

Aus dem  
CharitéCentrum für Tumormedizin CC14  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
Direktor: Professor Dr. K. Possinger

## **Habilitationsschrift**

# **Optimierung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms unter besonderer Berücksichtigung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jan Eucker  
geboren am 17. August 1967 in Kassel

Eingereicht: August 2012

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Zielinski

2. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Kreienberg

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Epidemiologischer Hintergrund .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Inzidenz des Mammakarzinoms .....	6
1.1.2 Mortalität des Mammakarzinoms .....	6
1.1.3 Mortalität des metastasierten Mammakarzinoms.....	7
<b>1.2 Klassifikation des metastasierten Mammakarzinoms .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Molekulare Aspekte des Mammakarzinoms .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg.....	9
1.3.1.1 Aktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs in Malignomen .....	9
1.3.1.2 Die Bedeutung von Akt im Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg .....	9
1.3.1.3 <i>Feed-back</i> -Mechanismen.....	10
1.3.1.4 Funktion von mTOR .....	10
1.3.1.5 mTORC1.....	11
1.3.1.6 Nahrungsangebot, Autophagie, Hypoxie und mTORC1 + 2 .....	11
1.3.1.7 Angiogenese und mTOR.....	12
1.3.1.8 Der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg in Mammakarzinomen .....	14
1.3.1.9 Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen .....	14
1.3.1.10 mTOR-Inhibitoren .....	15
1.3.1.11 mTOR-Inhibition als Monotherapie.....	15
1.3.1.12 Kombinationstherapie mit mTOR-Inhibitoren.....	16
1.3.2 Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR) .....	17
1.3.2.1 Allgemeine Funktion.....	17
1.3.2.2 Gewebsverteilung von PPAR .....	18
1.3.2.3 Antitumoreffekt von PPAR-Liganden.....	18
1.3.2.4 Natürliche und synthetische PPAR-Liganden.....	19
1.3.2.5 Wirkung von Thiazolidindionen auf Malignome .....	19

<b>1.4 Grundsätzliches zur medikamentösen Therapie des metastasierten Mammakarzinoms .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Die Optimierung der medikamentösen Therapie .....	21
<b>1.5 Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Eigene Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
2.1 Antitumoreffekt von Honokiol alleine und in Kombination mit anderen antineoplastischen Substanzen am Mammakarzinom .....	26
2.2 Der MTOR-Inhibitor RAD001 sensibilisiert Tumorzellen <i>in vitro</i> für die zytotoxische Wirkung von Carboplatin an Mammakarzinomzellen .....	36
2.3 Metformin und der mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) sensibilisieren Mammakarzinomzellen für den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika <i>in vitro</i> .....	47
2.4. Induktion einer Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums durch TZD18, einem neuen dualen Liganden für PPAR- $\alpha/\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\gamma$ ), in humanen Mammakarzinomzellen .....	59
2.5 5-Fluorouracil-Dauerinfusion bei stark vorbehandeltem fortgeschrittenem Mammakarzinom .....	72
2.6 Der MTOR-Inhibitor Everolimus in Kombination mit Carboplatin beim metastasierten Mammakarzinom - eine Phase-I-Studie .....	78
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>86</b>
<b>4 Ausblick.....</b>	<b>95</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>112</b>

## Abkürzungen

4E-BP1: *eIF4E binding protein 1*

AP-1: *activator protein 1*

Akt: *Proteinkinase B*

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ATRA: *All-trans-retinoic acid*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

CB: *Clinical benefit* (CR+PR+SD  $\geq$  6 Monate)

C-Fos: durch FOS-Gen kodiertes Protein

CR: *complete remission*

CTC: *common toxicity criteria*

EGFR: *epidermal growth factor receptor 1*

eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*

ER: *Östrogenrezeptor*

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*, Synonym: MAPK

FGFR: *fibroblast growth factor receptor*

FKBP12: *FK506-binding protein*

FOXO: *Forkhead-box-proteine*

GSK: *Glycogen synthase kinase*

HDM2: *human double minute 2*

HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*

HIF1 $\alpha$ : *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*

IGF-1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*

IKK: *I kappaB kinase*

IRS-1: *insulin receptor substrate 1*

LBK1: *serin threonin kinase 11*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

mTORC: *mammalian target of rapamycin complex*

NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

pCR: pathologisch komplette Remission

PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*

PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase 1*

PFS: Progressionsfreies Überleben

Pi3K: *phosphatidylinositol-3 kinase*

PIP2: *phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate*

PIP3: *phosphatidylinositol-3,4,5 trisphosphat*

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor(s)*

PPRE: *peroxisome proliferter response element*

PR: Progesteronrezeptor

PR: *partial remission*

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

Raf: *rapidly growing fibrosarcoma protein*

Raptor: *regulatory-associated protein of mTOR*

Ras: ein kleines G-Protein namens Ras

Rheb: *Ras-homolog-enriched-in-brain*

Rictor: *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*

RTK(s): Rezeptortyrosinkinase(n)

RXR: Retinoid-X-Rezeptor

SD: *stable disease*

S6K1: *ribosomale s6 kinase*

SEER: *National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology And End Results*

SERD: selektiver Östrogenrezeptor-Deregulator

siRNA: *small interference RNA*

Src: durch *viral sarcoma*-Gen codiertes Protein

TSC: *tuberous sclerosis complex*

TZD(s): Thiazolidindion(e)

# 1 Einleitung

## 1.1. Epidemiologischer Hintergrund

### 1.1.1 Inzidenz des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor bei Frauen und geschlechterunabhängig gesehen der dritthäufigste Tumor. In Deutschland erkranken jährlich etwa 74.500 Frauen, in den USA etwa 209.000 am Mammakarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren, jedoch ist etwa jede vierte Frau bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre. In Deutschland versterben pro Jahr 17.200 Frauen an dieser Erkrankung, in den USA 40.200 Frauen. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt je nach Erhebung zwischen 86 % und 90% [85, 96, 111, 148, 164].

Ende 2006 wurde überraschend eine deutliche Abnahme der Inzidenz in den USA konstatiert [144]. Es wurde nachgewiesen, dass die Inzidenz von Mammakarzinomen ab Mitte des Jahres 2002 erheblich gesunken war. Beim Vergleich der Inzidenz des Jahres 2001 mit dem Jahr 2004 zeigte sich eine Abnahme um 8,6%. Die Inzidenzabnahme fand sich vorwiegend bei Frauen im Alter von über 50 Jahren mit Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen. Der Rückgang lag bei dieser Gruppe von Frauen sogar bei 12%. Die Inzidenz Hormonrezeptor-negativer Tumoren war unverändert geblieben.

Als wichtigster Grund für die abnehmende Inzidenz wurde der Rückgang der Verordnung von Hormonersatztherapien angenommen. In einer randomisierten Studie bei Frauen, die eine Hormonersatztherapie erhielten, hatte sich gegenüber der Placebo-Gruppe eine signifikante Zunahme der Mammakarzinominzidenz gezeigt [34]. Nachdem die ersten Ergebnisse dieser Studie publiziert worden waren, war die Verschreibungshäufigkeit stark zurückgegangen [146]. In Berlin und den neuen Bundesländern stieg die Brustkrebsinzidenz bis zum Jahr 2002 an und erreichte dann ein Plateau. Bei über 50-jährigen Frauen war bis zum Jahr 2000 eine deutliche Zunahme der Brustkrebsinzidenz zu beobachten. Nach dem Jahr 2000 fand sich bei 50- bis 69-jährigen Frauen zunächst ein Inzidenz-Plateau, bevor sich dann ab 2003 ebenfalls ein deutlicher Inzidenzrückgang nachweisen ließ [Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt Oktober 2007]. In Deutschland fand sich nach Einführung des Mammakarzinom-Screening-Programms ab 2005 erneut ein sprunghafter Anstieg, da in der ersten Phase viele Tumore früher als ohne Screening entdeckt wurden und möglicherweise auch einige Tumore diagnostiziert wurden, die ansonsten lebenslang unentdeckt geblieben wären [150].

### 1.1.2 Mortalität des Mammakarzinoms

Die Mortalität des Mammakarzinoms nimmt hingegen spätestens seit 1990 kontinuierlich ab [33, 85, 96, 99, 164]. In einer ausführlichen SEER (*National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology And End Results*) -Datenbankanalyse aller invasiven Mammakarzinome zwischen 1990 und 2003 sank die Mortalität im Beobachtungszeitraum um 24%. Die Abnahme war bei Östrogenrezeptor(ER) -positiven Tumoren, die 77% aller Tumore ausmachten, ausgeprägter als bei ER-negativen [85]. Altersabhängige Unterschiede sind ebenfalls evident. Die Mammakarzinom-spezifischen Todesfälle

nahmen von 1990 bis 2007 um 1,96% pro Jahr ab. Die Abnahme war bei jungen Patientinnen zwischen 20 und 49 Jahren am stärksten (2,49% pro Jahr), und war in der höchsten Altersgruppe über 75 Jahren am schwächsten (1,14% pro Jahr) [164]. In einer anderen Untersuchung stieg im Zeitraum von 1975 bis 2005 die 5-Jahres-Überlebensrate von 75% auf 90% an [96]. Der Trend der abnehmenden Mortalität war bis zum Jahr 2012 weiter nachweisbar. In Deutschland ist eine Abnahme der Mammakarzinom-Mortalität von 2007 bis 2012 von 16,4 auf 14,8 Todesfälle pro 100.000 Einwohner nachweisbar [111].

Diese Entwicklung ist sowohl der zunehmend früheren Erkennung der Tumore, u. a. durch das Mammographie-Screening, als auch der konsequenten adjuvanten Therapieführung zuzurechnen [16, 38, 54]. Insbesondere der in diesem Zeitraum zunehmende Einsatz der antihormonellen (endokrinen) Therapie und der Chemotherapie, sowie der zunehmende Einsatz von Anthrazyklinen und Taxanen im Rahmen der adjuvanten Chemotherapie werden als entscheidende Faktoren angeführt [54, 113].

### 1.1.3 Mortalität des metastasierten Mammakarzinoms

Die Mortalität ist größtenteils durch das Rezidiv bzw. das Auftreten von Fernmetastasen und deren Progression bedingt. Es gibt Hinweise, dass auch die mittlere Überlebenszeit von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (MBC) in den letzten Jahrzehnten verbessert werden konnte [33, 62]. Zugleich stieg der Anteil an Patientinnen an, die ein oder mehrere palliative Therapien erhielten. In einer Arbeit aus dem Tumorregister München konnte dieser Überlebenstrend zwar nicht belegt werden, es wurden jedoch nur Patientinnen ausgewertet, die innerhalb von 5 Jahren eine Metastasierung entwickelten. Somit wurden die weniger aggressiven Tumore, die später metastasieren exkludiert [180]. Gleichwohl waren gerade die weniger aggressiven, meist Hormonrezeptor-positiven Tumoren (Luminal A und B) mit der Einführung der Aromatase-Inhibitoren Gegenstand deutlicher klinischer Fortschritte. Die Zeit bis zur Tumorprogression konnte durch die Aromatase-Inhibitoren (Letrozol, Anastrozol, Exemestan) und durch den selektiven Östrogenrezeptor-Deregulator (SERD) Fulvestrant bei postmenopausalen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom in Studien signifikant verbessert werden [21, 63, 123, 149]. Diese rezidivierten also später, d.h. zu einem größeren Teil später als nach 5 Jahren, so dass der Gewinn, der durch die verbesserte endokrine Therapie erreicht wurde, nicht vollständig in diese Statistik eingehen konnte.

Darüber hinaus veränderte sich durch die effektivere adjuvante Therapie zugleich das Spektrum rezidivierter Mammakarzinome in Richtung aggressiverer Tumore. Aber auch bei metastasierten Mammakarzinomen, die HER2 überexprimieren, wurde in Studien nicht nur eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens, sondern bei mehreren auch des Gesamtüberlebens, nachgewiesen [11, 114, 135, 163]. Allerdings machen die HER2-überexprimierenden Tumore nur 13-15% aller metastasierten Mammakarzinome aus, so dass deren Gewicht in der statistischen Beurteilung der Gesamtmortalität gering ist [40, 91]. Dies ist auch vor dem Hintergrund wichtig, dass das Mammakarzinom nicht mehr als homogene Tumorentität anzusehen ist, sondern die biologischen Subtypen berücksichtigt werden sollten.

## 1.2 Klassifikation des metastasierten Mammakarzinoms

Nicht nur epidemiologisch, sondern auch in zukünftigen Studien und im klinischen Alltag sollte man Mammakarzinome in unterschiedliche Subtypen einteilen, da diese unterschiedlich biologische Eigenschaften aufweisen. Seit Einführung der *DNA-Microarray* befindet sich die Definition dieser Subtypen im Wandel [139, 166]. Grundlage der Einteilung, die weitverbreitet klinische Anwendung gefunden hatte, ist bis dato die immunhistochemische bzw. histopathologische Charakterisierung anhand des Rezeptorstatus. Leitrezeptoren sind der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR) und HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*). Letzter gehört zur Familie der *human-epidermal-growth-factor-receptor*-Familie, von denen bisher vier charakterisiert wurden (EGFR1/HER1, HER2, HER3, HER4). Immunhistochemisch werden Mammakarzinome in ER- oder PR-positive, HER2-überexprimierende, deren Kombinationen, sowie tripel-negative Tumore eingeteilt. In den letzten Jahren wurde mehr und mehr favorisiert, sie insbesondere in der adjuvanten Therapiesituation nach ihrem molekularen Subtyp zu klassifizieren [64, 166]. Mittels *Gen-Array* lassen sich verschiedene molekulare Subtypen unterscheiden: Luminal-A-, Luminal-B-, Luminal/HER2-, HER2-*enriched*- und *Basal-like*-Tumore, sowie *Normal-like*- und *Claudin-low*-Tumore [166, 184]. Da jedoch die molekulare Klassifikation in der klinischen Routine zurzeit noch u.a. an der fehlenden Verfügbarkeit der Testsysteme und an den Kosten scheitert, wird empfohlen, die einzelnen Karzinome anhand ihrer immunhistochemischen Eigenschaften den molekularen Tumorsubtypen zuzuordnen [65]. Luminal-A- und Luminal-B-Tumore exprimieren Hormonrezeptoren. Das Grading liegt meist bei 1 oder 2. Luminal-A-Tumore zeigen oft sehr geringe Proliferationsraten. Luminal-B-Tumore haben eine höhere proliferative Aktivität und werden zusätzlich in HER2-negativ und -positiv (Luminal/HER2+) unterteilt. HER2-positive Tumore weisen nur zu einem Viertel Hormonrezeptoren auf, haben meist ein hohe proliferative Aktivität und ein Grading von 3. *Basal-like*-Tumore exprimieren weder Hormonrezeptoren noch HER2; sie werden deshalb als *triple*-negativ bezeichnet. Dieser „Rückübersetzung“ molekularer Subtypen in immunhistochemische Merkmale muss man sich bedienen, da die meisten Daten klinischer Studien noch auf der immunhistochemischen Einteilung beruhen.

Die Häufigkeiten der Subtypen zeigen wie bei lokalisierten Karzinomen auch in der metastasierten Situation eine Dominanz der Hormonrezeptor-positiven Tumore (Luminal A: 44%; Luminal B: 24%; Luminal/HER2: 6,5%) und die aggressiveren Tumore stehen in der Häufigkeit zurück: HER2 enriched: 7%; *basal-like*: 9,8%; *Triple-negative-non-basal*: 8,5% [91]. Innerhalb der ersten fünf Jahre treten nahezu alle Rückfälle der aggressiven Subtypen auf, während Luminal A/B-Tumore auch noch nach 5-15 Jahren metastasieren können und bisweilen sogar später. Entsprechende Untersuchungen zeigen, dass das mediane Überleben nach Erstdiagnose der Metastasierung sich zwischen den Subgruppen relevant unterscheidet (medianes Gesamtüberleben: Luminal A: 2,2 Jahre; Luminal B: 1,6 Jahre; Luminal/HER2: 1,3 Jahre; *HER2-enriched*: 0,7 Jahre; *basal-like*: 0,5 Jahre [91]. Aus diesen Zahlen ergibt sich selbstredend ein erheblicher Bedarf, den Verlauf des metastasierten Mammakarzinoms durch Optimierung der Therapie zu beeinflussen.



## 1.3 Molekulare Aspekte des Mammakarzinoms

### 1.3.1 Der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg

#### 1.3.1.1 Aktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs in Malignomen

Eine der wichtigsten Eigenschaften maligner Zellen, die zur Tumorentstehung beiträgt, ist die Fähigkeit, chronisch zu proliferieren. Die sie dazu befähigenden Signale werden zum Teil parakrin oder autokrin durch Wachstumsfaktoren vermittelt, die an Zelloberflächenrezeptoren binden, deren intrazelluläre Domänen eine Tyrosinkinase enthalten (Rezeptortyrosinkinasen, RTKs). Die Tyrosinkinase vermittelt diese Signale über verzweigte Signaltransduktionswege, die letztendlich die Zellzyklusprogression, das Zellwachstum und die Proliferation steuern und stimulieren. Der Stimulus kann aber auch ohne Wachstumsfaktoren durch konstitutiv überaktivierte Signaltransduktionswege erfolgen, z. B. infolge somatischer Mutationen. Oft werden über diese Signaltransduktionswege nicht nur die Proliferation und das Zellwachstum sondern auch andere zellbiologische Eigenschaften beeinflusst, wie Antiapoptose und Angiogenese oder der Energiemetabolismus der Tumorzelle [71].

Somatische Mutationen führen bei vielen Tumoren zu einer Überaktivierung von *phosphatidylinositol-3-kinase* (Pi3K) [86, 194]. Verschiedene RTKs, z. B. der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) und *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) können mit Pi3K interagieren und die Kinase aktivieren. Pi3K selbst verwendet *phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate* (PIP<sub>2</sub>) als Substrat und generiert *phosphatidylinositol-3,4,5 trisphosphat* (PIP<sub>3</sub>) als *second messenger* [194]. Pi3K ist auch an der Regulierung der mTOR-Aktivität als Reaktion auf Aminosäurespiegel und der Regulierung von Autophagie unter zellulärem Stress beteiligt [69, 173].

#### 1.3.1.2 Die Bedeutung von Akt im Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg

Die Serin-Threonin-Proteinkinase Akt ist eins der wichtigsten Zielproteine von Pi3K, das im Signaltransduktionsweg *downstream* folgt (Abbildung 1). PIP<sub>3</sub> bindet an Akt, führt zur Membranrekrutierung von Akt und bindet außerdem an die *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) [49]. PDK1 kann daraufhin Akt phosphorylieren. Aktiviertes Akt wandert in Zytoplasma und Kern, wo durch Phosphorylierung weitere Proteine aktiviert und inhibiert werden, die in verschiedene zelluläre Funktionen involviert sind, einschließlich Zellmetabolismus, Proteinsynthese, Inhibition von Apoptose und Zellzyklusprogression. Hier seien nur einige dieser weiteren Funktionen erwähnt [116]: Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionswegs durch Phosphorylierung von I- $\kappa$ B-Kinase (IKK)  $\alpha/\beta$ , die Regulierung des Tumorsuppressors p53 über HDM2, das die Proteasom-vermittelte Degradierung von p53 fördert und die Regulierung von Proliferation und Tumorstadium durch Beschleunigung der Zellzyklusprogression [55, 171]. Akt blockiert die FOXO(*forkhead box proteine*)-vermittelte Transkription von Zellzyklusinhibitoren und fördert so den Übergang von der G1- in die S-Phase. Akt stabilisiert auch c-Myc und Cyclin D1 durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und der GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin-Signalachse [86].

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktion. In diesem Signalweg phosphoryliert und inaktiviert Akt das Tuberin bzw. *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), ein GTPase aktivierendes Protein des Ras-Homologs Rheb (*Ras-homolog-enriched-in-brain*). Inaktivierung von

TSC2 ermöglicht GTP-gebundenem Rheb zu akkumulieren und aktiviert den mTOR/Raptor-Komplex (mTORC1), der aus mTOR und Raptor(*regulatory-associated protein of mTOR*) besteht. Auch durch die Präsenz von Aminosäuren wird Rheb ermöglicht mTOR zu aktivieren. So kann letztendlich physiologisch und in Tumorzellen Proteinsynthese und Zellwachstum reguliert werden [39, 68]. mTOR verbindet sich ebenfalls mit Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) und formt den mTOR/Rictor-Komplex mTORC2, der wiederum Akt an Ser473 phosphoryliert und aktivieren kann.

### 1.3.1.3 Feed-back-Mechanismen

Aber nicht nur Überaktivierung, sondern auch die pathologische Deregulierung von Feedback-Mechanismen von Signalwegen, die unter physiologischen Bedingungen die Homöostase von Wachstum und Hemmung bewahren, tragen zur Tumorentstehung bei. Auch hierfür ist der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg exemplarisch. Die Tumorsuppressorphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) antagonisiert die Pi3K-Wirkung, indem sie dessen Produkt PIP3 dephosphoryliert (s. Abbildung 1). Mutationen, die zu einem Verlust oder zur Abschwächung der PTEN-Aktivität führen, verstärken die Pi3K-Signalweitergabe [86, 194].

