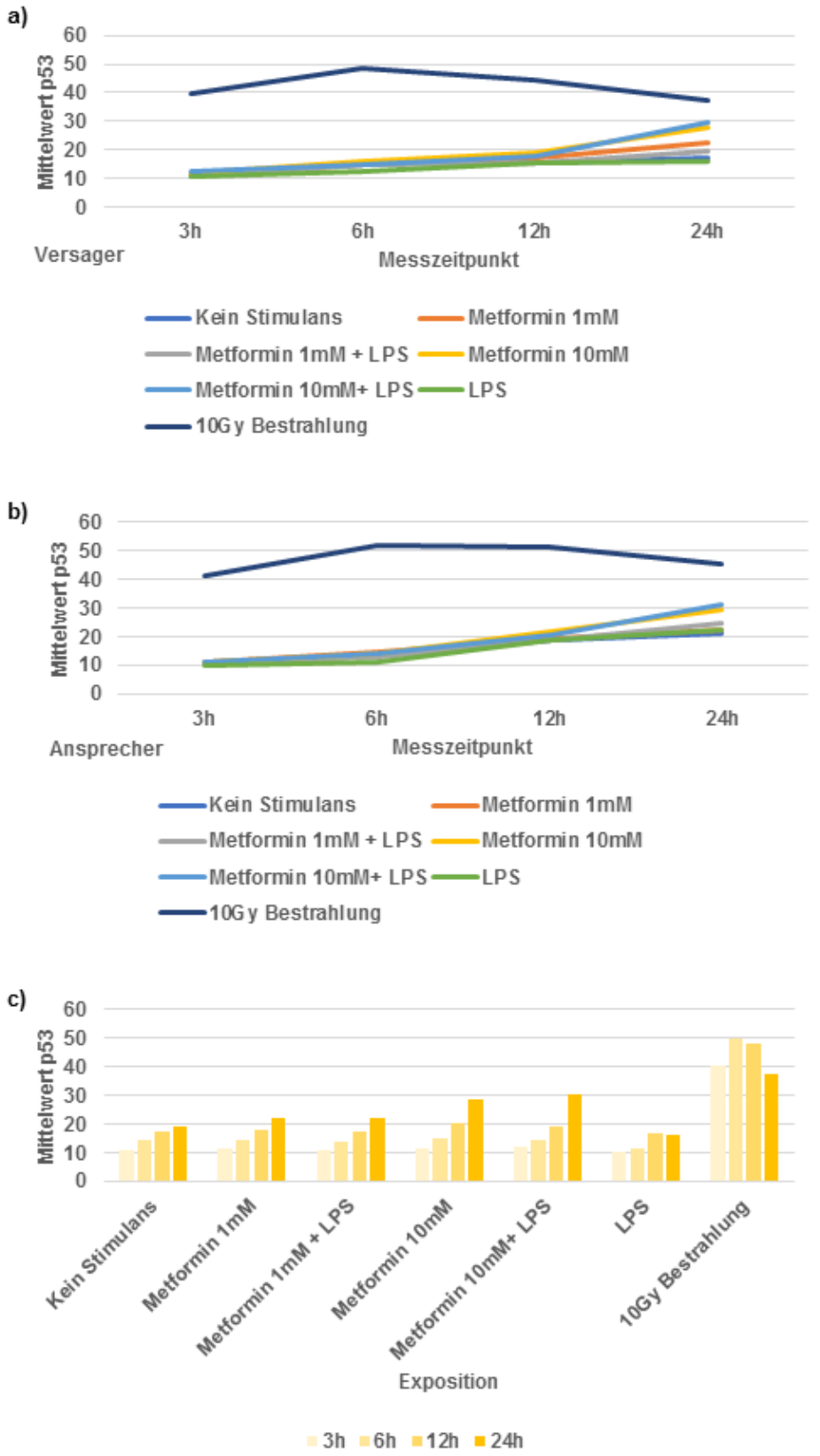


Abbildung 17: p53-Konzentration in Abhängigkeit von Messzeitpunkt und Exposition

a-c) p53-Konzentration in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt und der Exposition der B-Lymphoblastoiden Zelllinie (B-LCL): Signifikante p53-Konzentration-Erhöhung bei Metformin 10mM, M10+Lipopolysaccharid (LPS) und 10Gy-Bestrahlung nach t=24h bei Metfromin-Ansprechern und -Versagern.

3.6. Die Wirkung von Metformin auf p21

Wie oben bereits erwähnt, wird p21 u.a. durch p53 aktiviert. In der Durchflusszytometrie wurde neben p53 auch p21 in den B-LCL nachgewiesen. Bei der Analyse der Ergebnisse wurde auch hier vor der Betrachtung des Einflusses der Exposition über verschiedene Messzeitpunkte zunächst überprüft, ob sich die p21 Produktion zwischen Versagern mit Mutation und Ansprechern ohne Mutation zum Zeitpunkt t=0h ohne jegliche Exposition unterscheidet.

Hierfür wurde eine unifaktorielle Varianzanalyse mit dem Faktor „Ansprechen“ (Ansprechen vs. Versagen) durchgeführt. Es zeigte sich kein inferenzstatistisch bedeutsamer Effekt von Ansprechen/ Versagen ($F(1,22) = 0.037$, $p = .850$, $\eta^2_{partial} = .002$). Es zeigten sich somit vor der Intervention keine Unterschiede in der Produktion von p21 zwischen Patienten, die ein Ansprechen auf eine Metformintherapie zeigen versus Patienten, deren Blutzuckerspiegel nicht zufriedenstellend mittels Metformin eingestellt werden kann (Abb.18).

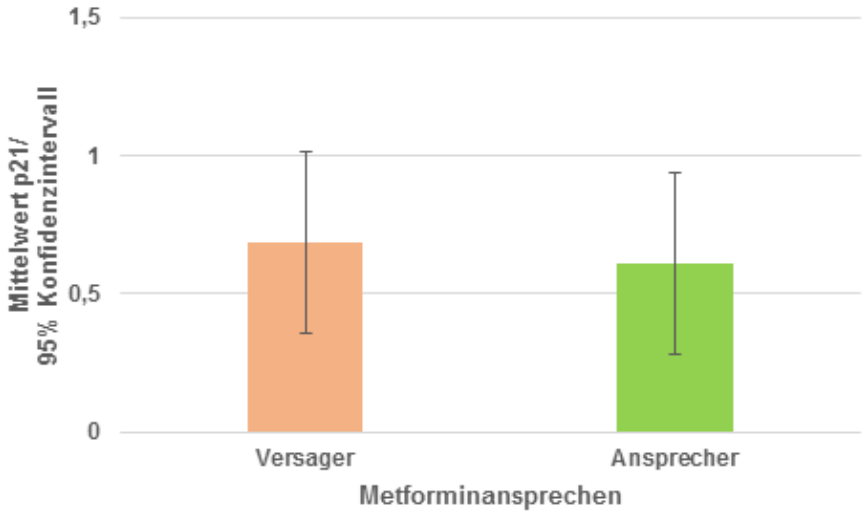


Abbildung 18: p21-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h abhängig vom Metforminansprechen

Mittelwert der p21-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h bei Versagern und Ansprechern. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der p21-Konzentration zwischen Versagern und Ansprechern zum Zeitpunkt t=0h.

In der multifaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich weder eine Signifikanz für den Messzeitpunkt ($F(3,20) = 1.407$, $p = .270$, $\eta^2_{partial} = .121$), noch für die Wechselwirkung Messzeitpunkt und Ansprechen ($F(3,20) = 0.037$, $p = .850$, $\eta^2_{partial} = .174$),

sowie die Interaktion aus Exposition und Ansprechen ($F(6,17) = 0.960$, $p = .481$, $\eta^2_{partial} = .253$). Für die Interaktion aus Messzeitpunkt und Exposition ($F(18,5) = 4.280$, $p = .057$, $\eta^2_{partial} = .939$) zeigte sich keine Signifikanz. Für die Exposition alleine zeigte sich eine Signifikanz ($F(6,17) = 3.798$, $p = .014$, $\eta^2_{partial} = .573$). Bei weiterer genauerer Betrachtung zeigt sich hier jedoch keine eindeutige Tendenz. Metformin führt zu keiner tendentiellen Erhöhung oder Senkung der p21-Konzentration, auch nicht in Verbindung mit dem Messzeitpunkt. Die Dreifachinteraktion aus Ansprechen, Exposition und Messzeitpunkt war auch hier nicht signifikant ($F(18,5) = 1.612$, $p = .314$, $\eta^2_{partial} = .853$).

