

Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Johannes Dietl

**Untersuchung des Glukosestoffwechsels beim
Mammakarzinom anhand der Glykolysemarker
Tumor-M2-Pyruvatkinase und phosphoryliertes Akt**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Carina Benesch
aus Würth am Main

Würzburg, Oktober 2010

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Melanie Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2011

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie für Deutschland.....	1
1.1.2	Therapie	2
1.2	Besonderheiten des Krebsstoffwechsels.....	3
1.2.1	Überblick.....	3
1.2.2	M2-Pyruvat-Kinase (M2-PK)	8
1.2.3	Phosphoryliertes Akt (pAkt).....	11
1.3	Fragestellung	16
2	Material und Methode.....	18
2.1	Patientengut.....	18
2.2	Immunhistochemische Färbung	21
2.2.1	Materialliste	21
2.2.2	Färbeprotokolle für die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tumor-M2-PK und pAkt.....	22
2.3	Bestimmung des immunreaktiven Scores für Tumor-M2-PK und pAkt	23
2.4	Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Charakteristika des Kollektivs	28
3.2	Kaplan-Meier-Analysen.....	29
3.3	Vergleich der Expression von M2-PK und pAkt.....	38
3.4	Vergleich verschiedener Parameter mit M2-PK-Expression.....	39
3.5	Vergleich verschiedener Parameter mit pAkt-Expression	42
3.6	Cox-Regressionsanalyse.....	44

4	Diskussion	45
4.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	45
4.2	Diskussion der Kaplan-Meier-Analysen und Cox-Regression	49
4.3	Die prognostische Bedeutung der M2-PK-Expression.....	52
4.4	Die prognostische Bedeutung der pAkt-Expression.....	56
4.5	Ausblick.....	60
5	Zusammenfassung.....	63
6	Literaturverzeichnis	66

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Überblick über Stoffwechselveränderungen durch pAkt und Tumor-M2-PK.....	5
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade zur Akt-Aktivierung	12
Abb. 3: Übersicht über die Stoffwechsell Aufgaben von pAkt.....	13
Abb. 4: Altersverteilung im Patientenkollektiv	18
Abb. 5: Charakteristika des Patientenkollektivs	20
Abb. 6: Übersicht zur Errechnung der IRS.....	24
Abb. 7: Mammakarzinomgewebe bei 250-facher Vergrößerung	24
7a: pAkt-Färbung der Mammakarzinomzellen	
7b: M2-PK-Färbung der Mammakarzinomzellen	
Abb. 8: Mammakarzinomgewebe bei 250-facher Vergrößerung	25
8a: schwache Intensität der M2-PK-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
8b: schwache Intensität der pAkt-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
8c: mittlere Intensität der M2-PK-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
8d: mittlere Intensität der pAkt-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
8e: starke Intensität der M2-PK-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
8f: starke Intensität der pAkt-Färbung in Mammakarzinomgewebe	
Abb. 9: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für M2-PK und pAkt.....	28
Abb. 10: Verteilung der Überlebenszeiten im Patientenkollektiv	29
Abb. 11: Gesamtmortalität im Zeitverlauf.....	30
Abb. 12: Übersicht über die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen.....	31
Abb. 13: Mortalität in Abhängigkeit vom Nodalstatus.....	32
Abb. 14: Mortalität in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus.....	33
Abb. 15: Mortalität in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus	34
Abb. 16: Mortalität in Abhängigkeit vom Auftreten eines Rezidivs.....	35
Abb. 17: Mortalität in Abhängigkeit vom Auftreten von Metastasen	36
Abb. 18: Mortalität in Abhängigkeit vom M2-PK/cut-off.....	37
Abb. 19: Mortalität in Abhängigkeit vom pAkt/cut-off	38
Abb. 20: Signifikanzniveaus beim Vergleich der M2-PK-Expression mit den Patientendaten ...	39
Abb. 21: Unterschiede des M2-PK/IRS bei Überlebenden und Verstorbenen	40
Abb. 22: Unterschiede des M2-PK/cut-off bei Überlebenden und Verstorbenen	41
Abb. 23: Signifikanzniveaus beim Vergleich der pAkt-Expression mit den Patientendaten	42
Abb. 24: Unterschiede des pAkt/cut-off in Abhängigkeit vom Alter.....	43

Abkürzungsverzeichnis:

a	Jahre
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
CI	95%-Konfidenzintervall
DAB	Diamino-Benzidin
ER	Östrogenrezeptor
¹⁸ F-DG-PET	¹⁸ Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
GDP	Guanidindiphosphat
GEKID	Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland e. V.
GLUT	Glukosetransporter
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase-3β
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER-2	“human epidermal growth factor receptor 2”
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase
IRS	Immunreaktiver Score
LSAB2 [®]	Labeled Streptavidin-Biotin2
M2-PK	M2-Pyruvatkinase, Tumor-M2-Pyruvatkinase
n	Anzahl der Proben bzw. Patienten
ns	nicht signifikant
NaOH	Natronlauge
NMR	Kernspinresonanztomographie
p	Signifikanzniveau
pAkt	phosphoryliertes Akt, aktiviertes Akt, aktivierte Proteinkinase B
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PEP	Phosphoenolpyruvat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PK	Pyruvatkinase
PR	Progesteronrezeptor
RKI	Robert Koch-Institut
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	signifikant
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie für Deutschland

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland und weltweit. Die Dachdokumentation Krebs des Robert Koch-Instituts und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. schätzte die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2004 auf 57.000, das bedeutet eine Inzidenz von 135,8/100.000 Frauen. Insgesamt beträgt die Lebenszeitprävalenz für deutsche Frauen 9,2%, das heißt, jede 11. Frau erkrankt im Lauf ihres Lebens an Brustkrebs (Schön et al. 2004).

Die Mortalitätsrate lag 2004 bei 41,7/100.000 Einwohnerinnen (Batzler et al. 2008), so dass Brustkrebs bei Frauen mit 18,0% gemäß Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes unter den Krebsmortalitäten ebenfalls führend ist. Laut saarländischem Krebsregister betrug die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit unter den zwischen 1990 und 1994 neu-diagnostizierten Erkrankten 78,0% (Schön et al. 2004). Derzeit beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate ca. 81,0% (Batzler et al. 2008). Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen ist die Prognose des Mammakarzinoms günstig.

In den letzten 30 Jahren haben sich die Überlebensaussichten erheblich verbessert (Giersiepen et al. 2005). Dieser Fortschritt ist unter anderem auf bessere Screening- und Therapiemethoden zurückzuführen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei vor allem die Mammographie, die 1990 als neues Früherkennungsverfahren eingeführt wurde. Dies hat dazu geführt, dass die Karzinome in früheren Stadien entdeckt und damit besser behandelt werden können.

Der häufigste invasive maligne Brusttumor ist das duktales Mammakarzinom, an zweiter Stelle steht das lobuläre Mammakarzinom. Neben den invasiven Karzinomen gibt es die nichtinvasiven Vorstufen duktales sowie lobuläres Carcinoma in situ. Nichtinvasive Vorstufen und gutartige Mammatumoren wie

zum Beispiel Fibroadenome, Zysten oder Lipome kommen insgesamt häufiger vor als das maligne Mammakarzinom.

Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome wird anhand der TNM-Klassifikation vorgenommen, wobei T die Größenausdehnung des Primärtumors beschreibt. N entspricht dem Lymphknotenstatus und gibt die Ausbreitung des Karzinoms in die lokalen Lymphknoten von Brust und Axilla an. Das M steht für das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Als etablierte Prognosefaktoren werden neben Lymphknotenbefall, Größe des Tumors und Alter der Patienten unter anderem die durch immunhistochemische Analysen bestimmte Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie HER-2/neu im Tumorgewebe herangezogen (Giersiepen et al. 2005).

Trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie ist die Heilung noch nicht für alle Patientinnen möglich. Warum manche Patientinnen durch die lokale Tumorexzision geheilt werden können und andere nicht bleibt unklar. Das zeigt, dass die heute eingesetzten Prognosefaktoren und Behandlungsmethoden noch unzureichend sind. Es bedarf der weiteren Forschung, um Zielmoleküle, die als spezifische Angriffspunkte für die Behandlung dienen können, zu finden. Solche Schlüsselfaktoren werden auch im Zellstoffwechsel, insbesondere im Glukosestoffwechsel von Tumorzellen vermutet.

1.1.2 Therapie

Die interdisziplinäre S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Deutschen Gesellschaft für Senologie beinhaltet sowohl die lokalen Therapiemethoden, die die operative Tumorexzision und die Radiatio umfassen, als auch verschiedene systemische Therapieansätze, von denen die Chemo- und Hormontherapie am wichtigsten sind (Kreienberg et al. 2008). Die operative Tumorentfernung hat zentrale Bedeutung und bis auf wenige Ausnahmen ist die brusterhaltende Operation heute die Methode der Wahl, die bei 70,0-80,0% der Patientinnen durchgeführt wird. Lediglich bei großen multizentrischen Tumoren, dem inflammatorischen Mammakarzinom oder ungünstigem Brust-Tumor-Verhältnis muss die Mastektomie erfolgen (Giersiepen et al. 2005). Zusätzlich zur operativen Entfernung des Tumors im Gesunden ist häufig die Lymphknotenentfernung aus der Axilla der betroffenen

Seite erforderlich. Gerechtfertigt wird die Axilladisektion durch die dadurch erzielte Verminderung des Rezidivrisikos sowie die Möglichkeit zur exakten Bestimmung des Erkrankungsstadiums (Giersiepen et al. 2005). Seit einigen Jahren kommt die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie zum Einsatz (Tanis et al. 2001). Dieses Verfahren bietet bei minimaler Komplikationsrate die Möglichkeit abzuklären, welche Patientinnen von der Axilladisektion profitieren (Hsueh et al. 1998). Ist der Wächterlymphknoten tumorfrei, kann heute auf die Axilladisektion verzichtet werden. Durch dieses Vorgehen wird eine Verbesserung der Lebensqualität durch den Erhalt des Lymphabflussgebietes des Armes erreicht (Veronesi et al. 2003, Krag und Ashikaga 2003). Im Anschluss an die brusterhaltende Operation erfolgt standardmäßig eine Nachbestrahlung. Durch die Radiatio sollen eventuell im Brustgewebe verbliebene mikroskopisch kleine Tumorreste vollständig eliminiert werden, um das Risiko eines Lokalrezidivs auf ein Minimum zu reduzieren. In Abhängigkeit von Stadium und Malignitätsgrad werden postoperativ bei den meisten Patientinnen adjuvante systemische Therapieverfahren angewendet, um okkulte Mikrometastasen zu vernichten.

Die aktuellen Empfehlungen zur hormonellen und chemotherapeutischen Nachbehandlung können der aktuellen S3-Leitlinie entnommen werden (Kreienberg et al. 2008).

1.2 Besonderheiten des Krebsstoffwechsels

1.2.1 Überblick

Während der Entstehung von Krebs kommt es zu zahlreichen Veränderungen im Zellstoffwechsel. Tumorzellen besitzen im Vergleich zu gesunden Zellen einen abgewandelten Stoffwechsel, der für sie charakteristisch ist. Die Modifikationen umfassen den Erwerb von Zellautonomie bezüglich Wachstum und Proliferation, sowie die Erlangung von Apoptoseresistenz und Immortalität. Weitere Besonderheiten sind die Fähigkeiten der Angiogeneese, sowie Gewebeanvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000).

Von vielen Krebszeleigenschaften wird angenommen, dass sie von der

Enthemmung verschiedenster Stoffwechselschritte herrühren, die in gesunden Zellen normalerweise strikt geregelt werden (Elstrom et al. 2004). Es konnten bereits verschiedene Onkogene und Tumorsuppressoren klassifiziert werden, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der karzinomzellspezifischen Eigenarten spielen (Hahn und Weinberg 2002). Die oben beschriebenen Charakteristika sind also das Ergebnis zahlreicher, grundlegender Veränderungen im Zellstoffwechsel. Diese sind sehr komplex und können bis heute nicht restlos erklärt werden. Die vorliegende Studie beschränkt sich daher auf einige Abwandlungen, die bei Krebszellen im Kohlenhydratstoffwechsel beobachtet werden können. Besonderer Augenschein wird im Rahmen dieser Arbeit auf ein Enzym der Glykolyse und ein Onkoprotein gelegt, das ebenfalls eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel von Karzinomzellen spielt. Bei dem Enzym handelt es sich um ein Schlüsselenzym der Glykolyse, die Pyruvatkinase. Insbesondere das Isoenzym M2-Pyruvatkinase, das in Tumorzellen durch Interaktion mit Onkogenen primär als Dimer vorliegt (Presek et al. 1988, Mazurek et al. 2003), wird hier näher betrachtet. Zu den Onkoproteinen, die das Zellüberleben regeln, zählt die Serin-Threonin-Kinase Akt (Dudek et al. 1997). Die Bedeutung der phosphorylierten Akt, also der aktiven Form der Proteinkinase (Vivanco und Sawyers 2002), wird genauer untersucht. Abb. 1 bietet einen Überblick über die metabolischen Veränderungen, die sich durch das Vorhandensein von M2-PK in der dimerisierten Form und pAkt für den Zellstoffwechsel ergeben. Insbesondere die veränderte Glykolyse und deren Interaktion mit dem Pentosephosphatzyklus werden dargestellt.

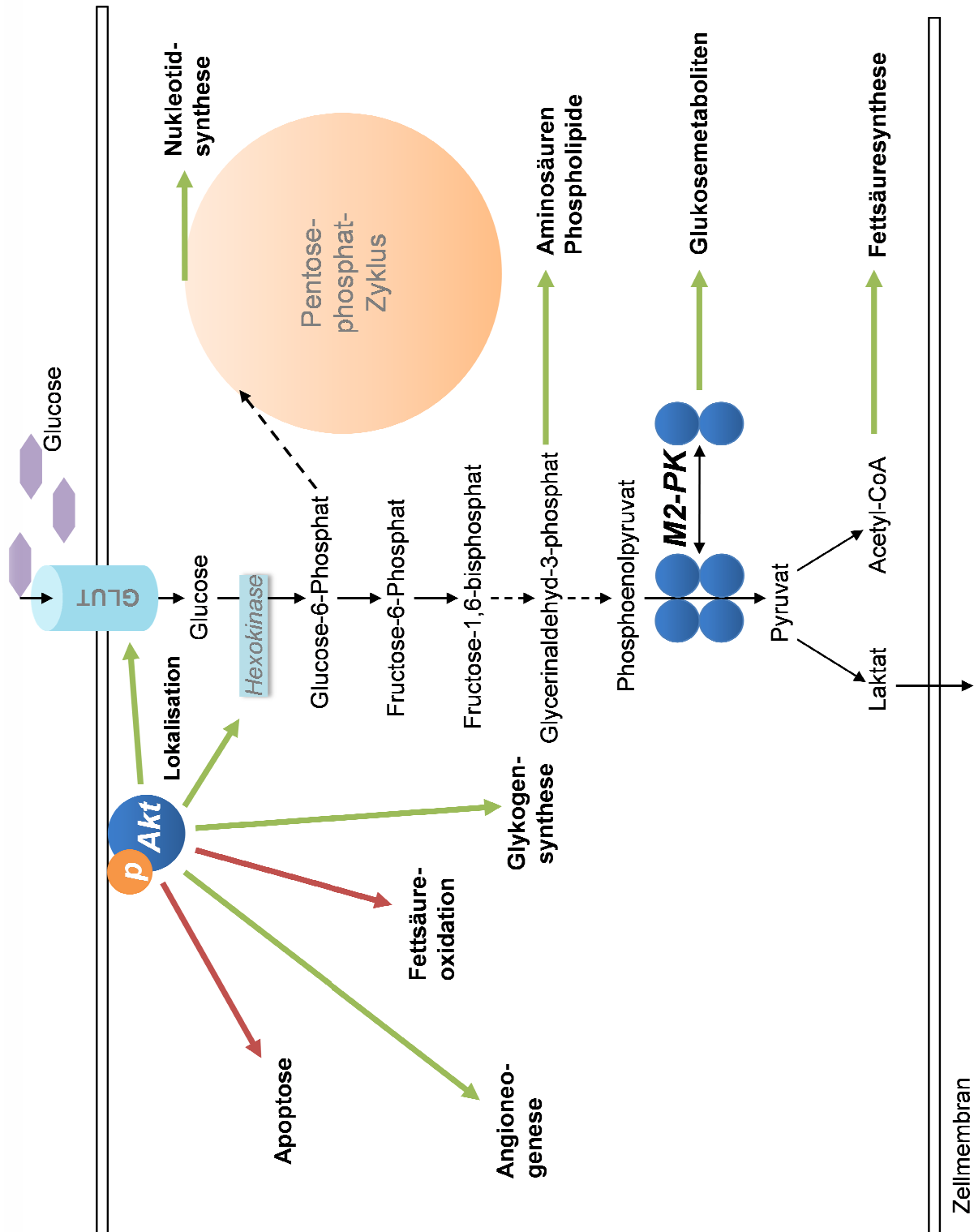


Abb. 1: Überblick über Stoffwechselveränderungen durch pAkt und Tumor-M2-PK. Die schwarzen durchgezogenen Pfeile stellen jeweils einzelne Reaktionsschritte der Glykolyse dar. Unterbrochene schwarze Pfeile bedeuten, dass hier Einzelreaktionen zwischen den Stoffwechselschritten übersprungen werden. Die grünen Pfeile stehen für eine Unterstützung und die roten für eine Hemmung des jeweiligen Stoffwechselwegs.