Zwar steigert die mTOR-Aktivierung grundsätzlich viele Prozesse, die für die Tumorentstehung bedeutsam sind, jedoch führt mTOR-Aktivierung in manchen Tumorzellen über einen negativen Feedback-Mechanismus über S6K1-IRS1-Pi3K auch zur Inhibition der Pi3K-Signaltransduktion. Somit kann eine mTOR-Inhibition auch zu einer partiellen Aktivierung des Signaltransduktionswegs führen, da der negative Feedback aufgehoben wird und darüber hinaus ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert wird [131]. Zusätzlich aktiviert eine S6K1-Inhibition die Transkription von PDGFR [198].

Diese Feed-back-Mechanismen gewährleisten unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Stimulierung und Inhibition.

### 1.3.1.4 Funktion von mTOR

Genetische und biochemische Untersuchungen an Hefen und Säugetieren führten zu der Entdeckung von TOR als Zielprotein des Immunsuppressivums Rapamycin (s. u.), das dem Protein seinen Namen gab: *target of rapamycin*. TOR, bei Säugern mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ist ein phylogenetisch hochkonserviertes Protein, das zum Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg gehört und den Organismus befähigt metabolischen, exogenen oder genetischen Stress zu verarbeiten [201]. mTOR ist die katalytische Untereinheit der zwei verschiedenen Proteinkomplexe, mTORC 1 und mTORC2. Diese zwei Komplexe unterscheiden sich im Wesentlichen durch die zwei regulatorische Proteine, die den Komplexen assoziiert sind, Raptor und Rictor. Sie dienen als Baugerüst der Komplexe, an die sich mTOR, Substrate und Regulatoren anlagern. Zum Beispiel bindet Rapamycin an das FK506-*binding protein* (FKBP) und im Gegenzug bindet dann der entstandene Rapamycin-FKBP-Komplex das Raptor-gebundene mTOR, jedoch nicht Rictor-gebundenes mTOR. Durch diese Bindung wird die Substratbindung von mTORC1 und damit die weitere Signaltransduktion verhindert, weshalb Rapamycin und seine Derivate als mTOR-Inhibitoren (s. Abschnitt 1.3.1.10) bezeichnet werden [44, 201].

### 1.3.1.5 mTORC1

Die wichtigsten Substrate von mTORC1 sind S6K1 und eIF4E binding protein 1 (4E-BP1). S6K1 und 4E-BP1 regulieren mRNA-Translation und rRNA-Transkription und dadurch die Rate der Proteinsynthese. Darüber hinaus kontrolliert mTORC1 auch verschiedene Transkriptionsfaktoren, die in die Lipidsynthese und den mitochondrialen Metabolismus involviert sind [201].

Die Schlüsselstellung von mTOR, insbesondere mTORC1, wird noch deutlicher, wenn man die Vernetzung mit anderen Signalwegen betrachtet. Zum Beispiel ist mTORC1 ein Schritt am Ende der Ras-Raf-ERK-Achse. ERK phosphoryliert TSC2 und inhibiert ihn somit, was in der Konsequenz zur mTOR-Aktivierung führt [107]. Darüber hinaus hat der Wnt-Signalweg Einfluss auf mTORC1. *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) agiert hier ebenfalls als negativer Regulator von mTORC1, da er TSC2 phosphoryliert. Durch Inhibition von GSK3 $\beta$  aktiviert Wnt mTORC1 (Abbildung 1) [81].

### 1.3.1.6 Nahrungsangebot, Autophagie, Hypoxie und mTORC1 + 2

Auch in Autophagieprozesse ist mTORC1 involviert. Autophagie ist ein wichtiger katabolischer Prozess zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, bei dem intrazelluläre Proteine oder vollständige Organellen, die beschädigt, überzählig oder gar gefährlich sind, kontrolliert degradiert werden. Sie sichert das Überleben einer Zelle unter Stress [183]. Bei geringem extrazellulärem Nährstoffangebot ist Autophagie für den Energiehaushalt der Zelle besonders bedeutsam, da während Autophagie degradierte zelleigene Bestandteile als Aminosäuren-Ressource dienen. mTORC1 unterdrückt Autophagie, während Inhibition von mTORC1 (z. B. durch mTOR-Inhibitoren oder Aminosäureentzug) Autophagie induziert. Zerstört man das für FKBP-kodierende Gen, kann durch mTOR-Inhibition keine Autophagie mehr induziert werden [125, 175].

Der mTOR-Signalweg wird auch über das Nahrungsangebot reguliert. Liegt viel Nahrung i. S. von Aminosäuren vor, wird LKB1, ein Tumorsuppressorprotein, und damit auch AMPK (*AMP-activated protein kinase*) inhibiert, das ansonsten über TSC2 das Rheb hemmen und somit auch den mTOR-Signalweg hemmen würde. Das bedeutet, bei viel Nährstoffangebot wird der mTOR-Signalweg nicht inhibiert, Zellteilung wird gefördert. Konstitutive mTORC1-Aktivierung fördert also unter anderem indirekt die Tumorgenese durch Suppression der Autophagie.

Physiologisch kommt es bei geringem Nährstoffangebot zum Abfall von ATP und zur Wachstumshemmung. In der Folge aber steigt die ATP/AMP-Ratio in der Zelle wieder an, denn AMP und ATP sind allosterische Regulatoren von AMPK, die wiederum TSC2 als auch Raptor phosphorylieren kann; beides wirkt inhibitorisch auf mTORC1 [39, 201].

Es gibt verschiedene Stressoren, die über AMPK zu mTORC1-Hemmung führen, unter anderem Hypoxie oder DNA-Schädigung. Letztere führt zur mTORC1-Inhibition über p53-abhängige Hochregulierung von AMPK [57].

Der andere mTOR-Komplex, mTORC2, wurde als Mediator der Aktin-Zytoskelettorganisation und Zellpolarisation identifiziert. Der Komplex kontrolliert verschiedene Regulatorproteine des Zytoskeletts. Von besonderer Bedeutung ist, dass mTORC2 Akt phosphoryliert, das dadurch im zweiten Schritt von PDK1 an Thr308, in der katalytischen Domäne von Akt, phosphoryliert werden kann und damit erst vollständig aktiviert wird. Die Akt-vermittelte Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3 verhindert deren Translokation in den Nucleus und die Aktivierung von Genexpressionsprogrammen, die die Apoptose fördern, d. h. mTORC2 hat über die durch Akt vermittelte FOXO1/2-Hemmung Bedeutung

für das Überleben der Zelle [201]. Die Regulatoren oberhalb von mTORC2 sind weit schlechter untersucht als bei mTORC1. Es wird davon ausgegangen, dass auch mTORC2 direkt oder indirekt durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert wird.

Im Signalweg *downstream* von mTORC1 wird E4-BP1 von diesem inaktiviert, wodurch eIF4E freigesetzt wird, das die Translation von mRNAs protoonkogenetischer Gene und Zellzyklusregulatoren induziert, was wesentlich zur Tumorentstehung beiträgt (Abbildung 1).

#### 1.3.1.7 Angiogenese und mTOR

Ein weiterer Mechanismus der Tumorentstehung, in den mTOR involviert ist, ist die Angiogenese bzw. die Neoangiogenese im Tumorgewebe. mTORC1 fördert die Angiogenese über HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), der die VEGF-Produktion stimuliert (Abbildung 1). Gerade Tumore mit dysregulierter Angiogenese erwiesen sich als sensibel für mTOR-Inhibition [80, 174, 201]. Aber nicht nur die Inhibition von HIF1 $\alpha$  in Tumorzellen wirkt antiangiogenetisch, sondern zugleich auch die Unterbrechung der durch VEGF stimulierten Signaltransduktion (durch mTOR-Inhibition) in den Endothelzellen [50, 112].

Diese beschriebenen komplexen Funktionen von mTOR, die zur Tumorentstehung wesentlich beitragen, können durch mTOR-Inhibitoren maßgeblich herunterreguliert werden (s. Abschnitt 1.3.1.10).

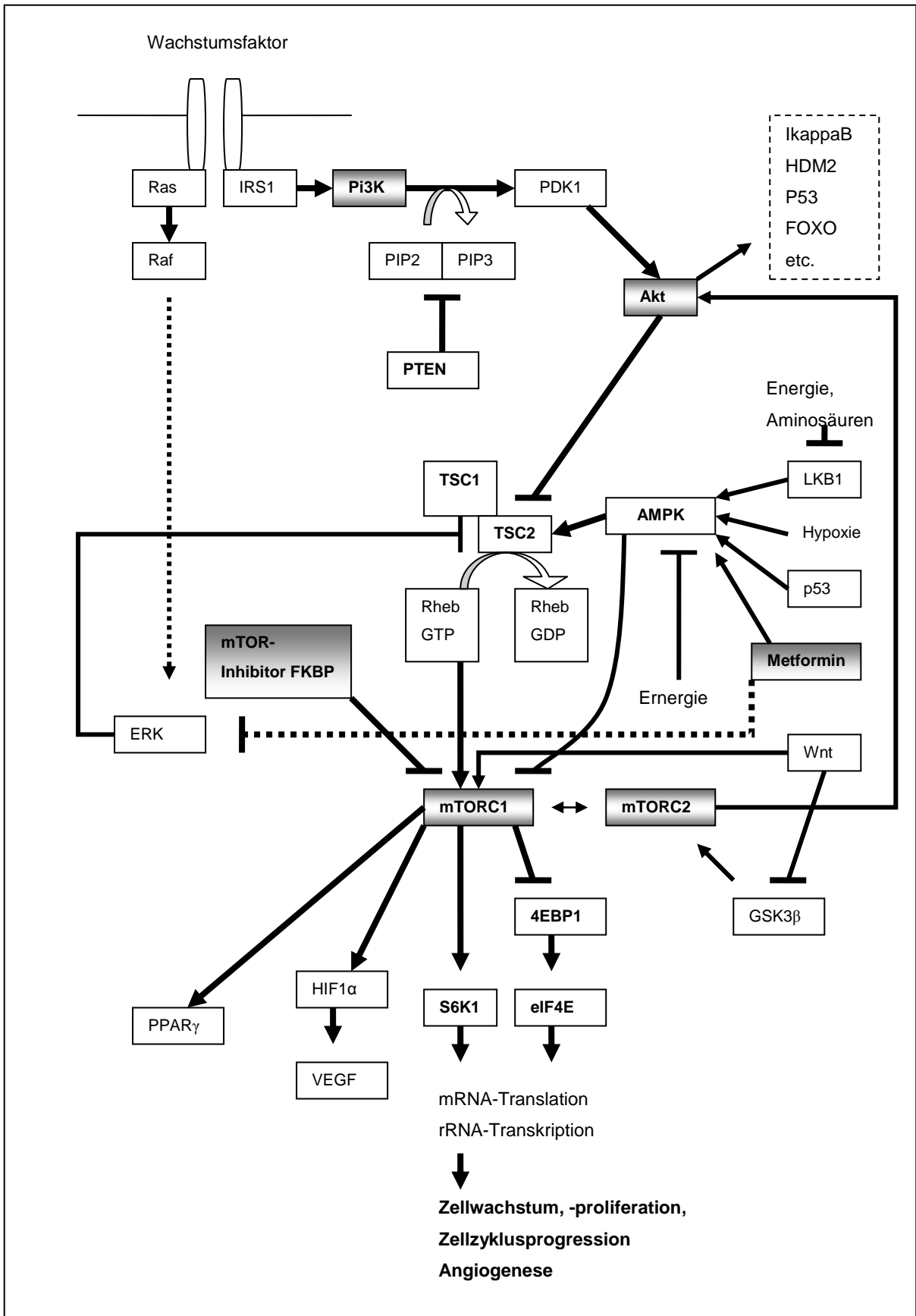


Abbildung 1: PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg.

#### 1.3.1.8 Der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg in Mammakarzinomen

Beim metastasierten Mammakarzinom spielen verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege eine besondere Rolle. Das Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung stellt eine der Voraussetzung für die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten dar.

Bei vielen Mammakarzinomen ist der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg überaktiviert. PIK3CA, das für die katalytische Subunit p110a kodierende Gen von Pi3K, weist beim Mammakarzinom häufig Mutationen auf (27% d. Fälle). Insgesamt wurden diese und andere PIK3-Mutationen in 7-35% der Fälle nachgewiesen. Daneben lag eine PTEN-Mutation oder ein Aktivitätsverlust von PTEN bei 20-33% der Mammakarzinome vor [104, 152, 194]. Bei HER2-überexprimierenden Zellen tritt der Verlust von PTEN-Expression in 22-47% der Fälle auf und wird als ein Mechanismus angesehen, der Trastuzumab-Resistenz bedingt, da der Pi3K-Signaltransduktionsweg nur inkomplett geblockt wird [194]. Dies ist von klinischer Relevanz, da die HER2-Überexpression zu einer verstärkten Aktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs führt [76].

Mutationen und Überaktivierungen des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs haben sowohl prognostische als prädiktive Bedeutung [151, 185]. Patientinnen mit Tumoren, die einen PTEN-Verlust aufwiesen, hatten ein signifikant schlechteres metastasenfreies Überleben und Gesamtüberleben [151]. PTEN-Verlust oder eine PIK3CA-Mutation war in der metastasierten Situation bei HER2-überexprimierenden Tumoren mit einem schlechteren Ansprechen auf Trastuzumab und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert [185].

#### 1.3.1.9 Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen

Aber nicht nur bei HER2-Überexpression, sondern auch bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, hat der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg Bedeutung. Er interagiert sowohl direkt als auch indirekt mit dem ER. Die ER-Phosphorylierung durch Akt erhöht die Östrogen-induzierte, Tamoxifen-induzierte oder Liganden-unabhängige transkriptionelle Aktivität des ERs. Darüber hinaus fördern Pi3K und Ras die Phosphorylierung von c-Jun; c-Jun formt einen Komplex mit c-Fos zum AP-1-Komplex, der wiederum an der ER-Transkription beteiligt ist. Auch die Aktivierung von S6K1, einem Folgeprodukt der mTOR-Aktivierung, phosphoryliert den ER und führt zu Liganden-unabhängiger transkriptioneller Aktivität des ER, was die Bedeutung auch beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom unterstreicht [27, 118].

Der intranukleäre ER selbst transkribiert Gene, die für die Signaltransduktionswege bedeutsam sind (IGF-1R, HER2, IRS-1 etc.). ER-positive Mammakarzinomzellen können unter Östrogenentzug oder Tamoxifentherapie HER2 hoch regulieren, womit sich der Kreis von den RTKs zum ER zu den RTKs schließt. ER bildet darüber hinaus Komplexe mit RTKs und Src und induziert rasche nicht-genomische Signaltransduktion [115]. Zwischen der ER- und PI3K-Signaltransduktion scheint ein Equilibrium zu bestehen, bei dem Tumore mit niedriger PI3K-Aktivierung hohe ER-Level aufweisen und umgekehrt [37, 116].

Östrogenentzug durch Aromatase-Inhibition supprimiert beim ER-positiven Mammakarzinom das Zellwachstum zum Teil über abnehmende Pi3K/Akt/mTOR-Aktivität [12]. Erworbene Resistenzen von Mammakarzinomzellen gegen Tamoxifen, Fulvestrant oder gegen Östrogenentzug sind ebenfalls mit einer Überaktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs assoziiert, so dass hier eine

sinnvolle Kombinationsmöglichkeit zwischen antihormoneller Therapie und mTOR-Inhibition besteht (s. Abschnitt 1.3.1.12) [27, 116, 117].

Bezogen auf den gesamten Pi3K-Signaltransduktionsweg weisen etwa 70% aller Mammakarzinome eine Dysregulation auf [104]. Dieser ist bei Mammakarzinomen somit als der am häufigsten dysregulierten Signaltransduktionsweg anzusehen. Eine zielgerichtete Therapie, die die Hemmung der Signaltransduktion über Pi3K/Akt/mTOR induziert, stellt somit einen vielversprechenden Ansatz dar.

#### 1.3.1.10 mTOR-Inhibitoren

Rapamycin, der erste bekannte mTOR-Inhibitor, und seine Derivate sind zunächst als Immunsuppressiva untersucht und klinisch erfolgreich eingesetzt worden. Rapamycin ist ein Makrolid, das in einem auf den Osterinseln (Rapa Nui) entdeckten Bakterium gefunden wurde [44]. Es handelt sich um eine nicht wasserlösliche weiße Substanz, sie wurde 1975 erstmals synthetisiert.

Die mTOR-Inhibitoren stellen eine Alternative zu den Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 (Tacrolimus) dar, die beide den gleichen Schritt der T-Zell-Aktivierung hemmen. Cyclosporin A und Tacrolimus sind Calcineurin-Antagonisten, die in T-Zellen die Antigen-induzierte, Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signaltransduktion hemmen und letztendlich die Transkription und Freisetzung von Zytokinen, insbesondere Interleukin-2, unterdrücken. Im Gegensatz dazu interferiert Rapamycin nicht mit der Antigenantwort, sondern beeinträchtigt einen späteren Schritt der T-Zell-Aktivierung, die Proliferation als Antwort auf Interleukin-2. Tacrolimus und die mTOR-Inhibitoren Everolimus (RAD001), Temsirolimus (CCI-779) oder Deforolimus (AP-23573, MK-8669) sind wiederum chemisch verwandte Makrolide, die alle an FKBP binden und hierüber ihre Wirkung entfalten [73, 157].

Rapamycin (Sirolimus) und seine Analoga inhibieren die mTOR-Aktivierung durch die Bindung an das FKBP mit hoher Spezifität. Somit wird mit hoher Treffsicherheit die Phosphorylierung der Substrate S6K1 und 4EBP1 gehemmt. Sie sind in intravenöser (z.B. Temsirolimus), oraler (z.B. Sirolimus) oder in beiden Formulierungen (z.B. Everolimus, Ridaforolimus) verfügbar. Die Effektivität der mTOR-Inhibition in der Therapie von hämatologischen und onkologischen Malignomen wurde in präklinischen und klinischen Studien untersucht und zeigte in einem weiten Spektrum an Tumorzellen und Tumoren Wirksamkeit [1, 19, 72, 108, 109, 142, 153, 197].

Die aus Phase-I-Studien hervorgegangene Standarddosis von Everolimus bei malignen Erkrankungen beträgt 10 mg/d per os. Die Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration ( $t_{max}$ ) beträgt 1 bis 2 Stunden. Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) 30 Stunden, die Plasmaproteinbindung ca. 74% [130, 172]. Es wird über die Leber metabolisiert und ist Substrat von CYP3A4 und P-Glykoprotein. Die Metabolite sind fast 100-fach weniger aktiv als Everolimus selbst. Die Elimination erfolgt zu 80% über die Fäzes und zu 5% über den Urin. Temsirolimus wird dagegen einmal wöchentlich mit 25 mg als Kurzinfusion über 30 Minuten appliziert ( $t_{max}$ : 0,5 Stunden,  $t_{1/2}$ : 13 Stunden). Sein Hauptmetabolit ist Sirolimus. Hauptenzym der Metabolisierung von beiden Substanzen ist das Cytochrom-P450-Isoenzym CYP3A4. Die Elimination erfolgt hauptsächlich über Fäzes [7].

#### 1.3.1.11 mTOR-Inhibition als Monotherapie

Die klinisch bedeutsamsten bisher publizierten Studien zur mTOR-Inhibition sind Phase-III-Studien, die zum Teil bereits zur Zulassung der Medikamente geführt haben. Es liegen mittlerweile Ergebnisse beim Nierenzellkarzinom mit Temsirolimus als auch Everolimus, beim Mantelzelllymphom mit

Temsirolimus, beim hochdifferenzierten pankreatischen neuroendokrinen Tumor mit Everolimus und beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom mit Everolimus (in Kombination mit Exemestan) vor [10, 74, 80, 122, 138, 189]. Bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren von niedrigem oder intermediärem Malignitätsgrad konnte das progressionsfreie Überleben (PFS) durch Everolimus-Monotherapie im Vergleich zu Placebo von 4,6 auf 11 Monate gesteigert werden. 5% der Patienten wiesen ein objektives Ansprechen des Tumors auf [189]. Beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom erbrachte Temsirolimus in der Erstlinientherapie ein signifikant längeres medianes PFS und Gesamtüberleben als die bis dahin gültige Standardtherapie Interferon- $\alpha$  [80]. Beim vorbehandelten fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im PFS durch die Monotherapie mit Everolimus im Vergleich zu Placebo (medianes PFS: 4,0 vs 1,9 Monate). Bei beiden Studien zum Nierenzellkarzinom kam es hauptsächlich zur Stabilisierung der Erkrankung. Es traten nur selten objektive Remissionen durch die Therapie mit den mTOR-Inhibitoren ein (Everolimus: 1%; Temsirolimus: 8,6%) [99, 122]. Beim stark vorbehandelten Mantelzelllymphom kam es in 22% der Fälle zu einem objektiven Ansprechen und das mediane Gesamtüberleben wurde im Vergleich zu einer Therapie nach Wahl des Untersuchers im Median von 9,7 auf 12,8 Monate verlängert [74]. In allen Studien, in denen ein mTOR-Inhibitor als Monotherapie eingesetzt wurde, zeigte sich, so wie es die präklinischen Daten bereits prädiziert hatten, dass die Wirkung der mTOR-Inhibition als Einzelsubstanz hauptsächlich zur Krankheitsstabilisierung führten und nur selten Remissionen induzierte.