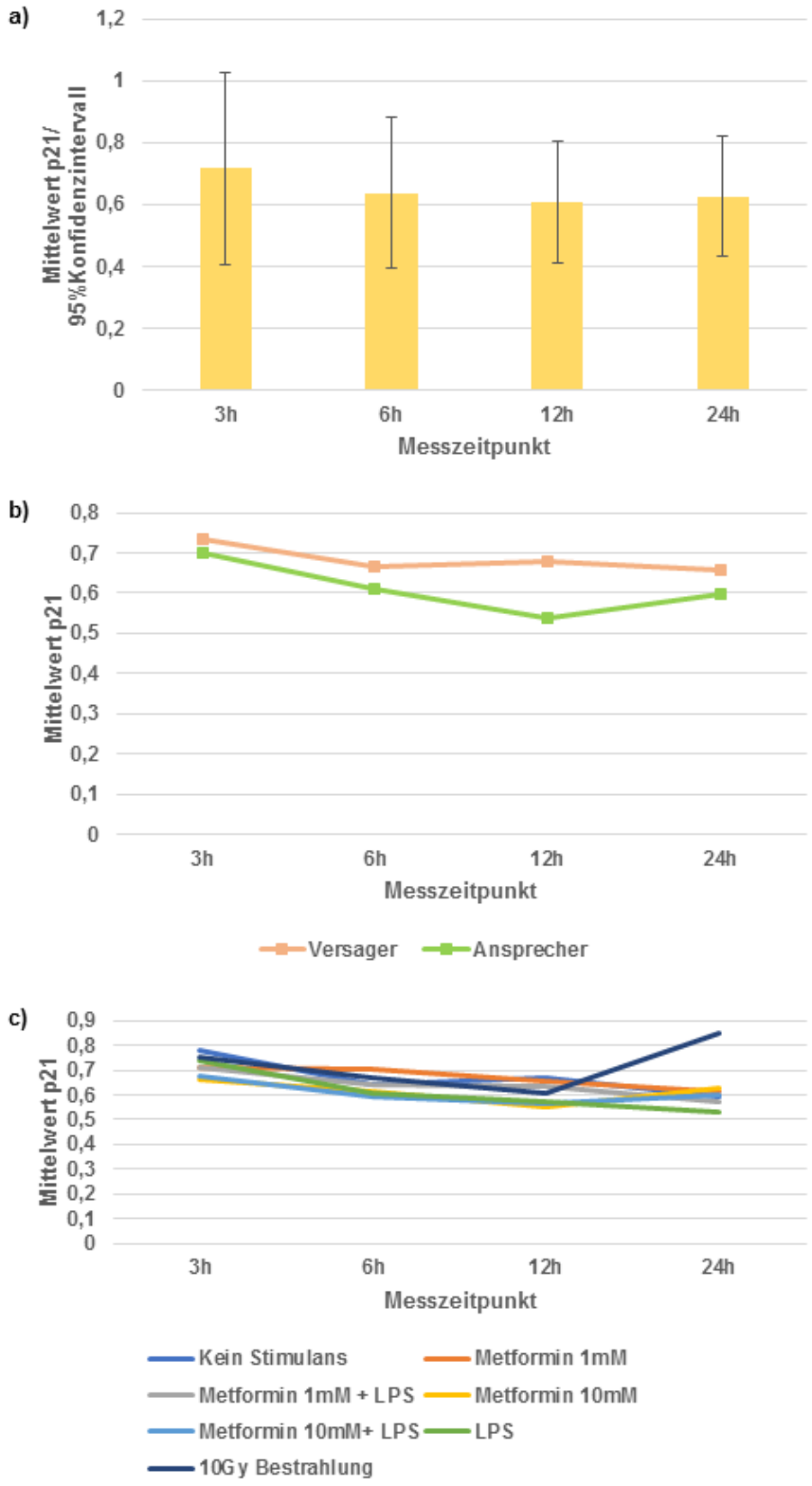


Abbildung 19: p21-Konzentration in Abhängigkeit von Messzeitpunkt und Exposition

a) Tendenzielle Abnahme der durchschnittlichen p21-Konzentration in B-lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCL) über die Messzeitpunkte t=3/6/12/24h; b) Tendenzielle Abnahme der durchschnittlichen p21-Konzentration in B-LCL über die Messzeitpunkte t=3/6/12/24h bei Metformin-Ansprechern und Versagern; c) p21-Konzentration in B-LCL in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt und der Exposition: Tendenzielle Abnahme der p21-Konzentration. Signifikante Zunahme bei t=24h bei den mit 10Gy bestrahlten B-LCL. LPS: Lipopolysaccharid

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

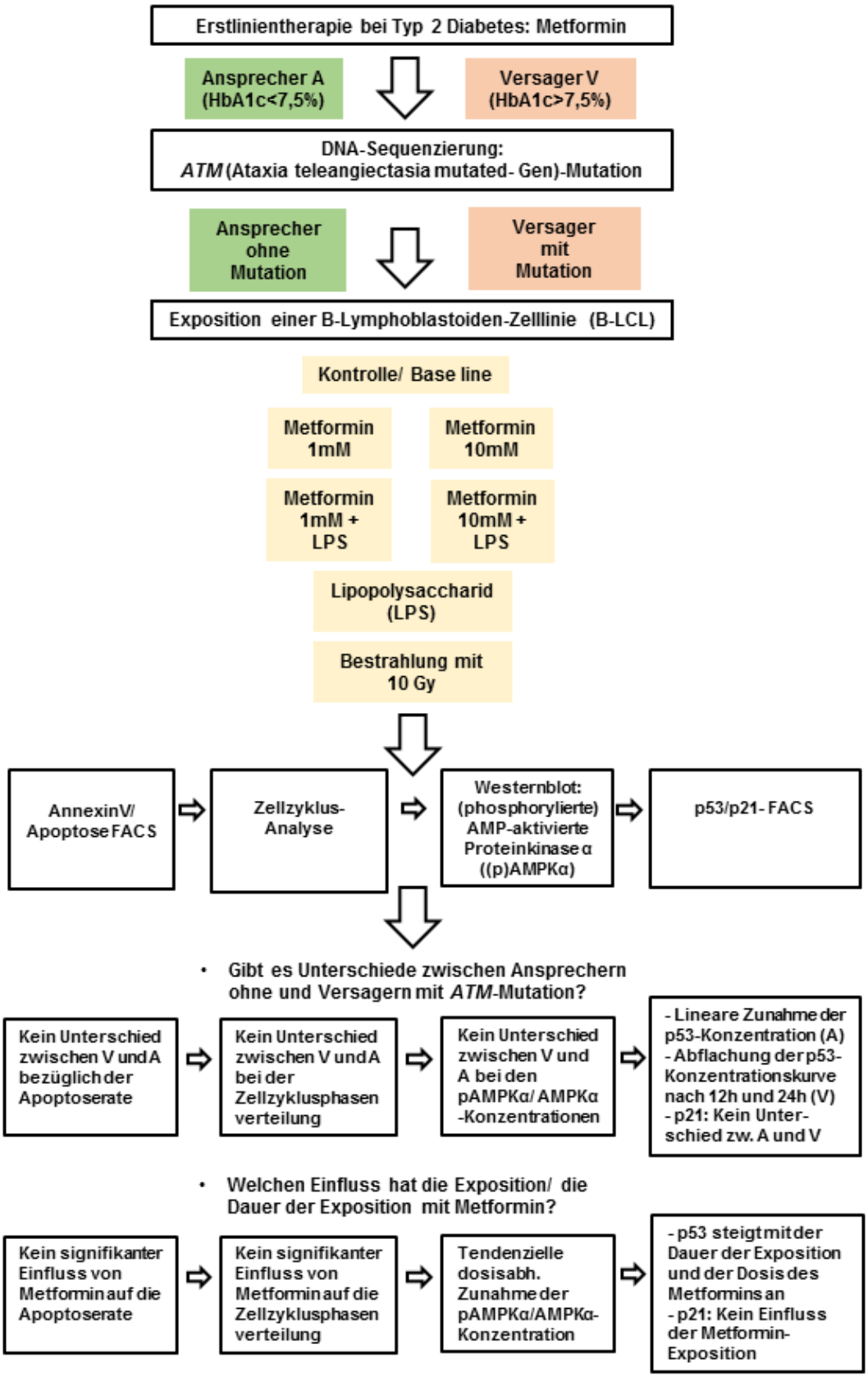


Abbildung 20: Zusammenfassung der Ergebnisse

4. Diskussion

4.1. *ATM* und das Metforminansprechen

Die DNA-Sequenzierung der DNA-Proben ergab eine signifikante Assoziation zwischen dem Behandlungsversagen bei T2D Patienten und dem Vorhandensein der SNP-Variante rs1800054 im *ATM*-Gen auf Chromosom 11. Insgesamt wurden in unserer Studie 1,880 Patienten mit T2D untersucht.

Diese Variante ist bisher in der Literatur mit einem diskret erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Fletcher, Johnson et al. 2010). Weitere Studien konnten jedoch diesen Zusammenhang jedoch nicht verifizieren (Travis, Reeves et al. 2010, Cox, Dunning et al. 2007, Ye, Dai et al. 2007). Ein Zusammenhang mit dem T2D, bzw. dem Metforminansprechen bei Patienten mit T2D wurde bisher nicht beschrieben.

In vorangehenden Studien wurde jedoch eine andere Variante in der Nähe des *ATM*- Gen beschrieben, die mit dem Metforminansprechen assoziiert sein soll. Die GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. 2011 beschrieben den Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des SNP rs11212617 im C-Allel in der Nähe des *ATM*-Gens, der mit dem Ansprechen auf Metformin assoziert sein soll. Van Leeuwen, Nijpels et al. 2012 bestätigten eine Assoziation zwischen der *ATM*-Variante rs11212617 mit Metforminansprechen in einer niederländischen Kohorte von 1365 Patienten mit T2D.

Florez, Jablonski et al. 2012 hingegen postulierten, dass der oben beschriebene SNP rs11212617 nicht mit dem Metforminansprechen assoziiert sei. Es zeige sich kein Unterschied bezüglich der Insulinsensitivität, dem Nüchtern-Blutzucker, dem HbA1c, dem Gewicht oder dem Dispositionsindex (Indikatoren für eine erfolgrecihe Metformintherapie). Die Autoren beschrieben einen nicht-signifikantem Trend zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Connelly, Smith et al. zeigten 2016, dass Patienten mit einer Mutation im *ATM*-Gen (SNP rs11212617) signifikant erhöhte Blutzuckerspiegel im OGTT und eine niedrigere Insulinsensitivität aufzeigen. Connelly, Smith et al. schlussfolgerten, dass ATM eine Rolle in den Glukose- und Insulin-

Signalwegen spielt, es jedoch weiter prospektive klinische Studien benötigt um dies weiter zu untersuchen.

Die aktuelle wissenschaftliche Literatur reflektiert die Schwierigkeiten, bei multifaktoriellen Erkrankungen wie dem Diabetes, einer prototypischen Erkrankung für Gen-Umwelt-Interaktionen, eine klare Ursache-Wirkungsbeziehung herzustellen.
Um Teile dieser inhärenten Probleme zu umgehen, haben wir die untersuchten Patientengruppen primär nach Genotyp des ATM-Gens stratifiziert, um anschließend an einer Surrogatzelllinie, den B-LCLs den Effekt von Metformin zu untersuchen.