Das Vorhandensein des aktiven Onkoproteins pAkt führt zum Einbau des Glukosetransporters GLUT 1 in die Zellmembran, so dass Glukose zur weiteren Verstoffwechslung in die Zelle hinein transportiert werden kann (Barnes et al. 2005). Zusätzlich wird die Hexokinase aktiviert (Majewski et al. 2004a). Phosphoryliertes Akt fördert die Glykogensynthese (Cross et al. 1995) und die Angiogeneese (Linderholm et al. 2003, Xia et al. 2006) in Krebszellen und wirkt sich hemmend auf die β -Oxidation der Fettsäuren (Buzzai et al. 2005) und die Apoptose (Pastorino et al. 2002, Rathmell et al. 2003, Majewski et al. 2004a) aus.

Die Glykolyse läuft in Tumorzellen im Wesentlichen bis zum Phosphoenolpyruvat, dem Substrat der Pyruvatkinase, genauso ab wie in gesunden Zellen. Unter physiologischen Bedingungen wird Phosphoenolpyruvat mit Hilfe der Pyruvatkinase in Pyruvat umgewandelt und anschließend über Acetyl-Coenzym A in den Citrat-Zyklus und die Atmungskette eingeschleust. Hierbei können insgesamt 36 Moleküle ATP aus einem Molekül Glukose gewonnen werden (Young und Anderson 2008). Das Vorliegen der M2-PK in der tumorspezifischen dimerisierten Form führt zur Erniedrigung deren Affinität für ihr Substrat Phosphoenolpyruvat. Durch die Blockierung der Glykolyse kommt es zur Akkumulation von Stoffwechselzwischenprodukten, die den malignen Zellen dann für die Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Phospholipiden zur Verfügung stehen (Eigenbrodt et al. 1992, Mazurek et al. 1997, Mazurek und Eigenbrodt 2003). In geringerem Maß liegt die M2-PK auch in Tumorgewebe als Tetramer vor und katalysiert so die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat. Hieraus kann dann das für die Fettsäuresynthese erforderliche Acetyl-CoA gebildet werden (Mazurek et al. 2005).

Die beschriebenen metabolischen Veränderungen wurden übereinstimmend in Karzinomzellen unterschiedlichster Gewebeherkunft gefunden (Semenza et al. 2001). Die Abhängigkeit von Glukose und der damit verbundene erhöhte Glukosestoffwechsel sind bereits von verschiedenen Krebsarten bekannt. Diese Eigenschaft wurde beispielsweise für Kolonkarzinome (Mazurek et al. 2000), Ovarialkarzinome (Krockenberger et al. 2007) und Granulosazelltumoren des

Ovars (Schmidt et al. 2008) beschrieben. Im Gegensatz zu normal proliferierenden Zellen überleben maligne Zellen auch bei wechselndem Sauerstoffangebot und sind auf ständige Versorgung mit Energie und Bausteinen für Syntheseprozesse angewiesen (zusammengefasst in Pelicano et al. 2006b). Bereits vor über 80 Jahren postulierte *Otto Warburg*, dass Krebszellen ihren Stoffwechsel weg von Respiration via Atmungskette hin zur Glykolyse verändern (Warburg 1924). Demnach nutzen maligne Zellen auch bei Anwesenheit von Sauerstoff überwiegend die Glykolyse zur ATP-Gewinnung und weisen hohe Laktat Spiegel auf. Diese Beobachtung legte für *Warburg* die Annahme nahe, dass Tumorzellen mitochondriale Defekte aufweisen, die letztendlich zu dieser sogenannten aeroben Glykolyse führen (Warburg 1930). Mittlerweile ist bei an einem Tumor erkrankten Mäusen der Nachweis gelungen, dass die Cardiolipin-Struktur der Mitochondrien sich tatsächlich von der gesunder Tiere unterscheidet. Dieser Befund kann als ein Hinweis auf die Gültigkeit der *Warburg*-Hypothese gesehen werden (Kiebish et al. 2008). In normalen Zellen hemmt die Anwesenheit von Sauerstoff die Glykolyse, was als Pasteureffekt bezeichnet wird (Pasteur 1861).

Das Phänomen der aeroben Glykolyse bei Tumorzellen wurde wiederholt beschrieben (Dang und Semenza 1999) aber die zugrunde liegenden Mechanismen und die Möglichkeiten für therapeutische Ansätze wurden erst vor kurzem entdeckt (zusammengefasst in Pelicano et al. 2006b). Eine entscheidende Rolle in der Erforschung des Zuckerstoffwechsels von Zellen spielt die Entwicklung von bildgebenden Verfahren, die die Stoffwechselaktivität darstellbar machten. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie wurde es möglich, die Hypothesen zum Glukosestoffwechsel neu zu bewerten. Bei der ^{18}F -FDG-PET wird den Patienten das radioaktiv markierte Glukoseanalogon ^{18}F -Fluordesoxyglukose injiziert. Dieses wird von Zellen wie Glukose aufgenommen, obwohl an einer Stelle des Moleküls eine Hydroxylgruppe durch das Radionuklid ^{18}F ersetzt ist. Da FDG-6-phosphat nach der Phosphorylierung nicht weiter verstoffwechselt wird, findet eine Anreicherung dieses Metaboliten statt. Die Verteilung von FDG im Körper erlaubt somit Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel verschiedener Gewebe und kann insbesondere auch

kleinere Tumoren und Metastasen sichtbar machen. Heute findet die ^{18}F -FDG-PET klinische Anwendung zur Detektion der aeroben Glykolyse in vielen Tumorarten und hat dadurch auch das Interesse an *Otto Warburgs* Theorie wiedererweckt (Hawkins und Hoh 1994, Avril et al. 2001, Gambhir 2002). Es konnte zum Beispiel anhand eines Karzinomzellmodells gezeigt werden, dass Glukoseentzug in entarteten Zellen die Glykolyse blockiert und letztendlich zur Apoptose führt, während es in nichtmalignen Zellen lediglich zu einem Stillstand des Zellzyklus kommt (Shim et al. 1998). Die Abhängigkeit maligner Zellen von der aeroben Glykolyse und deren fast gänzliche Unabhängigkeit von der mitochondrialen ATP-Produktion wurden auch von *Ramanathan* nachgewiesen (Ramanathan et al. 2005).

Der beschriebene Phänotyp von Karzinomzellen ist für die Energiegewinnung stark vom Vorhandensein von Glukose abhängig (Warburg 1924, Elstrom et al. 2004), so dass sich hier Ansatzpunkte für zukünftige Therapien und Prognosefaktoren bieten (zusammengefasst in Pelicano et al. 2006b).

1.2.2 M2-Pyruvat-Kinase (M2-PK)

Intensive Forschungen zu den Veränderungen, die im Kohlenhydratstoffwechsel während der Karzinogenese auftreten, zeigten, dass die Veränderung der Isoenzymzusammensetzung und die Hochregulation von Glykolyseenzymen die entscheidenden Schritte in der alterierten Glykolyse von Krebszellen sind (Reinacher und Eigenbrodt 1981, Eigenbrodt et al. 1985, Staal und Rijksen 1991, Eigenbrodt et al. 1992, Guminska et al. 1997).

Für den Ablauf der Glykolyse ausschlaggebend ist das Schlüsselenzym Pyruvatkinase (PK) (Mazurek et al. 2005). Von diesem Enzym existieren unterschiedliche gewebespezifische Isoenzyme (Marie et al. 1976). Neben der R-Form in Erythrozyten und dem L-Typ, der charakteristisch für die glukoneogenesefähigen Gewebe Leber und Niere ist, spielen die M-PK-Isoenzyme M1 und M2 eine wichtige Rolle. M1-PK findet man in Gehirn- und Muskelgewebe, wo schnell große Mengen Energie verfügbar sein müssen. Die M2-PK ist außer in Krebszellen in gesundem Lungengewebe und allen Zellen mit starker Nukleinsäuresynthese und Proliferation, wie embryonalen Zellen sowie adulten Stammzellen, vorhanden. Bei der Entstehung von Krebs findet

stets eine Verschiebung in der Isoenzymzusammensetzung statt. Für gewöhnlich verschwindet die gewebsspezifische PK und wird zunehmend durch M2-PK ersetzt (Reinacher und Eigenbrodt 1981, Eigenbrodt et al. 1985, Staal und Rijksen 1991, Eigenbrodt et al. 1992, Mazurek et al. 2005).

Doch nicht nur die Art des vorherrschenden Isoenzym unterscheidet das maligne von benignem Gewebe, auch die Quartärstruktur ist verschieden (Eigenbrodt E 1992, Schneider et al. 2002). Während M2-Pyruvatkinase im Gesunden vor allem als Tetramer vorkommt, liegt die M2-PK des Krebsgewebes in der dimerisierten Form vor (Reinacher und Eigenbrodt 1981, Oremek et al. 1999, Mazurek und Eigenbrodt 2003). Das M2-PK-Dimer wird oftmals Tumor-M2-PK genannt, weil diese Konformation typischerweise in Krebszellen zu finden ist (Oremek et al. 1999, Mazurek et al. 2005).

Die Dissoziation des Tetramers hin zum Dimer und dessen Hochregulation werden unter anderem durch Onkoproteine induziert (Presek et al. 1988, Zwerschke et al. 1999, Mazurek et al. 2001). Beispielhaft seien hier ras und das E7 Onkoprotein von HPV genannt, deren Wirkung anhand eines Karzinomzellmodells dargestellt werden konnte. Ras führte gemeinsam mit einigen Transkriptionsfaktoren (HIF-1, SP1, SP3) zur vermehrten Synthese der Tumor-M2-PK während E7 durch direkte Bindung an die PK unmittelbar deren Dimerisierung zur Folge hatte.

Einige Stoffwechselzwischenprodukte regulieren ebenfalls die Konformation der M2-PK, wie am bereits genannten Karzinomzellmodell ebenfalls gezeigt werden konnte. Beispielsweise führt eine hohe Fruktose-1,6-Bisphosphatkonzentrationen zur Umwandlung des Dimers ins Tetramer und umgekehrt. Die Anwesenheit von L-Serin führt zur allosterischen Affinitätserhöhung der M2-PK zu ihrem Substrat PEP und erniedrigt die für die Konformationsänderung notwendige Fruktose-1,6-Bisphosphatkonzentration. Andere Aminosäuren haben gegenteiligen Effekt. Auch Fettsäuren spielen in diesem Zusammenhang eine Rolle, indem gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren die M2-PK hemmen (Mazurek et al. 2005). Die Konzentration der Nukleinsäuretriphosphate hängt ebenfalls mit der jeweils vorhandenen M2-Pyruvatkinase zusammen. Wenn M2-PK als Dimer vorliegt, dann liegen gleichzeitig hohe ADP

und GDP bzw. niedrige ATP und GTP Konzentrationen vor, wobei bekannt ist, dass niedrige ATP-Level mit hoher Malignität korrelieren (Jackson et al. 1980). Als Tetramer liegt die M2-PK zusammen mit anderen Glykolyseenzymen im Glykolyseenzymkomplex und katalysiert unter Gewinnung von Energie die Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat (PEP) (Mazurek et al. 2001). Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat unter physiologischen Voraussetzungen in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA umgewandelt. Durch den Abbau des Acetyl-CoA via Zitratzyklus und Atmungskette kann die Zelle letztendlich Energie in Form von 36 Molekülen ATP gewinnen. Unter anaeroben Bedingungen wird aus Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase Laktat gebildet (Young und Anderson 2008). Aufgrund der Konformationsänderung der M2-PK in Tumorzellen kommt es für den Zellstoffwechsel zu tief greifenden Veränderungen, denn die Tumor-M2-PK hat eine geringere Affinität für ihr Substrat Phosphoenolpyruvat. Das bedeutet, dass physiologische PEP-Konzentrationen nicht mehr zur Umwandlung in Pyruvat ausreichen, da das Dimer fast inaktiv ist (Eigenbrodt et al. 1985, Eigenbrodt et al. 1992, Mazurek und Eigenbrodt 2003).

Auf den ersten Blick scheint es paradox, dass ausgerechnet Krebszellen mit hohem Glukoseverbrauch und vermehrter Laktatbildung die inaktive Tumor-M2-PK ausbilden. Der Vorteil besteht jedoch darin, dass es aufgrund der Dominanz des Dimers in malignen Zellen zur Anhäufung von Glykolysemetaboliten kommt, die dann für Syntheseprozesse zur Verfügung stehen. In proliferierenden Zellen besteht ein hoher Bedarf an diesen Bausteinen für die Nucleinsäure-, Aminosäure- und Phospholipidherstellung, der so gedeckt werden kann (Eigenbrodt et al. 1992, Mazurek et al. 1997, Mazurek und Eigenbrodt 2003). Einer der Phosphometaboliten, das Glukose-6-Phosphat, wird in den Pentosephosphatzyklus eingeschleust und über mehrere Zwischenschritte werden Nucleotide synthetisiert. Aus dem ebenfalls akkumulierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat können die Krebszellen wichtige Aminosäuren und Phospholipide herstellen (Mazurek et al. 2005).

Es erscheint daher logisch, dass die Konzentration von Glukosemetaboliten in Tumorzellen aufgrund des Auftretens der Tumor-M2-PK etwa 100mal höher als

in gesunden Zellen ist, wie durch Phosphor-31-NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte. Diese Tumoreigenschaft ist auch für die Diagnostik von Krebserkrankungen interessant (Engel et al. 2004, Mazurek et al. 2005). Ob dieser alterierte metabolische Phänotyp essentiell für die Tumorgenese ist, ist bis heute noch ungeklärt (Christofk et al. 2008).

Da die Pyruvatkinase in der dimeren Form nahezu inaktiv ist, erfolgt die von *Warburg* beschriebene Laktatbildung in Krebszellen vor allem durch Glutamin- und Serinolyse (McKeehan 1982, Eigenbrodt et al. 1985, Mazurek et al. 2002).

1.2.3 Phosphoryliertes Akt (pAkt)

In den letzten zehn Jahren konnten den Serin-Threoninkinasen eine Vielzahl zellulärer Prozesse zugeordnet werden, bei denen sie eine entscheidende Rolle spielen. Akt-Kinasen stellen zentrale Knotenpunkte in verschiedenen Signalkaskaden dar, die unterschiedlichste zelluläre Vorgänge regulieren. Hierzu zählen Zellwachstum, -proliferation, -überleben, der Glukose-metabolismus, die Genomstabilität und die Neovaskularisierung (Bellacosa et al. 2004).

Die Erstbeschreibung von Akt fand 1977 durch *Steve Staal* statt, der ein Provirus zellulären Ursprungs aus T-Zell-Karzinomen von Mäusen isolierte und dieses Akt nannte (Staal et al. 1977). Elf Jahre später konnte dem Provirus Akt1 ein Locus auf Chromosom 14 zugeordnet werden (Staal et al. 1988). Von den Akt-Kinasen existieren drei Unterformen: Akt-1, Akt-2, Akt-3. Akt-1 ist die häufigste Form und kommt in den meisten Geweben vor. Akt-2 ist in auf Insulin reagierenden Geweben exprimiert, während Akt-3 in östrogenrezeptor-negativem Brustkrebsgewebe zu finden ist. Beim Mammakarzinom können alle drei Isoformen gleichzeitig übermäßig exprimiert sein (Bacus et al. 2002, Pérez-Tenorio und Stal 2002, Stal et al. 2003).

Die Aktivierung der Proteinkinase Akt geschieht über Signaltransduktion für die sowohl die Membrantranslokation als auch die Phosphorylierung notwendig sind (Bellacosa et al. 1998).

Die Abb. 2 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Signalkaskade zur Akt-Aktivierung:

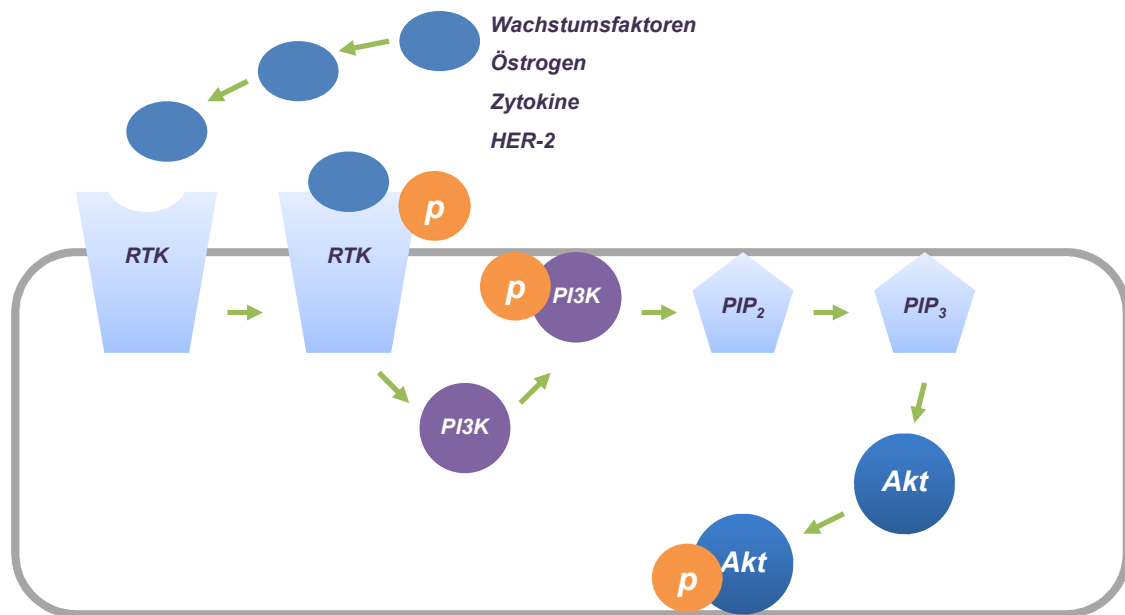


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade zur Akt-Aktivierung

An erster Stelle in diesem Signaltransduktionsweg stehen die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die durch Zytokinbindung, Östrogen, insulinähnliche Wachstumsfaktoren oder epidermale Wachstumsfaktoren wie HER-2 an ihrer extrazellulären Domäne phosphoryliert und damit aktiviert werden (Simonesi et al. 2000, Bellacosa et al. 2005, Shaw 2006). Der entscheidende Schritt für die Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung und damit Stimulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) durch die aktivierte RTK (Vivanco und Sawyers 2002). Die PI3K wird auch durch verschiedene Zytokine aktiviert und führt schließlich zur Phosphorylierung des sekundären Botenstoffs Phosphatidylinositol, so dass dann an der Plasmamembran Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) entstehen (zusammengefasst in Thompson und Thompson 2004). PIP₃ und PIP₂ besitzen hohe Affinität zur Pleckstrin-Homologie-Domäne von Akt und führen schließlich zur Translokation der Serin-Threoninkinase an die Zellmembran (Thompson und Thompson 2004). An der Plasmamembran lokalisiert wird Akt dann an zwei Stellen phosphoryliert. Zunächst an einem Threoninrest (Thr-308), was für die Aktivität von Akt unverzichtbar ist, zum zweiten an einem Serinrest (Ser-473), wodurch es lediglich zur Verstärkung der

Akt-Aktivität kommt (Datta et al. 1999, Vivanco und Sawyers 2002, Bellacosa et al. 2005).