Auch an Mammakarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sie die Zellproliferation effektiv inhibieren. In einer ausgewählten Zellkultursammlung erwiesen sich 55% aller Zelllinien als für Rapamycin-sensibel [126-127]. Aber auch beim Mammakarzinom zeigte sich, dass mTOR-Inhibition keine Apoptose, sondern lediglich eine Proliferationshemmung induzierte. In klinischen Studien zeigte sich meistens eine Tumorstabilisierung (stable disease), die objektiven Remissionsraten lagen in der Monotherapie mit Temsirolimus oder Everolimus bei lediglich 0-13% [31, 46, 58]. Aus den genannten Gründen lag der Gedanke nahe, die mTOR-Inhibition mit einem anderen Wirkprinzip zu kombinieren, dessen proapoptotischer Effekt damit verstärkt werden kann [41, 120].

#### 1.3.1.12 Kombinationstherapie mit mTOR-Inhibitoren

Beim Mammakarzinom wurden verschiedene mTOR-Inhibitoren getestet. Zurzeit liegen die meisten Daten zum Mammakarzinom für Everolimus vor. Besonders hervorzuheben sind die Studien zur endokrinen Therapie [9, 10, 12, 46]. Hier lag die Beobachtung zugrunde, dass Resistenzen gegen die endokrine Therapie, z. B. erworbene Resistenzen gegen Fulvestrant, Tamoxifen oder Letrozol, durch mTOR-Inhibition abgeschwächt und aufgehoben werden konnten [22, 41, 61].

Neben der antihormonellen Therapie wurden auch „klassische“ Zytostatika mit mTOR-Inhibitoren kombiniert. Resistenzen von Mammakarzinomen gegen solche Zytostatika, wie z. B. Adriamycin, Paclitaxel, Gemcitabin, Vinorelbin oder Platinderivaten, konnten durch mTOR-Inhibitoren *in-vitro* durchbrochen werden [120, 168]. Hierzu liegen auch erste Ergebnisse aus Phase-I-Studien vor [6, 28, 59]. Darüber hinaus bieten sich zur Kombination mit mTOR-Inhibitoren Substanzen an, die am gleichen Signaltransduktionsweg ansetzen an, zum Beispiel EGFR-Inhibitoren wie Gefitinib oder Pi3K-Inhibitoren. Aber auch bekannte Substanzen, mit denen klinische Erfahrungen vorliegen, wie Metformin, können hier bedeutsam sein, da die Antitumorwirkung von mTOR-Inhibitoren



wahrscheinlich durch die unter Abschnitt 1.3.1.1 beschriebenen Feedback-Mechanismen abgeschwächt wird. Die wichtigste Feedback-Schleife verläuft über die Aktivierung von Akt und IRS-1. Metformin, das in den Akt/mTOR-Signalweg eingreift, verringerte im Gegensatz zu Rapamycin die Aktivierung von Akt. Es konnte gezeigt werden, dass Metformin im Gegensatz zu Rapamycin zu einem Anstieg der Phosphorylierung von IRS-1 an Ser789 führte, was normalerweise zur Hemmung des Signalwegs führt. IRS-1 ist Substrat von AMPK, das auch bei Nährstoffmangel in der Zelle phosphoryliert wird, um den Energieverbrauch durch Proliferation herunter zu regulieren [195]. Sowohl mTOR-Inhibitoren als auch Metformin inhibierten mTOR, und zwar mTOR-Inhibitoren direkt, Metformin indirekt über AMPK. Bezüglich des Feedback-Mechanismus war ihre Wirkung jedoch gegensätzlich. Das wiederum qualifizierte Metformin in besonderer Weise zum Kombinationspartner für mTOR-Inhibitoren.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit ist der Versuch, *in vitro* sowohl mit der konventionellen Chemotherapie als auch mit Metformin oder Honokiol zunächst eine Antitumorwirkung beim Mammakarzinom zu erzielen, die zugrunde liegenden Mechanismen, insbesondere mit Blick auf den Pi3K/Akt/mTOR-Signalweg, zu analysieren und in der Kombinationstherapie mit mTOR-Inhibitoren, die Wirksamkeit zu untersuchen.

## 1.3.2 Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR)

### 1.3.2.1 Allgemeine Funktion

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören zur Steroidhormonrezeptor-Superfamilie. Drei Subtypen (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  und PPAR- $\gamma$ ) wurden identifiziert. Sie werden in Geweben unterschiedlich stark exprimiert und unterscheiden sich bezüglich ihrer Ligandenspezifität [15, 43].

PPAR- $\alpha$  wurde 1990 als wichtigstes molekulares Zielprotein von bestimmten Peroxisom-Proliferatoren (z. B. Fibraten) kloniert [82]. 1992 wurde PPAR- $\beta/\delta$  entdeckt, das in der Liganden-Bindungsdomäne eine DNA-Homologie zu PPAR- $\alpha$  von 71% aufweist, in der DNA-Bindungsdomäne von 86% [155]. Als letztes wurde 1994 PPAR- $\gamma$  identifiziert, das eine höhere Expression im Fettgewebe aufweist als die anderen PPAR [43, 176]. Das Gen der Acyl-Coenzym-A-Oxidase, einem typischen Marker der Peroxisom-Proliferation, war das erste Gen, von dem gezeigt wurde, dass ein Peroxisom-Proliferator Response-Element (*peroxisome proliferter response element*, PPRE) als Promotor existiert [178]. Voraussetzung für die Bindung von Liganden an dieses Response-Element, das in der Promotorregion des Zielgens liegt, ist die Heterodimerisierung von PPAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) [83]. Nach Bindung an ihre Liganden kommt es zur Konformationsänderung des PPAR-Moleküls, so dass sich die Liganden-Bindungsdomäne der Aktivierungsdomäne annähert. Es kommt zur Abspaltung von Korepressoren und Rekrutierung von Koaktivatoren und in der Folge als entscheidender Schritt zur Aktivierung und Verstärkung der Gentranskription (Abbildung 2) [15].

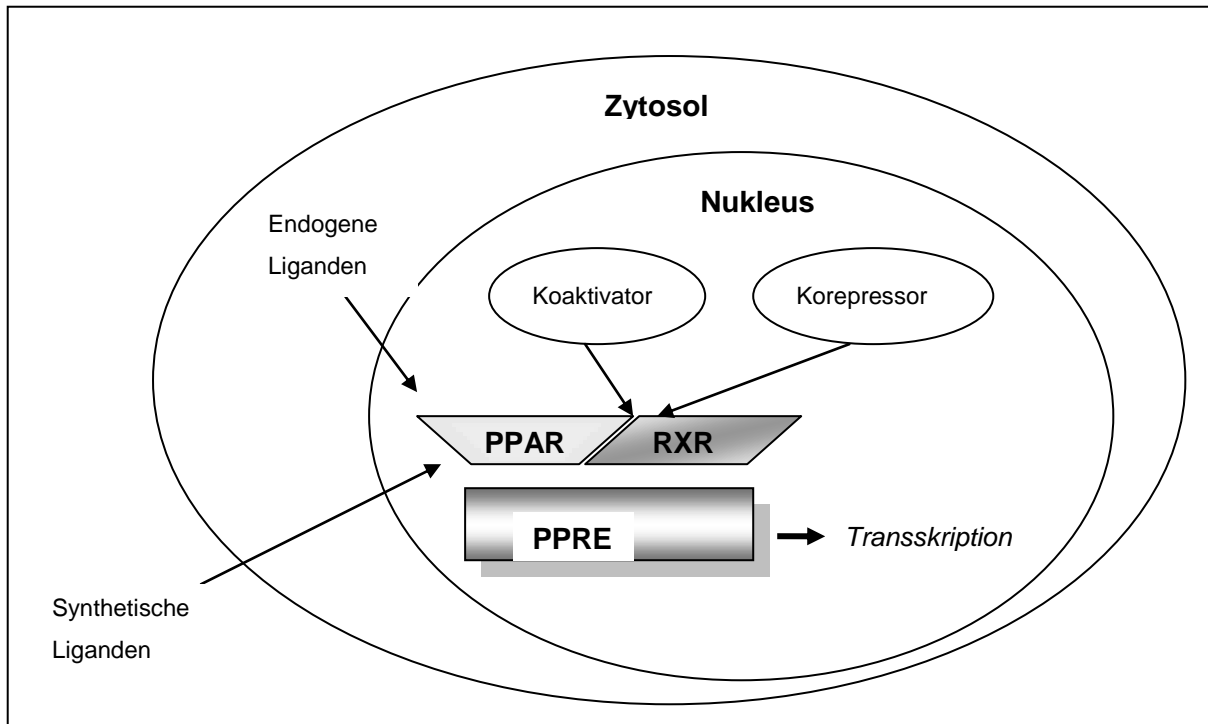


Abbildung 2: PPAR-Interaktion mit Liganden und Response-Element

Initial wurde die besondere Bedeutung von PPAR für den Glukose- und Lipidstoffwechsel erkannt. Später stellte sich heraus, dass die drei PPAR zum einen aufgrund ihrer Expression in unterschiedlichen Geweben und zum anderen wegen ihrer antiinflammatorischen, proapoptischen und Zellzyklus-inhibierenden Eigenschaften in einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen eine Rolle spielen. Bei chronischen Erkrankungen, die mit Veränderungen im Glukose- und Lipidstoffwechsel verbunden sind, wie Diabetes, Adipositas, Atherosklerose und der nicht-alkoholischen Fettleber, sind die PPAR involviert, darüber hinaus bei Inflammation und Angiogenese sowie im ZNS bei Myelinogenese und Gliazellreifung [43, 95].

### 1.3.2.2 Gewebsverteilung von PPAR

PPAR- $\alpha$  wird stark in Fettgewebe, Leber, Intestinum, braunem Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel sowie Niere exprimiert, in anderen Organen auf geringerem Niveau. PPAR- $\beta/\delta$  wird ubiquitär exprimiert, jedoch in stark schwankender Ausprägung. Für PPAR- $\gamma$  wurde eine starke Expression in Fettgewebe und Retina nachgewiesen; er fand sich aber auch im Kolon und in Zellen des Immunsystems, wie B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten. PPAR- $\gamma$  wirkt modulierend auf die Makrophagen, Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion. [23, 43, 169]. Nicht zuletzt fand sich PPAR- $\gamma$ -Expression in Gefäßendothelzellen und in verschiedenen Tumorgeweben.

### 1.3.2.3 Antitumoreffekt von PPAR-Liganden

Ein Antitumoreffekt von PPAR-Liganden *in vitro* wurde für eine Vielzahl von Tumoren berichtet [94, 134]. Hierunter befanden sich sowohl die am häufigsten vorkommenden soliden Tumore, wie Kolon-, Mamma-, Lungen-, Magen- und Prostatakarzinome, als auch hämatologische Neoplasien wie Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome und das multiple Myelom [51-52, 94, 103, 165, 196]. In einer

großen Datenbankanalyse an rund 88.000 männliche Patienten mit Diabetes mellitus wurde die Inzidenz von Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinomen erhoben und in Bezug auf die Einnahme von Antidiabetika ausgewertet [67]. Im ausgewerteten Zeitraum entwickelten 1.137 Patienten ein kolorektales Karzinom, 3.246 ein Prostatakarzinom und 1.371 ein Lungenkarzinom. Durch die Einnahme von Thiazolidindionen (TZD) - synthetischer PPAR- $\gamma$ -Agonisten, die in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt werden - wurde das Risiko, ein Lungenkarzinom zu entwickeln, signifikant (33%) reduziert. Für kolorektale und Prostatakarzinom wurde eine tendenzielle, nicht signifikante Risikoreduktion festgestellt [67].

#### 1.3.2.4 Natürliche und synthetische PPAR-Liganden

Als molekulare Regulatoren des Lipidmetabolismus wurden für die PPAR zahlreiche Fettsäuren und deren Derivate, inklusive Eicosanoide und Prostaglandine als Liganden identifiziert. Die drei PPAR weisen ein weites Spektrum natürlicher Liganden auf, das sich zum Teil überlappt. PPAR- $\alpha$  bevorzugt polyungesättigte Fettsäuren, einschließlich essentieller Fettsäuren, Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure, während PPAR- $\gamma$  durch ein großes Spektrum an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, z. B. Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Arachidonsäure aktiviert wird [15, 66, 186]. PPAR- $\beta/\delta$  interagiert ebenfalls mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, seine Ligandenselektivität nimmt eine Mittelstellung zwischen PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$  ein. Das große Spektrum wird damit erklärt, dass die PPAR in der Kristallstruktur eine weit größere Ligandenbindungstasche aufweisen als andere Kernrezeptoren. Die geringen Unterschiede der Ligandenbindungsdomäne der Rezeptoren führen jedoch zu relevanten Unterschieden in der Affinität der Liganden [98, 186-187].

Von klinischer Bedeutung ist die Spezifität für bestimmte synthetische Liganden, von denen einige bereits therapeutisch im Einsatz sind und zur Therapie der Dyslipoproteinämie, metabolischer Erkrankungen und des Typ 2-Diabetes mellitus eingesetzt werden. Fibrate wie Fenofibrat, Clofibrat oder Gemfibrozil, die zur Therapie der Hypertriglyceridämie eingesetzt werden, binden an PPAR- $\alpha$ , sind also synthetische PPAR- $\alpha$ -Agonisten [169]. Thiazolidindione (TZD) sind synthetische PPAR- $\gamma$ -Agonisten, die bei der Therapie des Typ-2-Diabetes als Insulin-Sensitizer genutzt werden. TZD binden mit besonderer Affinität an PPAR- $\gamma$  [98, 156].

Zunächst hatte man entdeckt, dass TZD einen Insulin-sensibilisierenden Effekt haben, die Differenzierung von Adipozyten induzieren und zu einer verstärkten Transkription von entsprechenden Genen führen. Erst im Verlauf wurde nachgewiesen, dass die Wirkung über PPAR- $\gamma$  vermittelt wird [15, 176]. Als potentester PPAR- $\gamma$ -Agonist gilt Rosiglitazon, weitere sind Pioglitazon, Troglitazon, Ciglitazon und Englitazon. Einschränkend muss erwähnt werden, dass von den verschiedenen TZD nur noch Pioglitazon therapeutisch eingesetzt wird. Troglitazon und Rosiglitazon sind aufgrund unerwünschter Wirkungen, insbesondere der Hepatotoxizität, nicht mehr im Einsatz. TZD führen zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Dies ist mit der Inhibition von Pi3K assoziiert und geht mit einer Cyclin D1-Reduktion einher [51-52, 154, 181].

#### 1.3.2.5 Wirkung von Thiazolidindionen auf Malignome

Auch in Mammakarzinomen wurde die Expression von PPAR- $\gamma$  nachgewiesen [92, 124]. Sie enthalten ebenfalls das PPRE, und TZD führen bei Mammakarzinomzellen PPAR- $\gamma$ -vermittelt zur Zelldifferenzierung, Proliferationshemmung oder Apoptose [93, 124]. Behandlung von

Mammakarzinomzellen mit PPAR- $\gamma$ -Liganden induzierte sowohl *in vitro* and *in vivo* Apoptose. Durch Kombination mit einem spezifischen RXR-Liganden (*all-trans retinoic acid*, ATRA) wurde dieser Effekt noch verstärkt [47-48]. Die Wachstumshemmung von Mammakarzinomzellen war mit Zellzyklusarrest in der G1-Phase assoziiert. [190, 192]. Auch wurde in Mammakarzinomzellen nachgewiesen, dass der PPAR- $\gamma$ -Ligand 15d-PGJ2 und die TZD Rosiglitazon, Ciglitazon und Troglitazon selektiv die Genexpression von Cyclin D1 inhibieren. [143, 181, 192]. Der G1-Zellzyklus-Arrest und die Abnahme von Cyclin D1 war zugleich mit einer Hemmung der Pi3K-Aktivität assoziiert [5].

In ER-positiven Mammakarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass PPAR- $\gamma$ -Liganden die Degradierung von ER induzieren [143]. Auch in HER2-überexprimierenden Zelllinien wurde die Wirkung von PPAR- $\gamma$ -Liganden untersucht. PPAR- $\gamma$  wird in HER2-überexprimierenden Zellen verstärkt exprimiert [188]. In diesen Mammakarzinomzellen zeigte sich bei der über HER2 und der über PPAR- $\gamma$  vermittelten Signaltransduktion durch Trastuzumab bzw. PPAR- $\gamma$ -Liganden ein Synergismus. Aktivierung von PPAR- $\gamma$  konnte die durch Neureguline vermittelte Tyrosinphosphorylierung von HER2 und HER3 in MCF-7-Zellen inhibieren und damit die Wirkung von HER2 auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose blockieren. Sowohl die Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktion als auch die Signaltransduktion über ERK wurden hierdurch inhibiert [141]. In Lungenkarzinomzellen reduzierte Rosiglitazon die Phosphorylierung von Akt und steigerte die PTEN-Proteinexpression. Außerdem steigerte es die Phosphorylierung von AMPK und zugleich reduzierte es, *downstream* von mTOR, die Phosphorylierung von S6K1 [70]. Troglitazon supprimierte an MCF-7-Zellen die HER2-Expression signifikant. Allerdings konnte Troglitazon allein an HER2-überexprimierenden Zelllinien keine Wachstumshemmung erzeugen [48]. Erst die Herunterregulierung von HER2 durch Trastuzumab sensibilisierte Mammakarzinomzellen für den Effekt von TZD [188]. Somit stellte die PPAR- $\gamma$ -Aktivierung einen vielversprechenden Therapieansatz zu Optimierung der Therapie des Mammakarzinoms dar, der weitere Untersuchungen erforderte.

Wenn auch zunächst alles darauf hindeutete, dass die apoptotische und antiproliferative Wirkung an Tumoren und die antiangiogenetische von TZD auf das Wachstum von Tumoren über PPAR vermittelt wird, so zeigte sich doch, dass insbesondere bei der Wirkung von Troglitazon und Ciglitazon weitere möglicherweise nicht PPAR-vermittelte Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen [2, 56, 182]. Zum Beispiel konnte für die TZDs gezeigt werden, dass sie die Ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation von Zellzyklus und Apoptose-regulierenden Proteinen (u. a.  $\beta$ -Catenin, Cyclin D1) fördern. In Hormonrezeptor-positiven und -negativen Mammakarzinomzellen konnte mit PPAR- $\gamma$ -inaktiven TZDs Cyclin D1 unterdrückt werden, ohne dass die mRNA-Level verändert wurden, so dass hier eine posttranskriptionelle Regulierung postuliert werden musste [36, 79, 182]. In Prostatakarzinomzellen wurde beobachtet, dass TZD unabhängig von PPAR- $\gamma$  die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 und anderer proapoptotischer Proteine hemmen [160]. Das warf u. a. die Frage auf, über welche weiteren Mechanismus TZD-Derivate ihre Wirkung auf Mammakarzinomzellen entfalten, und ob diese durch Bindung an andere PPAR oder Aktivierung weitere nicht PPAR-vermittelter Wirkungen verstärkt werden können.

## 1.4 Grundsätzliches zur medikamentösen Therapie des metastasierten Mammakarzinoms

Ein metastasiertes Mammakarzinom muss, von wenigen seltenen Ausnahmen abgesehen, als nicht kurativ therapierbar angesehen werden. Hieraus ergeben sich mehrere klinische Therapieziele. Im Vordergrund sollte die Erhaltung oder Verbesserung der Lebensqualität der Patientin stehen. Dieses kann sowohl durch Tumorkontrolle als auch durch eine effektive Supportivtherapie erreicht werden. Die Lebensverlängerung und - als Surrogatmarker - die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens oder die *Clinical-benefit*(CB)-Rate sind häufig primäre Ziele in Studien zur medikamentösen Therapie des metastasierten Mammakarzinoms [150].

Es ist nicht belegt, dass eine aggressive medikamentöse Therapie, z. B. eine Polychemotherapie, einer sequentiellen Monochemotherapie bezüglich des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens überlegen ist, wenn alle Therapiemaßnahmen ausgeschöpft werden. Eine Metaanalyse von Erstlinientherapiestudien zeigte zwar eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens zugunsten von Kombinationsregimen [30]. Jedoch kann aus dieser Untersuchung nicht unmittelbar ein Vorteil abgeleitet werden, da nur in sehr wenigen Studien, die der Erstlinientherapie nachfolgenden Therapien einbezogen wurden; kaum eine der Studien verglich die Polychemotherapie versus die sequentielle Therapie der gleichen Substanzen; und es gibt nur wenige Studien, die diese Erst- und Zweitlinientherapie zugleich beinhalten und ein Cross-over-Design verwenden [29]. Selbst wenn ein Cross-over-Design verwendet wurde, stellte sich in den meisten Studien heraus, dass nur ein geringer Anteil (17-30%) der Patientinnen nach Versagen der Erstlinientherapie in den anderen Studienarm wechselten [3, 132, 158, 167]. Es war nicht möglich die klinische Realität der sequentiellen Therapien in Studien abzubilden. Und nicht zuletzt spricht gegen den unkritischen Einsatz der Polychemotherapie, dass sie mit einer signifikanten stärkeren Toxizität einhergeht als die Monotherapie und somit dem Therapieziel der Lebensqualitätserhaltung oder Verbesserung zumindest temporär entgegengesetzt ist [29]. Aus dem Genannten ergibt sich, dass aus praktischer Sicht die Polychemotherapie nur bei hohem Remissionsdruck indiziert bleibt.