4.2. Metforminansprechen und die zellzyklusmodulierende Wirkung/ Apoptoseinduktion

In den ersten beiden Versuchen ging es darum, eine mögliche Wirkung des Metformins auf den Zellzyklus, im Sinne beispielsweise eines Zellzyklusarrests, und auf die Apotoserate zu untersuchen. Es konnte keine signifikant erhöhten Apoptoseraten und auch keine zellzyklusmodulierende Wirkung des Metformins in einer B-Lymphoblastoiden Zellinie nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen Versagern mit ATM- Mutation und Ansprechern ohne ATM-Mutation.

Auch Halicka, Zhao et al. beschrieben 2011, dass keine Unterschiede bezüglich der Zellzyklusverteilung zwischen unstimulierten Zellen und Zellen nach Exposition mit Metformin auftreten. Sie bestätigten jedoch eine von der Metforminkonzentration abhängige ATM-Aktivierung und mTOR-Hemmung, woraus eine Reduktion des DNA-Replikationsstress folgte sowie eine Verlangsamung der Zellalterung.

Weitere Studien wie die von Storozhuk, Hopmans et al. 2013 zeigten auf, dass Metformin konzentrationsabhängig die Proliferation von NSCLC- Zellen inhibiert und diese zudem strahlensensibeler macht. Metformin aktivierte den ATM-AMPK-p53/p21(cip1) und induziert einen Zellzyklusarrest in der Zellzyklusphase G1 und führte vermehrt zur Apoptose. Sacco, Calderone et al. beschrieben 2016, dass die anti-kanzerogenen Eigenschaften des Metformin eine Konsequenz der Zellzyklusstörung seien. Metformin induziere einen Zellzyklusarrest in G0/G1 und G2/M

Phase bei verschiedenen Krebszelltypen, einschließlich Brustkrebs und Ösophagus-Plattenepithelkarzinom. Die molekularen Mechanismen beinhalten laut Sacco, Calderone et al. inbesondere die Hochregulierung von CDKIs (cyclin-dependent kinase Inhibitoren), wie den Proteinen p21 oder p27.

Ein Großteil der Studien bestätigt eine zellzyklusinhibierende Wirkung des Metformins. Hier könnte auch die Auswahl der Zellen/Gewebetypen eine Rolle spielen. Ein Großteil der Versuche wurde in Krebszellinien durchgeführt, die sich in ihren Eigenschaften doch deutlich von gesundem Gewebe unterscheiden.

Diese Wirkung des Metformins weiter zu untersuchen und Zusammenhänge zu verschiedenen Krebsarten herzustellen bietet großes Potenzial, insbesondere für die Behandlung verschiedener Tumoren und auch deren Stratifizierung, falls neue Zusammenhänge zu Genmutationen hergestellt werden könnten.

4.3. Metformin und die pAMPKα/ AMPKα

Um der Fragestellung nachzugehen, ob Metformin die Konzentration der AMPKα bzw. der phosphorylierten Form, der pAMPKα in der BLCL erhöht und ob hier Unterschiede zwischen Versagern und Ansprechern auftreten, wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen „Metformin-Versagern“ und Ansprechern bezüglich der Konzentration der AMPKα, bzw. der pAMPKα. Abhängig von der Metformindosis zeigte sich eine tendentielle Zunahme der AMPKα-, als auch der pAMPKα-Konzentration. In diesen Versuchen zeigte sich keine signifikante Wirkung des Metformins auf die AMPKα/pAMPKα-Konzentrationen und folglich keine AMPKα/pAMPKα-abhängige Metforminwirkung.

Wie in 1.3 bereits angeführt, ist die AMPKα stark mit den pleiotropen Effekten von Metformin verknüpft. Metformin induziert über die Reduktion der Energie/des ATP die AMP-Kinase und darüber den glukosesenkenden Effekt von Metformin (Zhou, Myers et al. 2001).

Die GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. führten 2011 nach der DNA-Sequenzierung ebenfalls weiterführende Versuche in einer Ratten-Hepatom-Zellinie durch und

konnten zeigen, dass durch das Blockieren von ATM durch KU55933, einen ATM-Inhibitor, die AMPKα-Konzentration nach Exposition mit Metformin im Vergleich zu Zellen ohne ATM-Inhibition im Voraus signifikant erniedrigt sind. Yee, Chen et al. 2012 jedoch zeigten, dass KU55933 nicht über die ATM-Inhibition die AMPKα-Konzentrationen senke, sondern die Aufnahme von Metformin in die Zelle über Hemmung des OCT1 vermindere. Durch die geringere Metforminkonzentration in der Zelle komme es dann zu einer erniedrigten AMPKα-Konzentration. Auch Woods, Leiper et al. 2012 konnten die Ergebnisse der GoDARTS und UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group in Maus-Hepatomzellen nicht replizieren. Auch hier ergab sich kein Anhalt, dass ATM der AMPKα, einem der Schlüsselenzyme des Metformins, vorgeschaltet ist. Woods, Leiper et al. forderten 2012 dazu auf weitere Gene im selben Lokus zu untersuchen.

Erhöhte AMP-Konzentrationen und direkte AMPKα-Aktivierung repräsentieren zwei parallele Signalwege die versuchen einen normalen Energiestatus der Zelle zu erhalten und ähnliche Effekte auf die metabolischen Signalwege zeigen (Miller, Birnbaum 2010).

4.4. Metformin und der ATM/ AMPKα/ p53/ p21-Signalweg

Das Ansprechen auf Metformin war signifikant mit einer SNP-Variante im Bereich de ATM-Gens assoziiert. Meine These, dass durch die ATM-Kinase eine verstärkte Aktivierung der AMPKα und dadurch eine Aktivierung von p53 und p21 erfolgt und somit deutliche quantitative Unterschiede zwischen Ansprechern und Versagern festzustellen sind, konnte jedoch nicht mit dem gewählten Zellsubstrat, den B-LCLs, nachgewiesen werden. Es zeigte sich in allen Versuchen eine mit der Metforminkonzentration über die Zeit zunehmende AMPKα, pAMPKα und signifikante p53-Konzentration. Ein Unterschied zwischen Ansprechern und Versagern präsentierte sich bei der Art des p53- Anstiegs. Bei den Ansprechern stieg die p53-Konzentration linear über die Zeit während bei den Versagern sich der Expressionsgrad abflachte.

Obwohl in den letzten Jahren einige Studien eine Assoziation zwischen dem Metforminansprechen und dem ATM-Gen postulierten (GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al. 2011) und weitere Untersuchungen zur Rolle des *ATM*-Gens und der möglichen

beeinflussten Signalwege forderten (Birnbaum, Shaw 2011), finden sich in der Literatur keine neueren Resultate.

Bekannt ist schon seit 2001, dass die AMPKα p53 an Ser15 phosphoryliert (Imamura, Ogura et al. 2001) und auch die ATM-Proteinkinase p53 an Ser15 phophoryliert (Armata, Golebiowski et al. 2010). Zudem verstärkt p53 rückwirkend die Phosphorylierung der AMPKα-Untereinheit und stimuliert die AMPKα-Aktivität (Feng, Hu et al. 2007, Feng, Zhang et al. 2005).

Zu Metformin und seiner Wirkung auf ATM aber auch AMPKα gibt es kontroverse Stellungnahmen (s.o.). Die dosisabhängige Zunahme der AMPKα, der pAMPKα und der p53-Konzentration lässt einen Einfluss des Metformins wahrscheinlich werden. Einen Unterschied zwischen Ansprechern ohne und Versagern mit *ATM*-Mutation konnte man nicht feststellen. Hier sind weitere Versuche notwendig. Möglicherweise spielt hier die Zellart eine Rolle. Eine Versuchsreihe in Hepatozyten, dem (vermuteten) Hauptwirkungsort des Metformins wäre hier sicherlich eine experimentelle Option, gleichwohl müsste man entweder von verschiedenen Probanden Gewebproben gewinnen oder mittels Gene-Edition entspr. Zelllinien generieren. Auch ein direkter Nachweis der ATM-Aktivität vor und nach Metforminexposition in Hepatozyten von Ansprechern und Versagern mittels eines Reportersystems wäre ein dekbarer Weg für in vitro Experimente. Problem bei diesen Versuchen ist die Gewinnung des Zellmaterials. Daher bieten sich Versuche mittels Surrogatzelllinien, wie zum Beispiel B-LCLs an, die bereits in vielen vorhergehenden Studien zum Einsatz kamen (Ram, Mehta et al. 2016).

4.5. Personalisierte Medizin beim T2D – ein Blick in die Zukunft

Inzwischen sind durch die GWA-Studien über 150 verschiedene SNPs bekannt, die mit Diabetes allgemein verknüpft sind (Fuchsberger, Flannick et al. 2016, Gaulton, Ferreira et al. 2015). Die Schwierigkeit liegt darin, dass nicht immer direkt ein Protein betroffen ist. Diese Multidimensionalität macht weiterführende Studien schwierig. Verschiedene Signalwege können betroffen sein und zu den einzelnen Signalwegen ist nur wenig bekannt. In den nächsten Jahren gilt es hier weitere Informationen zu sammeln. Die Lücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Forschung einerseits und der Anwendung in der klinischen Praxis andererseits, die laut

Glauber, Rishe et al. immer größer wird, gilt es weiter zu schließen. Dann wird auch die Klassifizierung und Stratifizierung des T2D sich den neuen Entwicklungen anpassen und vielleicht auch weichen müssen (Mirnezami, Nicholson et al. 2012, National Research Council (US) Committee on A Framework for Developing a New Taxonomy of Disease 2011).