In Tumorzellen ist der Regulationsmechanismus der Aktivierung von Akt oftmals zugunsten einer konstitutiven Phosphorylierung gestört, so dass es in Krebszellen dauerhaft aktiv vorliegt (Vivanco und Sawyers 2002, Elstrom et al. 2004).

In der anschließenden Übersicht (Abb. 3) wird deutlich, welche mannigfaltigen Folgen die dauerhafte Aktivierung der Serin-Threoninkinase Akt für den Tumorzellmetabolismus hat:

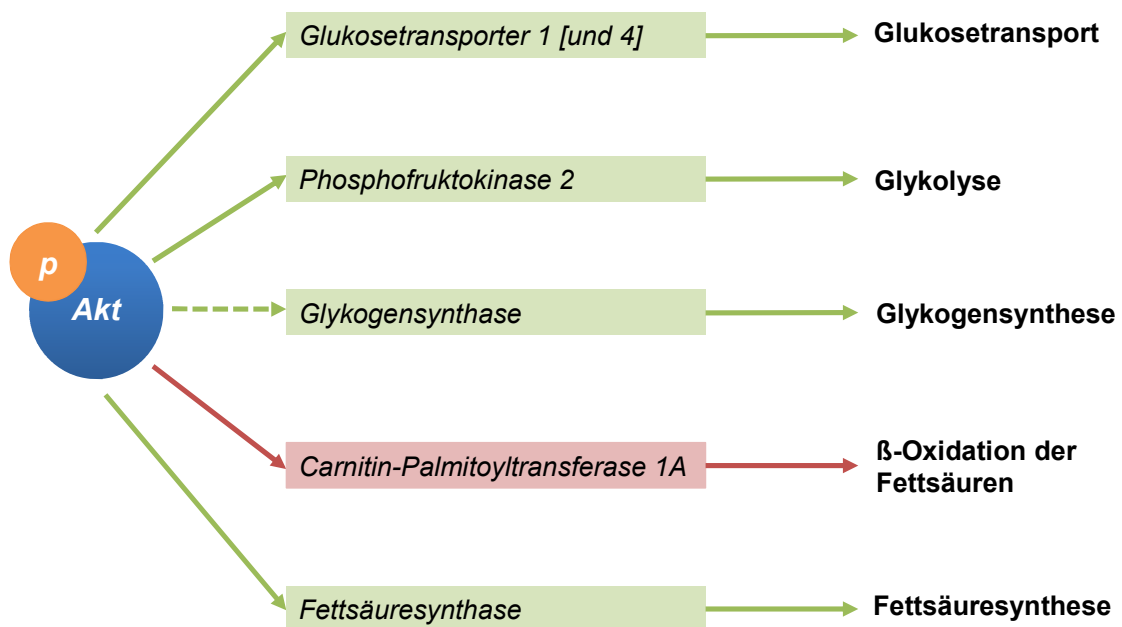


Abb. 3: Übersicht über die Stoffwechselläufe von pAkt

Die durchgezogenen Pfeile stellen jeweils einzelne Reaktionsschritte dar. Die grünen Pfeile stehen für eine Unterstützung und die roten für eine Hemmung des jeweiligen Stoffwechselläufes. Der unterbrochene grüne Pfeil signalisiert die indirekte Förderung des Stoffwechselläufes durch nicht dargestellte Zwischenschritte.

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, dass die Akt-Kinasen an einer Vielzahl komplexer zellulärer Vorgänge beteiligt sind. Im Rahmen dieser Studie wird besonderes Augenmerk auf den Glukosestoffwechsel gelegt.

Die phosphorylierte Akt-Kinase führt über den Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran dazu, dass Glukose zur weiteren Verstoffwechslung in die Zelle hinein transportiert werden kann (Barnes et al. 2005). Die Stimulierung des Glukosetransports durch den Einbau der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in die Zellmembran ist eine der vielen metabolischen Effekte des

Insulins auf den Zuckerstoffwechsel, die durch Akt mediiert werden (Kohn et al. 1996). Die konstitutive Aktivierung des Onkoproteins Akt führt in Krebszellen aufgrund einer erhöhten Transkriptionsrate zum Einbau von Glukosetransportern und somit zu vermehrter Glukoseaufnahme (Barnes et al. 2005).

Nicht nur der Transport, auch die Verstoffwechslung der Glukose via Glykolyse wird durch Akt gefördert. Dies geschieht zum einen durch Phosphorylierung der Phosphofruktokinase 2 (Deprez et al. 1997) und zum anderen durch transkriptionale Aktivierung glykolytischer Enzyme (Majumder et al. 2004). Zusätzlich stimuliert pAkt - durch Einbau der Hexokinasen I und II in die äußere Mitochondrienmembran - die mitochondrienassoziierte Hexokinaseaktivität, wodurch vermehrt Glukose zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert wird (Majewski et al. 2004a, Robey und Hay 2005).

Darüber hinaus fördert pAkt indirekt die Glykogensynthese (Cross et al. 1995). Normalerweise wird die Glykogensynthase durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β phosphoryliert und damit inaktiviert, was schließlich zur Hemmung der Glykogensynthese führt. Akt inaktiviert jedoch die GSK3 β , so dass deren hemmende Wirkung auf die Glykogensynthase entfällt, wodurch die Glykogensynthese gefördert wird (Cross et al. 1995, Klein et al. 1996, Cross et al. 1997). Der Anstoß zur genaueren Erforschung der Bedeutung der Akt-Kinase für den Kohlenhydratstoffwechsel wurde mit der Entdeckung ihres ersten Substrates, der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β , gegeben.

Akt hat nicht nur erheblichen Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel sondern auch Effekte auf den Fettstoffwechsel, indem es die β -Oxidation der Fettsäuren hemmt (DeBerardinis et al. 2006) und die Fettsäuresynthese aus Glukose- und Pyruvatvorstufen für den Aufbau von Zellmembranen fördert (Bauer et al. 2005, Young und Anderson 2008). Durch die phosphorylierte Akt wird ein wichtiges Enzym des Fettsäureabbaus, die Carnitin-Palmitoyltransferase 1A, gehemmt (Buzzai et al. 2005), während die Fettsäuresynthese durch vermehrte Transkription der erforderlichen Enzyme unterstützt wird (Porstmann et al. 2005).

In vielen Tumorzellen wurde Akt konstitutiv phosphoryliert und damit in seiner aktivierten Form vorgefunden (Sun et al. 2001). Die Überaktivität der Akt-

Kinasen konnte bereits in zahlreichen Tumorentitäten, wie auch beim Mammakarzinom beobachtet werden (Testa et al. 2001, Cantley 2002). Anhand von Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass Abwandlungen in den Akt-Signalwegen alleine oder im Zusammenhang mit anderen genetischen Störungen Malignität induzieren können bzw. zu höher malignen Phänotypen führen (Di Cristophano und Pandolfi 2000, Luo et al. 2003, Bellacosa et al. 2004, Bjornsti und Houghton 2004). Die Aktivierung des Onkoproteins Akt führt zu einem hochgradig glykolytischen Phänotyp von Krebszellen (Elstrom et al. 2004), das heißt, dass die Akt-Aktivierung direkt an der erhöhten Glykolyserate in Tumorzellen unter aeroben Bedingungen, also dem sogenannten Warburg-Effekt beteiligt ist (Elstrom et al. 2004). In Krebszellen mit konstitutiv phosphoryliertem Akt ist die Glykolyserate erhöht, während die oxidative Phosphorylierung unverändert bleibt, wie indirekt über Messungen des Sauerstoffverbrauchs gezeigt werden konnte (Elstrom et al. 2004).

Da Glukoseaufnahme und -verstoffwechslung in Krebszellen im Vergleich zum zellulären Bedarf normaler Zellen exzessiv erhöht sind, kommt es in entarteten Zellen zu vermehrter Laktatproduktion (Elstrom et al. 2004). Durch die erhöhte Glukoseaufnahme und erhöhte Glukose-6-Phosphatkonzentrationen stimuliert pAkt die aerobe Glykolyse in Krebszellen (Elstrom et al. 2004). Glukose-6-Phosphat wird entweder via Fruktose-6-Phosphat zu Phosphoenolpyruvat metabolisiert oder in den Pentosephosphatzyklus eingeschleust. Maligne Zellen mit konstitutiv aktiviertem Akt sind zwingend abhängig von Glukose als Energiequelle und sterben bei Glukoseentzug. Dies geschieht, weil Akt die β -Oxidation der Fettsäuren verhindert, die in normalen Zellen bei Abwesenheit von Glukose Energie liefert (Elstrom et al. 2004, Majewski et al. 2004a).

Neben den zahlreichen Auswirkungen, die die Akt-Aktivierung auf den Energiestoffwechsel von Krebszellen hat, ist sie auch für andere charakteristische Eigenschaften verantwortlich. Beispielsweise stimuliert pAkt über verschiedene Zwischenschritte die Angiogenese, die im Zellkern geregelt wird (Linderholm et al. 2003, Xia et al. 2006) und hemmt durch Aktivierung der Hexokinase auch die Apoptose. Hexokinasen beeinflussen die Funktion verschiedener Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung des

programmierten Zelltodes in malignen Zellen spielen (Pastorino et al. 2002, Rathmell et al. 2003, Majewski et al. 2004b), denn die Akt-vermittelte Aktivierung der Hexokinase bewirkt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, was zur Verhinderung der Apoptose führt (Gottlob et al. 2001, Bryson et al. 2002, Robey und Hay 2005).

In jüngster Zeit fanden sich Hinweise dafür, dass Defekte in der Zellatmung zur Aktivierung von Akt und damit zu den beschriebenen Stoffwechselveränderungen führen können (Pastorino et al. 2006a). Aufgrund der zentralen Rolle der Serin-Threoninkinase Akt im Tumorstoffwechsel ist sie als möglicher Ansatzpunkt für die zukünftige Krebstherapie sehr interessant und vielversprechend.

1.3 Fragestellung

In dieser Arbeit wird der Glukosestoffwechsel des Mammakarzinoms anhand der Glykolysemarker Tumor-M2-PK und pAkt untersucht. Die Bedeutung dieser Indikatoren als Schlüsselenzyme für die aerobe Glykolyse soll herausgearbeitet werden. Es soll ermittelt werden, ob der semiquantitative Nachweis von Tumor-M2-PK bzw. pAkt im Mammakarzinomgewebe mit dem Erkrankungsstadium bzw. -verlauf zusammenhängt und ob das Vorhandensein der Glykolysemarker eine prognostische und prädiktive Relevanz besitzt. Prognosefaktoren geben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Informationen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf, im Hinblick auf Rezidivfreiheit und Gesamtüberleben, die unabhängig von der Therapie sind. Prognostische Faktoren spiegeln die Fähigkeit des Tumors zur Proliferation, Invasion und Metastasierung wieder. Prädiktive Faktoren sagen die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens eines Tumors auf eine bestimmte Therapie voraus. Sie sind entweder selbst Angriffspunkt der Therapie, oder ihre Expression ist ein Epiphänomen der Therapiewirksamkeit bzw. -resistenz (Decker et al. 2009). Damit zuverlässige Aussagen möglich sind, wurde ein Patientenkollektiv mit besonders langem, mindestens 13jährigem Nachbeobachtungszeitraum seit Erstdiagnose gewählt. Alle 160 Patientinnen wurden brusterhaltend operiert und an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg behandelt. Die Überlebensdaten werden durch

Aktenstudium und Kontaktierung der Patientinnen erhoben und die Charakteristika und Überlebenskurven des Kollektivs ermittelt. Die erhobenen Daten werden mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen abgeglichen, um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Expression von Tumor-M2-PK und pAkt sowie den Überlebensdaten besteht. Bei der Auswertung werden folgende Parameter berücksichtigt: das Alter bei Diagnosestellung, die Mortalität, die Überlebenszeit, die Todesursache, das Tumorstadium, der Lymphknotenstatus, der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie das Auftreten von Rezidiven oder Metastasen. Auf diese Weise soll der Frage nachgegangen werden, ob Tumor-M2-PK und pAkt in Zukunft als Prognoseindikatoren beim Mammakarzinom eingesetzt werden können und ob die Hemmung der Glykolyse eine mögliche Therapieoption bietet.

2 Material und Methode

2.1 Patientengut

Im Rahmen dieser Studie werden 160 Mammakarzinompatientinnen erfasst, die im Zeitraum zwischen 1985 und 1995 an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg einer brusterhaltenden Therapie unterzogen wurden. Die Altersverteilung des Patientenkollektivs (Abb. 4) umfasste Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren, von denen die jüngste Patientin zum Diagnosezeitpunkt 19 und die älteste Patientin 79 Jahre alt war. Der Häufigkeitsgipfel lag zwischen 50 und 55 Jahren.

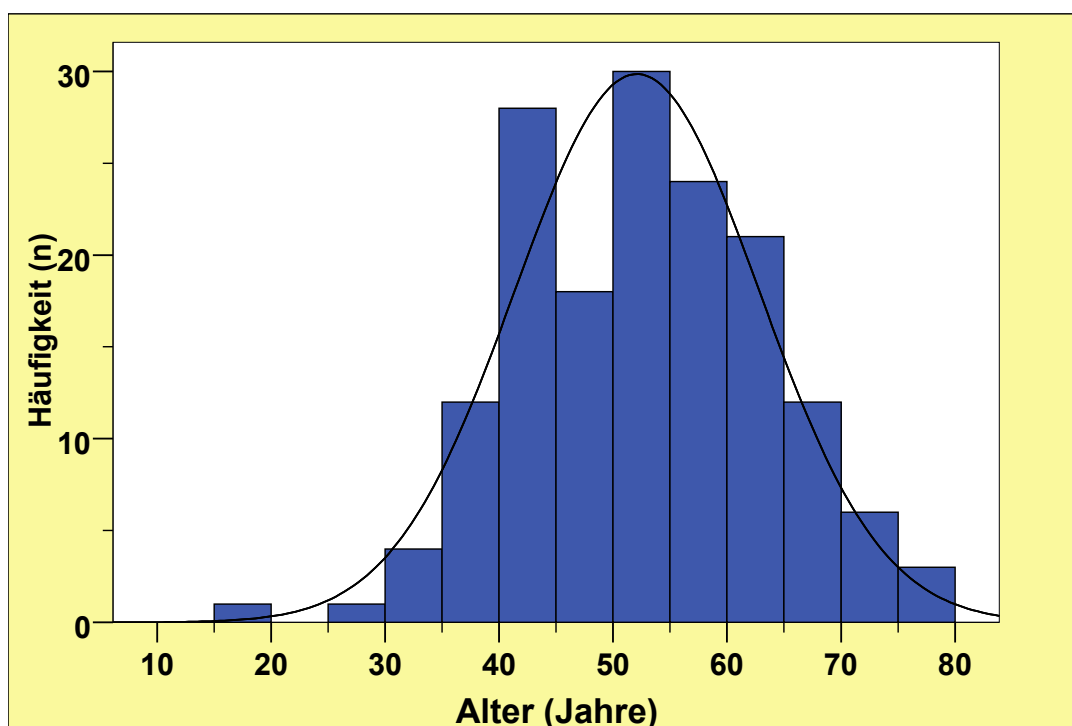


Abb. 4: Altersverteilung im Patientenkollektiv

Für das Datum der Erstdiagnose wurde stets der Tag der primären Tumorexzision gewählt, an dem die Diagnose invasives Karzinom - nach histologischer Begutachtung mittels Schnellschnitt - bestätigt war. Brusterhaltende Therapie bedeutet in den hier berücksichtigten Fällen die Tumorexzirpation mit anschließender Axilladisektion, wobei die Lymphknoten und das umliegende Fettgewebe der Level I und II entfernt wurden. Ziel der Lymphonodektomie war es, mindestens zehn Lymphknoten für die histopathologische Begutachtung zu erhalten. Darauf folgend schloss sich die

Radiatio des verbliebenen Mammagewebes und gegebenenfalls zusätzlich eine zytostatische Therapie bzw. Hormonbehandlung an. Das Stadium der Tumorerkrankung wurde histopathologisch anhand der TNM-Klassifikation festgelegt, wobei ergänzend die genaue Anzahl der untersuchten und befallenen Lymphknoten erfasst wurde.