### 1.4.1 Die Optimierung der medikamentösen Therapie

Die Ansätze zur Optimierung der Therapie sind vielschichtig. Sie können die Supportivtherapie, die medikamentöse Therapie, aber auch die operative Therapie und Strahlentherapie einschließen. Voraussetzung der Verbesserung der medikamentösen Therapie ist das Verständnis der molekularen Zusammenhänge in der Mammakarzinomzelle. Eine mittlere Überlebenszeit von 20 Monaten für Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom aller Subtypen ist nach wie vor unbefriedigend, impliziert eine therapeutische Herausforderung und stellte die Rationale für die wissenschaftliche Untersuchung molekularer Mechanismen der Kanzerogenese des Mammakarzinoms und die Erprobung neuer Substanzen *in vitro* sowie *in vivo* dar. Diese Arbeit widmete sich insbesondere der Optimierung der medikamentösen Therapie.

Es wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl neuer Substanzen entwickelt, die in klinischer Testung sind und zum Teil eine Zulassung für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms erhalten haben [53]. Insbesondere ist durch die Einführung neuer Substanzen der Begriff der

Kombinationstherapie nicht mehr gleichzusetzen mit Polychemotherapie, da mittlerweile Chemotherapie mit Antikörpertherapie, Tyrosinkinaseinhibitor(TKI)-Therapie oder anderen zielgerichteten Therapien (*targeted therapy*) kombiniert werden. Hierdurch wurde zum Teil die Toxizität der Kombinationstherapie durch Vermeidung eines Additionseffektes gesenkt, zum anderen kamen aber neue Nebenwirkungsspektren hinzu [90]. In den letzten 5 Jahren wurden für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms in Europa mehr zielgerichtete Substanzen (Lapatinib, Denosumab, Bevacizumab, Fulvestrant) als „klassische“ Zytostatika (nab-Paclitaxel, Eribulin) zugelassen. In Phase-III-Studien haben sich kürzlich verschiedene Substanzen mit für die Therapie des Mammakarzinoms neuen Wirkmechanismen als effektiver als die Standardtherapie erwiesen. Hierzu zählen insbesondere Pertuzumab und Everolimus, die über Dimerisierungshemmung des HER2-Rezeptors bzw. über mTOR-Inhibition wirken [11, 77].

In den letzten Jahren erfuhr der Einsatz von Platinderivaten beim Mammakarzinom eine Art Renaissance. Zwar waren Platinderivate schon früher getestet worden, jedoch war ihre klinische Wirksamkeit als moderat eingestuft worden [129]. Da der Verlauf metastasierter Mammakarzinome jedoch sehr unterschiedlich ist und viele Patientinnen multiplen sequentiellen Therapien zugeführt werden können, wurden auch als weniger wirksam eingeschätzte Substanzen wieder in die Therapiesequenz aufgenommen. Darüber hinaus führte die weitere Differenzierung der Mammakarzinome mittels Mikroarray in biologische Subtypen (s. Abschnitt 1.2) und das Verständnis der Wirkmechanismen zu der Erkenntnis, dass Platinderivate bei den aggressiveren Subtypen wirksamer sein könnten als angenommen und entsprechende Studien wurde konzipiert, insbesondere bei HER2-überexprimierenden und *triple*-negativen Mammakarzinomen [32, 133, 147, 162, 179]. Somit war Carboplatin dafür prädestiniert als Kombinationspartner im Zellkulturmodell herangezogen zu werden.

Eine weitere Methode, die Nebenwirkungen einer palliativen Chemotherapie gering zu halten, war die Fraktionierung, die mittlerweile ein bewährtes Prinzip darstellt. Sie ermöglicht eine bessere Steuerbarkeit der Dosisintensität und flexibleres Reagieren auf manifeste Nebenwirkungen. Beim metastasierten Mammakarzinom zählen z. B. die wöchentliche Paclitaxel- und Vinorelbinterapie zum Standardprocedere. Auch Anthrazyklin-haltige Therapien können zur besseren Steuerbarkeit wöchentlich fraktioniert appliziert werden. Die orale Capecitabintherapie ist ebenfalls im vierzehntägigen Zeitraum der Applikation gut steuerbar. In diesem Zusammenhang ist auch die 5-Fluorouracil-Dauerinfusion zu werten, die tägliche Applikation einer geringen Dosis vorsieht.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war die Optimierung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms, sowohl mittels präklinischer Untersuchungen als auch durch eine retrospektive sowie eine prospektive klinische Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom.

Wie unter Abschnitt 1.3.1.8 beschrieben, ist der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg bei Mammakarzinomen als der am häufigsten dysregulierte Signaltransduktionsweg anzusehen. mTOR ist an der Regulierung von Translation und Transkription wichtiger Proteine beteiligt, die mit Tumorigenese assoziiert sind und die Zellzyklusprogression, Zellwachstum, Proliferation und Angiogenese von Tumoren regulieren. Hemmung von mTOR hat somit erhebliche Auswirkungen auf diese Zellfunktionen. Deshalb sollte die Pi3K/Akt/mTOR-Achse als Ziel einer spezifischen Mammakarzinomtherapie zunächst *in vitro* untersucht werden und Veränderungen der beteiligten Proteine unter der Therapie im Zellkulturmodell evaluiert werden.

1) Initial hatte sich auf der Suche nach einer innovativen Substanz für die medikamentöse Therapie des Mammakarzinoms Honokiol, für das wachstumshemmende Effekte und Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien außer für Mammakarzinomzellen nachgewiesen worden waren, angeboten. Seine Wirkung auf Mammakarzinome sollte im Zellkulturmodell untersucht werden. Hierbei zeigte sich u. a. eine Inhibition des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg, weshalb wir die Kombination von Honokiol mit einem mTOR-Inhibitor untersuchten. Dies erschien ein vielversprechender Ansatz.

2) Aufgrund der regulatorischen *Feed-back*-Mechanismen des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs wird die Signalkaskade durch mTOR-Inhibitoren nicht vollständig unterbunden. In den bis dato publizierten präklinischen und klinischen Studien mit mTOR-Inhibitoren in der Monotherapie zeigte sich ebenfalls eher eine Krankheitsstabilisierung als eine Regression der Erkrankung (s. Abschnitt 1.3.1.11). Ein Weg der Wirkungssteigerung an Mammakarzinomzellen bestand somit in der Kombination mit anderen Substanzen. Deshalb wurden verschiedene Medikamente, die Synergismen mit mTOR-Inhibitoren vermuten ließen und deren Nebenwirkungsprofil nicht wesentlich mit mTOR-Inhibitoren überlappen sollten (Honokiol, Metformin, Carboplatin, Paclitaxel, Adriamycin) *in-vitro* getestet. Sie wurden u. a. auf ihre proliferationshemmenden und proapoptischen Eigenschaften hin in Kombination mit der Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs mittels Everolimus oder Metformin untersucht.

3) Carboplatin war zum Zeitpunkt der Untersuchungen keins der Zytostatika, die als Standard in der Erst- oder Zweitlinientherapie des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt wurden. Es hatten sich jedoch in den letzten Jahren die Hinweise gemehrt, dass es beim Mammakarzinom klinische Wirksamkeit besitzt (s. Abschnitt 1.4.1). Dies prädisponierte Carboplatin dafür, als Kombinationspartner bei der Untersuchung neuer Medikamente zur Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt zu werden. Es wurde deshalb mit Everolimus kombiniert und im Zellkulturmodell

untersucht. Unser Ziel war es, die theoretische Grundlage für eine klinische Studie mit diesen Medikamenten zu schaffen.

4) Ein weiterer möglicher Ansatz bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms stellte die PPAR- $\gamma$ -vermittelte Wirkung dar (s. Abschnitt 1.3.2). Für PPAR-Liganden war *in vitro* für eine Vielzahl von Tumoren und hämatologische Neoplasien ein Antitumoreffekt berichtet worden, insbesondere auch für das Mammakarzinom [48, 51-52, 94, 103, 165, 196]. In den letzten Jahren hatte sich jedoch gezeigt, dass die Wirkung der Thiazolidindione (PPAR- $\gamma$ -Liganden) an Mammakarzinomzellen nicht nur über PPAR- $\gamma$  vermittelt wurde (s. Abschnitt 1.3.2.5) und die bekannten TZDs in der klinischen Praxis nebenwirkungsbelastet waren. Das warf die Fragen auf, über welche weiteren Mechanismus TZDs oder deren Derivate ihre Wirkung auf Mammakarzinomzellen entfalten und ob diese durch Bindung an andere PPAR oder Aktivierung weiterer nicht PPAR-vermittelter Wirkungen verstärkt werden können. Darüber hinaus waren inzwischen, außer Pioglitazon, anderen TZD (Troglitazon, Rosiglitazon) die Zulassung entzogen worden, so dass neuere PPAR-Agonisten in den Focus rückten und auf ihren Antitumoreffekt hin überprüft werden sollten. Wir testeten deshalb TZD18, einen dualen Inhibitor von PPAR- $\gamma$  und - $\alpha$ , im Zellkulturmodell an Mammakarzinomzellen.

5) Parallel zu den Zellkulturexperimenten versuchten wir, anhand einer retrospektiven Analyse der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die in der Medizinischen Klinik m. S. Onkologie und Hämatologie, Campus Charité Mitte, therapiert wurden, Erkenntnisse über die Effektivität bekannter aber bis dato wenig systematisch untersuchter Therapiemodalitäten zu erlangen. Altbewährte Zytostatika wie 5-Fluorouracil (5-FU) werden in der klinischen Praxis oft durch neuere Substanzen abgelöst, nicht immer wegen erdrückender Effektivitätsunterschiede, sondern auch, weil zu alten Substanzen keine randomisierten Studien vorliegen und voraussichtlich auch keine mehr durchgeführt werden. Insbesondere stark vorbehandelte Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom können in späteren Therapielinien, in denen kein einheitlicher Standard mehr existiert, vom Einsatz bewährter Zytostatika profitieren. Aufgrund der in diesen Therapielinien vorbestehenden Knochenmarkschädigung und der eingeschränkten Knochenmarkreserve ist eine Therapie mit geringer Hämatotoxizität und guter Steuerbarkeit angebracht. 5-FU hatte synergistische Effekte in der Zellkultur und in klinischen Studien mit mTOR-Inhibitoren gezeigt [18, 25]. mTOR-Inhibition ebenso wie die metronomische Therapie entfaltet seine Wirkung u. a. über Antiangiogenese. Darüber hinaus konnte für 5-FU ein inhibierender Einfluss auf den PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg nachgewiesen werden [24]. Vor diesem Hintergrund sollte die metronomischen Therapie mit 5-FU als Dauerinfusion retrospektiv bezüglich ihrer Effektivität und Toxizität bei metastasiertem Mammakarzinom evaluiert werden.

6) Zum einen aufgrund eigener vielversprechender Ergebnisse *in vitro* mit Carboplatin in Kombination mit Metformin und Everolimus an Mammakarzinom-Zelllinien, zum anderen da es Hinweise darauf gibt, dass die Kombination mit Everolimus Chemotherapie- und Hormontherapieresistenzen überwinden kann und nicht zuletzt aufgrund der schwierigen therapeutischen Situation von Patientinnen mit stark vorbehandeltem Mammakarzinom initiierten wir eine prospektive klinische



Phase-I-Studie mit der Kombination von Everolimus und wöchentlich fraktioniertem Carboplatin. Primäres Studienziel war die maximal tolerierte Dosis dieser Kombination. Bei erfolgreicher Testung sollte sich eine Phase-II-Studie unmittelbar anschließen.

## 2 Eigene Ergebnisse

### 2.1 Antitumoreffekt von Honokiol alleine und in Kombination mit anderen antineoplastischen Substanzen am Mammakarzinom

Honokiol ist eine aktive Substanz, die aus Pflanzen der Gattung *Magnolia* isoliert und aufgereinigt wird, für die wachstumshemmende Effekte und Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien, inklusive Leukämie-, Kolonkarzinom- und Lungenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen wurden. Auch die Hemmung angiogenetischer Aktivität an humanen Endothelzellen sowie Wachstumshemmung von Angiosarcomen in Nacktmäusen wurde nachgewiesen.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Behandlung verschiedener humaner Mammakarzinom-Zelllinien mit Honokiol zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Wachstumsinhibition führt. Dies wurde sowohl in ER-positiven als auch -negativen Zelllinien sowie in Adriamycin- und Tamoxifen-resistenten Zelllinien nachgewiesen. Die Wachstumshemmung war mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose assoziiert.

Der Effekt von Honokiol könnte gegensätzlich mit der Expression *des humanen epidermal growth factor receptor 2* (HER2, erbB-2) verbunden sein, da die Ausschaltung der HER2-Expression durch siRNA die Sensibilität von HER2-überexprimierenden BT-474-Zellen für die Honokiol-induzierte Apoptose signifikant verstärkte. Darüber hinaus wurde der antitumoröse Effekt von Honokiol durch die Hemmung der HER2-Signaltransduktion mittels des spezifischen dualen Tyrosinkinaseinhibitors für EGFR1 und HER-2 Lapatinib an HER2-überprimierenden Mammakarzinomzellen synergistisch verstärkt.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass Honokiol in der Lage war, die Signaltransduktion über den PI3K/AKT/MTOR-Signaltransduktionsweg durch Herabregulierung der Akt-Phosphorylierung und Hochregulierung der PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*)-Expression abzuschwächen. Die Kombination von Honokiol mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin ergab synergistische Effekte auf die Apoptoseinduktion in Mammakarzinomzellen.

Zusammenfassend ergab sich, dass Honokiol alleine oder dessen Kombination mit anderen Substanzen, insbesondere mit mTOR-Inhibitoren oder Lapatinib, interessante Therapieansätze für das Mammakarzinom darstellten.

**Liu H., Zang C., Emde A., Planas-Silva M.D., Rosche M., Kühnl A., Schulz C.O., Elstner E., Possinger K. & Eucker J.: Anti-tumor effect of honokiol alone and in combination with other anti-cancer agents in breast cancer. European Journal of Pharmacology 591, 2008, 43-51**



















## 2.2 Der mTOR-Inhibitor RAD001 sensibilisiert Tumorzellen *in vitro* für die zytotoxische Wirkung von Carboplatin an Mammakarzinomzellen

Der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg ist in vielen Tumorarten, inklusive dem Mammakarzinom, überaktiviert. Es ist bekannt, dass Mammakarzinomzellen oft Resistenzen gegen Standardtherapien durch Aktivierung dieses Signaltransduktionswegs entwickeln. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob eine zielgerichtete Hemmung dieses Signaltransduktionswegs durch Everolimus den zytotoxischen Effekt einer konventionellen Chemotherapie verstärken kann.

Die Zellproliferation wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) - Test, Zellapoptose mittels ELISA gemessen. Für die Zellzyklusanalyse und Analyse der mitochondrialen Membranfunktion wurde die Durchflusszytometrie verwendet; Geneexpressionsanalysen auf Proteinebene erfolgten mittels Westernblot.

Der mTOR-Inhibitor Everolimus verstärkte die Sensibilität von Mammakarzinomzellen für Carboplatin. Die Kombination von Everolimus und Carboplatin führte zu einer synergistischen Hemmung von Zellproliferation und Caspase-unabhängiger Apoptose in diesen Zellen. In den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und BT-474 wurden synergistische Effekte dieser Kombination auf den G2/M-Zellzyklus-Arrest und auf die Regulierung verschiedener Moleküle, die für die Zellzyklus-Transition verantwortlich sind, beobachtet. Es zeigte sich, dass auch p53 an den synergistischen Effekten von Everolimus und Carboplatin auf die Proliferationshemmung und Apoptose von Mammakarzinomzellen beteiligt war. Der Synergismus konnte in allen Zelllinien, die Wildtyp-p53 aufwiesen, demonstriert werden, und der Einsatz eines p53-Inhibitors konnte die Wirkung von Everolimus und Carboplatin auf p53 und p21 partiell antagonisieren und darüber hinaus auch deren inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation entgegenwirken. Gleichwohl fand sich bei zwei p53-mutierten Zelllinien mit hoher Akt-Expression ein synergistischer Effekt der Kombination auf die Zellproliferation, so dass vermutet werden muss, dass ein weiterer alternativer Mechanismus, der dem beobachteten Synergismus zugrunde liegt, existiert. Darüber hinaus war der Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-FMK nicht in der Lage die durch Carboplatin und Everolimus induzierte Apoptose und Proliferationshemmung zu antagonisieren. Auch war nach der Kombinationsbehandlung kein Anstieg der Caspase-3-, -8- und -9-Aktivität messbar. Diese Versuche legten erstmalig nahe, dass diese Apoptose zumindest teilweise Caspase-unabhängig verlief.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legten auf zellulärer Ebene nahe, dass die Kombination von Everolimus und Carboplatin ein vielversprechender neuer Therapieansatz für Mammakarzinome darstellt. Auf dem Boden dieser Ergebnisse wurde weitere Versuche mit anderen Kombinationspartnern initiiert und darüber hinaus eine Phase-I/II-Studie mit der Kombination von Carboplatin und Everolimus für Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konzipiert.

**Liu H., Zang C., Schemper J.H., Schwarzlose-Schwarck S., Regierer A.C., Elstner E., Schulz C.O., Scholz C.W., Possinger K. & Eucker J.: The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to the cytotoxic effect of carboplatin in breast cancer in vitro. Anticancer Research 31, 2011, 2713-22**





















## **2.3 Metformin und der mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) sensibilisieren Mammakarzinomzellen für den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika *in vitro***

Metformin hat direkten Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose von Tumorzellen. Einer seiner Schlüsselmechanismen ist die Aktivierung von Adenosinmonophosphat-aktivierter Proteinkinase (AMPK). AMPK hat sowohl eine Verbindung zum Pi3K/Akt/mTOR-Signalweg als auch zum MAPK/ERK-Signalweg, die beide in Mammakarzinomen häufig dysreguliert vorliegen. Deshalb stellte es einen interessanten therapeutischen Ansatz dar, in Mammakarzinomen durch Metformin über AMPK mTOR zu hemmen und zugleich mit bekannt wirksamen Zytostatika zu kombinieren. Darüber hinaus war es fraglich, ob die duale Blockade des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs mittels eines mTOR-Inhibitors und Metformin einen zusätzlichen Effekt erbringt.

Das Ziel dieser Untersuchung war es, an unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien die Antitumorwirkung von Metformin alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika und dem mTOR-Inhibitor Everolimus zu evaluieren. Die Proliferation von Mammakarzinomzellen wurde mit MTT-Test, Apoptose der Zellen mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und Gen-Expression auf Proteinebene mittels Westernblot gemessen. Metformin alleine und in Kombination mit Everolimus und/oder Chemotherapeutika (Carboplatin, Paclitaxel oder Doxorubicin) wurde an verschiedenen humanen Mammakarzinom-Zelllinien bezüglich Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und Autophagie getestet. Metformin-Monotherapie inhibierte die Zellproliferation und induzierte Apoptose bei verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien (ER-positive, HER2-überexprimierende und *triple-negative*). Der zytotoxische Effekt von Metformin war an triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien ausgeprägter als an anderen. Die durch Metformin induzierte Apoptose war zumindest teilweise Caspase-abhängig sowie Apoptosis-inducing-factor (AIF)-abhängig. Darüber hinaus führte Metformin zur Autophagie der Zellen. Die Hemmung der Autophagie mit Chloroquin verstärkte die Wirkung von Metformin, was darauf hindeutete, dass die Metformin-induzierte Autophagie Mammakarzinomzellen vor Apoptose schützen kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika und Metformin sowie Everolimus die Zellproliferationshemmung intensiviert. Die Analyse der Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin D, Cyclin E und p27 mittels Westernblot ergab, dass die synergistische Inhibition der G1-Phase des Zellzyklus durch die Kombinationsbehandlung mit Metformin, Chemotherapeutika und/oder RAD001 zur synergistischen Proliferationshemmung beitrug. Zusammenfassend stellen diese Untersuchungen eine Rationale für den Einsatz von Metformin innerhalb medikamentöser Behandlungsregime des Mammakarzinoms dar, insbesondere aber sollte die Dreierkombination Carboplatin/Metformin/Everolimus weiter untersucht werden.

**Liu H., Scholz C., Zang C., Scheffe J.H., Habbel P., Regierer A.C., Schulz C.O., Possinger K., & Eucker J.: Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. Anticancer Research 32, 2012, 1627-37**

























## 2.4. Induktion einer Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums durch TZD18, einem neuen dualen Liganden für PPAR- $\alpha/\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\gamma$ ), in humanen Mammakarzinomzellen

Synthetische PPAR-Liganden, insbesondere TZD, waren in der Lage in Malignomen Wachstumshemmung und Apoptose zu erzeugen. Sie hatten sich *in vitro* auch an Mammakarzinomzellen als effektiv erwiesen. Ihr ungünstiges Toxizitätsprofil *in vivo* hatte allerdings dazu geführt, dass nach neuen PPAR-Agonisten gesucht wurde, die Antitumoreigenschaften aufweisen. Es war gezeigt worden, dass der duale Ligand für PPAR- $\alpha/\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$ ) TZD18 zur Wachstumsinhibition und Apoptose von Leukämie- und Glioblastomzellen führte.