Das sogenannte „Palettenmodell“ von Marc McCarthy ist eine neue multidimensionale Sichtweise der personalisierten Medizin beim T2D und passt deutlich besser zu der multifaktoriell bedingten Erkrankung T2D. Hier geht es darum das einzelne Individuum anhand verschiedenster Parameter der Pathophysiologie, die dem aktuellen Wissensstand der Forschung entsprechen, in einem großen Cluster einzuordnen. Welche Signalwege, die letzten Endes zu einem T2D führen, sind wie stark betroffen (McCarthy 2017). Wie kann man dieses Cluster mit klinischen zu diagnostizierenden Faktoren füllen? Marc McCarthy empfiehlt die Fortführung der Erforschung bestimmter „Archetypen“ (McCarthy 2017). Parallel ist jedoch die weitere Erforschung auch niedrigpathogener Varianten und deren mögliche Auswirkung auf verschiedene Signalwege und die Verbindung mit bereits bestehenden Therapiemöglichkeiten und neuen Ansatzmöglichkeiten notwendig. Eine Zukunftsperspektive ist dieses Cluster auch mit einem Cluster für Therapieansprechen zu verbinden. Neben den zugrundeliegenden pathophysiologischen Ursachen wäre dann auch eine Prädiktion eines Therapieerfolgs einzelner Pharmaka abhängig vom individuellen Risikoprofil möglich.

Bis dahin ist es noch ein langer steiniger Weg. Es gilt die Spreu vom Weizen zu trennen. Welche Genvarianten sind tatsächlich funktionell. Was sind die zugrundeliegenden Mechanismen? Welche Signalwege werden beeinflusst? Welche klinischen Auswirkungen haben diese? Für welche Patientengruppen ist dies relevant? Auch diese Studie ist ein kleiner Baustein, ein Puzzleteil in der weiter fortschreitenden Stratifizierung des T2D und der Weiterentwicklung der personalisierten individualisierten Medizin.

5. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Volkskrankheit, die mit steigenden Patientenzahlen und hohen Gesundheitskosten die Gesundheitssysteme dieser Welt fordert. Mittels einer individuelleren Klassifizierung und Therapie könnte diese Herausforderung gemeistert werden. Es gilt mehr über die mögliche Pathogenese, unterschiedliche Signalwege und die Verbindung mit Therapiemöglichkeiten herauszufinden, unter anderem über sogenannte genomweite Assoziationsstudien (GWA-Studien).

Der Goldstandard in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, das Biguanid Metformin, wird seit Jahren erfolgreich angewandt und dennoch ist seine Wirkungsweise nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, das Wissen über die pleiotropen Effekte des Metformins zu erweitern.

Der erste Schritt war die DNA-Sequenzierung bei Metforminansprechern und Metforminversagern. Hier zeigte sich in einer Kohorte von 1880 Patienten eine signifikante Assoziation zwischen dem SNP 1800054 im *Ataxia teleangiectasia mutated (ATM)*- Gen auf Chromosom 11 und dem Metforminversagen.

Um dies näher zu untersuchen, wurde eine B-Lymphoblastoide Zellinie (B-LCL) ausgewählt. Dann folgte die Exposition der Zellen mit Metformin 1mM und 10mM und anschließend die Analyse eines möglichen Einflusses auf den bereits in anderen Zusammenhängen vorbeschriebenen ATM/AMPKα/p53- Signalweg mittels Durchflusszytometrie (FACS) und Westernblot-Analysen.

Im durchgeführten Apoptose-AnnexinV-FACS zeigte sich kein Unterschied zwischen Metforminansprechern und Metforminversagern. Die Exposition mit Metformin 1mM und 10mM führte zu keinen erhöhten Apoptoseraten. Auch in der Zellzyklusanalyse konnten keine unterschiedlichen metforminabhängigen Zellzyklusphasen-Verteilungsmuster zwischen Metforminansprechern und Metforminversagern detektiert werden. Tendenziell führt Metformin zu einer dosisabhängigen Zunahme der AMPKα, der pAMPKα und einer signifikanten Zunahme des Phosphoproteins

p53. Auch hier zeigt sich keine Differenz zwischen Metforminansprechern und Metforminversagern. Weder die Exposition mit Metformin noch die *ATM*-Mutation hatte einen Einfluss auf die p21-Konzentration.

Erstmalig wurde eine Assoziation zwischen Metforminversagen und dem SNP 1800054 im *ATM*-Gen beschrieben. Eine mögliche direkte Verbindung zum ATM/AMPKα/p53- Signalweg in einer B-LCL konnte nicht hergestellt werden. Es sind weitere Versuchsreihen auch in anderen Zellreihen notwendig um mögliche Signalwege zu erruieren.

6. Literaturverzeichnis

1. ARMATA, H.L., GOLEBIOWSKI, D., JUNG, D.Y., KO, H.J., KIM, J.K. and SLUSS, H.K., 2010. Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathway for glucose homeostasis. *Molecular and cellular biology,* **30**, 5787-5794.

2. BANIN, S., MOYAL, L., SHIEH, S., TAYA, Y., ANDERSON, C.W., CHESSA, L., SMORODINSKY, N.I., PRIVES, C., REISS, Y., SHILOH, Y. and ZIV, Y., 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.),* **281**, 1674-1677.

3. BAR, R.S., LEVIS, W.R., RECHLER, M.M., HARRISON, L.C., SIEBERT, C., PODSKALNY, J., ROTH, J. and MUGGEO, M., 1978. Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. *The New England journal of medicine,* **298**, 1164-1171.

4. BENSAAD, K. and VOUSDEN, K.H., 2007. P53: New Roles in Metabolism. *Trends in cell biology,* **17**, 286-291.

5. BEREZIN, A., 2016. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. *Diabetes & metabolic syndrome,* **10**, S176-83.

6. BIRNBAUM, M.J. and SHAW, R.J., 2011. Genomics: Drugs, diabetes and cancer. *Nature,* **470**, 338-339.

7. BODER, E., 1985. Ataxia-telangiectasia: an overview. *Kroc Foundation series,* **19**, 1-63.

8. BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), KASSENÄRZTLICHE BUNDESVEREINIGUNG (KBV), ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN (AWMF), 2013-last update, Nationale VersorgungsLeitlinieTherapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage, Version 1. Available: http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2_therapie [5.5.2014].

9. BUTLER, D., 2008. Translational research: crossing the valley of death. *Nature,* **453**, 840-842.

10. CANMAN, C.E., LIM, D.S., CIMPRICH, K.A., TAYA, Y., TAMAI, K., SAKAGUCHI, K., APPELLA, E., KASTAN, M.B. and SILICIANO, J.D., 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science (New York, N.Y.),* **281,** 1677-1679.

11. CHEUNG, E.C. and VOUSDEN, K.H., 2010. The role of p53 in glucose metabolism. *Current opinion in cell biology,* **22,** 186-191.

12. CONNELLY, P.J., SMITH, N., CHADWICK, R., EXLEY, A.R., SHNEERSON, J.M. and PEARSON, E.R., 2016. Recessive mutations in the cancer gene Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), at a locus previously associated with metformin response, cause dysglycaemia and insulin resistance. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association,* **33**, 371-375.

13. COX, A., DUNNING, A.M., GARCIA-CLOSAS, M., BALASUBRAMANIAN, S., REED, M.W., POOLEY, K.A., SCOLLEN, S., BAYNES, C., PONDER, B.A., CHANOCK, S., LISSOWSKA, J., BRINTON, L., PEPLONSKA, B., SOUTHEY, M.C., HOPPER, J.L., MCCREDIE, M.R., GILES, G.G., FLETCHER, O., JOHNSON, N., DOS SANTOS SILVA, I., GIBSON, L., BOJESEN, S.E., NORDESTGAARD, B.G., AXELSSON, C.K., TORRES, D., HAMANN, U., JUSTENHOVEN, C., BRAUCH, H., CHANG-CLAUDE, J., KROPP, S., RISCH, A., WANG-GOHRKE, S., SCHURMANN, P., BOGDANOVA, N., DORK, T., FAGERHOLM, R., AALTONEN, K., BLOMQVIST, C., NEVANLINNA, H., SEAL, S., RENWICK, A., STRATTON, M.R., RAHMAN, N., SANGRAJRANG, S., HUGHES, D., ODEFREY, F., BRENNAN, P., SPURDLE, A.B., CHENEVIX-TRENCH, G., KATHLEEN CUNNINGHAM FOUNDATION CONSORTIUM FOR RESEARCH INTO FAMILIAL BREAST CANCER, BEESLEY, J., MANNERMAA, A., HARTIKAINEN, J., KATAJA, V., KOSMA, V.M., COUCH, F.J., OLSON, J.E., GOODE, E.L., BROEKS, A., SCHMIDT, M.K., HOGERVORST, F.B., VAN'T VEER, L.J., KANG, D., YOO, K.Y., NOH, D.Y., AHN, S.H., WEDREN, S., HALL, P., LOW, Y.L., LIU, J., MILNE, R.L., RIBAS, G., GONZALEZ-NEIRA, A., BENITEZ, J., SIGURDSON, A.J., STREDRICK, D.L., ALEXANDER, B.H., STRUEWING, J.P., PHAROAH, P.D., EASTON, D.F. and BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM, 2007. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics,* **39**, 352-358.

14. CROWLEY, M., DIAMANTIDIS, C., MCDUFFIE, J., CAMERON, B., STANIFER, J., MOCK, C., KOSINSKI, A., WANG, X., TANG, S. and WILLIAMS, J., JW., 2016. APPENDIX A, FDA SAFETY ANNOUNCEMENTS FOR METFORMIN. In: DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS (US), ed, *Metformin Use in Patients with Historical Contraindications or Precautions.* Washington (DC).

15. CURRIE, C.J., POOLE, C.D. and GALE, E.A., 2009. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia,* **52**, 1766-1777.

16. DANAEI, G., FINUCANE, M.M., LU, Y., SINGH, G.M., COWAN, M.J., PACIOREK, C.J., LIN, J.K., FARZADFAR, F., KHANG, Y., STEVENS, G.A., RAO, M., ALI, M.K., RILEY, L.M., ROBINSON, C.A. and EZZATI, M., 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *The Lancet,* **378**, 31-40.