Mit 126 lagen die Mehrzahl der Tumoren bei Diagnosestellung im Stadium T₁ (78,8%), 33 (20,6%) im Stadium T₂ und ein Tumor (0,6%) im T₃-Stadium vor. Bei 58 (36,2%) Patientinnen des vorliegenden Kollektivs waren die Lymphknoten tumorbefallen, während die restlichen 102 Patientinnen (63,8%) einen negativen Nodalstatus aufwiesen. Keine der Mammakarzinompatientinnen wies zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen auf. Bei der histopathologischen Begutachtung wurde auch eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Tumorentitäten vorgenommen, wobei lobuläre und duktale Karzinome die große Mehrheit stellten. Außerdem wurden vereinzelt medulläre, muzinöse, tubuläre Karzinome, sowie jeweils ein papilläres und ein Siegelringzell-Karzinom gefunden. Ab 1989 kam die immunhistologische Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren hinzu. 92 Gewebeproben wurden auf ER untersucht, von denen 35 (38,0%) positiv und 57 (62,0%) negativ waren. Der PR wurde bei 88 Mammakarzinomen bestimmt, dies ergab positive Werte für 46 (52,3%) Proben, während bei 42 (47,7%) keine Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden konnten. Über einen Zeitraum von mindestens 13 Jahren wurde der weitere Krankheitsverlauf individuell beobachtet und dokumentiert, falls die Patientinnen nicht vorher verstorben waren. Die gesammelten Überlebensdaten beinhalten genaue Informationen bezüglich des Auftretens von Rezidiven und Metastasen mit dem jeweiligen Diagnosedatum. Außerdem wurde der Überlebenszeitraum seit Erstdiagnose, gegebenenfalls mit Sterbejahr und Todesursache festgehalten.

Die Abb. 5 bietet einen Überblick über die ermittelten klinisch-pathologischen Charakteristika des Patientenkollektivs.

	Anzahl	Prozentsatz
TumorgroÙe		
T ₁	126	78,8
T ₂	33	20,6
T ₃	1	0,6
Lymphknotenstatus		
N ₀	102	63,8
N ₁₋₃	58	36,2
Östrogenrezeptorstatus		
negativ	57	62,0
positiv	35	38,0
unbekannt	68	
Progesteronrezeptorstatus		
negativ	42	47,7
positiv	46	52,3
unbekannt	72	
Rezidiv		
nein	34	56,7
ja	26	43,3
unbekannt	100	
Metastasen		
nein	36	52,9
ja	32	47,1
unbekannt	92	
Überlebenszeit (> 13 Jahre)		
nein	61	38,6
ja	97	61,4
unbekannt	2	
Tod am Mammakarzinom		
nein	5	23,8
ja	16	76,2
unbekannt	139	

Abb. 5: Charakteristika des Patientenkollektivs

Zwischen 13 und 23 Jahre nach Diagnosestellung lebten 60,6% (97) der Patientinnen, 38,1% (61) waren bereits verstorben. Die genaue Todesursache konnte nur für 21 Patientinnen ermittelt werden - 16 sind hiervon am Mammakarzinom verstorben. Bezüglich des Auftretens von In-Brust-Rezidiven liegen Daten von 60 Patientinnen vor. Von diesen erlitten nach erfolgter Therapie 26 ein lokoregionäres Rezidiv, 34 blieben bis heute rezidivfrei. Für insgesamt 68 Studienteilnehmer konnten Daten erhoben werden, ob Fernmetastasen aufgetreten sind, dies war bei 32 Frauen der Fall.

2.2 Immunhistochemische Färbung

2.2.1 Materialiste

- Objektträger: Super Frost Plus OT, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Xylol, Baker, Holland
- Ethanol, Baker, Holland
- Methanol, Baker, Holland
- Technischer Alkohol vergällt über die Universitätsversorgung der Universität Würzburg, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mikrowellenpuffer: Zitronensäure-Monohydrat 0,2g/100ml Aqua dest. abgepuffert auf pH 6 mit 2N Natronlauge (NaOH)
 - o Zitronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
 - o Natronlauge (NaOH) 2N, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphat gepufferte Saline (PBS): 10 Tabletten Oxoid auf einen Liter Aqua dest.
 - o PBS Oxoid Tabletten, Oxoid, Hampshire, UK
- Antikörperlösung: Dako Cytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components, DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark
- Ziegen-Normalserum (1:5 in PBS): DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark

- Hämalau, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- VitroClud, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Entwicklerlösung Diamino-Benzidin (DAB): DAB-Substratkit DCS (1 Tropfen/ml) DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland
 - DCS Chromoline DAB-Konzentrat
 - DCS Chromoline DAB-Substratpuffer
- DAKO LSAB2[®] (Labeled Streptavidin-Biotin2) System-HRP (Horseradish Peroxidase), Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
 - Biotenylated link
 - Streptavidin-HRP
- M2-PK-Antikörper (1:250 in Antikörperlösung), (DF4, ScheBo Biotech AG, Giessen, Deutschland
- pAkt-Antikörper (1:100 in Antikörperlösung), Abcam ab28821, rabbit polyclonal, Abcam plc, Cambridge, UK

2.2.2 Färbeprotokolle für die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tumor-M2-PK und pAkt

Von den in Paraffin eingebetteten Tumorblöcken wurden mit dem Schlittenmikrotom 2 µm dünne Schnitte hergestellt, auf dem Wasserbad (Aqua destillata kalt und 50°C) gestreckt und dann auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen. Nach der Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur, erfolgte das Entparaffinieren und Hydratisieren. Hierfür wurden die Präparate zunächst in einem zweimaligen Xylol-Bad für je zehn Minuten entparaffiniert und dann in absteigender Alkoholreihe, zuerst zweimal zwei Minuten in 100%igem Ethanol, anschließend in absteigenden Konzentrationen bis Ethanol 70,0% unter stetigem Auf- und Abbewegen in den Flüssigkeiten hydratisiert und zum Abschluss in Aqua dest. gründlich gespült. Für die Vorbehandlung, zur Demaskierung der Proteine, wurde zunächst eine Zitronensäure-Monohydratlösung aus 0,2 g Zitronensäuremonohydrat pro 100 ml Aqua dest. hergestellt und mit zweimolarer Natronlauge auf pH 6,0 titriert. In dieser Lösung wurden die Präparate zweimal für die pAkt- bzw. dreimal für die M2-PK-Färbung je fünf Minuten lang bei 750 Watt gekocht und nach 20minütigem Abkühlen mit Aqua dest. gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase

wurden die Schnitte in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (aus 30%igem H₂O₂ mit Methanol im Verhältnis 1:10 verdünnt) zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Aqua dest. und zur pH-Angleichung wurden die Objektträger für zwei Minuten in PBS belassen. Unspezifische Bindungskapazitäten im Gewebe wurden mit 20%igem Ziegennormalserum in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nach Inkubation wurde die Lösung von den Objektträgern abgekippt und im Anschluss daran der jeweilige primäre Antikörper gegen M2-PK oder pAkt aufgetragen. Für die M2-PK-Färbung wurde das Antikörperkonzentrat 1:250, für die pAkt-Färbung im Verhältnis 1:100 mit Dako Antibody Diluent verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht, bei 4°C im Kühlschrank. Am darauf folgenden Tag wurde zunächst fünfmal mit PBS gespült, bevor die Detektion mit dem Dako LSAB2[®] System-HRP bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Diese Detektion setzte sich zusammen aus jeweils 15 minütiger Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper, gefolgt von HRP-markiertem Streptavidin. Intermittierend wurde ausgiebig mit PBS gewaschen. Die erfolgte Reaktion wurde mittels DAB-Substratkit DCS laut Angaben des Herstellers sichtbar gemacht (1 Tropfen des DCS Chromoline DAB-Konzentrats mit 1 ml DCS Chromoline DAB-Substratpuffer verdünnt). Die Reaktion wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, so dass das Signal deutlich erkennbar war. Im Anschluss wurde nochmals fünfmal mit PBS, sowie mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Die Kernfärbung erfolgte durch zweiminütiges Bad in Hämalaun nach Mayer. Anschließend wurde in Leitungswasser gebläut, mit Aqua dest. gespült, über die aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und mittels Xylol als Intermedium mit Vitroclud eingedeckt.

2.3 Bestimmung des immunreaktiven Scores für Tumor-M2-PK und pAkt

Anhand der immunhistochemischen Färbungen wurde der Expressionsgrad von Tumor-M2-PK und pAkt festgestellt. Die Präparate wurden zunächst histopathologisch begutachtet und das Tumorgewebe dann wie folgt bewertet. Eine Übersicht zur Errechnung der immunreaktiven Scores bietet Abb. 6:

Färbeintensität		Positive Zellen	
0	keine Reaktion	0	Keine
1	schwache Reaktion	1	weniger als 10,0%
2	mäßige Reaktion	2	zwischen 10,0 und 49,9%
3	starke Reaktion	3	zwischen 50,0 und 79,9%
		4	mindestens 80,0%

Abb. 6: Übersicht zur Errechnung der IRS

Zur semiquantitativen Evaluation der Anzahl positiv angefärbter Tumorzellen wurden Punktzahlen zwischen eins und vier definiert. Ein Score von eins bedeutet, dass weniger als 10,0% der Tumorzellen eine Färbung aufweisen, bei einem Wert von zwei sind 10,0-49,9% der malignen Zellen angefärbt, bei drei sind es zwischen 50,0 und 79,9% und mit vier wurden Präparate bewertet, bei denen mindestens 80% der Mammakarzinomzellen eine Färbung zeigten.

Um die Intensität der Färbung zu ermessen, wurden ähnliche Scores definiert. Bei fehlender Färbung wurde der Wert null vergeben, für eine schwache Färbeintensität der Wert eins. Die Ziffer zwei steht für moderate und drei bedeutet starke Färbung.

Die positive Färbung zeigt sich bei dem M2-PK-Antikörper lediglich im Zytoplasma, während der pAkt-Antikörper sowohl das Zytoplasma als auch die Zellmembran und den Nukleus anfärben kann (Abb. 7a und b).

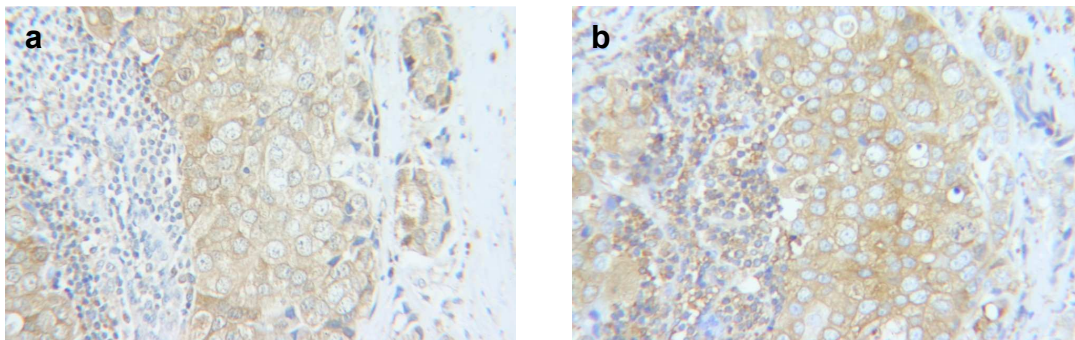


Abb. 7: Mammakarzinomgewebe bei 250-facher Vergrößerung

Abb. 7a: pAkt-Färbung der Mammakarzinomzellen Abb. 7b: M2-PK-Färbung der Mammakarzinomzellen

Die linke Abbildung (Abb. 7a) zeigt eine pAkt-Färbung, hier ist deutlich die Kernfärbung, sowie eine Anfärbung der Zellmembran zu erkennen, während Kern- sowie Plasmamembranfärbung auf dem rechten Foto mit M2-PK-Färbung (Abb. 7b) fehlen. Beide Präparate zeigen eine mittelstark ausgeprägte

Anfärbung des Zytoplasmas.

Der verwendete Antikörper ab28821 bindet spezifisch an das vollständig aktivierte phosphorylierte pAkt-1 (Ser-473), erkennt aber aufgrund von Sequenzhomologien auch pAkt-2 (Ser-473) und pAkt-3 (Ser-473). Für die Tumor-M2-PK-Färbungen wurde Klon DF4 eines monoklonalen Mausantikörpers verwendet, dessen spezifischer Ligand die Ratten- oder menschliche M2-PK ist und der keinerlei Kreuzreaktivität mit der L-Pyruvatkinase zeigt.

Es folgen Beispiele (Abb. 8a-f), die die unterschiedliche Färbintensität, anhand von Präparaten, die für diese Studie hergestellt und gefärbt wurden, zeigen.

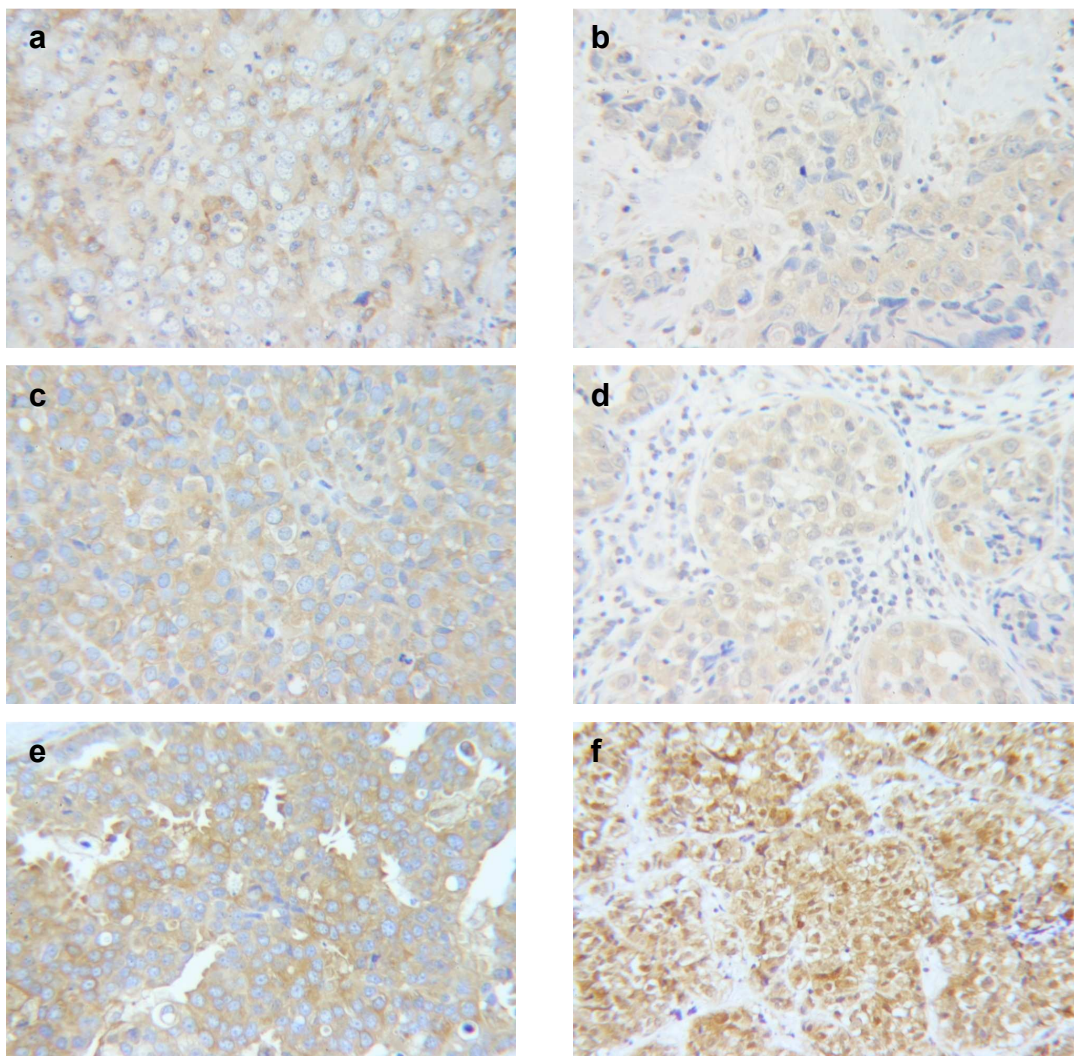


Abb. 8: Mammakarzinomgewebe bei 250-facher Vergrößerung

Abb. 8a zeigt schwache, 8c mittlere und 8e starke Intensität der M2-PK-Färbung in Mammakarzinomgewebe

Abb. 8b zeigt schwache, 8d mittlere und 8f starke Färbungen der pAkt-Färbung in Mammakarzinomgewebe

Durch Multiplizieren der beiden Werte für Anzahl der gefärbten Tumorzellen, sowie Intensität der Färbung erhält man den immunreaktiven Score (IRS), wie er ursprünglich zur Ermittlung des Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom entwickelt wurde (Remmele und Stegner 1987).

Um eine bessere statistische Auswertung zu ermöglichen, werden die Färbungen nach dem IRS Score zusätzlich in positive und negative Färbereaktionen aufgeteilt und als cut-off-Werte bezeichnet. Als positive cut-offs werden IRS-Scores größer vier gewertet, IRS-Scores kleiner oder gleich vier werden als negative Färbereaktion und damit fehlende Antigenexpression gewertet.

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistischen Berechnungen kam SPSS für Windows, Version 15.0 (SPSS Inc., U.S.A.) zum Einsatz.

Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte aus Mittelwerten, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden.