In der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche Effekt von TZD18 an sechs humanen Mammakarzinom-Zelllinien demonstriert. Da es Hinweise gab, dass die Wirkung nicht nur PPAR-vermittelt war und um die Mechanismen der von TZD18 induzierten Wachstumsinhibition und Apoptose weitergehend zu untersuchen, wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von TZD18-behandelten und unbehandelten MCF-7- und MDA-MB-231-Mammakarzinom-Zelllinien mittels Microarray vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass viele Gene, die in die Signaltransduktion des endoplasmatischen Retikulums bei Stress involviert sind, wie CHOP (auch bekannt als DDIT3 oder GADD153), GRP78 (HSPA5) und ATF4, stark hoch reguliert wurden. Transfektionsversuche mit siRNA (small interference RNA) ergaben, dass die Apoptose und Wachstumshemmung der Mammakarzinomzellen entgegen der Erwartungen nicht über PPAR- $\alpha$  oder PPAR- $\gamma$  vermittelt wurden. Dies legte nahe, dass der Hauptmechanismus die Induktion von Retikulumstress beinhaltete. Diese Annahme wurde dadurch untermauert, dass die Behandlung von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit TZD18 sowohl die Phosphorylierung von PERK (*pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase*) an der  $\alpha$ -Subunit des eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic initiation factor 2*) induzierte als auch zur Hochregulierung von GRP78 und Aktivierung von ATF6, allesamt spezifische Marker für Retikulumstress, führte. Mit Pioglitazon hingegen, dem synthetischen PPAR- $\gamma$ -Liganden, wurden diese Veränderungen an Mammakarzinomzellen nicht gesehen. Auch konnte TZD18 diese Veränderungen nicht an normalen Mammazellen (MCF-10) induzieren.

Darüber hinaus erhöhte TZD18 Retikulumstress-assoziierte Zelltod-Regulatoren wie CHOP, DR5, GADD34, Bax, and Bak in diesen Mammakarzinom-Zelllinien. Das Ausschalten von CHOP durch siRNA antagonisierte, im Gegensatz zur Ausschaltung von PPAR- $\alpha$  oder PPAR- $\gamma$ , die TZD18-induzierte Apoptose, was auf die zentrale Rolle von CHOP bei der Apoptose durch TZD18 hinwies. Zusätzlich aktivierte TZD18 den Stress-sensitiven MAPK/ERK-Signaltransduktionsweg einschließlich p38, ERK und JNK. Der spezifische Inhibitor von MAPK verminderte die TZD18-induzierte Wachstumsinhibition in diesen Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung von MAPK für die TZD18-induzierte Wachstumsinhibition bedeutsam war.

Zusammenfassend führte TZD18-Behandlung von Mammakarzinomzellen zur Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums und nachfolgend zu Wachstumshemmung und Caspase-abhängiger Apoptose. PPAR- $\alpha$  oder PPAR- $\gamma$  waren wider Erwarten daran nicht beteiligt.

**Zang C., Liu H., Bertz J., Possinger K., Koeffler H.P., Elstner E. & Eucker J.:  
Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for  
peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer  
cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 2009, 2296-307**

























## **2.5 5-Fluorouracil-Dauerinfusion bei stark vorbehandeltem fortgeschrittenem Mammakarzinom**

Die Optimierung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms ist insbesondere bei vorbehandelten Patientinnen eine Herausforderung. In der Erst- und Zweitlinientherapie des metastasierten Mammakarzinoms gibt es Therapiestandards, wenn auch nicht in jeder Situation. In späteren Therapielinien ist die Therapie stark von der klinischen Situation anhängig, die sehr stark variieren kann. Das palliative Therapieziel, die Nebenwirkungsraten und Komorbiditäten bestimmen die Wahl der Therapie. Aufgrund der starken Vorbehandlung sind Therapien mit geringer Toxizität zu favorisieren. Die Wirkung von 5-Fluorouracil (5-FU) als metronomische Therapie, d. h. unter der Annahme, dass bei niedrigen, permanenten Plasmaspiegel eines Zytostatikums die Antiangiogenese den Hauptwirkmechanismus im Tumor darstellt, beinhaltet die Möglichkeit einer geringen Nebenwirkungsrate.

In dieser retrospektiven Studie wurden alle Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die mit 5-Fluorouracil-Dauerinfusion als Monotherapie an der Medizinischen Klinik m. S. Onkologie und Hämatologie (CCM) behandelt wurden, ausgewertet. Die 5-FU-Dosierung betrug zwischen 150 und 300 mg/m<sup>2</sup>/d als Dauerinfusion. Es wurden 43 Patientinnen identifiziert und ausgewertet. Die Patientinnen hatten im Median 3 (1–11) palliative Vortherapien erhalten. 42 Patientinnen konnten bezüglich des Ansprechens ausgewertet werden. Bei 5 (12%) Patientinnen wurde ein partielles Ansprechen des metastasierten Mammakarzinoms festgestellt, bei 6 (15%) eine Krankheitsstabilisierung (SD) ≥6 Monate. Die CB-Rate (komplettes Ansprechen + PR + SD ≥6 Monate) lag bei 27%. Die mediane Zeitspanne bis zum Fortschreiten der Erkrankung bei Patientinnen mit CB lag bei 10 Monaten (3–22). Das Gesamtüberleben betrug 8 Monate (1–75) und ab Zeitpunkt der ersten Metastase 42 Monate (9–281). Die Toxizität war selbst bei Patientinnen mit hepatischer Insuffizienz gering. Unter den wenigen Patientinnen, bei denen die Therapie während einer hepatischen Insuffizienz durchgeführt wurde, konnte zum Teil eine Revision der eigentlich infausten Situation erreicht werden.

Die 5-FU-Dauerinfusion erwies sich als sehr gut verträglich und war selbst in Grenzsituationen, in denen keine anderen Zytostatika mehr einsetzbar sind, bei stark vorbehandelten Patientinnen eine wirksame Alternative.



**Regierer A.C., Reinecke F., Weigel A., Dieing A., Lehenbauer-Dehm S., Schwarzlose-Schwarck S., Possinger K. & Eucker J.: 5FU continuous infusion in heavily pretreated advanced breast cancer patients. Onkologie 34, 2011, 696-700**









## 2.6 Der MTOR-Inhibitor Everolimus in Kombination mit Carboplatin beim metastasierten Mammakarzinom - eine Phase-I-Studie

Der MTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) ist eine viel versprechende Substanz, die für die Behandlung von soliden Tumoren in verschiedenen Situationen zugelassen ist. Als Monotherapie wurde sie für die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms in einer täglichen Dosierung von 10 mg zugelassen. Carboplatin wird in der Therapie verschiedener Malignome eingesetzt und erfuhr in den letzten Jahren eine Art „Renaissance“ bei der Therapie des Mammakarzinoms. Die eigenen präklinischen Untersuchungen legten die Vermutung nahe, dass die Kombination aus beiden Substanzen beim Mammakarzinom effektiver ist als jede Substanz für sich.

Es wurde eine prospektive monozentrische Phase-I-Studie mit der Kombination von Carboplatin und Everolimus beim metastasierten Mammakarzinom durchgeführt. Ziel war es, die maximal tolerable Dosis (MTD) von Carboplatin/Everolimus zu ermitteln und die Sicherheit bei vorbehandelten Patientinnen zu bewerten.

Patientinnen mit vorbehandeltem metastasiertem Mammakarzinom erhielten Carboplatin (AUC<sub>2</sub>, wöchentlich, i.v.) und Everolimus in verschiedenen Dosisstufen (Level I: 2,5 mg; II: 5 mg; III: 7,5 mg; IV: 10 mg) in einem 21-Tage-Zyklus. Die Therapie wurde fortgesetzt bis zur Progression oder dem Auftreten von intolerabler Toxizität. Jeder Dosisstufe (von Stufe I bis III) wurden drei Patientinnen zugeordnet, in Dosisstufe IV wurden sechs Patientinnen behandelt. Wenn bei drei Patientinnen keine dosislimitierende Toxizität auftrat, wurden die folgenden Patientinnen auf einer Dosisstufe höher behandelt.

15 Patientinnen wurden in die Studie eingeschlossen (medianes Alter: 58 Jahre). Die mediane Anzahl vorhergehender Chemotherapien lag bei vier. Zwölf Patientinnen hatten ein Hormonrezeptor-positives, fünf ein HER2-überexprimierendes Mammakarzinom. Die Dosisstufen konnten bis zur Stufe IV gesteigert werden, da in Stufe I bis III keine dosislimitierende Toxizität aufgetreten war. Sechs Patientinnen wurden in Stufe IV behandelt. Definitionsgemäß wurde die Dosisstufe IV als MTD bestimmt. Die Patientinnen erhielten im Median vier Zyklen der Therapie; neun komplettierten mindestens vier Zyklen, 3 mindestens acht und eine Patientin 13 Zyklen. Insgesamt stellte sich die aufgetretene Toxizität als gut handhabbar heraus, die häufigste Grad-3/4-Toxizität umfasste Leukopenien bei drei Patientinnen, Thrombozytopenien bei zwei und Infektionen bei je zwei Patientinnen. Unter den 14 diesbezüglich auswertbaren Patientinnen erreichten 21% eine partielle Remission (PR) ihres Tumors, 43% eine stabile Erkrankung (SD) und bei 36% kam es zur Progression (PD) der Erkrankung. Unter den neun Patientinnen, die mindestens vier Zyklen komplettierten, lag die Ansprechrate bei: 2/9 PR, 6/9 SD. Carboplatin and Everolimus stellte somit eine relativ gut verträgliche Therapie bei Patientinnen mit stark vorbehandeltem metastasiertem Mammakarzinomen dar. Everolimus (10 mg/d) and Carboplatin (AUC 2 wöchentlich) wurde als MTD festgelegt. Die 10 mg-Dosis von Everolimus stimmte mit der zugelassenen Dosis für die Monotherapie bei anderen Erkrankungen überein. Diese Dosis wurde für die laufende Phase-II-Studie mit dieser Kombination weiter verwendet.

**Schwarzlose-Schwarck S., Scholz C.W., Regierer A.C., Martus P., Neumann C., Habel P., Liu H., Zang C., Schefe J.H., Schulz C.O., Possinger K. & Eucker J.: The mTOR inhibitor everolimus in combination with carboplatin in metastatic breast cancer – a phase I trial. *Anticancer Research* 32, 2012, 3435-42**















### 3 Diskussion

Die wissenschaftlichen Arbeiten, die in dieser Schrift kumulativ zusammengefasst sind, gliedern sich in zwei Teile.

Zum einen sind es *in-vitro*-Untersuchungen zu neuen Medikamenten, die beim Mammakarzinom potentielle Wirksamkeit gezeigt hatten und bezüglich ihrer Effektivität und ihrer Wirkmechanismen weiter analysiert wurden und bei denen der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt. Zum anderen geht es um zwei klinische Untersuchungen, die die Anwendung neuer (mTOR-Inhibition in Kombination mit Carboplatin) oder etablierter Medikamente (5-Fluorouracil als Dauerinfusion) bei Patientinnen metastasiertem Mammakarzinom zum Gegenstand hatten, die direkt oder indirekt die Angiogenese beeinflussen.

Bezogen auf den gesamten Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg weisen etwa 70% aller Mammakarzinome eine Dysregulation dieses Signalwegs auf (s. Abschnitt 1.3.1.8) [104]. Die vorliegenden präklinischen Untersuchungen befassen sich mit der Beeinflussung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs, der zum einen durch den mTOR-Inhibitor Everolimus inhibiert werden kann und dessen Inhibition zum anderen durch Kombination mit weiteren zytostatisch wirksamen Substanzen effektiv verstärkt werden kann. Everolimus alleine führt zur Proliferationshemmung, jedoch nicht zur Apoptose, in den getesteten Mammakarzinomzellen. Zwar gab es initiale Berichte, in denen Rapamycin mit Apoptose in Verbindung gebracht wurde, doch konnte in jüngerer Zeit an unterschiedlichen Neoplasien nachgewiesen werden, dass mTOR-Inhibitoren als Monosubstanz kaum oder gar nicht zur Apoptose führen [72, 78, 88, 126]. Auch unsere Untersuchungen am Mammakarzinom und die anderer belegen, dass unabhängig von der Rezeptorexpression (HER2-Überexpression oder ER-Expression) als auch vom p53-Mutationsstatus die Proliferationshemmung im Vordergrund steht [60, 126]. mTOR-Inhibitoren wirken jedoch sensibilisierend auf Tumorzellen für die Induktion von Apoptose durch andere Substanzen oder Noxen. Neben der Translations- und Proliferationshemmung und Zellzyklusarrest führt mTOR-Inhibition auch zur Inhibition der Angiogenese bzw. der Neoangiogenese im Tumorgewebe. mTORC1 fördert die Angiogenese über HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), der die VEGF-Produktion stimuliert. Gerade Tumore mit dysregulierter Angiogenese erwiesen sich als sensibel für mTOR-Inhibition [80, 174, 201]. Aber nicht nur die Inhibition von HIF1 $\alpha$  in Tumorzellen wirkt antiangiogenetisch, sondern zugleich auch die Unterbrechung der durch VEGF stimulierten Signaltransduktion (durch mTOR-Inhibition) in den Endothelzellen [50, 112]. Dies könnte erklären, weshalb trotz der schwachen antiapoptotischen Effekte *in vitro*, eine klinisch signifikante Wirkung nachzuweisen ist, insbesondere bei Tumoren mit dysregulierter Angiogenese. Zugleich unterstreicht es aber auch die Bedeutung der Kombinationstherapie zur Wirkungsverstärkung.

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin sensibilisierte in den eigenen Untersuchungen Mammakarzinomzellen gegenüber der Wirkung von Honokiol und verstärkte signifikant die Apoptose dieser Zellen. Honokiol ist ein Extrakt aus der Rinde der Magnolien-Spezies *Magnolia officinalis*, die in China endemisch vorkommt. Es wurde in der traditionellen chinesischen Medizin u. a. als Anxiolytikum verwendet, später wurden für Honokiol jedoch auch antiinflammatorische, antithrombotische und antioxidative

Eigenschaft nachgewiesen [101, 105, 199]. Honokiol induzierte signifikante Veränderungen im Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg. Es konnte mittels Westernblot gezeigt werden, dass unter Honokiol-Behandlung verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien die Phosphorylierung (Aktivierung) von Akt abnahm und der Level von PTEN anstieg. Da auch der HER2-induzierte Wachstumsstimulus u. a. über den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg vermittelt wird, konnte in der vorliegenden Arbeit von uns nachgewiesen werden, dass die inhibitorische Wirkung des dualen EGFR/HER2-Thyrosinkinaseinhibitors Lapatinib durch Honokiol verstärkt wird. Darüber hinaus führte Honokiol als Monosubstanz zu einem G1-Zellzyklusarrest, ähnlich wie mTOR-Inhibitoren. Wir vermuten, dass zwischen Honokiol und mTOR-Inhibitoren in ihrer Wirkung auf den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg ein Synergismus an Mammakarzinomzellen nachzuweisen ist. Rapamycin allein induzierte bereits eine Proliferationshemmung, wurde Honokiol mit Rapamycin kombiniert, so führte das in Mammakarzinomzellen nicht nur zu einer verstärkten Proliferationshemmung, sondern darüber hinaus wurde die Honokiol-induzierte Apoptose mittels Rapamycin signifikant verstärkt.

Der aus der Kombination von mTOR-Inhibitoren und anderen zytostatisch wirksamen Substanzen entstehende Synergismus an Tumorzellen ist die wichtigste funktionelle Rationale beim Einsatz der mTOR-Inhibitoren. Dies konnten wir nicht nur anhand von Honokiol und Rapamycin, sondern ebenfalls anhand von Carboplatin, Paclitaxel, Doxorubicin oder Metformin in Kombination mit Everolimus belegen. Dieses Prinzip wurde auch in den klinischen Prüfungen der mTOR-Inhibitoren an Patientinnen mit Mammakarzinom zugrunde gelegt [6, 9-12, 121]. Theoretischer Hintergrund ist hierbei zusätzlich die Überwindung von Resistenzen.

Trastuzumabresistenz beim Mammakarzinom ist mit der Aktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs assoziiert [106]. Trastuzumabresistenz erwies sich durch Everolimus als überwindbar, weshalb eine Phase-I/II-Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nach Trastuzumab-Vorbehandlung durchgeführt wurde [121]. Die Kombination von Trastuzumab und Everolimus führte unter diesen 47 Patientinnen trotz der Trastuzumab-Vorbehandlung immerhin zu einer Remissionsrate von 15%, einer CB-Rate von 34% und einem medianen PFS von 4,1 Monaten.

Erworbene Resistenzen von Mammakarzinomzellen gegen Tamoxifen, Fulvestrant oder gegen Östrogenentzug sind ebenfalls mit einer Überaktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs assoziiert [27, 116, 117]. Nachdem *in vitro* nachgewiesen wurde, dass die Resistenz gegen Aromatase-Inhibitoren oder Tamoxifen durch mTOR-Inhibitoren revidiert werden konnte, wurden klinische Studien initiiert [14, 22, 41]. In zwei klinischen Studien an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde verifiziert, dass die Hormonresistenz durch die Kombination mit Everolimus auch *in vivo* überwunden werden kann. In der einen, einer randomisierten Phase-II-Studie, wurde durch Kombination von Tamoxifen und Everolimus die CB-Rate im Vergleich zu Tamoxifen allein von 42% auf 61% erhöht. In der Subgruppe der Patientinnen, die eine sekundäre Resistenz gegen Aromatase-Inhibitoren aufwiesen, zeigte sich der ausgeprägteste Effekt. Bei diesen wurde die mediane Zeit bis zur Tumorprogression von 5 auf 17 Monate verlängert. Letzteres war allerdings in dieser Studie nicht das primäre Studienziel und ist deshalb mit Vorsicht zu werten [9]. Bei Patientinnen mit Resistenz gegen nicht-steroidale Aromatase-Inhibitoren (Letrozol oder Anastrozol) wurde in einer randomisierten Phase-III-Studie die Remissionsrate durch Kombination des steroidalen Aromatase-Inhibitors Exemestan mit Everolimus im Vergleich zu Exemestan-Monotherapie von 1%

auf 12%, die CB-Rate von 26% auf 51% erhöht und das mediane PFS (primäres Studienziel) von 4 auf 11 Monate verlängert, was aus klinischer Sicht ein bedeutender Fortschritt in der Therapie des metastasierten, vorbehandelten Mammakarzinoms darstellt [11].

In den eigenen Untersuchungen wurde Carboplatin als Kombinationspartner gewählt und zunächst in *in-vitro*-Experimenten mit Everolimus kombiniert, da Platinderivate, wie in Abschnitt 1.4.1 dargelegt, in den letzten Jahren wieder verstärkt beim Mammakarzinom zum Einsatz kamen. Everolimus verstärkte die Sensibilität von Mammakarzinomzellen für Carboplatin. Die Kombination von Everolimus und Carboplatin führte zu einer synergistischen Hemmung von Zellproliferation und darüber hinaus zu verstärkter Apoptose in unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien.

Es liegen nur wenige Untersuchungen zur Kombination von Platinderivaten mit mTOR-Inhibitoren an unterschiedlichen Tumorarten (Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom) vor, die jeweils nur Teilaspekte untersucht haben [17, 108, 120]. In allen konnte jedoch ein synergistischer Effekt von Platinderivaten und der Kombination mit einem mTOR-Inhibitor nachgewiesen werden. Mondesire et al. [120] hatten an Mammakarzinomzellen ebenfalls beobachtet, dass die Kombination von Carboplatin, Paclitaxel oder Vinorelbin mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin verstärkt Apoptose induzierte. Der Apoptosemechanismus wurde allerdings nur für Paclitaxel und Rapamycin untersucht und ergab Caspase-Abhängigkeit der Apoptose. In unseren Untersuchungen mit Carboplatin, das einen G2/M-Phase-Arrest induziert, zeigte sich, dass der Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-FMK die durch Carboplatin und Everolimus induzierte Apoptose und Proliferationshemmung nicht antagonisiert. Auch war nach der Kombinationsbehandlung kein Anstieg der Caspase-3-, -8- und -9-Aktivität messbar. Diese Versuche zeigten erstmalig, dass diese Apoptose zumindest teilweise Caspase-unabhängig verlief. Darüber hinaus zeigte sich, dass bei der Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie p53 involviert ist. Dies war ebenfalls für Paclitaxel und Rapamycin nachgewiesen worden [120]. Da Platinderivate insbesondere bei p53-Wildtyp-Zellen besonders wirksam sind, war ein Synergismus besonders bedeutsam [161]. Allerdings zeigte sich in den beiden eigenen Arbeiten eine Sensibilisierung für die Apoptose durch mTOR-Inhibition nicht nur in p53-Wildtyp-Zellen sondern auch in p53-mutierten Zellen, so dass zwar p53 involviert war, aber ein weiterer Mechanismus beteiligt sein musste, der aber noch nicht näher charakterisiert werden konnte. Für einen p53-unabhängigen Mechanismus sprach auch, dass die Kombination mit Everolimus die Expression von Proteinen inhibierte, die die G2/M-Zellzyklus-Transition regulieren (Cyclin B1, CDK-1 und CDC-25C).

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit analog zu einer Arbeit mit Cisplatin+Everolimus an Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden, dass höhere Akt-Expression in Tumorzellen, d. h. stärkere Aktivierung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs, mit einer verminderten Wirksamkeit einhergeht. Das untermauert die These, dass die mit Akt-Aktivierung einhergehende Resistenz gegen Zytostatika durch Kombination mit mTOR-Inhibition aufgehoben werden kann, das folglich auch für Platinderivate angenommen werden darf [108, 116].