17. DAVIES, S.P., HELPS, N.R., COHEN, P.T. and HARDIE, D.G., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein

phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS letters,* **377**, 421-425.

18. EL-MIR, M.Y., NOGUEIRA, V., FONTAINE, E., AVERET, N., RIGOULET, M. and LEVERVE, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry,* **275**, 223-228.

19. EVANS, J.M., DONNELLY, L.A., EMSLIE-SMITH, A.M., ALESSI, D.R. and MORRIS, A.D., 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ (Clinical research ed.),* **330**, 1304-1305.

20. FENG, Z., HU, W., DE STANCHINA, E., TERESKY, A.K., JIN, S., LOWE, S. and LEVINE, A.J., 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research,* **67**, 3043-3053.

21. FENG, Z., ZHANG, H., LEVINE, A.J. and JIN, S., 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **102**, 8204-8209.

22. FLETCHER, O., JOHNSON, N., DOS SANTOS SILVA, I., ORR, N., ASHWORTH, A., NEVANLINNA, H., HEIKKINEN, T., AITTOMAKI, K., BLOMQVIST, C., BURWINKEL, B., BARTRAM, C.R., MEINDL, A., SCHMUTZLER, R.K., COX, A., BROCK, I., ELLIOTT, G., REED, M.W., SOUTHEY, M.C., SMITH, L., SPURDLE, A.B., HOPPER, J.L., COUCH, F.J., OLSON, J.E., WANG, X., FREDERICKSEN, Z., SCHURMANN, P., WALTES, R., BREMER, M., DORK, T., DEVILEE, P., VAN ASPEREN, C.J., TOLLENAAR, R.A., SEYNAEVE, C., HALL, P., CZENE, K., HUMPHREYS, K., LIU, J., AHMED, S., DUNNING, A.M., MARANIAN, M., PHAROAH, P.D., CHENEVIX-TRENCH, G., KCONFAB INVESTIGATORS, AOCS GROUP, BEESLEY, J., BOGDANOVA, N.V., ANTONENKOVA, N.N., ZALUTSKY, I.V., ANTON-CULVER, H., ZIOGAS, A., BRAUCH, H., KO, Y.D., HAMANN, U., GENICA CONSORTIUM, FASCHING, P.A., STRICK, R., EKICI, A.B., BECKMANN, M.W., GILES, G.G., SEVERI, G., BAGLIETTO, L., ENGLISH, D.R., MILNE, R.L., BENITEZ, J., ARIAS, J.I., PITA, G., NORDESTGAARD, B.G., BOJESEN, S.E., FLYGER, H., KANG, D., YOO, K.Y., NOH, D.Y., MANNERMAA, A., KATAJA, V., KOSMA, V.M., GARCIA-CLOSAS, M., CHANOCK, S., LISSOWSKA, J., BRINTON, L.A., CHANG-CLAUDE, J., WANG-GOHRKE, S., BROEKS, A., SCHMIDT, M.K., VAN LEEUWEN, F.E., VAN'T VEER, L.J., MARGOLIN, S., LINDBLOM, A., HUMPHREYS, M.K., MORRISON, J., PLATTE, R., EASTON, D.F., PETO, J. and BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM, 2010. Missense variants in ATM in 26,101 breast cancer cases and 29,842 controls. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology,* **19**, 2143-2151.

23. FLOREZ, J.C., JABLONSKI, K.A., TAYLOR, A., MATHER, K., HORTON, E., WHITE, N.H., BARRETT-CONNOR, E., KNOWLER, W.C., SHULDINER, A.R.,

POLLIN, T.I. and DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP, 2012. The C allele of ATM rs11212617 does not associate with metformin response in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes care,* **35**, 1864-1867.

24. FORETZ, M., HEBRARD, S., LECLERC, J., ZARRINPASHNEH, E., SOTY, M., MITHIEUX, G., SAKAMOTO, K., ANDREELLI, F. and VIOLLET, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of clinical investigation,* **120**, 2355-2369.

25. FU, X., WAN, S., LYU, Y.L., LIU, L.F. and QI, H., 2008. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PloS one,* **3**, e2009.

26. FUCHSBERGER, C., FLANNICK, J., TESLOVICH, T.M., MAHAJAN, A., AGARWALA, V., GAULTON, K.J., MA, C., FONTANILLAS, P., MOUTSIANAS, L., MCCARTHY, D.J., RIVAS, M.A., PERRY, J.R., SIM, X., BLACKWELL, T.W., ROBERTSON, N.R., RAYNER, N.W., CINGOLANI, P., LOCKE, A.E., FERNANDEZ TAJES, J., HIGHLAND, H.M., DUPUIS, J., CHINES, P.S., LINDGREN, C.M., HARTL, C., JACKSON, A.U., CHEN, H., HUYGHE, J.R., VAN DE BUNT, M., PEARSON, R.D., KUMAR, A., MULLER-NURASYID, M., GRARUP, N., STRINGHAM, H.M., GAMAZON, E.R., LEE, J., CHEN, Y., SCOTT, R.A., BELOW, J.E., CHEN, P., HUANG, J., GO, M.J., STITZEL, M.L., PASKO, D., PARKER, S.C., VARGA, T.V., GREEN, T., BEER, N.L., DAY-WILLIAMS, A.G., FERREIRA, T., FINGERLIN, T., HORIKOSHI, M., HU, C., HUH, I., IKRAM, M.K., KIM, B.J., KIM, Y., KIM, Y.J., KWON, M.S., LEE, J., LEE, S., LIN, K.H., MAXWELL, T.J., NAGAI, Y., WANG, X., WELCH, R.P., YOON, J., ZHANG, W., BARZILAI, N., VOIGHT, B.F., HAN, B.G., JENKINSON, C.P., KUULASMAA, T., KUUSISTO, J., MANNING, A., NG, M.C., PALMER, N.D., BALKAU, B., STANCAKOVA, A., ABBOUD, H.E., BOEING, H., GIEDRAITIS, V., PRABHAKARAN, D., GOTTESMAN, O., SCOTT, J., CAREY, J., KWAN, P., GRANT, G., SMITH, J.D., NEALE, B.M., PURCELL, S., BUTTERWORTH, A.S., HOWSON, J.M., LEE, H.M., LU, Y., KWAK, S.H., ZHAO, W., DANESH, J., LAM, V.K., PARK, K.S., SALEHEEN, D., SO, W.Y., TAM, C.H., AFZAL, U., AGUILAR, D., ARYA, R., AUNG, T., CHAN, E., NAVARRO, C., CHENG, C.Y., PALLI, D., CORREA, A., CURRAN, J.E., RYBIN, D., FAROOK, V.S., FOWLER, S.P., FREEDMAN, B.I., GRISWOLD, M., HALE, D.E., HICKS, P.J., KHOR, C.C., KUMAR, S., LEHNE, B., THUILLIER, D., LIM, W.Y., LIU, J., VAN DER SCHOUW, Y.T., LOH, M., MUSANI, S.K., PUPPALA, S., SCOTT, W.R., YENGO, L., TAN, S.T., TAYLOR, H.A.,Jr, THAMEEM, F., WILSON, G.S., WONG, T.Y., NJOLSTAD, P.R., LEVY, J.C., MANGINO, M., BONNYCASTLE, L.L., SCHWARZMAYR, T., FADISTA, J., SURDULESCU, G.L., HERDER, C., GROVES, C.J., WIELAND, T., BORK-JENSEN, J., BRANDSLUND, I., CHRISTENSEN, C., KOISTINEN, H.A., DONEY, A.S., KINNUNEN, L., ESKO, T., FARMER, A.J., HAKASTE, L., HODGKISS, D., KRAVIC, J., LYSSENKO, V., HOLLENSTED, M., JORGENSEN, M.E., JORGENSEN, T., LADENVALL, C., JUSTESEN, J.M., KARAJAMAKI, A., KRIEBEL, J., RATHMANN, W., LANNFELT, L., LAURITZEN, T., NARISU, N., LINNEBERG, A., MELANDER, O., MILANI, L., NEVILLE, M., ORHO-MELANDER, M., QI, L., QI, Q., RODEN, M., ROLANDSSON, O., SWIFT, A., ROSENGREN, A.H., STIRRUPS, K., WOOD,

A.R., MIHAILOV, E., BLANCHER, C., CARNEIRO, M.O., MAGUIRE, J., POPLIN, R., SHAKIR, K., FENNELL, T., DEPRISTO, M., HRABE DE ANGELIS, M., DELOUKAS, P., GJESING, A.P., JUN, G., NILSSON, P., MURPHY, J., ONOFRIO, R., THORAND, B., HANSEN, T., MEISINGER, C., HU, F.B., ISOMAA, B., KARPE, F., LIANG, L., PETERS, A., HUTH, C., O'RAHILLY, S.P., PALMER, C.N., PEDERSEN, O., RAURAMAA, R., TUOMILEHTO, J., SALOMAA, V., WATANABE, R.M., SYVANEN, A.C., BERGMAN, R.N., BHARADWAJ, D., BOTTINGER, E.P., CHO, Y.S., CHANDAK, G.R., CHAN, J.C., CHIA, K.S., DALY, M.J., EBRAHIM, S.B., LANGENBERG, C., ELLIOTT, P., JABLONSKI, K.A., LEHMAN, D.M., JIA, W., MA, R.C., POLLIN, T.I., SANDHU, M., TANDON, N., FROGUEL, P., BARROSO, I., TEO, Y.Y., ZEGGINI, E., LOOS, R.J., SMALL, K.S., RIED, J.S., DEFRONZO, R.A., GRALLERT, H., GLASER, B., METSPALU, A., WAREHAM, N.J., WALKER, M., BANKS, E., GIEGER, C., INGELSSON, E., IM, H.K., ILLIG, T., FRANKS, P.W., BUCK, G., TRAKALO, J., BUCK, D., PROKOPENKO, I., MAGI, R., LIND, L., FARJOUN, Y., OWEN, K.R., GLOYN, A.L., STRAUCH, K., TUOMI, T., KOONER, J.S., LEE, J.Y., PARK, T., DONNELLY, P., MORRIS, A.D., HATTERSLEY, A.T., BOWDEN, D.W., COLLINS, F.S., ATZMON, G., CHAMBERS, J.C., SPECTOR, T.D., LAAKSO, M., STROM, T.M., BELL, G.I., BLANGERO, J., DUGGIRALA, R., TAI, E.S., MCVEAN, G., HANIS, C.L., WILSON, J.G., SEIELSTAD, M., FRAYLING, T.M., MEIGS, J.B., COX, N.J., SLADEK, R., LANDER, E.S., GABRIEL, S., BURTT, N.P., MOHLKE, K.L., MEITINGER, T., GROOP, L., ABECASIS, G., FLOREZ, J.C., SCOTT, L.J., MORRIS, A.P., KANG, H.M., BOEHNKE, M., ALTSHULER, D. and MCCARTHY, M.I., 2016. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature,* **536**, 41-47.