Die kontinuierlichen Variablen wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Signifikanzen $p < 0,05$ gelten als nicht normalverteilt.

Für zwei unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0,05$) wurde bei den Mittelwertvergleichen ausschließlich der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test herangezogen.

Die kategorisierten Daten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung. Zur vergleichbaren Quantifizierung der Testergebnisse wurden p-Werte ermittelt, wobei für alle statistischen Tests $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. P-Werte, die kleiner oder gleich 0,01 sind gelten als sehr signifikant. Bei $p > 0,05$ kann nicht von einer Signifikanz ausgegangen werden, bei Werten, die größer als 0,05 und kleiner als 0,08 sind spricht man jedoch von grenzwertiger Signifikanz.

Die Überlebensstatistiken wurden anhand von Kaplan-Meier-Analysen

durchgeführt. Dabei wurden kontinuierliche Daten durch den Mittelwert kategorisiert, so dass ein Vergleich der Mortalität in den beiden Gruppen erfolgen konnte. Anhand von Kaplan-Meier-Analysen werden die chronographischen Veränderungen einzelner Parameter innerhalb des Patientenkollektivs dargestellt.

Als Testverfahren zum Vergleich der Sterberaten wurde Log Rank verwendet.

In der multivarianten Analyse wurden die Parameter hinsichtlich ihres unabhängigen Einflusses auf die Mortalität durch die Coxregression überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika des Kollektivs

Die immunhistochemische Auswertung der Mammakarzinomgewebeproben ergibt in 70,0% der Fälle (112 Präparate) positive Werte für M2-PK und in 58,1% (93 Präparate) positive Ergebnisse für pAkt (Abb. 9).

	Zahl	Prozentsatz
M2-PK-Expression		
negativ	48	30,0
positiv	112	70,0
pAkt-Expression		
negativ	67	41,9
positiv	93	58,1

Abb. 9: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für M2-PK und pAkt

Um Mittelwertvergleiche für alle Parameter zu ermöglichen, werden zusätzlich Mittelwerte für das Alter bei Diagnosestellung, die Überlebenszeit und den Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus gebildet. Es ergeben sich folglich jeweils zwei Gruppen, eine mit Werten kleiner oder gleich dem Mittelwert und eine mit Werten größer als der Mittelwert.

Das durchschnittliche Patientenalter liegt bei 52 Jahren. Für die Hormonrezeptoren ergeben sich mittlere IRS von vier für Östrogen- und fünf für Progesteronrezeptoren.

Die Überlebenszeit der Patientinnen variiert zwischen weniger als einem bis zu maximal 22 Jahren für Patientinnen, bei denen die Erstdiagnose bereits 1985 erfolgt war (Abb. 10). Die mittlere Überlebenszeit beträgt 13 Jahre bei einem Nachbeobachtungszeitraum von mindestens 13 Jahren nach Erstdiagnose.

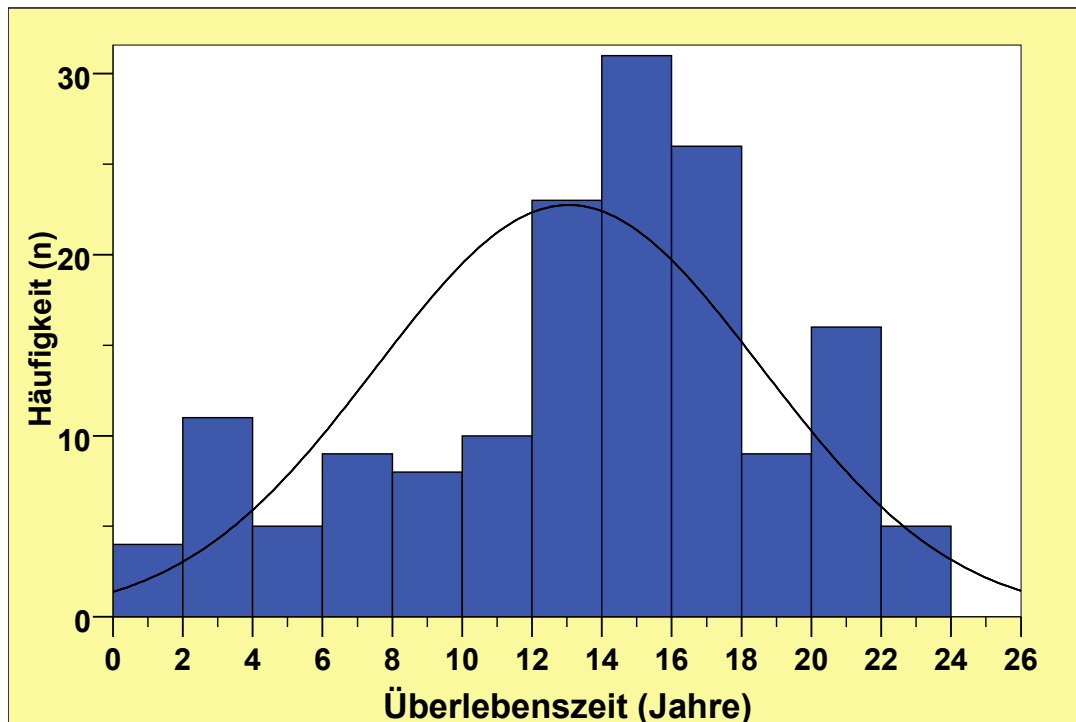


Abb. 10: Verteilung der Überlebenszeiten im Patientenkollektiv

Die genaue Todesursache ließ sich nur von wenigen Studienteilnehmern ermitteln, so dass diese Daten aufgrund zu geringer Anzahl aus der Wertung genommen werden.

Alle erfassten Stichproben werden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Es zeigt sich, dass alle Parameter nicht normalverteilt ($p < 0,05$), d. h. unabhängig voneinander sind und somit in keinem direkten Zusammenhang zueinander stehen.

3.2 Kaplan-Meier-Analysen

Die Prozedur „Kaplan-Meier“ stellt eine Methode dar, um Modelle, welche die Zeit bis zum Eintreten des Ereignisses angeben, in Gegenwart zensierter Fälle zu schätzen. Das Kaplan-Meier-Modell basiert auf der Schätzung bedingter Wahrscheinlichkeiten zu jedem Zeitpunkt eines auftretenden Ereignisses und auf der Bildung des Produktgrenzwertes dieser Wahrscheinlichkeiten zur Schätzung der Überlebensrate zu jedem Zeitpunkt.

In die Kaplan-Meier-Statistik gehen Daten von 157 der insgesamt 160 Patientinnen ein, da von den übrigen drei Patientinnen die Überlebenszeit nicht

bekannt ist.

Die Gesamtmortalität des Patientenkollektivs stellt sich über einen Zeitraum von 23 Jahren wie folgt dar (Abb. 11):

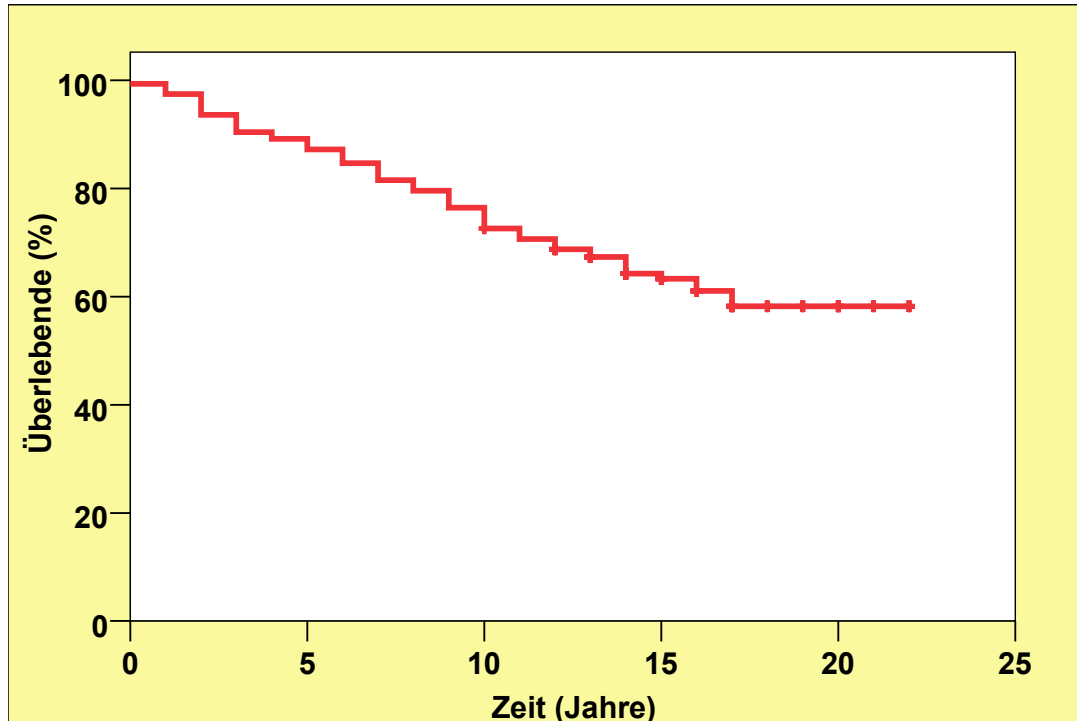


Abb. 11: Gesamtmortalität im Zeitverlauf

Betrachtet man die Sterblichkeit (Abb. 11), so ergibt sich durch die Kaplan-Meier-Analysen eine Gesamtmortalität von 38,2%. Die geschätzte mittlere Überlebenszeit beträgt 16,4 Jahre mit einem 95%-Konfidenzintervall von 15,2 bis 17,6 Jahren. Die Zahl der Überlebenden bleibt bei denjenigen, die bereits die ersten 17 Jahre überlebt haben, konstant bei 61,8%.

In den ersten 5 Jahren nach Diagnosestellung überlebten 88,0% der Patientinnen; die 10-Jahresüberlebensrate lag bei 73,0%; 15 Jahre nach Primärdiagnose sank die Überlebensrate auf 64,0%, zu Studienende betrug sie 61,8% (Abb. 11).

In der folgenden Abb. 12 sind die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen zu den verschiedenen klinischen Parametern dargestellt. Beispielsweise beträgt die Überlebensrate der Patientinnen, die bei Diagnosestellung nicht älter als 52 Jahre waren 65,5%, während von den über 52 Jährigen lediglich 57,5% das Studienende erlebt haben.

Überlebensraten am Studienende in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren		
Alter	<= 52a	>52a
	65,5%	57,5%
Tumorgröße	T₁	T₂
	60,2%	69,7%
Nodalstatus	N₁	N₀
	51,8%	67,3%
ER	positiv	negativ
	76,5%	63,2%
PR	positiv	negativ
	73,3%	61,9%
Rezidiv	ja	nein
	46,2%	91,2%
Metastasen	ja	nein
	16,1%	97,2%
M2-PK/cut-off	positiv	negativ
	66,7%	50,0%
pAkt/cut-off	positiv	negativ
	58,7%	66,2%

Abb. 12: Übersicht über die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen

Für das Patientenalter bei Diagnosestellung kann kein signifikanter Einfluss auf das Überleben (Log Rank: $p=0,320$) festgestellt werden.

Es besteht ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang der geschätzten Überlebenszeit mit verschiedenen T-Stadien ($p=0,500$). Bezüglich der Mortalität werden die Stadien T₁ und T₂ untersucht, das Stadium T₃ wird aufgrund der geringen Häufigkeit ($n=1$) aus der Analyse herausgenommen.

Die Mortalität ist bei Patientinnen, die bei Diagnosestellung einen negativen Lymphknotenstatus aufwiesen im Vergleich zu Patientinnen mit befallenen Lymphknoten signifikant geringer (Abb. 13).

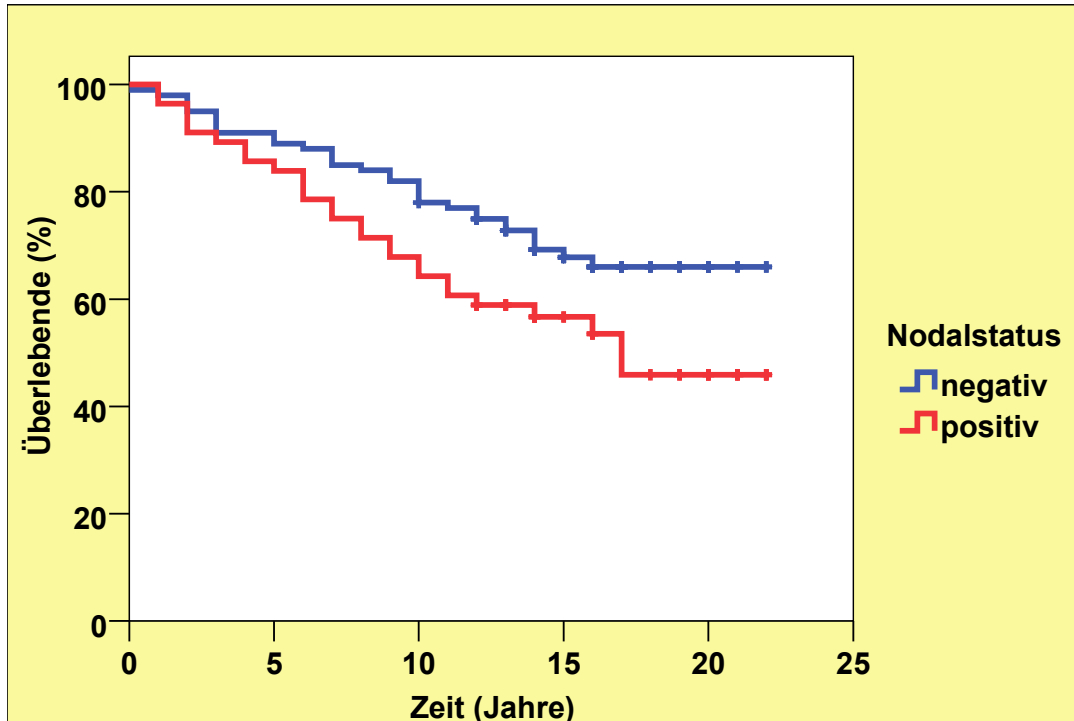


Abb. 13: Mortalität in Abhängigkeit vom Nodalstatus

Das bedeutet, dass die geschätzte Überlebenszeit bei nodalpositivem Status signifikant kürzer als bei nodalnegativem Status ist (14,8a [CI 12,7a - 16,8a] vs. 17,3a [CI 15,9a - 18,7a]; Log Rank: $p=0,045$). Am Ende des Beobachtungszeitraumes war knapp die Hälfte (48,2%) der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten verstorben, hingegen lebten noch 67,3% der Studienteilnehmerinnen ohne Lymphknotenmetastasen.

Insgesamt war der Östrogenrezeptorstatus für 91 Tumorgewebeproben bekannt. Abb. 14 stellt die Mortalität in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus dar:

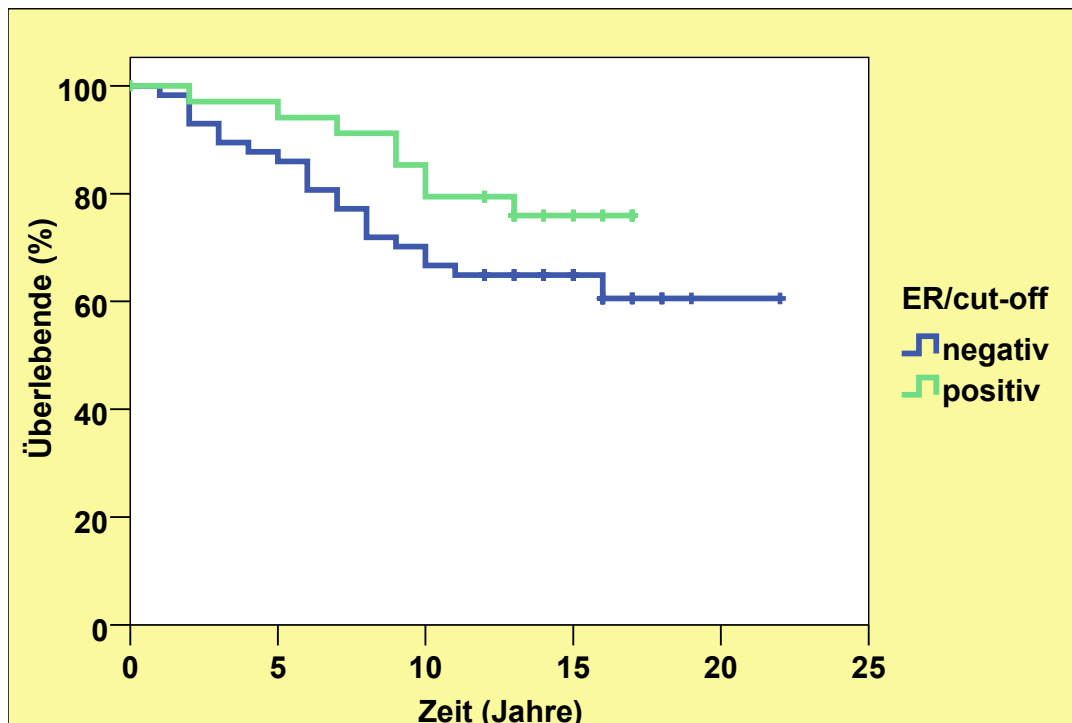


Abb. 14: Mortalität in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

Die geschätzte Überlebenszeit ist bei Patientinnen mit positivem ER-Rezeptorstatus (ER-IRS>4) etwas länger, allerdings nicht signifikant länger, als bei den Patientinnen mit fehlenden ER-Rezeptoren im Tumorgewebe (ER-IRS</=4) (14,9a [CI 13,5a - 16,3a] vs. 16,1a [CI 14,0a - 18,1a]; Log Rank: p=0,160). Abb. 14 zeigt, dass am Ende der Studienzeit 76,5% der Studienteilnehmerinnen mit positivem ER überlebt haben, während von den Patientinnen mit negativem Rezeptorstatus etwas mehr als 63,2% überlebt haben.