Ein weiterer indirekter Inhibitor von mTOR ist Metformin. Er hemmt über die Aktivierung von AMPK sowie über die Hemmung von ERK den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg (Abbildung 1). AMPK ist ein zentraler zellulärer Energiesensor, dessen Aktivierung durch Metformin zur Unterdrückung



energiekonsumierender Prozesse wie Glukoneogenese, Protein- oder Fettsäuresynthese führt und beim Diabetes mellitus Typ 2 Besserung der Hyperglykämie und Insulinresistenz bewirkt [159, 177]. In Tumorzellen führt die durch Metformin-vermittelte Stimulierung von AMPK zur Inhibition von mTOR, indem TSC2 phosphoryliert und stabilisiert wird. Dies gilt als Hauptmechanismus der Antitumorwirkung. Es kommt nachfolgend zur Hemmung der pathologischen Zellzyklusprogression, des Zellwachstum und der Angiogenese [84]. Retrospektive Untersuchungen legten nahe, dass Patienten, die an einem mit Metformin therapierten Diabetes erkrankt sind, eine geringere Inzidenz für unterschiedliche Tumore, inklusive des Mammakarzinoms, und ein verlängertes Überleben aufweisen [100, 128, 200]. Die Rate der pathologischen kompletten Remissionen (pCR) bei Patientinnen mit Mammakarzinom, die eine neoadjuvante Therapie erhielten, lag in einer retrospektiven Studie signifikant höher, wenn die Patientinnen einen mit Metformin behandelten Diabetes mellitus hatten (pCR 24%). Die Vergleichsgruppe der nicht mit Metformin behandelten Diabetikerinnen wies eine pCR-Rate von 8% auf. Im Vergleich zu Patientinnen ohne Diabetes zeigte sich immerhin ein nicht signifikanter Trend zu einer besseren pCR unter Metformin (24% versus 16%) [87]. Dies wies zwar darauf hin, dass nicht nur durch die Verbesserung der diabetischen Stoffwechselsituation die Effektivität der Tumortherapie gesteigert werden kann, sondern dass auch ein direkter Effekt auf den Tumor besteht. Gleichwohl ist es bisher nicht zweifelsfrei geklärt, welcher Mechanismus im Vordergrund steht.

Metformin wirkte *in-vitro* antiproliferativ auf Mammakarzinomzellen, sowohl auf ER-positive, HER2-überexprimieren sowie triple-negative, in den vorliegenden eigenen Untersuchungen sogar mit einem ausgeprägteren Effekt auf die triple-negativen Mammakarzinomzellen. Auch im Nacktmaus-Modell inhibierte Metformin das Wachstum *triple*-negativer Mammakarzinome [4, 102, 195]. Jedoch liegen auch Untersuchungen vor, die den Einsatz von Metformin als Monotherapie kritisch infrage stellen. Kürzlich sind retrospektive Daten bei der Subgruppe der Patientinnen mit *triple*-negativem Mammakarzinom publiziert worden, die keinen Überlebensvorteil durch Metformin auswiesen [13]. Darüber hinaus zeigte eine randomisierte Phase-II-Studie an Patientinnen mit operablem Mammakarzinom, die 4 Wochen vor der Therapie mit einer Standarddosis Metformin oder Placebo behandelt wurden, dass die proliferative Aktivität des Tumors vor und nach der Therapie nicht signifikant unterschiedlich ausfiel. Der antiproliferative Effekt auf Mammakarzinome *in vivo* scheint, zumindest nach kurzer Exposition, eher gering zu sein, wenn Metformin als Monotherapie eingesetzt wird [20]. Auch gibt es im Gegensatz zu mTOR-Inhibitoren unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Angiogenese-Inhibition. In einer Arbeit reduzierte Metforminbehandlung zwar die VEGF-Expression in ER-positiven Mammakarzinomzellen, bewirkte aber in ER-negativen eher eine Stimulierung [140].

Auch bei Metformin, das ein günstiges Nebenwirkungsprofil am Patienten aufweist, wurde deshalb in den eigenen Untersuchungen der Ansatz verfolgt, die Therapie des Mammakarzinoms mittels Kombinationstherapie zu optimieren. Die Kombination von Metformin mit Doxorubicin war *in vitro* deutlich effektiver als jede einzelne der beiden Substanzen beim Mammakarzinom. Im Gegensatz zu Doxorubicin allein erwies sich die Kombination nicht nur generell gegen Tumorzellen als wirksam, sondern auch gegen Tumorstammzellen [75]. Metformin allein induzierte bereits Apoptose in Mammakarzinomzellen, in Kombination mit Carboplatin kam es wiederum zu einem synergistischen

Effekt. Dies konnten wir ebenfalls für die Kombination von Metformin mit Paclitaxel und Doxorubicin, zwei anderen beim Mammakarzinom hochwirksamen Zytostatika, beobachten. Fügte man noch Everolimus hinzu, wurde der Effekt auf den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs weiter verstärkt, der p27-Level wurde weiter erhöht und die Herunterregulierung der Phosphorylierung von 4E-BP1 wurde intensiviert. Das besondere an der Kombination von mTOR-Inhibition mit Metformin ist die synergistische und zugleich differenzierte Wirkung am Pi3K/Akt/mTOR-Signalweg. Auch für die Kombination von Metformin mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin (ohne Zytostatika) wurden synergistische Effekte auf S6K1 beschrieben. Darüber hinaus kommt es unter Metformin im Gegensatz zu mTOR-Inhibitoren, nicht zu dem *Feed-back*-Mechanismus durch Akt-Aktivierung, der der Proliferationshemmung durch mTOR-Inhibition entgegenwirken kann, sondern über eine Phosphorylierung der inhibitorische Komponente von IRS-1 zu einer Inhibition dieses *Feed-back*-Mechanismus [195]. Zugleich wirkt AMPK ebenfalls auf den ERK-Signaltransduktionsweg, so dass in die Metformin-induzierte Apoptose nicht nur der mTOR/Akt/Pi3K- sondern auch den ERK-Signaltransduktionsweg involviert ist [110]. Neuere Daten zeigten auch, dass Metformin in triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien die Stat3-Aktivierung inhibierte und Stat3-*Knockdown* die Metforminwirkung verstärkte. Somit muss auch Stat3 als ein wichtiger Regulator der Metforminwirkung über den JAK2/Stat-Signaltransduktionsweg angesehen werden [42]. Der Nachweis der Hemmung mehrerer Signalkaskaden durch Metformin sowie des *Feed-back*-Mechanismus unterstützt unsere Beobachtung eines zusätzlichen Effekts in Kombination mit mTOR-Inhibition. Zugleich könnte aber auch eine effektivere Hemmung durch duale Inhibition des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs die Ursache sein.

Ein anderer Ansatz, die Therapie des Mammakarzinoms zu optimieren, war zunächst die PPAR- $\gamma$ -vermittelte Wirkung auf Mammakarzinome *in vitro* zu untersuchen. Synthetische PPAR- $\gamma$ -Liganden, Substanzen, die in eigenen Arbeiten bereits zuvor auch an Mantelzelllymphom-Zelllinien und Myelom-Zelllinien untersucht worden waren, stellten, wie in Abschnitt 1.3.2.3 beschrieben, zunächst einen vielversprechenden Ansatz dar [51-52]. Sie induzierten auch bei Mammakarzinomen eine Wachstumshemmung, die mit Zellzyklusarrest in der G1-Phase assoziiert war [190, 192]. Auch wurde in Mammakarzinomzellen nachgewiesen, dass der natürliche PPAR- $\gamma$ -Ligand 15d-PGJ2 und die TZD Rosiglitazon, Ciglitazon und Troglitazone selektiv die Genexpression von Cyclin D1 inhibieren [143, 181, 192]. Der G1-Zellzyklus-Arrest und die Abnahme von Cyclin D1 waren zugleich mit einer Hemmung der Pi3K-Aktivität assoziiert [5]. Sowohl die Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktion als auch die Signaltransduktion über ERK wurden hierdurch inhibiert, somit waren auch - wenn auch nicht ausschließlich - die gleichen Transduktionswege wie bei Metformin und mTOR-Inhibitoren involviert [141]. Als ein Wirkungsmechanismus von PPAR- $\gamma$ -Agonisten wurden auch die Hochregulierung von PTEN, einem Tumorsupressor des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg beschrieben [137]. In Mammakarzinomen zeigten sich erhöhte Expressionslevel von PTEN, eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung, ein Anstieg von Bax und Abnahme von Bcl-2, wenn sie mit Rosiglitazon behandelt wurden [93]. Auch in Lungenkarzinomzellen reduzierte Rosiglitazon die Phosphorylierung von Akt und steigerte die PTEN-Proteinexpression sowie die Phosphorylierung von AMPK und zugleich reduzierte

es, *downstream* von mTOR, die Phosphorylierung von S6K1, so dass eine Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktion als ein Wirkmechanismus wahrscheinlich ist [70].

Allerdings war schon zu jenem Zeitpunkt eine ausgeprägte Hepatotoxizität für TZD beobachtet worden, anfangs nur für Troglitazon, später auch für Rosiglitazon. Der wahrscheinlichste Mechanismus der Hepatotoxizität der PPAR-Agonisten war die Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. Es ist davon auszugehen, dass auch Pioglitazon diesen Mechanismus induziert. Da Pioglitazon jedoch eine geringere Affinität zu PPAR- $\gamma$  aufweist, besitzt es deshalb möglicherweise ein günstigeres Nebenwirkungsprofil. Da die Toxizität, die bei einem potentiellen Einsatz von Rosiglitazon oder auch Pioglitazon als Zytostatikum auftreten könnte, besondere Vorsicht bei Vorschädigung der Leber, z. B. bei hepatischer Metastasierung, und bei hepatotoxischer Begleitmedikation (z. B. Taxane) nahelegen würde, sowie die Erkenntnis, dass die Dosen, die zur Proliferationshemmung im Zellkulturmodell verwendet wurden, deutlich oberhalb des therapeutischen Bereichs beim Diabetes mellitus lagen, führte dazu, dass wir diesen Ansatz zunächst nicht weiter verfolgten. Sie legte vielmehr die Verwendung alternativer PPAR-Agonisten nahe, z. B. dualer Agonisten. In den eigenen Untersuchungen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Behandlung von humanen Mammakarzinom-Zelllinien mit TZD18, einem dualen PPAR- $\alpha/\gamma$ -Agonisten, einen Wachstumsstopp induziert und zur Apoptose führt, die mit der zellulären Reaktion auf endoplasmatischem Retikulumstress verbunden ist. Es stellte sich heraus, dass die Ausschaltung der Expression von PPAR- $\alpha$  oder PPAR- $\gamma$  mittels siRNA keinen wesentlichen Einfluss auf die TZD18-induzierte Proliferationshemmung an Mammakarzinomzellen hatte, was stark darauf hindeutete, dass die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  und/oder PPAR- $\gamma$  in dieser Hinsicht nicht bedeutsam waren. Ein Phänomen, das auch mit anderen TZD bereits beobachtet worden war. Auch bei der Wirkung anderer TZD, z. B. Troglitazon und Ciglitazon, spielten weitere möglicherweise nicht PPAR-vermittelte Mechanismen ebenfalls eine Rolle [2, 56, 182, 193]. Zum Beispiel konnte für die TZDs gezeigt werden, dass sie die Ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation von Zellzyklus und Apoptose-regulierenden Proteinen (u. a.  $\beta$ -Catenin, Cyclin D1) fördern. In Hormonrezeptor-positiven und –negativen Mammakarzinomzellen konnte mit PPAR- $\gamma$ -inaktiven TZDs Cyclin D1 unterdrückt werden, ohne dass die mRNA-Level verändert wurden, so dass hier eine posttranskriptionelle Regulierung postuliert werden musste [36, 79, 182]. In Prostatakarzinomzellen wurde beobachtet, dass TZDs unabhängig von PPAR- $\gamma$  die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 und anderer proapoptotischer Proteine hemmen [160]. Auch hatte der Rezeptorstatus der unterschiedlichen getesteten Mammakarzinom-Zelllinien keinen Einfluss auf die TZD18-Wirkung. Es bleibt aber unklar, inwieweit die Effektivität von TZDs, wie Rosiglitazon oder Pioglitazon, beim Mammakarzinom PPAR-vermittelt ist und inwieweit andere Mechanismen zur Proliferationshemmung und Apoptose beitragen. Die Wirkung TZD18, dem dualen PPAR- $\alpha/\gamma$ -Agonisten, wurde nicht PPAR-vermittelt.

Als weiterer Ansatz zur Verbesserung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms wurde neben den *in-vitro*-Untersuchungen eine klinische Untersuchung durchgeführt. Parallel zu den Zellkulturexperimenten wurde versucht, anhand einer retrospektive Analyse der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die in der Medizinische Klinik m. S. Onkologie Hämatologie, Campus Charité Mitte, therapiert wurden, Erkenntnisse über die Effektivität einer bekannten, aber bis

dato wenig systematisch untersuchten, Therapiemodalität zu erlangen, der niedrigdosierten 5-FU-Dauerinfusion als palliative Chemotherapie des Mammakarzinoms.

Es wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl neuer Substanzen entwickelt, die in klinischer Testung sind oder Zulassung für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms erhalten haben [53]. Altbewährte Zytostatika wie 5-FU werden in der klinischen Praxis oft durch neuere Substanzen abgelöst, nicht immer wegen deutlicher Effektivitätsunterschiede, sondern auch, weil zu alten Substanzen keine randomisierten Studien vorliegen und auch keine mehr durchgeführt werden.

Die Landschaft der Arzneimittelprüfungen hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten erheblich verändert. Die gesetzlichen Maßnahmen zur Verbesserung der Reliabilität klinischer Arzneimittelprüfungen hat zur Folge, dass die Durchführung erheblich teurer und aufwendiger geworden ist und somit eine Tendenz dahingehend besteht, dass wissenschaftlich interessante klinische Studien nur dann durchgeführt werden können, wenn eine entsprechende finanzielle Unterstützung stattfindet. Dieses setzt aber das Interesse von Sponsoren voraus, das bei Arzneimittelstudien oft marktwirtschaftlich gesteuert ist. In dieser Studie wurde versucht, mit möglichst einfachen Mitteln Erkenntnisse über eine Therapie zu gewinnen, an der zurzeit kein merkantiles Interesse mehr besteht. Ein Sponsoring fand nicht statt.

Insbesondere stark vorbehandelte Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom können in späteren Therapielinien, in denen kein einheitlicher Standard mehr existiert, vom Einsatz bewährter Zytostatika profitieren. Um hier die Evidenzlage zu verbessern, wurde die 5-FU-Dauerinfusion untersucht. 5-FU ist zwar ein bewährtes Medikament zur Therapie des Mammakarzinoms, jedoch war die niedrigdosierte Dauerinfusion nicht gut untersucht. 5-FU wurde als metronomische Therapie eingesetzt, d. h. es wird davon ausgegangen, dass bei niedrigem, permanentem Plasmaspiegel eines Zytostatikums die Antiangiogenese den Hauptwirkmechanismus gegen den Tumor darstellt [136]. Auch die mTOR-Inhibition beinhaltet einen antiangiogenetischen Effekt. Zum einen unterbindet mTOR-Hemmung die durch VEGF-induzierte Signalkaskade in Endothelzellen und zum anderen kommt es in Tumorzellen vermittels HIF1 $\alpha$  zu verminderter VEGF-Produktion (Abbildung 1) [50, 112]. Es gibt Hinweise für einen Synergismus bezüglich der antiangiogenetischen Wirkung von mTOR-Inhibitoren und 5-FU. In einer Phase-I-Studie, in der 5-FU in einer hohen Dosierung mit Rapamycin an soliden Tumoren kombiniert wurde, kam in mehreren Fällen zu einer Darmperforation, einer für Angiogenese-Inhibition typischen unerwünschten Wirkung, die für beide Substanzen allein nicht beschrieben war [142].

In unserer Studie sollte zunächst evaluiert werden, ob die 5-FU-Dauerinfusion, den klinischen Ansprüchen an eine palliativmedizinische medikamentöse Therapie gerecht wird, da es bisher nur wenige Untersuchungen hierzu beim Mammakarzinom gab [26, 35, 89, 145]. Darüber hinaus sollte die Analyse die Grundlage für eine eventuelle Kombinationstherapie mit einem mTOR-Inhibitor bilden, sofern ausreichende Effektivität in diesem Dosisbereich nachzuweisen wäre.

Als wesentliche Therapieziele in der palliativen Tumorthherapie seien erwähnt: Bewahrung der seelischen und körperlichen Integrität, Erhaltung oder Verbesserung der Lebensqualität des Patienten, Symptomkontrolle und Lebensverlängerung, die nicht nur, aber auch, durch Tumorkontrolle erreicht werden können. In unserer Studie konnten aus methodischen Gründe bezüglich einer Lebensverlängerung keine exakten Vergleiche hergestellt werden, denn es handelte sich um eine

retrospektive, nicht-randomisierte Studie; auch war die Patientenzahl (n=43) relativ gering. Die methodisch wünschenswerte Evaluation der Lebensqualität war aufgrund des retrospektiven Charakters ebenfalls nicht möglich. Als grobe Surrogatparameter für Lebensqualität bei Studien zur palliativen Therapie werden üblicherweise die CB-Rate und die Nebenwirkungsraten herangezogen. Es zeigte sich eine relativ niedrige Nebenwirkungsrate, es wurde keine CTC (*common toxicity criteria*)-Grad-4-Toxizität dokumentiert, lediglich fünf Patientinnen erlitten Grad-3-Toxizitäten. Zugleich fand sich eine relativ hohe Effektivität (CB-Rate: 27%), stellte man die im Median fünf Vortherapien der Patientinnen in Rechnung. In älteren Studien zur 5-FU-Dauerinfusion war die Messung der CB-Rate noch nicht obligat, so dass bisher dazu keine Angaben zum vorbehandelten metastasierten Mammakarzinom vorlagen, die Ansprechraten bei vorbehandelten Patientinnen waren vergleichbar [26, 35, 89, 145]. Die Nebenwirkungsrate stellte die Stärke dieser Therapie dar, insbesondere die geringe Hepatotoxizität.

Für Patientinnen mit Mammakarzinom in einer metastatisch bedingten fortgeschrittenen Leberinsuffizienz, ist die metronomische 5-FU-Dauertherapie oft die einzige Therapieoption, da Taxane, Anthrazykline, Vinorelbin, Eribulin, Methotrexat und Gemcitabin entweder kontraindiziert sind oder bei Leberinsuffizienz mit einer unabschätzbaren Toxizität einhergehen. In unserer Studie wurden sechs Patientinnen, auf die diese Situation zutraf, mit ausgewertet, drei davon zeigten ein Ansprechen i. S. eines Bilirubinabfalles, eine zeigte ein objektives Ansprechen des Tumors, das mehr als 6 Monate anhielt. Gleichwohl ist der retrospektive Charakter dieser Studie bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen. Nicht alle Toxizitäten werden im klinischen Alltag in den Akten dokumentiert, so dass hier eine nicht unwesentliche Fehlerquelle bestand. Auch unterlag die Auswertung des Ansprechens nicht einer zweiten unabhängigen Begutachtung. Somit konnten die Ergebnisse nur zur Generierung einer Hypothese verwendet werden, die in prospektiven Untersuchungen zu überprüfen wäre. Allerdings ist vor dem Hintergrund des aktuellen Arzneimittelgesetzes, das eine klinische Studie mit einem erheblichen bürokratischen und damit finanziellen Aufwand verbindet, eine Arzneimittelprüfung in den meisten Fällen nur noch mit finanzieller Unterstützung aus der pharmazeutischen Industrie möglich. Die bewährte, nicht mehr einem Patent unterliegende Substanz 5-FU wird jedoch von milderem Interesse für die pharmazeutische Industrie sein. Die gute Verträglichkeit und Effektivität rechtfertigen 5-FU-Dauerinfusion zukünftig in Kombination mit Pi3K- oder mTOR-Inhibitoren zu testen. An Magenkarzinomzellen sowie an Zellen des hepatozellulären Karzinoms konnte bereits *in vitro* ein Synergismus von mTOR-Inhibition und 5-FU nachgewiesen werden [18, 25]. Sowohl die mTOR-Inhibition als auch die duale Pi3K/mTOR-Inhibition erhöhten die Sensitivität von Tumorzellen für 5-FU und das Tumorwachstum wurde durch die Kombination stärker inhibiert als durch die Einzelsubstanzen [18]. Jedoch sollte auf eine niedrige Dosierung der 5-FU-Dosis geachtet werden, da sich höhere Dosierungen in Kombination mit Rapamycin in einer Phase-I-Studie bereits als schlecht verträglich erwiesen hatten [142].