27. GAULTON, K.J., FERREIRA, T., LEE, Y., RAIMONDO, A., MAGI, R., RESCHEN, M.E., MAHAJAN, A., LOCKE, A., RAYNER, N.W., ROBERTSON, N., SCOTT, R.A., PROKOPENKO, I., SCOTT, L.J., GREEN, T., SPARSO, T., THUILLIER, D., YENGO, L., GRALLERT, H., WAHL, S., FRANBERG, M., STRAWBRIDGE, R.J., KESTLER, H., CHHEDA, H., EISELE, L., GUSTAFSSON, S., STEINTHORSDOTTIR, V., THORLEIFSSON, G., QI, L., KARSSEN, L.C., VAN LEEUWEN, E.M., WILLEMS, S.M., LI, M., CHEN, H., FUCHSBERGER, C., KWAN, P., MA, C., LINDERMAN, M., LU, Y., THOMSEN, S.K., RUNDLE, J.K., BEER, N.L., VAN DE BUNT, M., CHALISEY, A., KANG, H.M., VOIGHT, B.F., ABECASIS, G.R., ALMGREN, P., BALDASSARRE, D., BALKAU, B., BENEDIKTSSON, R., BLUHER, M., BOEING, H., BONNYCASTLE, L.L., BOTTINGER, E.P., BURTT, N.P., CAREY, J., CHARPENTIER, G., CHINES, P.S., CORNELIS, M.C., COUPER, D.J., CRENSHAW, A.T., VAN DAM, R.M., DONEY, A.S., DORKHAN, M., EDKINS, S., ERIKSSON, J.G., ESKO, T., EURY, E., FADISTA, J., FLANNICK, J., FONTANILLAS, P., FOX, C., FRANKS, P.W., GERTOW, K., GIEGER, C., GIGANTE, B., GOTTESMAN, O., GRANT, G.B., GRARUP, N., GROVES, C.J., HASSINEN, M., HAVE, C.T., HERDER, C., HOLMEN, O.L., HREIDARSSON, A.B., HUMPHRIES, S.E., HUNTER, D.J., JACKSON, A.U., JONSSON, A., JORGENSEN, M.E., JORGENSEN, T., KAO, W.H., KERRISON, N.D., KINNUNEN, L., KLOPP, N., KONG, A., KOVACS, P., KRAFT, P., KRAVIC, J., LANGFORD, C., LEANDER, K., LIANG, L., LICHTNER, P., LINDGREN, C.M., LINDHOLM, E., LINNEBERG, A., LIU, C.T., LOBBENS, S., LUAN, J., LYSSENKO, V., MANNISTO, S., MCLEOD, O., MEYER, J., MIHAILOV, E.,

MIRZA, G., MUHLEISEN, T.W., MULLER-NURASYID, M., NAVARRO, C., NOTHEN, M.M., OSKOLKOV, N.N., OWEN, K.R., PALLI, D., PECHLIVANIS, S., PELTONEN, L., PERRY, J.R., PLATOU, C.G., RODEN, M., RUDERFER, D., RYBIN, D., VAN DER SCHOUW, Y.T., SENNBLAD, B., SIGURETHSSON, G., STANCAKOVA, A., STEINBACH, G., STORM, P., STRAUCH, K., STRINGHAM, H.M., SUN, Q., THORAND, B., TIKKANEN, E., TONJES, A., TRAKALO, J., TREMOLI, E., TUOMI, T., WENNAUER, R., WILTSHIRE, S., WOOD, A.R., ZEGGINI, E., DUNHAM, I., BIRNEY, E., PASQUALI, L., FERRER, J., LOOS, R.J., DUPUIS, J., FLOREZ, J.C., BOERWINKLE, E., PANKOW, J.S., VAN DUIJN, C., SIJBRANDS, E., MEIGS, J.B., HU, F.B., THORSTEINSDOTTIR, U., STEFANSSON, K., LAKKA, T.A., RAURAMAA, R., STUMVOLL, M., PEDERSEN, N.L., LIND, L., KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S.M., KORPI-HYOVALTI, E., SAARISTO, T.E., SALTEVO, J., KUUSISTO, J., LAAKSO, M., METSPALU, A., ERBEL, R., JOCKE, K.H., MOEBUS, S., RIPATTI, S., SALOMAA, V., INGELSSON, E., BOEHM, B.O., BERGMAN, R.N., COLLINS, F.S., MOHLKE, K.L., KOISTINEN, H., TUOMILEHTO, J., HVEEM, K., NJOLSTAD, I., DELOUKAS, P., DONNELLY, P.J., FRAYLING, T.M., HATTERSLEY, A.T., DE FAIRE, U., HAMSTEN, A., ILLIG, T., PETERS, A., CAUCHI, S., SLADEK, R., FROGUEL, P., HANSEN, T., PEDERSEN, O., MORRIS, A.D., PALMER, C.N., KATHIRESAN, S., MELANDER, O., NILSSON, P.M., GROOP, L.C., BARROSO, I., LANGENBERG, C., WAREHAM, N.J., O'CALLAGHAN, C.A., GLOYN, A.L., ALTSHULER, D., BOEHNKE, M., TESLOVICH, T.M., MCCARTHY, M.I., MORRIS, A.P. and DIABETES GENETICS REPLICATION AND META-ANALYSIS (DIAGRAM) CONSORTIUM, 2015. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nature genetics,* **47**, 1415-1425.

28. GIACOMINI, K.M., BRETT, C.M., ALTMAN, R.B., BENOWITZ, N.L., DOLAN, M.E., FLOCKHART, D.A., JOHNSON, J.A., HAYES, D.F., KLEIN, T., KRAUSS, R.M., KROETZ, D.L., MCLEOD, H.L., NGUYEN, A.T., RATAIN, M.J., RELLING, M.V., REUS, V., RODEN, D.M., SCHAEFER, C.A., SHULDINER, A.R., SKAAR, T., TANTISIRA, K., TYNDALE, R.F., WANG, L., WEINSHILBOUM, R.M., WEISS, S.T., ZINEH, I. and PHARMACOGENETICS RESEARCH NETWORK, 2007. The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response. *Clinical pharmacology and therapeutics,* **81**, 328-345.

29. GIOVANNUCCI, E., HARLAN, D.M., ARCHER, M.C., BERGENSTAL, R.M., GAPSTUR, S.M., HABEL, L.A., POLLAK, M., REGENSTEINER, J.G. and YEE, D., 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes care,* **33**, 1674-1685.

30. GLAUBER, H.S., RISHE, N. and KARNIELI, E., 2014. Introduction to personalized medicine in diabetes mellitus. *Rambam Maimonides medical journal,* **5**, e0002.

31. GODARTS AND UKPDS DIABETES PHARMACOGENETICS STUDY GROUP, WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM 2, ZHOU, K., BELLENGUEZ, C., SPENCER, C.C., BENNETT, A.J., COLEMAN, R.L., TAVENDALE, R., HAWLEY, S.A., DONNELLY, L.A., SCHOFIELD, C.,

GROVES, C.J., BURCH, L., CARR, F., STRANGE, A., FREEMAN, C., BLACKWELL, J.M., BRAMON, E., BROWN, M.A., CASAS, J.P., CORVIN, A., CRADDOCK, N., DELOUKAS, P., DRONOV, S., DUNCANSON, A., EDKINS, S., GRAY, E., HUNT, S., JANKOWSKI, J., LANGFORD, C., MARKUS, H.S., MATHEW, C.G., PLOMIN, R., RAUTANEN, A., SAWCER, S.J., SAMANI, N.J., TREMBATH, R., VISWANATHAN, A.C., WOOD, N.W., MAGIC INVESTIGATORS, HARRIES, L.W., HATTERSLEY, A.T., DONEY, A.S., COLHOUN, H., MORRIS, A.D., SUTHERLAND, C., HARDIE, D.G., PELTONEN, L., MCCARTHY, M.I., HOLMAN, R.R., PALMER, C.N., DONNELLY, P. and PEARSON, E.R., 2011. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nature genetics,* **43**, 117-120.

32. GOODWIN, P.J., PRITCHARD, K.I., ENNIS, M., CLEMONS, M., GRAHAM, M. and FANTUS, I.G., 2008. Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clinical breast cancer,* **8**, 501-505.

33. GRISOUARD, J., DEMBINSKI, K., MAYER, D., KELLER, U., MULLER, B. and CHRIST-CRAIN, M., 2011. Targeting AMP-activated protein kinase in adipocytes to modulate obesity-related adipokine production associated with insulin resistance and breast cancer cell proliferation. *Diabetology & metabolic syndrome,* **3**, 16-5996-3-16.