Der Progesteronrezeptorstatus lag bei 87 Gewebeproben vor. Die Mortalität in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus wird aus Abb. 15 ersichtlich:

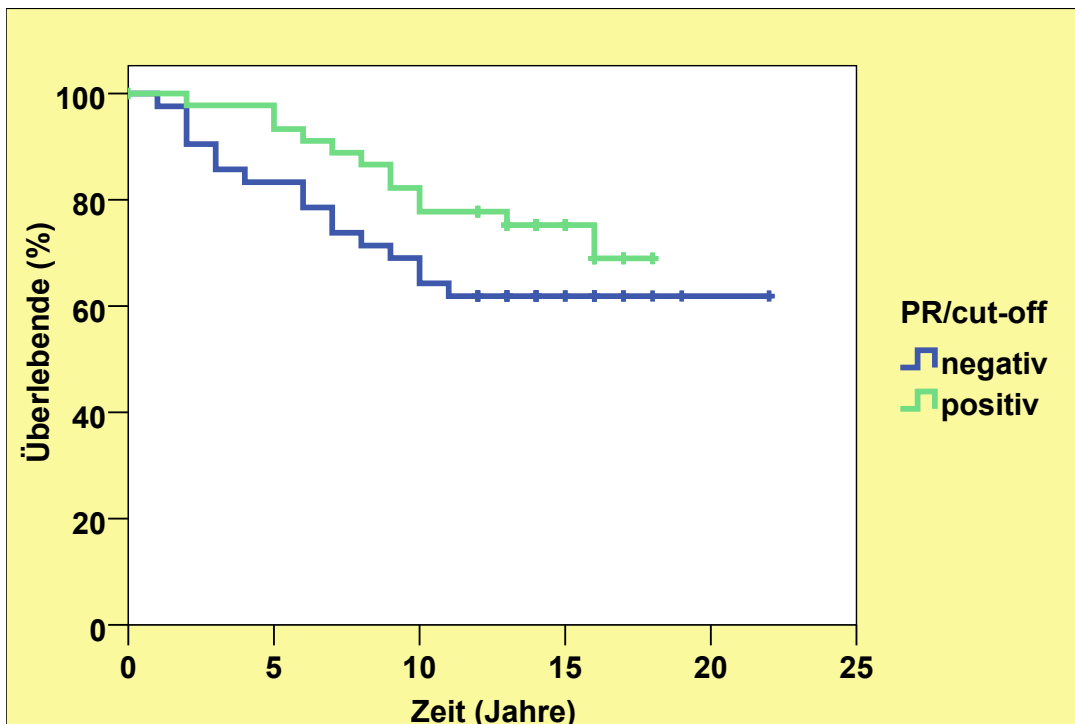


Abb. 15: Mortalität in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus

Auch hier übertrifft die geschätzte Überlebenszeit der Patientinnen mit nachgewiesenen PR-Rezeptoren (PR-IRS>4) geringfügig die Lebenserwartung bzw. geschätzte Überlebenszeit der Patientinnen, bei denen kein PR-Rezeptor im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte (IRS</=4) (15,3 a [CI 14,0a - 16,7a] vs. 15,8a [CI 13,3a - 18,3a]; Log Rank: p=0,190). Letztendlich haben 73,3% der PR-Rezeptor-Positiven und 61,9% der Patientinnen mit PR-negativen Karzinomen bis zum Abschluss der Studie überlebt, wie aus Abb. 15 deutlich wird.

Aus Abb. 16 werden sehr signifikante unterschiedliche Überlebensraten in Abhängigkeit vom Auftreten eines Rezidivs deutlich:

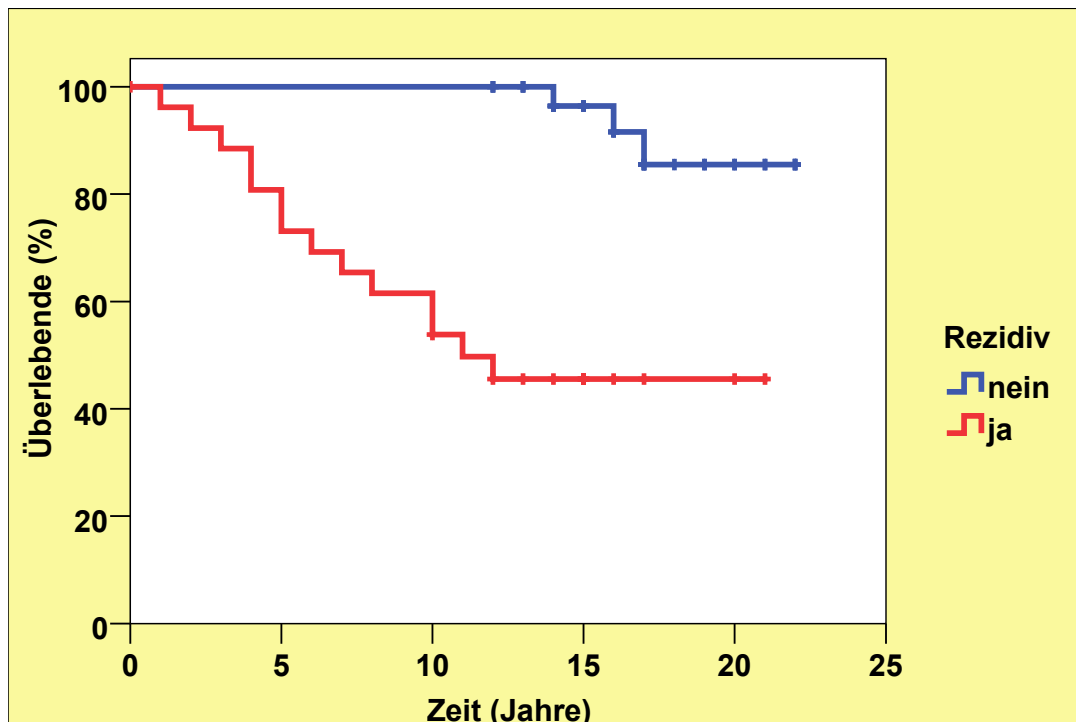


Abb. 16: Mortalität in Abhängigkeit vom Auftreten eines Rezidivs

Die geschätzte Überlebenszeit ist bei Auftreten eines Rezidivs signifikant kürzer als bei Rezidivfreiheit (13,0a [CI 10,0a - 16,0a] vs. 21,1a [CI 20,2a - 22,0a]; Log Rank: $p < 0,001$). Von denjenigen Patientinnen, bei denen bis zum Abschluss der Beobachtung kein Rezidiv vorliegt, leben am Ende noch 91,2%, während nur 46,2% der Patientinnen, die ein In-Brust-Rezidiv erlitten hatten, das Studienende erlebt haben (Abb. 16).

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Metastasen und der Mortalitätsrate ist sehr signifikant, wie die folgende Abb. 17 veranschaulicht:

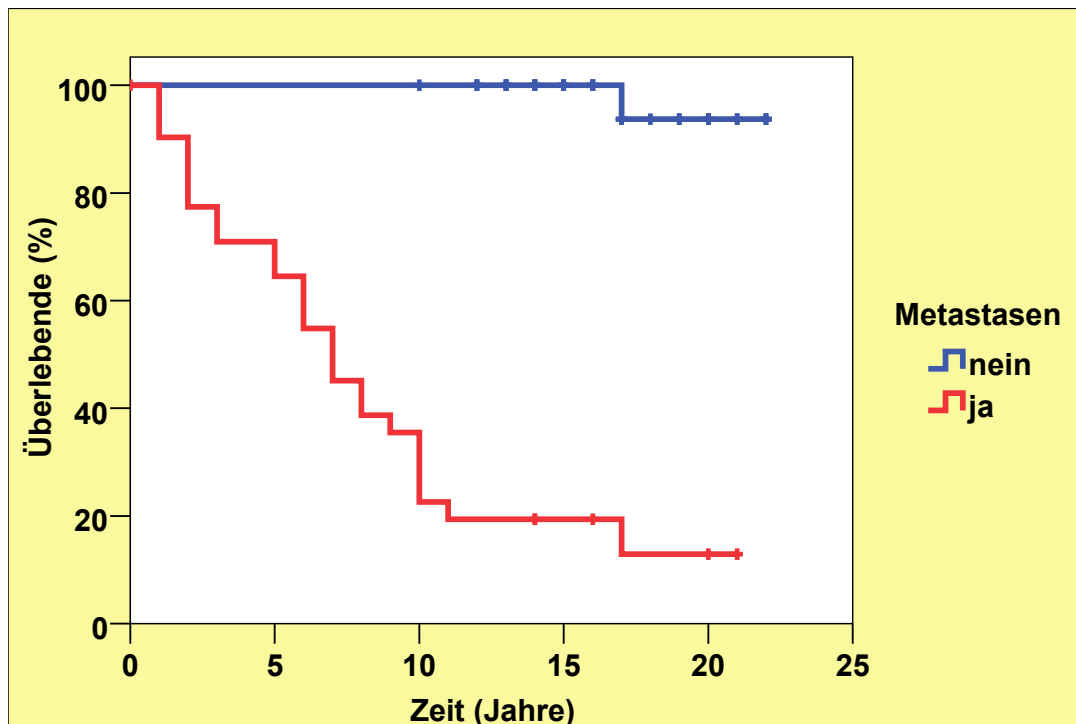


Abb. 17: Mortalität in Abhängigkeit vom Auftreten von Metastasen

Für Patientinnen, bei denen Metastasen aufgetreten sind, ergibt sich eine signifikant kürzere geschätzte Überlebenszeit im Vergleich zu Patientinnen ohne Metastasen (8,4a [CI 6,1a - 10,6a] vs. 21,7a [CI 21,1a - 22,3a]; Log Rank: $p < 0,001$). Aus Abb. 17 wird deutlich, dass 16,1% der Patientinnen mit Metastasen bis zum Zeitpunkt des Studienendes überlebt haben. Von der Gruppe ohne Metastasen leben hingegen noch 97,2%.

Abb. 18 zeigt den grenzwertig signifikanten Unterschied im Überleben von Patientinnen mit positiven und negativen M2-PK/cut-off-Werten:

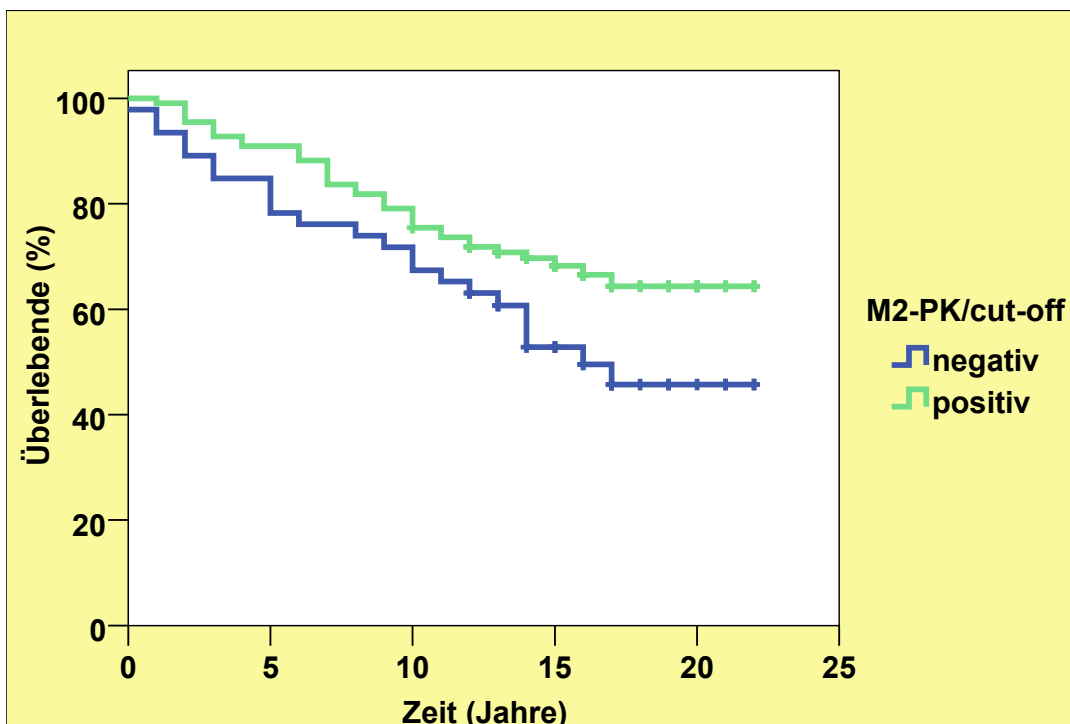


Abb. 18: Mortalität in Abhängigkeit vom M2-PK/cut-off

Die geschätzte Überlebenszeit ist bei fehlender M2-PK-Expression (IRS \leq 4) grenzwertig signifikant kürzer als bei vorhandener M2-PK-Expression (IRS $>$ 4) (14,7a [CI 12,4a - 17,0a] vs. 17,1a [CI 15,8a - 18,5a]; Log Rank: p=0,058). Wie aus Abb. 18 zu erkennen ist, haben 66,7% der Patientinnen mit positivem M2-PK (M2-PK-IRS $>$ 4) und 50,0% der Patientinnen ohne M2-PK-Expression (M2-PK-IRS \leq 4) das Ende der Nachbeobachtungszeit erlebt.

Die geringe Differenz der Überlebensraten bei unterschiedlichen pAkt/cut-offs zeigt Abb. 19.

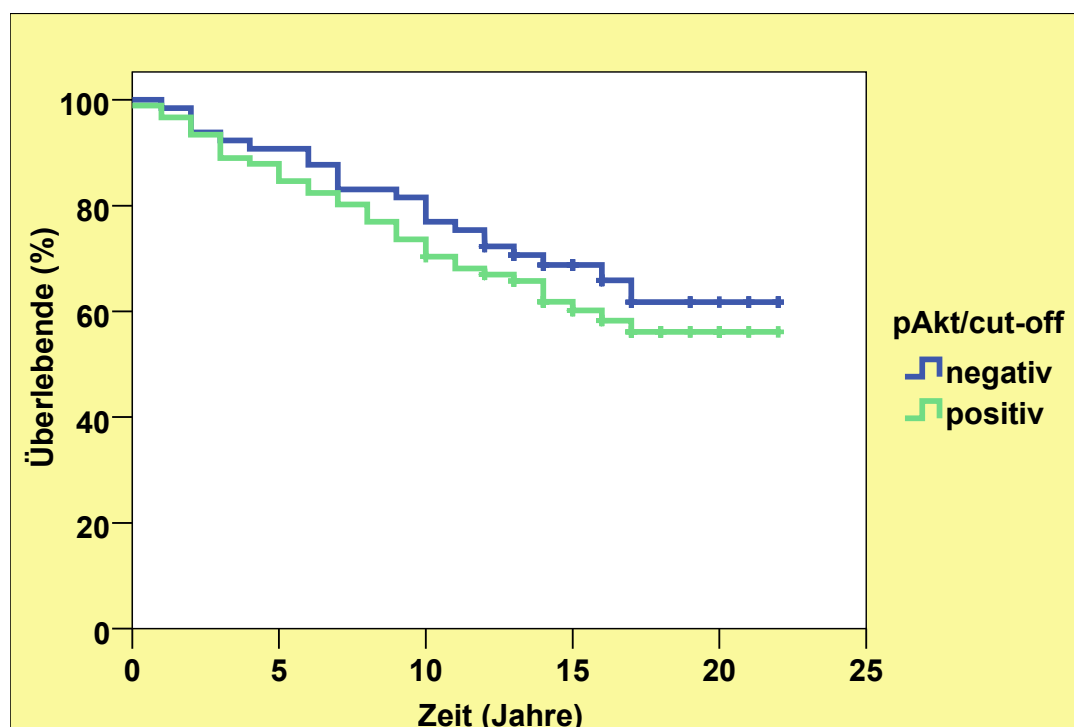


Abb. 19: Mortalität in Abhängigkeit vom pAkt/cut-off

Bei positivem pAkt/cut-off-Wert ($pAkt\text{-IRS} > 4$) liegt die geschätzte Überlebensrate unter der geschätzten Überlebensrate von Patientinnen mit $pAkt\text{-IRS} \leq 4$. Dies ist jedoch nicht signifikant (15,9a [CI 14,3a - 17,5a] vs. 17,1a [CI 15,3a - 18,8a]; Log Rank: $p=0,340$). Abb. 19 vergleicht die Überlebenskurven von Patientinnen mit positivem und negativem pAkt/cut-off. Zu Studienende weicht die Mortalität der Patienten mit $pAkt\text{-IRS} > 4$, um nur wenige Prozentpunkte von denjenigen ohne pAkt-Expression ($pAkt\text{-IRS} \leq 4$) ab.

3.3 Vergleich der Expression von M2-PK und pAkt

Der Chi-Quadrat-Test ergibt keinen signifikanten Zusammenhang für die immunreaktiven Scores von M2-PK und pAkt ($p=1,000$) und die entsprechenden cut-off-Werte ($p=0,600$).