Die präklinischen Untersuchungen mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus bildeten die experimentelle Grundlage für die prospektive monozentrische Phase-I-Studie mit Carboplatin und Everolimus. Auch wenn, wie oben dargelegt, die Überwindung von Resistenzen durch Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs der wichtigste Ansatz für diese Kombination darstellte und hierzu *in-vitro* wie

*in-vivo* Belege vorlagen, so ist es das Wesen einer Phase-I-Studie, dass zunächst nur die MTD als primäres Studienziel bestimmt und die Verträglichkeit getestet wird. Effektivitätsanalysen wurden zwar vorgenommen waren aber nicht primäres Studienziel und lassen keine sicheren Aussagen zur Wirksamkeit zu. Carboplatin wurde, ähnlich wie die 5-FU-Therapie, in einer niedrigen Dosis (AUC<sub>2</sub>) wöchentlich appliziert, weil gerade bei zytostatisch vorbehandelten Patientinnen zumeist eine eingeschränkte Knochenmarkreserve besteht und eine wöchentliche Gabe eine bessere Steuerbarkeit der Toxizität ermöglicht als eine dreiwöchige Applikation. Es kam im Rahmen der Studie, wie antizipiert, zu relativ vielen Therapieunterbrechungen, aber nur in 4 von 15 Patientinnen war eine Dosisreduktion notwendig. Thrombozytopenie, Leukopenie, Hypercholesterinämie, Mukositis und Diarrhoe waren die häufigsten therapiebedingten unerwünschten Wirkungen. Leukopenie und Thrombozytopenie waren die häufigsten unerwünschten Wirkungen vom CTC-Grad 3 und 4, die eher Carboplatin als Everolimus zuschreiben sind, wenn auch Everolimus als Monotherapie eine leichtgradige Hämatotoxizität induziert [121-122, 189]. Es wurden keine bisher nicht bekannten unerwünschten Wirkungen der Prüfsubstanzen beobachtet. Everolimus (10 mg/d) und Carboplatin (AUC 2 wöchentlich) wurde als MTD festgelegt.

Die Dosis von 10 mg/d hatte sich in den meisten Studien an unterschiedlichen Malignomen inklusive hämatologischer Neoplasien sowohl in der Kombinationstherapie als auch der Monotherapie als MTD herausgestellt [6, 8, 59, 121, 170, 191]. Sie stimmte auch mit der für Nierenzellkarzinom und neuroendokrine Tumore zugelassenen Dosis überein. Lediglich in der Kombination mit Gefitinib fand sich in einer Phase-I-Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom unter der 10 mg-Dosis eine dosislimitierende Toxizität, so dass 5 mg Everolimus pro Tag in Kombination mit 250 mg Gefitinib als MTD festgelegt wurde. Dort war es unter in der 10-Dosis-Stufe zu einem Todesfall gekommen, der ätiologisch nicht sicher zu klären war, jedoch eine Therapieassoziation bestand [119]. Die Ergebnisse mit Carboplatin und Everolimus rechtfertigten die weitere Untersuchung dieser Kombination, da sie zum einen den palliativmedizinischen Ansprüchen einer moderaten Toxizität gerecht wurden, zum anderen auch bei 3 von 14 auswertbaren Patientinnen Remissionen beobachtet wurden, d. h. Unwirksamkeit der Therapie ausgeschlossen werden konnte. Eine klinische Phase-II-Studie mit der Kombination wird deshalb zurzeit an unserer Klinik durchgeführt.

## 4 Ausblick

Die Polychemotherapie oder eine Kombinationstherapie mit zytostatischem Effekt beinhaltet immer die Möglichkeit eines Synergismus bezüglich der Effektivität und verminderter unerwünschter Wirkungen, da die einzelnen Substanzen niedriger dosiert werden können, insbesondere dann, wenn unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde liegen und somit keine additiven Effekte bei den unerwünschten Wirkungen entstehen. Dieses Potential besitzt die Kombination von Chemotherapie mit Substanzen, die den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg in Mammakarzinomen inhibieren, sei es Metformin oder Everolimus.

Nach den eigenen *in-vitro*-Daten käme auch eine Kombination der Chemotherapie mit Everolimus, Metformin oder beiden infrage. Insbesondere die Kombination von Carboplatin und Everolimus wird an der Medizinischen Klinik m. S. Onkologie und Hämatologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, als vielversprechender Ansatz für das metastasierte Mammakarzinom bereits klinisch getestet. Nach Abschluss der monozentrischen Phase-I-Studie mit Carboplatin und Everolimus bei Patientinnen mit vorbehandeltem metastasiertem Mammakarzinom wurde die klinische Prüfung in einer Phase-II fortgesetzt. Die Ergebnisse müssen abgewartet werden.

Es sind verschiedene neue Substanzen in Entwicklung, die den Pi3K/Akt/mTOR-Signalweg inhibieren. Zurzeit liegen die meisten klinischen Daten zu den mTOR-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus vor. Für die kombinierte antihormonelle Therapie gibt es bereits erfolversprechende Ergebnisse von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Es ist absehbar, dass die Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signalwegs, sei es durch direkte mTOR-Inhibitoren, durch duale Inhibitoren, die Pi3K und mTOR parallel inhibieren, oder reine Pi3K-Inhibitoren als Kombinationspartner für Chemotherapie oder antihormonelle Therapie zur Optimierung beitragen wird. Klinische Prüfungen mit vollständigerer Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signalwegs sind im Gange und könnten, sofern höhere Effektivität nicht mit einer höheren Rate unerwünschter Wirkungen assoziiert ist, die Therapie weiter verbessern. Eine klinische Studie mit Carboplatin mit Metformin +/- Everolimus wäre eine weitere interessante Kombination. Der Nachweis der Hemmung mehrerer Signalkaskaden durch Metformin sowie des *Feedback*-Mechanismus unterstützt die Beobachtung eines zusätzlichen Effekts in Kombination mit mTOR-Inhibition. Zugleich könnte aber auch eine effektivere Hemmung durch duale Inhibition des mTOR/Akt/Pi3K-Signaltransduktionswegs die Ursache der Wirkverstärkung sein. Aufgrund des günstigen und wenig überlappenden Nebenwirkungsprofils wäre eine *in-vivo*-Untersuchung anzustreben.

Aufgrund der widersprüchlichen Daten bezüglich des Wirkmechanismus der TZD und der wahrscheinlich nicht PPAR-vermittelten Wirkung von TZD18 sollte zunächst versucht werden, die Wirkmechanismen *in-vitro* weiter aufzuklären. Auch existieren bisher keine Daten über *in-vivo*-Nebenwirkungen von TZD18. Dies zu untersuchen wäre der nächste Schritt, bevor eine weitergehende klinische Testung sinnvoll ist.

Um die Effektivität und unerwünschte Wirkungen der 5-FU-Dauerinfusion als metronomische Therapie mit höherer Evidenz als mit der vorliegenden retrospektiven Analyse bewerten zu können, wäre eine prospektive Prüfung, zunächst als Phase-II-Studie, anzustreben. Im Falle der Bestätigung der hier

dargestellten Ergebnisse wäre eine Phase-III-Studie sinnvoll, d. h. ein prospektiver Vergleich mit einer anderen etablierten palliativen Therapie bei vorbehandelten Mammakarzinomen. Auch der Vergleich mit Capecitabin, einem Prodrug von 5-FU, wäre zu evaluieren, insbesondere inwieweit sich die pharmakodynamischen und kinetischen Unterschiede der beiden Substanzen auf die Effektivität bei vorbehandelten Mammakarzinomen auswirken. Mehr noch würde sich die Kombination der niedrigdosierten 5-FU-Dauerinfusion mit einem mTOR-Inhibitor anbieten, da ein synergistischer antiangiogenetischer Effekt auf Mammakarzinome wahrscheinlich ist.

Insgesamt unterstützen die vorliegenden Daten die Beobachtung, dass die Chemotherapie oder die endokrine Therapie weiterhin die Grundlage der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms darstellen, die zwar durch neue Substanzen wie Metformin oder Everolimus ergänzt und verstärkt werden können, jedoch bis dato nicht durch sie ersetzbar sind.



## 5 Zusammenfassung

Die in dieser Schrift kumulativ zusammengefassten wissenschaftlichen Arbeiten gliedern sich in zwei Teile: zum einen in *in-vitro*-Untersuchungen zu neuen Medikamenten, die beim Mammakarzinom potentielle Wirksamkeit gezeigt hatten und bezüglich ihrer Effektivität und ihrer Wirkmechanismen weiter analysiert wurden und bei denen der Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt; zum anderen in klinische Untersuchungen, die die Anwendung neuer Medikamente (mTOR-Inhibition in Kombination mit Carboplatin) oder etablierter Medikamente (5-Fluorouracil als Dauerinfusion) bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zum Gegenstand haben.

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung verschiedener humaner Mammakarzinom-Zelllinien mit Honokiol, einem Extrakt aus der Rinde der Magnolien-Spezies *Magnolia officinalis*, zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Wachstumsinhibition in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien führt. Die Wachstumshemmung war mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose assoziiert. Durch Honokiol wurde die Signaltransduktion über den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg durch Herabregulierung der Akt-Phosphorylierung und Hochregulierung der PTEN-Expression abgeschwächt, und es zeigte sich, dass die Kombination von Honokiol mit einem mTOR-Inhibitor (Rapamycin) synergistisch auf die Apoptoseinduktion von Mammakarzinomzellen wirkt.

Die Pi3K/Akt/mTOR-Inhibition wurde im Zellkulturmodell näher untersucht, und wir konnten zeigen, dass der mTOR-Inhibitor Everolimus, ein Rapamycin-Derivat, die Sensibilität von Mammakarzinomzellen für das konventionelle Zytostatikum Carboplatin verstärkte. Die Kombination von Everolimus und Carboplatin führte zu einer synergistischen Hemmung der Zellproliferation. Everolimus verstärkte den Carboplatin-induzierten G2/M-Zellzyklus-Arrest und führte in der Kombination zu Caspase-unabhängiger Apoptose in verschiedenen Mammakarzinomzellen.

Metformin, das über AMPK ebenfalls den Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg inhibiert, wurde als Monosubstanz oder in Kombination mit Everolimus und/oder Chemotherapeutika (Carboplatin, Paclitaxel oder Doxorubicin) an verschiedenen humanen Mammakarzinom-Zelllinien bezüglich Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion getestet. Metformin-Monotherapie inhibierte die Zellproliferation und induzierte Apoptose. Der zytotoxische Effekt von Metformin war an triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien ausgeprägter als an anderen und die durch Metformin induzierte Apoptose war zumindest teilweise Caspase-abhängig. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika und Metformin sowie Everolimus die Proliferationshemmung intensivierte.

Die Ergebnisse mit Everolimus legten nahe, dass das Prinzip der Hemmung des Pi3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs, sei es durch Everolimus oder Metformin, beim Mammakarzinom eine vielversprechende Therapieoption darstellt, insbesondere in Kombination mit anderen Wirkprinzipien. Hiermit wurde eine experimentelle Grundlage geschaffen, die eine Untersuchung *in vivo* rechtfertigte. Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms war der Einsatz von PPAR-Liganden. Es wurde gezeigt, dass ein dualer Ligand für PPAR- $\alpha/\gamma$  (TZD18) zur Wachstumsinhibition und Apoptose an sechs humanen Mammakarzinom-Zelllinien führte. Da es

Hinweise gab, dass die Wirkung nicht nur PPAR-vermittelt war und um die Mechanismen der von TZD18 induzierten Wachstumsinhibition und Apoptose weitergehend zu untersuchen, wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse von TZD18-behandelten Mammakarzinom-Zelllinien mittels Microarray vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass viele Gene, die in die Signaltransduktion des endoplasmatischen Retikulums bei Stress involviert sind, signifikant hoch reguliert wurden. Zusätzlich aktivierte TZD18 den Stress-sensitiven MAPK/ERK-Signaltransduktionsweg einschließlich p38, ERK und JNK. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Aktivierung von MAPK für die TZD18-induzierte Wachstumsinhibition bedeutsam war. Somit konnte nachgewiesen werden, dass sich die Wirkung von TZD18 über Retikulumstress entwickeln könnte und nicht allein über PPAR vermittelt wird, jedoch blieb der genauere Wirkmechanismus noch weiter zu klären und über die klinische Bedeutung konnte noch keine Aussage getroffen werden.

Die klinischen Untersuchungen zur Optimierung der Therapie des Mammakarzinoms umfassten zum einen eine retrospektive Studie, mit der die Evidenz für die Wirksamkeit einer 5-FU-Dauerinfusion erhöht werden sollte. Als Wirkmechanismus wurde in dieser Dosis insbesondere ein antiangiogenetischer Effekt postuliert. Der Einsatz von 5-FU als Dauerinfusion im Sinne einer metronomischen Therapie zeigte eine Ansprechrate von 12% und eine Krankheitsstabilisierung in 15% der Fälle sowie eine CB-Rate von 27% bei insgesamt moderaten Nebenwirkungen. Bei weit fortgeschrittenen und vorbehandelten Mammakarzinomen konnte anhand dieser retrospektiven Auswertung gezeigt werden, dass es ein Chemotherapie-Regime mit geringer Knochenmarktoxizität gibt, das u. a. auch bei metastasenbedingter hepatischer Insuffizienz noch einsetzbar ist. Eine Kombination mit mTOR-Inhibitoren, die ebenfalls eine nachgewiesene Wirksamkeit auf die VEGF-Produktion besitzen, wäre nach diesen Daten ein potentieller Kombinationspartner für 5-FU.

Nicht zuletzt wurde auf dem Boden der eigenen *in-vitro*-Untersuchungen mit Carboplatin und dem mTOR-Inhibitor Everolimus eine prospektive monozentrische klinische Phase-I-Studie mit Carboplatin und Everolimus für Patientinnen mit stark vorbehandeltem metastasiertem Mammakarzinom initiiert. Primärer Studienparameter war die maximal tolerable Dosis. Carboplatin in Kombination mit Everolimus stellte sich als relativ gut verträgliche Therapie bei Patientinnen mit stark vorbehandeltem metastasiertem Mammakarzinomen dar. Everolimus (10 mg/d) und Carboplatin (AUC 2 wöchentlich) wurde als MTD festgelegt. Die 10-mg-Dosis von Everolimus stimmte mit der für andere Tumorentitäten zugelassenen Dosis überein. Diese Dosis wird zurzeit in einer laufenden Phase-II-Studie mit dieser Kombination bei gleicher Indikation weiter untersucht.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Agulnik M: New developments in mammalian target of rapamycin inhibitors for the treatment of sarcoma. *Cancer* 2012; 118:1486-1497.
2. Al-Alem L, Southard RC, Kilgore MW, Curry TE. Specific thiazolidinediones inhibit ovarian cancer cell line proliferation and cause cell cycle arrest in a PPAR $\gamma$  independent manner. *PLoS One*. 2011; 6: e16179.
3. Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, Jordaan JP, Llombart AC, Pluzanska A, Rolski J, Melemed AS, Reyes-Vidal JM, Sekhon JS, Simms L, O'Shaughnessy J. Gemcitabine plus paclitaxel versus paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J Clin Oncol* 2008; 26:3950-3957.
4. Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 2009; 8:909-915.
5. Altiock S, Xu M, Spiegelman BM. PPAR- $\gamma$  induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via downregulation of PP2A. *Genes Dev* 1997; 11:1987-1998.
6. Andre F, Campone M, O'Regan R, Manlius C, Massacesi C, Sahmoud T, Mukhopadhyay P, Soria JC, Naughton M, Hurvitz SA. Phase I study of everolimus plus weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with metastatic breast cancer pretreated with trastuzumab. *J Clin Oncol* 2010; 28:5110-5115.
7. Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou S, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:909-918.
8. Awada A, Cardoso F, Fontaine C, Dirix L, De Grève J, Sotiriou C, Steinseifer J, Wouters C, Tanaka C, Zoellner U, Tang P, Piccart M. The oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in combination with letrozole in patients with advanced breast cancer: Results of a phase I study with pharmacokinetics. *Eur J Cancer* 2008; 44:84-91.
9. Bachelot T, Bourgier C, Cropet C, Guastalla J-P, Ferrero J-M, Leger-Falandry C, Soulie P, Eymard J-C, Debled M, Spaeth D, Legouffe E, Delozier T, El Kouri C, Chidiac J. TAMRAD: A GINECO randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone in patients (pts) with hormone-receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer (MBC) with prior exposure to aromatase inhibitors (AI). 33st San Antonio Breast Cancer Symposium 2010, Abstract S1-6.
10. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:520-529.
11. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM; CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:109-119.
12. Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, Campone M, Kubista E, Greil R, Bianchi G, Steinseifer J, Molloy B, Tokaji E, Gardner H, Phillips P, Stumm M, Lane HA, Dixon JM, Jonat W, Rugo HS. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:2630-2637.

13. Bayraktar S, Hernandez-Aya LF, Lei X, Meric-Bernstam F, Litton JK, Hsu L, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. *Cancer* 2012; 118:1202-1211.
14. Beeram M, Tan QT, Tekmal RR, Russell D, Middleton A, DeGraffenried LA. Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann Oncol* 2007; 18: 1323–1328.
15. Berger J, Moller DF. The mechanisms of action of PPARs. *Ann Rev Med* 2002; 53: 409–435.
16. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ: Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1784-1792.
17. Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell* 2005; 120:747-759.
18. Bhattacharya B, Akram M, Balasubramanian I, Tam KKY, Koh KX, Yee MQ, Soong R. Pharmacologic synergy between dual phosphoinositide-3-kinase and mammalian target of rapamycin inhibition and 5-Fluorouracil in PIK3CA mutant gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012; 13:34-42.
19. Bjornsti MA, Houghton PJ: The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:335-348.
20. Bonanni B, Puntoni M, Cazzaniga M, Pruneri G, Serrano D, Guerrieri-Gonzaga A, Gennari A, Stella Trabacca M, Galimberti V, Veronesi P, Johansson H, Aristarco V, Bassi F, Luini A, Lazzeroni M, Varricchio C, Viale G, Bruzzi P, Decensi A. Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J Clin Oncol*; published online 7 May 2012.
21. Bonnetterre J, Buzdar A, Nabholz JM, Robertson JF, Thürlimann B, von Euler M, Sahmoud T, Webster A, Steinberg M. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer* 2001; 92:2247-2258.
22. Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O'Reilly T, Evans DB, Chen S, Lane HA. Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5319-5328.
23. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137:354–366.
24. Bu X, Jia F, Wang W, Guo X, Wu M, Wei L. Coupled down-regulation of mTOR and telomerase activity during fluorouracil-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells. *BMC Cancer* 2007, 7:208.
25. Bu X, Le C, Jia F, Guo X, Zhang L, Zhang B, Wu M, Wei L. Synergistic effect of mTOR inhibitor rapamycin and fluorouracil in inducing apoptosis and cell senescence in hepatocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2008; 7:392-396.
26. Cameron DA, Gabra H, Leonard RC: Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br J Cancer* 1994; 70:120–124.
27. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H: Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor  $\alpha$ : a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001; 276:9817-9824.
28. Campone M, Levy V, Bourbouloux E, Berton Rigaud D, Bootle D, Dutreix C, Zoellner U, Shand N, Calvo F, Raymond E. Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2009; 100:315 – 321
29. Cardoso F, Bedard PL, Winer EP, Paganì O, Senkus-Konefka E, Fallowfield LJ, Kyriakides S, Costa A, Cufer T, Albain KS. International guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1174–1181.

30. Carrick S, Parker S, Thornton CE, Ghersi D, Simes J, Wilcken N. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, Issue 2. Art. No.: CD003372. DOI: 10.1002/14651858.CD003372.pub3.
31. Chan S, Scheulen ME, Johnston S, Mross K, Cardoso F, Ditttrich C, Eiermann W, Hess D, Morant R, Semiglazov V, Borner M, Salzberg M, Ostapenko V, Illiger HJ, Behringer D, Bardy-Bouxin N, Boni J, Kong S, Cincotta M, Moore L. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:5314-5322.
32. Chan D, Yeo WL, Tiemsim Cordero M, Wong CI, Chuah B, Soo R, Tan SH, Lim SE, Goh BC, Lee SC. Phase II study of gemcitabine and carboplatin in metastatic breast cancers with prior exposure to anthracyclines and taxanes. *Invest New Drugs* 2010; 28:859–865.
33. Chia SK, Speers CH, D'yachkova Y, Kang A, Malfair-Taylor S, Barnett J, Coldman A, Gelmon KA, O'Reilly SE, Olivotto IA. The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer. *Cancer* 2007; 110: 973-979.
34. Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, Stefanick ML, Manson JE, Gass M, Aragaki AK, Ockene JK, Lane DS, Sarto GE, Rajkovic A, Schenken R, Hendrix SL, Ravdin PM, Rohan TE, Yasmeen S, Anderson G for the WHI Investigators. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2009; 360:573-587.
35. Chu L, Sutton LM, Peterson BL, Havlin KA, Winer EP. Continuous infusion 5-fluorouracil as first-line therapy for metastatic breast cancer. *J Infus Chemother* 1996; 6:211–216.
36. Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, Boisbrun M, Kuntz S, Lecomte J, Chaptour Y, Flament S. New troglitazone derivatives devoid of PPAR $\gamma$  agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124:101–110.
37. Creighton CJ, Fu X, Hennessy BT, Casa AJ, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Gray JW, Brown PH, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Mills GB, Lee AV, Schiff R: Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010, 12: 1-12.
38. Cronin KA, Mariotto AB, Clarke LD, Feuer EJ. Additional common inputs for analyzing impact of adjuvant therapy and mammography on U.S. mortality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2006; 36:26-29.
39. Dancey JE: Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:1065-1073.
40. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol* 2010; 28:92-98.
41. deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, ilva JM, Roth RA, Hidalgo M. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. *Clin Cancer Res* 2005; 10:8059–8067.
42. Deng XS, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, Wahdan-Alaswad R, Thor AD: Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle* 2012; 11:367–376.
43. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Rev* 1998; 20:649-688.
44. De Virgilio C, Loewith R: Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 2006; 25: 6392–6415.

45. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2011; 379:432-444.
46. Ellard SL, Clemons M, Gelmon KA, Norris B, Kennecke H, Chia S, Pritchard K, Eisen A, Vandenberg T, Taylor M, Sauerbrei E, Mishaeli M, Huntsman D, Walsh W, Olivo M, McIntosh L, Seymour L. Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND.163. *J Clin Oncol* 2009; 27:4536-4541.
47. Elstner E, Williamson EA, Zang C, Fritz J, Heber D, Fenner M, Possinger K, Koeffler HP. Novel therapeutic approach: ligands for PPAR- $\gamma$  and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74:155-165.
48. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8806-8811.
49. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7:606–619.
50. Escudier B: Signaling inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer J* 2008; 14: 325–329.
51. Eucker J, Bängeroth K, Zavrski I, Krebbel H, Zang C, Heider U, Jakob C, Elstner E, Possinger K, Sezer O. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induce apoptosis in multiple myeloma. *Anti-Cancer Drugs* 2004, 15:955-960.
52. Eucker J, Sterz J, Krebbel H, Zavrski I, Kaiser M, Zang C, Heider U, Jakob C, Elstner E, Sezer O. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands inhibit proliferation and induce apoptosis in mantle cell lymphoma. *Anti-Cancer Drugs* 2006; 17: 763-769.
53. Eucker J, Possinger K. [Individualized treatment of breast cancer]. *Dtsch Med Wochenschr* 2011; 136:486-491.
54. Evans A, Whelehan P. Breast screening policy: Are we heading in the right direction? *Clin Radiol* 2011; 66:915-919.
55. Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J* 2005; 19:342–353.
56. Feinstein DL, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavrilyuk V, Dello Russo C. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol* 2005; 70:177–188.
57. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The regulation of AMPK  $\beta$ 1, 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 Res* 2007; 67:3043–3053.
58. Fleming GF, Ma CX, Huo D, Sattar H, Tretiakova M, Lin L, Hahn OM, Olopade FO, Nanda R, Hoffman PC, Naughton MJ, Pluard T, Conzen SD, Ellis MJ. Phase II trial of temsirolimus in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, published online 13 Jan 2012.
59. Fury MG, Sherman E, Haque S, Korte S, Lisa D, Shen R, Wu N, Pfister D. A phase I study of daily everolimus plus low-dose weekly cisplatin for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69:591-598.
60. García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menendez-Gutierrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:2172–2181.

61. Ghayad SE, Bieche I, Vendrell JA, Keime C, Lidereau R, Dumontet C, Cohen PA. mTOR inhibition reverses acquired endocrine therapy resistance of breast cancer cells at the cell proliferation and gene-expression levels. *Cancer Sci* 2008; 99:1992-2003.
62. Giordano SH, Buzdar AU, Smith TL, Kau SW, Yang Y, Hortobagyi GN. Is breast cancer survival improving? Trends in survival for patients with recurrent breast cancer diagnosed from 1974 through 2000. *Cancer* 2004; 100:44-52.
63. Glück S: Exemestane as first-line therapy in postmenopausal women with recurrent or metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2010; 33:314-319.
64. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the consensus discussion. *Breast Care* 2011; 6:136-141.
65. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736-1747.
66. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4653-4657.
67. Govindarajan R, Ratnasinghe L, Simmons DL, Siegel ER, Midathada MV, Kim L, Kim PJ, Owens RJ, Lang NP. Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and colon cancer in patients with diabetes. *J Clin Oncol* 2007; 25:1476-1481.
68. Guertin DA, Sabatini DM: Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007; 12:9-22.
69. Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca<sup>2+</sup>/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* 2008; 7:456-465.
70. Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent signal pathways. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:430-437.
71. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
72. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21:333-339.
73. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253:905-909.
74. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, Laurell A, Offner F, Strahs A, Berkenblit A, Hanushevsky O, Clancy J, Hewes B, Moore L, Coiffier B. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27:3822-3829.
75. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009; 69:7507-7511.
76. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas III CF, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8933-8938.
77. Hortobagyi GN, Piccart M, Rugo H, Burris H, Campone M, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Vittori L, Mukhopadhyay P, Sahmoud T, Lebwohl D, Baselga J. Everolimus for postmenopausal women with advanced breast cancer: updated results of the BOLERO-2 phase III trial. *Cancer Res* 2011; 71(24 Suppl.) S.34s.
78. Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 1999; 59:886-894.

79. Huang JW, Shiau CW, Yang YT, Kulp SK, Chen KF, Brueggemeier RW, Shapiro CL, Chen C. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2005; 67:1342–1348.
80. Hudes G, Carducci M, Tomczak P Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma; *N Engl J Med* 2007; 356:2271–2281.
81. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006; 126:955–968.
82. Issemann I, Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347:645-650.
83. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrates hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 1993; 11:37-47.
84. Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, de Vries EG. Metformin: Taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer* 2010; 46:2369-2380.
85. Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, Rosenberg PS. Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis. *J Clin Oncol* 2007; 25:1683-1690.
86. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 102:19–65.
87. Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:3297–3302.
88. Jundt F, Raetzl N, Müller C, Calkhoven CF, Kley K, Mathas S, Lietz A, Leutz A, Dörken B. A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein  $\beta$  and NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 2005; 106:1801-1807.
89. Karapetis CS, Patterson WK, Pittman KB, Kotasek D, Sage RE: Treatment of metastatic breast cancer with continuous infusional 5 fluorouracil. *Aust N Z J Med* 1999; 29:517–522.
90. Keefe DMK, Bateman EH. Tumor control versus adverse events with targeted anticancer therapies. *Nature Rev Clin Oncol* 2012; 9: 98-109.
91. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; 28:3271-3277.
92. Kilgore MW, Tate PL, Pai S, Sengoku E, Price TM. MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 129:229–235.
93. Kim KY, Kim SS, Cheon HG. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:530-540.
94. Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1–9.
95. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol. Res* 2005; 51: 85–94.
96. Kris MG, Benowitz SI, Adams S, Diller L, Ganz P, Kahlenberg MS, Le QT, Markman M, Masters GA, Newman L, Obel JC, Seidman AD, Smith SM, Vogelzang N, Petrelli NJ. Clinical cancer advances 2010: annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2010; 28:5327-5347.



97. Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, Grillier-Vuissoz I. Disruption of ER $\alpha$  signalling pathway by PPAR $\gamma$  agonists: evidences of PPAR $\gamma$ -independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112:437–51.
98. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). *J Biol Chem* 1995; 270:12953–12956.
99. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from major cancers in the European Union, including acceding countries, in 2004. *Cancer* 2004; 101:2843-2849.
100. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1620-1625.
101. Liou KT, Shen YC, Chen CF, Tsao CM, Tsai SK. The anti-inflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production. *Eur J Pharmacol* 2003; 475:19–27.
102. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, Thor AD. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 2009; 8:2031–2040.
103. Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. PPAR  $\gamma$  ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79:63–74.
104. Lopez-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar EK, Qiu MR, Crea P, Daly RJ, Musgrove EA, Sutherland RL. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* 2010; 126:1121–1131.
105. Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY. Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 549–553.
106. Lu CH, Wyszomierski SL, Tseng LM, Sun MH, Lan KH, Neal CL, Mills GB, Hortobagyi GN, Esteva FJ, Yu D. Preclinical testing of clinically applicable strategies for overcoming trastuzumab resistance caused by PTEN deficiency. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5883-5888.
107. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121:179–193.
108. Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, Hoelzle MK, Hensley HH, Hamilton TC, Testa JR. RAD001 (Everolimus) Delays Tumor Onset and Progression in a Transgenic Mouse Model of Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2007; 67:2408-2413.
109. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA, Sellers WR. MTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004; 10:594-601.
110. Malki A and Youssef A: Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res* 2011; 19:275-285.
111. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* 2012; 23:1044-1052.
112. Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M, Bruns CJ: Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:892-900.
113. Mariotto A, Feuer EJ, Harlan LC, Wun LM, Johnson KA, Abrams J. Trends in use of adjuvant multi-agent chemotherapy and tamoxifen for breast cancer in the United States: 1975-1999. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1626- 1634.

114. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Antón A, Lluch A, Kennedy J, O'Byrne K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005; 23:4265-4274.
115. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4451-4461.
116. Miller TW, Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, Garcia-Echeverria C, Shyr Y, Arteaga CL: Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest* 2010; 120:2406-2413.
117. Miller TW, Perez-Torres M, Narasanna A, Guix M, Stål O, Pérez-Tenorio G, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB, Kennedy JP, Lindsley CW, Arteaga CL: Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69:4192-4201.
118. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL: Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011; 13:224.
119. Milton DT, Riely GJ, Azzoli CG, Gomez JE, Heelan RT, Kris MG, Krug LM, Pao W, Pizzo B, Rizvi NA, Miller VA. Phase 1 trial of everolimus and gefitinib in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2007; 110:599-605.
120. Mondesire WH, Jian W, Zhang H, Ensor J, Hung MC, Mills GB, Meric-Bernstam F. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7031–7042.
121. Morrow PK, Wulf GM, Ensor J, Booser DJ, Moore JA, Flores PR, Xiong Y, Zhang S, Krop IE, Winer EP, Kindelberger DW, Coviello J, Sahin AA, Nuñez R, Hortobagyi GN, Yu D, Esteva FJ. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol* 2011; 29:3126-3132.
122. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A, for the RECORD-1 Study Group: Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008; 372:449-456.
123. Mouridsen HT: Letrozole in advanced breast cancer: the PO25 trial. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 105:19–29.
124. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR  $\gamma$ . *Mol Cell* 1998;1:465–470.
125. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998; 273:3963–3966.
126. Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong JJ, Mills GB, Hung, MC, Meric-Bernstam F. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1013–1023.
127. Noh WC, Kim YH, Kim MS, Koh JS, Kim HA, Moon NM, Paik NS: Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 110:477–483.
128. Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7:e33411.

129. O'Brien MER, Talbot DC, Smith IE. Carboplatin in the treatment of advanced breast cancer: a phase II study using a pharmacokinetically guided dose schedule. *J Clin Oncol* 1993; 11:2112-2117.
130. O'Donnell A, Faivre S, Burris HA 3rd, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, Lane HA, Hazell K, Zoellner U, Kovarik JM, Brock C, Jones S, Raymond E, Judson. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26:1588-1595.
131. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006; 66:1500–1508.
132. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub JP, Cervantes G, Fumoleau P, Jones S, Lui WY, Mauriac L, Twelves C, Van Hazel G, Verma S, Leonard R. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002; 20:2812-2823.
133. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:205-214.
134. Panigrahy D, Singer S, Shen L, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A: PPAR  $\gamma$  ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110:923-932.
135. Papaldo P, Fabi A, Ferretti G, Mottolese M, Cianciulli AM, Di Cocco B, Pino MS, Carlini P, Di Cosimo S, Sacchi I, Sperduti I, Nardoni C, Cognetti F. A phase II study on metastatic breast cancer patients treated with weekly vinorelbine with or without trastuzumab according to HER2 expression: changing the natural history of HER2-positive disease. *Ann Oncol* 2006; 17: 630–636.
136. Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7:455-465.
137. Patel L, Pass I, Coxon P, Downes CP, Smith SA, Macphee CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR $\gamma$  agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol* 2001; 11:764-768.
138. Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Öberg K, Cutsem EV, Yao JC, for the RADIANT-2 Study Group: Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2011; 378:2006-2012.
139. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406, 747-752
140. Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER $\alpha$  negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113:101–111.
141. Pignatelli M, Cortés-Canteli M, Lai C, Santos A, Perez-Castillo A. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J Cell Sci* 2001, 114:4117-4126.
142. Punt CJA, Boni J, Brunsch U, Peters M, Thielert M. Phase I and pharmacokinetic study of CCI-779, a novel cytostatic cell-cycle inhibitor, in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2003; 14:931–937.
143. Qin C, Burghardt R, Smith R, Wormke M, Stewart J, Safe S: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and oestrogen receptor- $\alpha$  in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63:958-964.
144. Ravdin PM, Cronin KA, Howlander N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards PK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356:1670-1674.

145. Regazzoni S, Pesce G, Marini G, Cavalli F, Goldhirsch A: Low-dose continuous intravenous infusion of 5-fluorouracil for metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 1996; 7:807–813.
146. Robbin AS, Clarke CA. Regional changes in hormone therapy use and breast cancer incidence in California from 2001 to 2004. *J Clin Oncol* 2007; 25:3437-3439.
147. Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Illegbodun D, Loesch D, Raju R, Valentine E, Sayre R, Cobleigh M, Albain K, McCullough C, Fuchs L, Slamon D. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2–overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:2786-2792.
148. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Berlin, 2012; 8. Ausgabe: 64-67.
149. Robertson JFR, Llombart-Cussac A, Rolski J, Feltl D, Dewar J, Macpherson E, Lindemann J, Ellis MJ. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study. *J Clin Oncol* 2009; 27:4530-4535.
150. Saad ED, Katz A, Buyse M. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer: a review of recent randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2010; 28:1958-1962
151. Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, Koujak S, Ferrando AA, Malmstrom P, Memeo L, Isola J, Bendahl PO, Rosen N, Hibshoosh H, Ringner M, Borg A, Parsons R. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:7564-7569.
152. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008; 133:403–414.
153. Sarkaria JN, Schwingler P, Schild SE, Grogan PT, Mladek AC, Mandrekar SM, Tan AD, Kobayashi T, Marks RS, Kita H, Miller RC, Limper AH, Leof EB. Phase I trial of sirolimus combined with radiation and cisplatin in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2:751-757.
154. Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T1, Rumi MAK, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR $\gamma$  agonists. *Br J Cancer* 2002; 83:1394–1400.
155. Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol* 1992; 6:1634-1641.
156. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; 15:5336–5348.
157. Schreiber SL: Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; 251:283-287.
158. Seidman AD, Brufsky A, Ansari RH, Hart LL, Stein RS, Schwartzberg LS, Stewart JF, Russell CA, Chen SC, Fein LE, De La Cruz Vargas JA, Kim SB, Cavalheiro J, Zhao L, Gill JF, Obasaju CK, Orlando M, Tai DF. Phase III trial of gemcitabine plus docetaxel versus capecitabine plus docetaxel with planned crossover to the alternate single agent in metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22:1094-1101.
159. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC: The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310:1642-1646.
160. Shiao CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW, Chen CS. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPAR $\gamma$ . *Cancer Res* 2005; 65:1561–1569.
161. Siddik Z. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265–7279.

162. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J. Breast Cancer International Research Group: Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 365:1273-1283.
163. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-792.
164. Smith BD, Jiang J, McLaughlin SS, Hurria A, Smith GL, Giordano SH, Buchholz TA. Improvement in breast cancer outcomes over time: are older women missing out? *J Clin Oncol* 2011; 29:4647-4653.
165. Smith MR, Kantoff PW. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) as a novel target for prostate cancer. *Invest New Drug* 2002; 20:195–200.
166. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869–10874.
167. Sparano JA, Makhson AN, Semiglazov VF, Tjulandin SA, Balashova OI, Bondarenko IN, Bogdanova NV, Manikhas GM, Oliynychenko GP, Chatikhine VA, Zhuang SH, Xiu L, Yuan Z, Rackoff WR. Pegylated liposomal doxorubicin plus docetaxel significantly improves time to progression without additive cardiotoxicity compared with docetaxel monotherapy in patients with advanced breast cancer previously treated with neoadjuvant-adjuvant anthracycline therapy: results from a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2009; 27:4522-4529.
168. Steelman LS, Navolanic PM, Sokolosky ML, Taylor JR, Lehmann BD, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Stadelman KM, Terrian DM, Leslie NR, Martelli AM, Stivala F, Libra M, Franklin RA, McCubrey JA. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. *Oncogene* 2008; 27:4086–4095.
169. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2007; 28:551–558.
170. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebowitz D, Baselga J. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26:1603-1610.
171. Tanaka H, Fujita N, Tsuruo T. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1- mediated I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (I $\kappa$ B) phosphorylation activates NF- $\kappa$ B signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:40965–40973.
172. Tanaka C, O'Reilly T, Kovarik JM, Shand N, Hazell K, Judson I, Raymond E, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Boulay A, Hattenberger M, Thomas G, Lane HA. Identifying optimal biologic doses of everolimus (RAD001) in patients with cancer based on the modeling of preclinical and clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Clin Oncol* 2008; 26:1596-1602.
173. Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J* 2003; 376:577–586.
174. Thomas GV, Tran C, Mellinger IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B, Czernin J, Sawyers CL. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nature Med* 2006; 12:122–127.
175. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DT, Gray NS. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009; 284:8023–8032.

176. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelmann BM. mPPAR  $\gamma$  2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994; 8:1224-1234.
177. Towler MC and Hardie DG: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007; 100:328-341.
178. Tugwood JD, Isssemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992; 11:433-439.
179. Valero V, Forbes J, Pegram MD, Pienkowski T, Eiermann W, von Minckwitz G, Roche H, Martin M, Crown J, Mackey JR, Fumoleau P, Rolski J, Mrcic-Krmpotic Z, Jagiello-Gruszfeld A, Riva A, Buyse M, Taupin H, Sauter G, Press MF, Slamon DJ. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens. *J Clin Oncol* 2011; 29:149-156.
180. van den Hurk CJG, Eckel R, van de Poll-Franse LV, Coebergh JWW, Nortier JWR, Hölzel D, Breed WPM, Engel J. Unfavourable pattern of metastases in M0 breast cancer patients during 1978-2008: a population-based analysis of the Munich Cancer Registry. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128:795-805.
181. Wang C, Fu M, D'Amico M, Albanese C, Zhou JN, Brownlee M, Lisanti MP, Chatterjee VK, Lazar MA, Pestell RG. Inhibition of cellular proliferation through I $\kappa$ B kinase-independent and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -dependent repression of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2001; 21:3057-3070.
182. Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK, Chen CS. PPAR $\gamma$ -independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 2009; 276:119-124.
183. White EJ, Martin V, Liu JL, Klein SR, Piya S, Gomez-Manzano C, Fueyo J, and Jiang H: Autophagy regulation in cancer development and therapy. *Am J Cancer Res* 2011; 1:362-372.
184. Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *Breast* 2009; 18: S3, 56-58 .
185. Xu B, Guan Z, Shen Z, Tong Z, Juang Z, Yang J, DeSilvio M, Leigh M, Ellis C: Association of PTEN loss and PIK3CA mutations on outcome in HER2 metastatic breast cancer patients treated with first-line lapatinib plus paclitaxel or paclitaxel alone. San Antonio Breast Cancer Symposium 2011. *Cancer Res* 2011; 71(24 Suppl.): 34s.
186. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 1999; 3:397-403.
187. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL, Oplinger JA, Kliewer SA, Gampe RT Jr, McKee DD, Moore JT, Willson TM. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13919-13924.
188. Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Balasenthil S, Hortobagyi G, Sahin AA, Barnes CJ, Kumar R. HER2 regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) expression and sensitivity of breast cancer cells to PPAR- $\gamma$  ligand therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3198-3203.
189. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364:514-523.
190. Yee LD, Guo Y, Bradbury J, Suster S, Clinton SK, Seewaldt VL. The antiproliferative effects of PPAR- $\gamma$  ligands in normal human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78:179-192.
191. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, Thomas D, Wierda W, Apostolidou E, Albitar M, O'Brien S, Andreeff M, Giles FJ. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin

- inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5165-5173.
192. Yin F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR, Van Herle AJ, Law RE. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:916-922.
193. Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol* 2011; 164:68–82.
194. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27:5497–5510.
195. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66:10269–10273.
196. Zang C, Liu H, Posch MG, Waechter M, Facklam M, Fenner MH, Ruthardt M, Possinger K, Koeffler PH, Elstner E. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28:387–397.
197. Zeng Z, Sarbassov DD, Samudio IJ, Yee KWL, Munsell MF, Jackson CE, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M: Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 2007; 109: 8:3509-3512.
198. Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, Wang H, Moseman AP, Dabora SL, Griffin JD, Kwiatkowski DJ. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J Clin Invest* 2007; 117:730–738.
199. Zhang X, Chen S, Wang Y. Honokiol up-regulates prostacyclin synthase protein expression and inhibits endothelial cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2007; 554:1–7.
200. Zhang ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao E, Kip KE. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2011; 34:2323–2328.
201. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:21-35.

## **7 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Kurt Possinger danke ich in besonderer Weise für die langjährige, von großer Menschlichkeit geprägte klinische und wissenschaftliche Zusammenarbeit, und nicht zuletzt für die Möglichkeit eine wissenschaftliche Arbeitsgruppe zu leiten und für die vielen fundierten und kritischen Anregungen.

Ich danke Frau Dr. Hongyu Liu und Herrn Dr. Chuanbing Zang für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, ohne deren langjährige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Dr. Carsten-Oliver Schulz danke ich für seine stets von regem Geist geprägte fachliche und menschliche Unterstützung in der wissenschaftlichen und klinischen Zusammenarbeit.

Frau Dr. Anne Constanze Regierer, Frau Dr. Dagmar Kühnhardt und Frau Dr. Marleen Rosche danke ich für die ausdauernde Unterstützung und Kooperation bei der Durchführung klinischer, wissenschaftlicher Projekte.



## Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum/Unterschrift