34. HALICKA, H.D., ZHAO, H., LI, J., TRAGANOS, F., ZHANG, S., LEE, M. and DARZYNKIEWICZ, Z., 2011. Genome protective effect of metformin as revealed by reduced level of constitutive DNA damage signaling. *Aging,* **3**, 1028-1038.

35. HAMBURG, M.A. and COLLINS, F.S., 2010. The path to personalized medicine. *The New England journal of medicine,* **363**, 301-304.

36. HARDIE, D.G., 2011. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochemical Society transactions,* **39**, 1-13.

37. HARDIE, D.G., 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology,* **8**, 774-785.

38. HAWLEY, S.A., ROSS, F.A., CHEVTZOFF, C., GREEN, K.A., EVANS, A., FOGARTY, S., TOWLER, M.C., BROWN, L.J., OGUNBAYO, O.A., EVANS, A.M. and HARDIE, D.G., 2010. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell metabolism,* **11**, 554-565.

39. HIEN, P., BÖHM, B., CLAUDI-BÖHM, S., KRÄMER, C. and KOHLHAS, K., 2013. *Diabetes Handbuch.* 7.Auflage edn. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

40. HINDORFF, L.A., SETHUPATHY, P., JUNKINS, H.A., RAMOS, E.M., MEHTA, J.P., COLLINS, F.S. and MANOLIO, T.A., 2009. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106**, 9362-9367.

41. HUNDAL, R.S., KRSSAK, M., DUFOUR, S., LAURENT, D., LEBON, V., CHANDRAMOULI, V., INZUCCHI, S.E., SCHUMANN, W.C., PETERSEN, K.F., LANDAU, B.R. and SHULMAN, G.I., 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes,* **49,** 2063-2069.

42. IMAMURA, K., OGURA, T., KISHIMOTO, A., KAMINISHI, M. and ESUMI, H., 2001. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochemical and biophysical research communications,* **287**, 562-567.

43. IPE, J., SWART, M., BURGESS, K.S. and SKAAR, T.C., 2017. High-Throughput Assays to Assess the Functional Impact of Genetic Variants: A Road Towards Genomic-Driven Medicine. *Clinical and translational science,* **10**, 67-77.

44. JALVING, M., GIETEMA, J.A., LEFRANDT, J.D., DE JONG, S., REYNERS, A.K., GANS, R.O. and DE VRIES, E.G., 2010. Metformin: taking away the candy for cancer? *European journal of cancer (Oxford, England: 1990),* **46**, 2369-2380.

45. JONES, R.G., PLAS, D.R., KUBEK, S., BUZZAI, M., MU, J., XU, Y., BIRNBAUM, M.J. and THOMPSON, C.B., 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell,* **18**, 283-293.

46. KÖSTER, I., VON FERBER, L. and HAUNER, H., 2005. *Die Kosten des Diabetes mellitus - Ergebnisse der KoDiM-Studie.* Köln: PMV-Forschergruppe.

47. KUMAR, V., ABBAS, A., FAUSTO, N. and MITCHELL, R., 2012. *Robbins Basic Pathology.* 9. edn. Philadelphia: Saunders.

48. LAMANNA, C., MONAMI, M., MARCHIONNI, N. and MANNUCCI, E., 2011. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, obesity & metabolism,* **13**, 221-228.

49. LAVIN, M.F., 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology,* **9**, 759-769.

50. MALANDRINO, N. and SMITH, R.J., 2011. Personalized medicine in diabetes. *Clinical chemistry,* **57**, 231-240.

51. MANOLIO, T.A., FOWLER, D.M., STARITA, L.M., HAENDEL, M.A., MACARTHUR, D.G., BIESECKER, L.G., WORTHEY, E., CHISHOLM, R.L., GREEN, E.D., JACOB, H.J., MCLEOD, H.L., RODEN, D., RODRIGUEZ, L.L., WILLIAMS, M.S., COOPER, G.M., COX, N.J., HERMAN, G.E., KINGSMORE, S., LO, C., LUTZ, C., MACRAE, C.A., NUSSBAUM, R.L., ORDOVAS, J.M., RAMOS, E.M., ROBINSON, P.N., RUBINSTEIN, W.S., SEIDMAN, C.,

STRANGER, B.E., WANG, H., WESTERFIELD, M. and BULT, C., 2017. Bedside Back to Bench: Building Bridges between Basic and Clinical Genomic Research. *Cell,* **169,** 6-12.

52. MARATHE, P.H., GAO, H.X. and CLOSE, K.L., 2017. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2017. *Journal of diabetes,* **9**, 320-324.

53. MCCARTHY, M.I., 2017. Painting a new picture of personalised medicine for diabetes. *Diabetologia*.

54. MILLER, R.A. and BIRNBAUM, M.J., 2010. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *The Journal of clinical investigation,* **120**, 2267-2270.

55. MIRNEZAMI, R., NICHOLSON, J. and DARZI, A., 2012. Preparing for precision medicine. *The New England journal of medicine,* **366**, 489-491.

56. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON A FRAMEWORK FOR DEVELOPING A NEW TAXONOMY OF DISEASE, 2011.

57. NEWGARD, C.B. and ATTIE, A.D., 2010. Getting biological about the genetics of diabetes. *Nature medicine,* **16**, 388-391.

58. OWEN, M.R., DORAN, E. and HALESTRAP, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal,* **348,** 607-614.

59. PEARSON, E.R., STARKEY, B.J., POWELL, R.J., GRIBBLE, F.M., CLARK, P.M. and HATTERSLEY, A.T., 2003. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet (London, England),* **362**, 1275-1281.

60. PERNICOVA, I. and KORBONITS, M., 2014. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature reviews. Endocrinology,* **10**, 143-156.

61. PIQUETTE-MILLER, M. and GRANT, D.M., 2007. The art and science of personalized medicine. *Clinical pharmacology and therapeutics,* **81**, 311-315.

62. RAM, R., MEHTA, M., NGUYEN, Q.T., LARMA, I., BOEHM, B.O., POCIOT, F., CONCANNON, P. and MORAHAN, G., 2016. Systematic Evaluation of Genes and Genetic Variants Associated with Type 1 Diabetes Susceptibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950),* **196**, 3043-3053.

63. ROBERT KOCH-INSTITUT, ed, 2011. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*
Daten und Fakten: Ergbnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2009". Berlin: RKI.

64. ROSINGER, S., NUTLAND, S., MICKELSON, E., VARNEY, M.D., BOEHM, B.O., OLSEM, G.J., HANSEN, J.A., NICHOLSON, I., HILNER, J.E., PERDUE,

L.H., PIERCE, J.J., AKOLKAR, B., NIERRAS, C., STEFFES, M.W. and T1DGC, 2010. Collection and processing of whole blood for transformation of peripheral blood mononuclear cells and extraction of DNA: the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Clinical trials (London, England),* **7**, 65-74.

65. SACCO, F., CALDERONE, A., CASTAGNOLI, L. and CESARENI, G., 2016. The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *British journal of cancer,* **115**, 1451-1456.

66. SALMINEN, A., HYTTINEN, J.M. and KAARNIRANTA, K., 2011. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany),* **89**, 667-676.

67. SANLI, T., RASHID, A., LIU, C., HARDING, S., BRISTOW, R.G., CUTZ, J.C., SINGH, G., WRIGHT, J. and TSAKIRIDIS, T., 2010. Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics,* **78**, 221-229.

68. SCHAFER, H.J., MAINKA, L., RATHGEBER, G. and ZIMMER, G., 1983. Photoaffinity cross-linking of oligomycin-sensitive ATPase from beef heart mitochondria by 3'-arylazido-8-azido ATP. *Biochemical and biophysical research communications,* **111**, 732-739.

69. SCHALCH, D.S., MCFARLIN, D.E. and BARLOW, M.H., 1970. An unusual form of diabetes mellitus in ataxia telangiectasia. *The New England journal of medicine,* **282**, 1396-1402.

70. SELVIN, E., BOLEN, S., YEH, H.C., WILEY, C., WILSON, L.M., MARINOPOULOS, S.S., FELDMAN, L., VASSY, J., WILSON, R., BASS, E.B. and BRANCATI, F.L., 2008. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Archives of Internal Medicine,* **168**, 2070-2080.

71. SHAW, R.J., KOSMATKA, M., BARDEESY, N., HURLEY, R.L., WITTERS, L.A., DEPINHO, R.A. and CANTLEY, L.C., 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **101**, 3329-3335.

72. SHU, Y., SHEARDOWN, S.A., BROWN, C., OWEN, R.P., ZHANG, S., CASTRO, R.A., IANCULESCU, A.G., YUE, L., LO, J.C., BURCHARD, E.G., BRETT, C.M. and GIACOMINI, K.M., 2007. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *The Journal of clinical investigation,* **117**, 1422-1431.

73. STEPHENNE, X., FORETZ, M., TALEUX, N., VAN DER ZON, G.C., SOKAL, E., HUE, L., VIOLLET, B. and GUIGAS, B., 2011. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia,* **54**, 3101-3110.

74. STORM, P., ROSENGREN, A.G. and GROOP, L., 2016. *A Novel Fine-Tuned Classification of Diabetes with Prognostic Value: Steps towards Precision Medicine.* Abstract 359-OR. edn. New Orleans, LA.: ADA 76th Scientific Sessions.

75. STOROZHUK, Y., HOPMANS, S.N., SANLI, T., BARRON, C., TSIANI, E., CUTZ, J.C., POND, G., WRIGHT, J., SINGH, G. and TSAKIRIDIS, T., 2013. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK. *British journal of cancer,* **108**, 2021-2032.