3.4 Vergleich verschiedener Parameter mit M2-PK-Expression

Im Folgenden wird der Expressionsgrad von M2-PK (M2-PK-IRS) mit verschiedenen Parametern verglichen, um mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen: Patientenalter zum Diagnosezeitpunkt, Mortalität, Überlebenszeit, Tumorstadium (T-Stadium), Lymphknotenstatus (N-Stadium), Nachweis von Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR) im Tumorgewebe, Auftreten von Rezidiven und Metastasen und Expression von pAkt. Anschließend werden die gleichen Berechnungen für den M2-PK/cut-off-Wert vorgenommen. Die Abb. 20 zeigt die Signifikanzniveaus beim Vergleich der M2-PK-Expression mit den Patientendaten.

	Signifikanzniveau		Signifikanzniveau	
	M2-PK IRS	Mann-Whitney- U-Test	M2-PK cut-off	Chi-Quadrat- Test
Alter bei Diagnose	ns	p=0,591	ns	p=0,865
Mortalität (lebt j/n)	s	p=0,013	s	p=0,049
Überlebenszeit	ns	p=0,154	ns	p=0,385
T-Stadium	ns	p=0,563	ns	p=0,568
Lymphknotenstatus	ns	p=0,743	ns	p=0,720
ER	ns	p=0,625	ns	p=1,000
PR	ns	p=0,793	ns	p=0,439
Rezidiv	ns	p=0,646	ns	p=0,760
Metastasen	ns	p=0,476	ns	p=0,292

Abb. 20: Signifikanzniveaus beim Vergleich der M2-PK-Expression mit den Patientendaten

Der Mann-Whitney-U-Test weist nach, dass das Alter bei Primärdiagnose keinen signifikanten Einfluss auf den ermittelten M2-PK-Wert hat (p=0,591).

Die aus Abb. 20 ersichtlichen signifikanten Unterschiede der M2-PK-IRS von Überlebenden und Verstorbenen verifiziert Abb. 21:

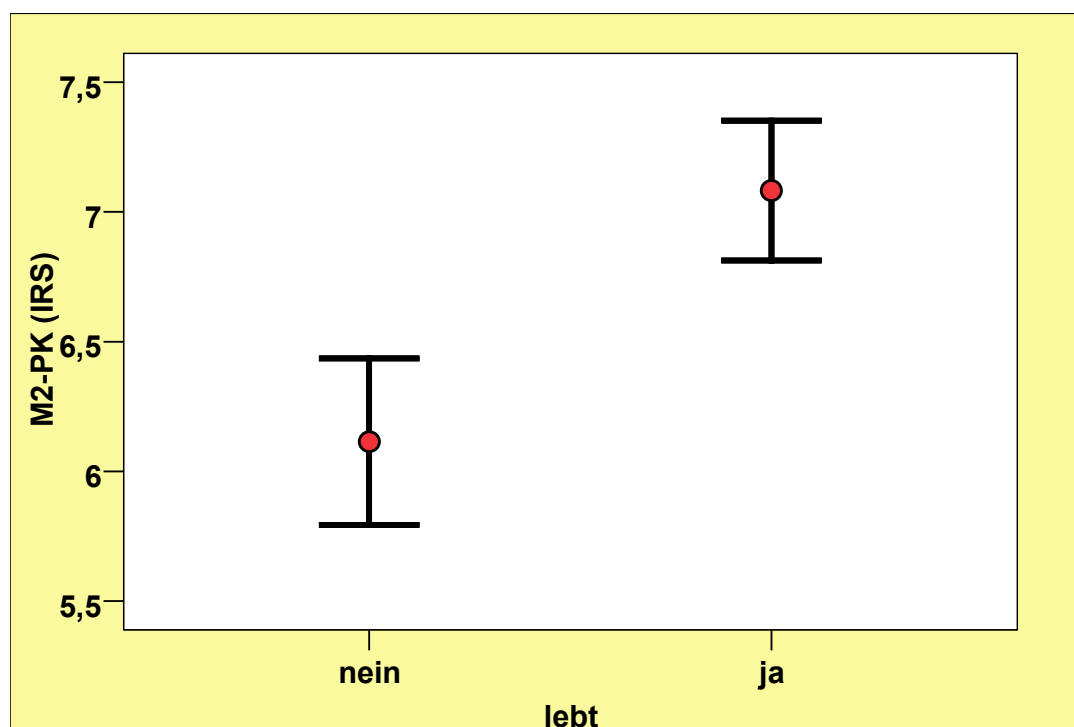


Abb. 21: Unterschiede des M2-PK/IRS bei Überlebenden und Verstorbenen

Beim Vergleich der M2-PK-IRS von verstorbenen und noch lebenden Patientinnen (Abb. 21) zeigt sich, dass Patientinnen, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorben sind, signifikant niedrigere M2-PK-Werte haben als Patientinnen, die noch am Leben sind ($p=0,013$).

Zwischen den immunreaktiven Scores für M2-PK und der Überlebenszeit kann kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p=0,154$).

Die Tumorstadien T_1 und T_2 weisen keinen signifikanten Einfluss auf die ermittelten M2-PK-Werte ($p=0,563$) auf. Das Stadium T_3 wird aufgrund der geringen Anzahl ($n=1$) nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Für die Vergleiche der M2-PK-Werte mit dem Nodalstatus ($p=0,743$) und mit der Ausprägung der Östrogen- ($p=0,625$) bzw. Progesteronrezeptoren ($p=0,793$) zeigt sich ebenfalls keine Signifikanz.

Der Mann-Whitney-U-Test ergibt keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Ausprägungsgrad der M2-PK und dem Auftreten von Rezidiven ($p=0,646$) oder Metastasen ($p=0,476$).

Mittels Chi-Quadrat-Test werden Berechnungen, in denen die oben genannten

Parameter mit dem M2-PK/cut-off-Wert abgeglichen werden, durchgeführt.

Für die Variablen Patientenalter bei Erstdiagnose ($p=0,865$), Überlebenszeit ($p=0,871$), Tumorstadium ($p=0,568$), Lymphknotenstatus ($p=0,720$), Östrogenrezeptorstatus ($p=1,000$), Progesteronrezeptorstatus ($p=0,439$), Rezidiv ($p=0,760$) und Metastasen ($p=0,292$) ist ebenfalls keine Signifikanz nachweisbar.

Das in Abb. 20 beschriebene signifikante Ergebnis für die Mortalität mit $p=0,049$, wird durch Abb. 22 veranschaulicht:

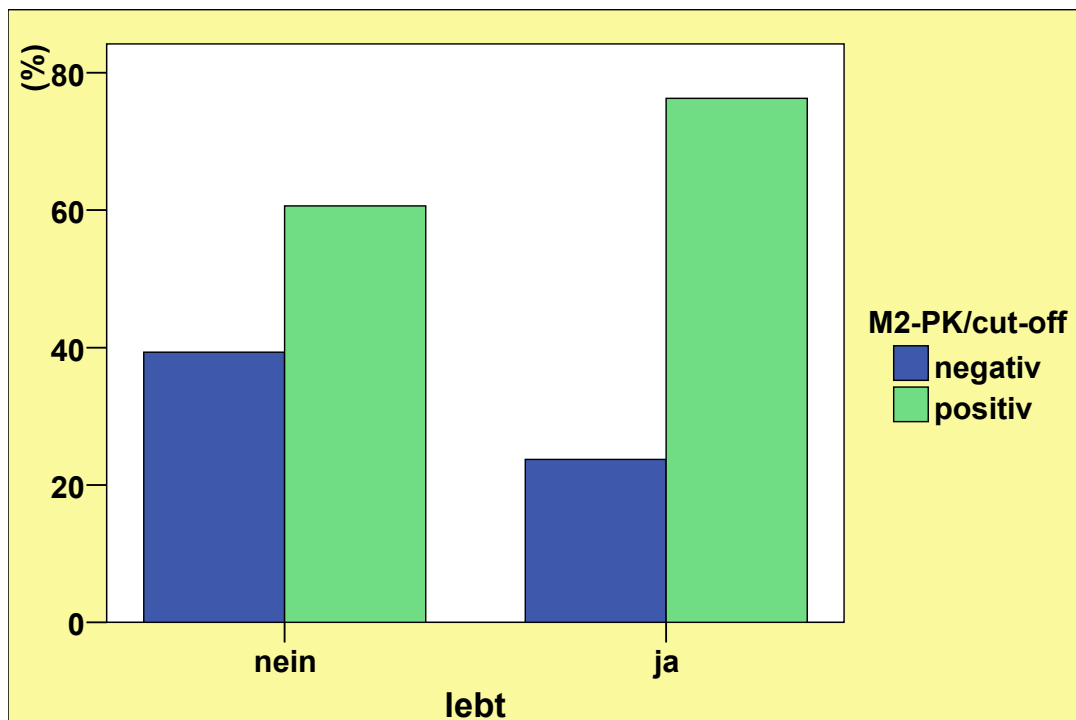


Abb. 22: Unterschiede des M2-PK/cut-off bei Überlebenden und Verstorbenen

Von den Patienten, die am Ende der Studie noch lebten haben 76,3% positive und nur 23,7% negative M2-PK/cut-offs. Bei den Verstorbenen sind 60,7% M2-PK-positiv und 39,3% negativ. Insgesamt betrachtet weisen 70,3% der Patientinnen ($n=111$) eine M2-PK-Überexpression auf.

3.5 Vergleich verschiedener Parameter mit pAkt-Expression

Das Patientenalter bei Diagnosestellung, die Mortalität, die Überlebenszeit, das Tumorstadium, der Lymphknotenstatus, das Vorhandensein von Progesteron- bzw. Östrogenrezeptoren im Tumorgewebe, sowie das Auftreten von Rezidiven und Metastasen werden im Folgenden jeweils mit dem Ausprägungsgrad von pAkt (pAkt-IRS) und mit dem pAkt/cut-off-Wert verglichen (Abb. 23).

	Signifikanzniveau		Signifikanzniveau	
	pAkt IRS	Mann-Whitney-U-Test	pAkt cut-off	Chi-Quadrat-Test
Alter bei Diagnose	ns	p=0,116	s	p=0,038
Mortalität (lebt j/n)	ns	p=0,841	ns	p=0,324
Überlebenszeit	ns	p=0,654	ns	p=0,871
T-Stadium	ns	p=0,673	ns	p=0,523
Lymphknotenstatus	ns	p=0,894	ns	p=0,319
ER	ns	p=0,106	ns	p=0,080
PR	ns	p=0,545	ns	p=1,000
Rezidiv	ns	p=0,837	ns	p=1,000
Metastasen	ns	p=0,980	ns	p=0,626

Abb. 23: Signifikanzniveaus beim Vergleich der pAkt-Expression mit den Patientendaten

In Bezug auf das Patientenalter bei Erstdiagnose lässt sich für pAkt-IRS keine Signifikanz nachweisen (p=0,116).

Ebenfalls kein signifikantes Ergebnis liefern die Berechnungen zu Mortalität (p=0,841) und Überlebenszeit (p=0,654).

Auch zwischen dem T-Stadium (p=0,673), dem Lymphknotenstatus (p=0,894), der Ausbildung von ER- (p=0,106) und PR-Rezeptoren (p=0,545) sowie dem Auftreten von Rezidiven (p=0,837) und Metastasen (p=0,980) verglichen mit pAkt-Werten findet sich kein Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang.

Betrachtet man jedoch den pAkt/cut-off zeigen sich signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Patientenalter wie auch Abb. 24 veranschaulicht.

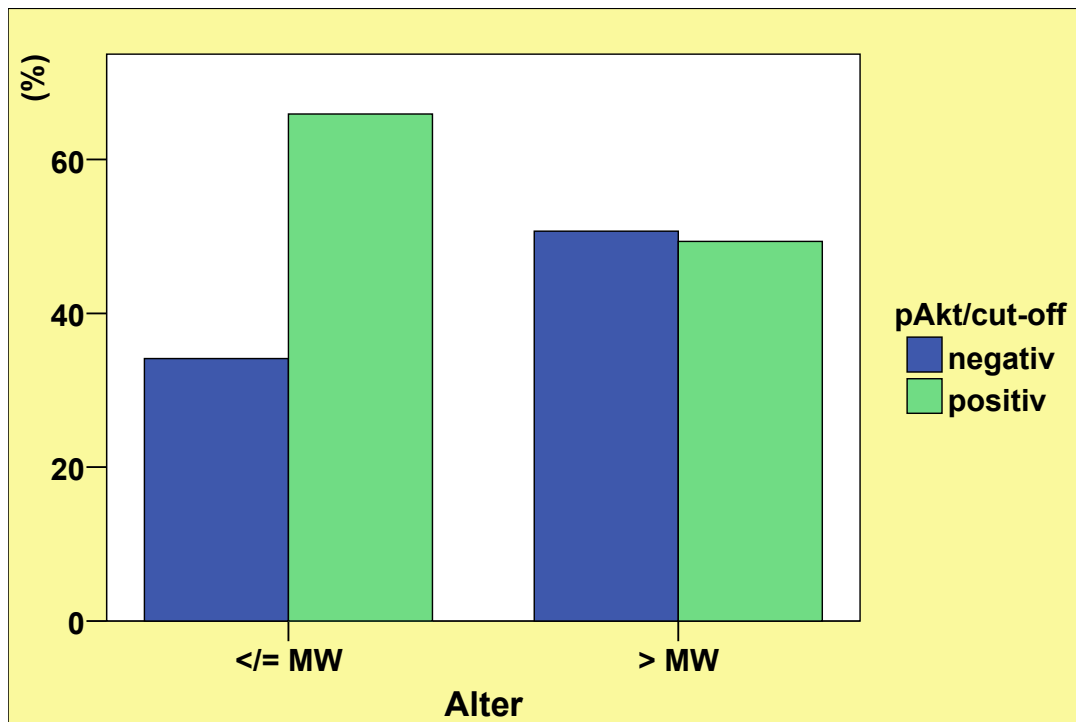


Abb. 24: Unterschiede des pAkt/cut-off in Abhängigkeit vom Alter

Vergleicht man den pAkt/cut-off mit jeweils einer Patientengruppe, deren Alter zum Zeitpunkt der Diagnose unterhalb des Mittelwertes liegt bzw. dem Mittelwert entspricht und einer Gruppe von Patientinnen deren Alter den Mittelwert übersteigt (Abb. 24), so kann mit Hilfe des exakten Tests nach Fischer eine signifikant höhere Expression von pAkt im Tumorgewebe von Patientinnen unterhalb des Durchschnittsalters von 52 Jahren nachgewiesen werden ($p=0,038$).

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem pAkt/cut-off und der Mortalität ($p=0,324$), der Überlebenszeit ($p=0,871$), dem Tumorstadium ($p=0,523$), dem Lymphknotenstatus ($p=0,319$), dem PR ($p=1,000$), sowie dem Auftreten von Rezidiven ($p=1,000$) oder Metastasen ($p=0,626$).

Bezüglich des Östrogenrezeptorstatus zeigt sich im Chi-Quadrat-Test ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ($p=0,080$), jedoch ein Trend zu positivem pAkt-Nachweis bei negativer Hormonrezeptorexpression.

3.6 Cox-Regressionsanalyse

Zur Ermittlung unabhängiger Prognosefaktoren für die Überlebenszeit wird die Cox-Regressionsanalyse verwendet. In die Analyse fließen die Werte Alter bei Diagnosestellung, T-Stadium, Lymphknotenstatus, M2-PK/cut-off und pAkt/cut-off ein.

Aufgrund unvollständiger Datenerfassung werden die Parameter ER- und PR-Rezeptorstatus, sowie aufgetretene Rezidive oder Metastasen nicht in die Analyse mit einbezogen.

Das Alter und der Lymphknotenstatus werden als unabhängige Determinanten der Mortalität identifiziert ($p=0,032$ bzw. $p=0,011$), während für den M2-PK/cut-off-Wert eine grenzwertige Signifikanz als unabhängige Determinante für Mortalität besteht ($p=0,059$).

Keine Signifikanz bestehen für das Tumorstadium ($p=0,353$) und den pAkt/cut-off ($p=0,182$).

4 Diskussion

Brustkrebs ist eine sehr gut untersuchte Tumorentität, trotzdem ist bisher nur wenig über die Einflüsse des Glukosestoffwechsels auf die Progredienz der Erkrankung und die Überlebenszeit bekannt. Indikatoren für Veränderungen im Zuckerstoffwechsel wurde in der Vergangenheit nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet. In letzter Zeit erlangten verschiedene Glykolysemarker, die den in Krebszellen abgewandelten Glukosemetabolismus anzeigen, wachsendes Interesse. Über die prognostische Relevanz, die die Expression dieser Marker im Mammakarzinomgewebe besitzt, ist bis heute nur wenig bekannt. Inwiefern sie als mögliche therapeutische Ansatzpunkte in der Krebsbehandlung dienen können und welche Bedeutung sie als prädiktive Faktoren haben, muss noch genauer erforscht werden.

In dieser experimentellen Studie wurde primäres Mammakarzinomgewebe von 160 Patientinnen auf die Expression von M2-PK und pAkt untersucht. Um zuverlässige prognostische Aussagen zu ermöglichen, wurde ein Kollektiv mit einer sehr langen Nachbeobachtungszeit von mindestens 13 Jahren nach Diagnosestellung und brusterhaltender operativer Therapie ausgewählt. Von den Patientinnen wurden Daten erhoben, die Informationen über das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (T-Stadium, Nodalstatus), den Hormonrezeptorstatus, das Alter, die aufgetretenen Metastasen und Rezidive sowie die krankheitsspezifische Mortalität beinhalten. Die gesammelten Überlebensdaten wurden statistisch ausgewertet und mit den Resultaten der immunhistochemischen Färbungen in Bezug gesetzt.