76. SUHRE, K., SHIN, S.Y., PETERSEN, A.K., MOHNEY, R.P., MEREDITH, D., WAGELE, B., ALTMAIER, E., CARDIOGRAM, DELOUKAS, P., ERDMANN, J., GRUNDBERG, E., HAMMOND, C.J., DE ANGELIS, M.H., KASTENMULLER, G., KOTTGEN, A., KRONENBERG, F., MANGINO, M., MEISINGER, C., MEITINGER, T., MEWES, H.W., MILBURN, M.V., PREHN, C., RAFFLER, J., RIED, J.S., ROMISCH-MARGL, W., SAMANI, N.J., SMALL, K.S., WICHMANN, H.E., ZHAI, G., ILLIG, T., SPECTOR, T.D., ADAMSKI, J., SORANZO, N. and GIEGER, C., 2011. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature,* **477**, 54-60.

77. SUN, Y., CONNORS, K.E. and YANG, D.Q., 2007. AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Molecular and cellular biochemistry,* **306**, 239-245.

78. TANG, T., LORD, J.M., NORMAN, R.J., YASMIN, E. and BALEN, A.H., 2012. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews,* **5**, CD003053.

79. TRAVIS, R.C., REEVES, G.K., GREEN, J., BULL, D., TIPPER, S.J., BAKER, K., BERAL, V., PETO, R., BELL, J., ZELENIKA, D., LATHROP, M. and MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS, 2010. Gene-environment interactions in 7610 women with breast cancer: prospective evidence from the Million Women Study. *Lancet (London, England),* **375**, 2143-2151.

80. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet,* **352**, 854-865.

81. VAN LEEUWEN, N., NIJPELS, G., BECKER, M.L., DESHMUKH, H., ZHOU, K., STRICKER, B.H., UITTERLINDEN, A.G., HOFMAN, A., VAN 'T RIET, E., PALMER, C.N., GUIGAS, B., SLAGBOOM, P.E., DURRINGTON, P., CALLE, R.A., NEIL, A., HITMAN, G., LIVINGSTONE, S.J., COLHOUN, H., HOLMAN, R.R., MCCARTHY, M.I., DEKKER, J.M., 'T HART, L.M. and PEARSON, E.R., 2012. A gene variant near ATM is significantly associated with metformin treatment response in type 2 diabetes: a replication and meta-analysis of five cohorts. *Diabetologia,* **55**, 1971-1977.

82. VIOLLET, B. and FORETZ, M., 2013. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Annales d'Endocrinologie,* **74**, 123-129.

83. VIOLLET, B., GUIGAS, B., LECLERC, J., HEBRARD, S., LANTIER, L., MOUNIER, R., ANDREELLI, F. and FORETZ, M., 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta physiologica (Oxford, England),* **196**, 81-98.

84. VIOLLET, B., GUIGAS, B., SANZ GARCIA, N., LECLERC, J., FORETZ, M. and ANDREELLI, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science (London, England: 1979),* **122**, 253-270.

85. WILCOCK, C. and BAILEY, C.J., 1994. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems,* **24**, 49-57.

86. WOODS, A., DICKERSON, K., HEATH, R., HONG, S.P., MOMCILOVIC, M., JOHNSTONE, S.R., CARLSON, M. and CARLING, D., 2005. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism,* **2**, 21-33.

87. WOODS, A., JOHNSTONE, S.R., DICKERSON, K., LEIPER, F.C., FRYER, L.G., NEUMANN, D., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLSON, M. and CARLING, D., 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology: CB,* **13**, 2004-2008.

88. WOODS, A., LEIPER, J.M. and CARLING, D., 2012. The role of ATM in response to metformin treatment and activation of AMPK. *Nature genetics,* **44**, 360-361.

89. WORLD HEALTH ORGANIZATION, ed, 2009. *Global Health Risks Mortality and burden of disease attributable to selected major risks.* Geneva: World Health Organization.

90. YE, C., DAI, Q., LU, W., CAI, Q., ZHENG, Y., SHU, X.O., GU, K., GAO, Y.T. and ZHENG, W., 2007. Two-stage case-control study of common ATM gene variants in relation to breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment,* **106**, 121-126.

91. YEE, S.W., CHEN, L. and GIACOMINI, K.M., 2012. The role of ATM in response to metformin treatment and activation of AMPK. *Nature genetics,* **44**, 359-360.

92. ZHOU, G., MYERS, R., LI, Y., CHEN, Y., SHEN, X., FENYK-MELODY, J., WU, M., VENTRE, J., DOEBBER, T., FUJII, N., MUSI, N., HIRSHMAN, M.F., GOODYEAR, L.J. and MOLLER, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation,* **108**, 1167-1174.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AMPKα und die pleiotropen Effekte von Metformin 8
Abbildung 2: Metformin und die antidiabetische Wirkung der ATM-Kinase 10
Abbildung 3: Aktivierung von p53 durch Metformin 12
Abbildung 4: Das Patientenkollektiv 15
Abbildung 5: Das Prinzip der AnnexinV-/PI-Apoptose-Durchflusszytometrie 19
Abbildung 6: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie 21
Abbildung 7: Der Versuchsablauf 26
Abbildung 8: Deskriptive Auswertung der AnnexinV-/PI-Apoptose Durchflusszytometrie 29
Abbildung 9: Zellzyklusanalyse ohne Nocodazole 30
Abbildung 10: Zellzyklusanalyse mit Nocodazole 31
Abbildung 11: AMPKα – Unterschiede zwischen Versagern und Ansprechern 33
Abbildung 12: pAMPKα – Unterschiede zwischen Versagern und Ansprechern 35
Abbildung 13: AMPKα – Einfluss der Exposition 37
Abbildung 14: pAMPKα – Einfluss der Exposition 39
Abbildung 15: p53-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h abhängig vom Metforminansprechen 40
Abbildung 16: p53-Konzentration zu den Messzeitpunkten t=3/6/12/24h 42
Abbildung 17: p53-Konzentration in Abhängigkeit von Messzeitpunkt und Exposition 44
Abbildung 18: p21-Konzentration zum Messzeitpunkt t=0h abhängig vom Metforminansprechen 45
Abbildung 19: p21-Konzentration in Abhängigkeit von Messzeitpunkt und Exposition 47
Abbildung 20: Zusammenfassung der Ergebnisse 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht SNP im Bereich ATM bei Therapieversagern auf Metformin 27

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich bei meiner Dissertation in den letzten Jahren unterstützt, begleitet, gefordert und gefördert haben.

Vor allem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bernhard O. Böhm für die Bereitstellung des Themas und die anregenden, konstruktiven Diskussionen. Den Forschungsaufenthalt am Oxford Center for Diabetes, Endocrinology and Metabolism (OCDEM) bei Prof. Marc McCarthy und Dr. Katharine Owen und damit viele herausragende Erfahrungen der letzten Jahre verdanke ich ihm.

Zudem bin ich der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) zu großem Dank verpflichtet, sowohl für die fachliche als auch finanzielle Förderung während meiner Promotion im Rahmen des GrK1041. Der Austausch mit meinen Konstipendiatinnen und Konstipendiaten des Graduiertenkollegs 1041 für molekulare Endokrinologie und Diabetologie war interessant, manchmal kontrovers und stets gewinnbringend. Ganz besonders bei Diplombiologin und Konstipendiatin Christin Münzberg möchte ich mich bedanken. Sie stand mir mit ihrem fachlichen Wissen zur Seite.

Die Mitarbeiter im Labor von Prof. Böhm haben für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt und mich wohlwollend in ihr Team aufgenommen. Insbesondere Frau Angelika Kurkhaus unterstützte mich, indem sie ihre langjährige Erfahrung im Bereich Zellkultur mit mir teilte.

Meiner Familie und meinen Freunden gebührt großer Dank. Sie haben mich stets unterstützt und motiviert. Meine Eltern haben mich mein Leben lang begleitet, mich gefordert, gefördert und bestärkt. Stets standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite. Deshalb widme ich diese Arbeit von Herzen meinen Eltern Heinz und Andrea Eininger.

Lebenslauf

Name:	Ann-Kathrin Eininger
Geburtsdatum/-ort:	5. Juni 1989 in Nürtingen

Schulbildung

1995-1999	Alleenschule Grundschule Kirchheim/ Teck
1999-2008	Ludwig-Uhland-Gymnasium Kirchheim/ Teck

Ausbildung/ Ärztliche Tätigkeit

2008-2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm 09/2010: Erste ärztliche Prüfung 10/2014: Zweite ärztliche Prüfung 11/2015: Dritte ärztliche Prüfung
12/2015	Approbation als Ärztin
Seit 03/2016	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Orthopädin/ Unfallchirurgin am Diakonie-Klinikum Stuttgart

Wissenschaftliche Arbeit

09/2011-12/2011	Forschungsaufenthalt am Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism (OCDEM) Supervisoren: Prof. Marc McCarthy/ Prof. Katharine Owen
09/2011-06/2013	Aktives Mitglied des Graduiertenkollegs 1041 (Molecular Diabetology and Endocrinology in Medicine)

Publikationen/ Poster/ Kongressbeiträge

Eininger, AK, Oram, RA, Friend, PJ et al., (2013). Simultaneous pancreas and kidney transplantation (SPK) should be indicated for patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY) and end-stage nephropathy. DIABETIC MEDICINE, 30, 92-93

Mughal, SA, Einiger, AK, Novokmet, M et al., (2013). Use of high sensitivity C-reactive protein and DG9-glycan index for differential diagnosis of maturity-onset diabetes of the young due to HNF1A mutations in young adults. DIABETIC MEDICINE, 30, 26-26.

Stipendien/ Auszeichnungen

06/2008	Scheffelpreis der literarischen Gesellschaft/ Scheffelbund für besondere Leistungen im Fach Deutsch und gute literarische Kenntnisse
Seit 10/2008	Stipendium der „Deutschen Studentenförderung“ der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.
09/2011-06/2013	DFG-Stipendium und Teilnahme am Graduiertenkolleg „Molekulare Diabetologie und Endokrinologie in der Medizin“
07/2013-12/2013	Stipendium, Universitätsklinikum Ulm (D.0288)

Stuttgart, den 4. April 2017

Ann-Kathrin Eininger