4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Im Vergleich zu Studien, die sich mit der allgemeinen Prognose und bereits etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms befassen, ist ein Kollektiv von 160 Patientinnen relativ klein und der Beobachtungszeitraum durchschnittlich (z. B.: *Hatteville*: n=3180, 20a; *Arriagada*: n=2410, 25a). Das gilt aber nicht für die Untersuchungen, die bisher zur Tumor-M2-PK und zum pAkt beim Mammakarzinom durchgeführt wurden. Insbesondere für M2-PK sind

die Fallzahlen und Beobachtungszeiträume dieser Studien kleiner als in der vorliegenden Arbeit (*Lüftner*: n=67, 4 Wochen; *Thomas*: n=18, 12 Monate; *Hoopmann*: n=20, 13 Monate). In Bezug auf pAkt sind bereits größere Patientenzahlen untersucht worden, aber in diesen Studien waren die Beobachtungszeiträume kürzer: *Kirkegaard*: n=402, 6,45a; *Andre*: n=781, 10a; *Tokunaga*: n=252; maximal 14a; *Schmitz*: n=99, 10a; *Vestey*: n=95, 51 Monate). Der Nachbeobachtungszeitraum dieser Arbeit mit mindestens 13 bis zu 23 Jahren nach Primärdiagnose ist verglichen mit früheren Studien, die die prognostische und prädiktive Relevanz von Glykolysemarkern untersucht haben, ungewöhnlich lang.

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung ist mit 52 Jahren niedriger als der Bundesdurchschnitt. Laut RKI liegt das mittlere Erkrankungsalter für Brustkrebs in Deutschland aktuell bei 63 Jahren (*Batzler et al. 2008*). Übereinstimmend mit den Daten des statistischen Bundesamts ist in der vorliegenden Studie ein Anstieg der Inzidenzrate mit zunehmendem Alter, insbesondere zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr, zu beobachten (*Giersiepen et al. 2005*).

Bei den Patientinnen der UFK in Würzburg lagen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung überwiegend Tumoren vor, die kleiner als 2 cm (78,8% T₁-Tumoren) oder maximal 5 cm (20,6% T₂-Tumoren) groß waren. Lediglich 0,6% der Karzinome wurden im bereits fortgeschrittenen Stadium T₃ diagnostiziert. Die Daten des Würzburger Kollektivs spiegeln exakt die Ergebnisse aus deutschlandweiten Mammographie-Screening-Untersuchungen wider, bei denen 79,5% der Karzinome im Stadium T₁, 19,6% im Stadium T₂ und 0,9% im Stadium T₃ diagnostiziert worden sind (*Giersiepen et al. 2005*).

Lymphknotenmetastasen wurden bei den Studienteilnehmerinnen aus Würzburg häufiger festgestellt (36,2%) als bei Teilnehmerinnen bundesweiter Früherkennungsmaßnahmen (16,9%). Das liegt jedoch in erster Linie daran, dass für die vorliegende Studie nur Patientinnen mit invasiven Karzinomen rekrutiert wurden, während *Giersiepen* in die Auswertungen des Mammographie-Screenings auch nichtinvasive Vorstufen (Carcinomata in situ) einbezogen hat.

Bei der histologischen Klassifikation stimmt die Häufigkeitsverteilung des

Würzburger Kollektivs mit internationalen Daten überein, wonach die duktales (70,0-80,0%) und lobulären Karzinome (10,0-15,0%) die weitaus häufigsten sind.

Im Mittelpunkt der Brustkrebsbehandlung steht nach wie vor die lokale Entfernung des Tumors (Kreienberg et al. 2008). Orientierend am Tumorstadium wurde bei allen Studienteilnehmerinnen als operative Therapie eine brusterhaltende Operation mit Axilladissektion durchgeführt. Allgemein wird diese Operationsmethode heute in 70,0-80,0% der Fälle angewandt und wird in aller Regel mit der Entfernung der Achsellymphknoten kombiniert (Giersiepen et al. 2005). Im Anschluss an die Operation erfolgte als therapeutischer Standard die Nachbestrahlung des verbliebenen Mammagewebes. Die Auswahl weiterer systemisch wirksamer Therapien erfolgte bei den 160 Patientinnen dieser Studie, wie allgemein üblich, nach Risikostratifizierung.

Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der adjuvanten Therapiemethoden ist der Hormonrezeptorstatus. Die Expression der Hormonrezeptoren im Mammakarzinomgewebe wird erst seit 1989 untersucht. Deshalb war der Östrogenrezeptorstatus nur für 92 und der Progesteronrezeptorstatus für 88 Gewebeproben bestimmt worden, wovon 38,0% eine ER- und 52,3% eine PR-Expression aufwiesen. In der internationalen Literatur finden sich unterschiedliche Expressionsgrade für den Östrogenrezeptor, sie liegen deutlich höher als im Kollektiv dieser Studie. Der Anteil an ER-positiven Karzinomen variiert zwischen 59,3% (Schmitz et al. 2004), 61,0% (Vestey et al. 2005), 66,8% (Cañizares et al. 2001) und 78,3% (Hilsenbeck et al. 1998).

Die Häufigkeit, mit der in den untersuchten Gewebeproben PR-Expression nachgewiesen wurde, liegt nur knapp über dem Durchschnitt der Resultate aus anderen Studien, bei denen von 46,6% (Tokunaga et al. 2006) bis 54,7% (Cañizares et al. 2001) PR-positive Tumoren gefunden worden sind.

Für die lückenlose Erfassung von Überlebensdaten sind ein hohes Maß an Compliance und exakte Dokumentation erforderlich. So lässt sich erklären, dass lediglich von 60 Patientinnen bekannt ist, ob sich ein Rezidiv entwickelt hat, und dass die gesammelten Daten nicht mit den Häufigkeiten der

Gesamtbevölkerung übereinstimmen. In Würzburg ist bei 43,3% (n=26) der 60 Patientinnen ein lokoregionäres Rezidiv aufgetreten, während laut RKI nur in 5,0-8,0% der Fälle mit einem In-Brust-Rezidiv zu rechnen ist (Giersiepen et al. 2005). Diese Diskrepanz ist wohl dadurch entstanden, dass Rezidivfreiheit meistens nicht explizit dokumentiert wird und dass die Patientinnen der vorliegenden Studie sehr lange nachbeobachtet worden sind. Unter der Annahme, dass die Patientinnen, deren Krankheitsverlauf in puncto Rezidiv unbekannt ist, nicht dokumentiert wurden, da sie rezidivfrei geblieben sind, läge die Häufigkeit für ein In-Brust-Rezidiv mit 16,3% deutlich niedriger.

Ebenso schwierig ist die Datenregistrierung für das Auftreten von Fernmetastasen. Dies ist möglicherweise ein Grund dafür, dass es keine Vergleichsdaten des RKI für die Häufigkeit des Auftretens von Fernmetastasen bei deutschen Brustkrebspatientinnen gibt. Außerdem führen die systematische Suche nach Fernmetastasen, sowie deren frühe Erkennung und Behandlung laut RKI zu keinem Überlebensvorteil (Giersiepen et al. 2005). In der Würzburger Studie können diesbezüglich Angaben zu 68 Probandinnen gemacht werden. Bei 47,1% dieser Frauen waren während des Nachbeobachtungszeitraums Metastasen zu verzeichnen. In anderen Studien mit größeren Teilnehmerzahlen wurden seltener Metastasen beobachtet. Bei einer Nachbeobachtungszeit zwischen 8 und 25 Jahren werden in der Literatur folgende Werte genannt: *Pass* 12,0%, *Touboul* 14,0%, *Veronesi (1995)* 18,5% und *Kini* 19,0%. Da die Abweichungen von der Literatur auch in puncto Metastasen drastisch sind, liegt hier die gleiche Vermutung nahe wie bei den Werten für Rezidive. Nimmt man auch hier an, dass die Mehrzahl der unbekannteren Verläufe nicht dokumentierte Metastasenfreiheit bedeutet, so läge die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen nur bei 20,0%.

Bezüglich der Überlebenszeit ergeben sich aufgrund der statistischen Auswertungsmethode Ungenauigkeiten. Die Überlebenskurve stellt sich für Überlebenszeiten, die mehr als 13 Jahre betragen verzerrt dar: Der Rekrutierungszeitraum umfasst die Jahre 1985 bis 1995, also insgesamt 10 Jahre. Der Nachbeobachtungszeitraum endet für alle Studienteilnehmer im Jahr 2008. Das heißt, dass sich für Patientinnen, die erst 1995 in die Studie

aufgenommen wurden, eine maximal mögliche Überlebenszeit von lediglich 13 Jahren ergibt. Betrachtet man die Überlebenszeiten 14 bis 23 Jahre, so sinken die Häufigkeiten für das Überleben schon allein wegen abnehmender Patientenzahlen. Es lässt sich also nur eingeschränkt eine Aussage über die mittlere Überlebenszeit treffen. Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft bezüglich der Überlebenszeit ergibt sich wie folgt: Weil nicht in jedem Jahr gleich viele Patientinnen für die Studie rekrutiert werden konnten, sind auch Überlebenszeiten, die geringer als 13 Jahre sind, nur bedingt für eine Aussage bezüglich der Überlebensrate verwendbar.

Daten zum krankheitsspezifischen Überleben, die das Mammakarzinom als Todesursache dokumentieren, sind nur schwer zu erheben. Die genaue Todesursache konnte in der vorliegenden Studie nur für 21 Patientinnen eruiert werden, wovon 76,2% an Brustkrebs verstorben sind. Aufgrund der geringen Anzahl sind diesbezüglich keine verlässlichen statistischen Aussagen möglich. Es fand sich bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens nur eine Studie mit Vergleichswerten. Von *Schmitz* wird berichtet, dass sich die Todesursache für 27 von insgesamt 106 Studienteilnehmerinnen nachvollziehen lies. Hiervon waren 70,1% der Patientinnen an Brustkrebs verstorben (Schmitz et al. 2004).

4.2 Diskussion der Kaplan-Meier-Analysen und Cox-Regression

Bei den Kaplan-Meier-Analysen gelten bezüglich der Mortalitätsraten die gleichen Einschränkungen in der Aussagekraft wie bereits für die Überlebenszeit beschrieben, da der Rekrutierungszeitraum einen Zeitraum von 10 Jahren umfasst und sich somit unterschiedliche Ausgangswerte für den Startzeitpunkt der Nachbeobachtungsphase ergeben. Diese Ungenauigkeiten basieren auf der statistischen Auswertungsmethode, die jedoch allgemein für diese Art von Daten angewendet wird. Um Vergleiche mit nationalen Daten des deutschen Krebsregisters und anderen Studien zu ermöglichen, wurde zur Schätzung der Mortalitätsraten trotz der erwähnten Unklarheiten die Methode nach Kaplan-Meier eingesetzt. Gleichwohl sollte in Zukunft eine Prüfung der Aussagekraft dieses Rechenwegs erfolgen und es ist empfehlenswert, andere Verfahren für die Erstellung von Überlebensstatistiken anzuwenden.

Die geschätzte mittlere Überlebenszeit der brusterhaltend therapierten Patientinnen dieser Studie beträgt 16,4 Jahre. Die Fünfjahresgesamtüberlebensrate liegt bei 88,0% und damit über der Fünfjahresüberlebensrate des saarländischen Krebsregisters aus dem Diagnosezeitraum 1990 bis 94, die laut RKI 78,0% beträgt. Die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt über alle Stadien hinweg in Deutschland aktuell bei 81,0% (Batzler et al. 2008). In der vorliegenden Studie waren nach 10 Jahren 73,0%, nach 15 Jahren 64,0% und am Studienende noch 61,8% der Patientinnen am Leben. Für die Überlebensraten 10 bzw. 15 Jahre nach Primärdiagnose liegen keine bundesweiten Vergleichsdaten vor. Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Krankheitsverlauf in den ersten fünf Jahren nach Diagnosestellung bei den Patientinnen aus Würzburg günstiger ausgefallen ist, als nach bundesdeutschem Durchschnitt zu erwarten gewesen wäre.

Im vorliegenden Kollektiv hatte das Alter bei Diagnosestellung keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben, es konnte jedoch durch die Cox-Regressionsanalyse als unabhängige Determinante der Mortalität identifiziert werden. Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven haben hingegen gezeigt, dass Frauen unter 35 Jahren eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen (Kroman et al. 2000, Kaufmann et al. 2005, Soerjomataram et al. 2008). Gleiches gilt auch für Frauen, die bei Diagnosestellung älter als 70 Jahre sind (Fisher et al. 2001, Arriagada et al. 2006, Soerjomataram et al. 2008). Internationale Experten stimmen darin überein, dass ein Erkrankungsalter unter 35 Jahren ein nachteiliger Faktor für die Prognose ist (Goldhirsch et al. 2007), was durch aggressivere Tumoreigenschaften bei jüngeren Patienten erklärt wird (Cluze et al. 2009). Bei der Studie von *Maggard* besitzt das Alter bei Diagnosestellung auch nach Kontrolle anderer etablierter Prognosefaktoren eine signifikante Relevanz (Maggard et al. 2003). Ob es wirklich einen Bezug zwischen dem Alter und dem Überleben gibt, wird jedoch derzeit noch kontrovers diskutiert (Cluze et al. 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die Aussage von *Rapiti*, dass das Alter keinen prognostisch relevanten Faktor darstellt (Rapiti et al. 2005).

Das Tumorstadium dient international als etablierter Prognosefaktor (Decker et

al. 2009). Verschiedene Studien an bis zu 24.740 Brustkrebspatientinnen zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Tumordurchmesser und der Überlebenszeit auf (Quiet et al. 1995, Rosen et al. 1993, Carter et al. 1989). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwischen der Tumorgröße und der Überlebenszeit durch die Kaplan-Meier- und die Cox-Regressionsanalyse kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Im Gegenteil, am Studienende lag die Mortalitätsrate bei Patienten mit T₂-Tumoren unter der Rate derjenigen mit T₁-Tumoren. Dies lässt sich am ehesten durch die heterogene Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv erklären, denn die große Mehrzahl (123 von insgesamt 156) der Studienteilnehmerinnen wiesen Tumoren unter 2 cm Durchmesser (T₁) auf. Lediglich 33 Frauen hatten größere Tumoren im Stadium T₂.

Der axilläre Lymphknotenstatus ist der stärkste Prognosefaktor (Decker et al. 2009). Sind die Lymphknoten befallen, so erhöht sich die Mortalität um das Vier- bis Achtfache. Auch das Rezidivrisiko ist dann so stark erhöht, dass allein anhand dieses einen Faktors die Entscheidung für eine adjuvante systemische Therapie getroffen wird (Arriagada et al. 2006). Die prognostische Aussagekraft des Lymphknotenstatus wird eindeutig durch die vorliegende Studie an den Würzburger Patientinnen bestätigt, denn die geschätzte Überlebenszeit war bei positivem Nodalstatus signifikant kürzer als bei den nodalnegativen Patientinnen. Außerdem konnte der Nodalstatus auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse als stärkster Prognosefaktor bestätigt werden.

Im Zeitverlauf ließ sich beobachten, dass der Nachweis von Östrogen- sowie Progesteronrezeptoren einen Überlebensvorteil für die Patientinnen bedeutet, der für nur Progesteronrezeptorpositive etwas geringer ausfällt. Exprimiert das Karzinom keine ER, so erhöht dies die Mortalität um das 1,5- bis 2-fache (McGuire et al. 1990). Das Vorhandensein von Hormonrezeptoren lässt Voraussagen über das Ansprechen einer Hormontherapie zu (Clarke et al. 2005) und dient daher eher als prädiktiver denn als prognostischer Marker (Harris et al. 2007, Soerjomataram et al. 2008). Allerdings kann die prädiktive Aussagekraft auch von der unterschiedlich starken Expression beider Hormonrezeptoren abhängen (Goldhirsch et al. 2007, Decker et al. 2009). Die

prognostische Aussagekraft des ER- und PR-Status ist laut verschiedener Studien als gering einzustufen (Vorgias et al. 2001, Vincent-Salomon et al. 2001) oder sogar vernachlässigbar klein (Reed et al. 2000). Dies gilt laut *Costa* vor allem für die ersten Jahre nach Diagnosestellung (Costa et al. 2002), während *Hilsenbeck* gegenteilige Beobachtungen gemacht hat (Hilsenbeck et al. 1998).

Die geschätzte Überlebenszeit der Patientinnen war signifikant kürzer, wenn Metastasen oder ein Rezidiv aufgetreten sind. Diese Beobachtungen werden laut *Soerjomataram* 2008 durch die internationale Literatur eindeutig bestätigt (Fisher et al. 2001, Hatteville et al. 2002, Wapnir et al. 2006). *Hatteville* berichtet, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit 20 Jahre nach Diagnosestellung von 78,0% auf 72,0% bei rezidiviertem und auf lediglich 18,0% bei metastasiertem Mammakarzinom sinkt. In dieser Studie, mit einer Nachbeobachtungszeit von 23 Jahren, war der Unterschied noch deutlicher. Hier betrug die Überlebensrate für Patientinnen ohne Rezidiv 91,2% und sank, sobald ein Rezidiv zu verzeichnen war, auf 46,2% ab. Bei Vorliegen von Metastasen war das Bild noch deutlicher, hier verringerte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit von 97,2% auf 16,1%.

4.3 Die prognostische Bedeutung der M2-PK-Expression

Die prognostische und prädiktive Aussagekraft der Tumor-M2-Pyruvatkinase wurde bereits für viele Krebsarten untersucht. Die meisten Studien basieren auf Vergleichen der Tumor-M2-PK-Plasmakonzentration mit etablierten Prognosemarkern und dem Krankheitsverlauf. Diese Methode wurde durch *Eigenbrodt* entwickelt, der durch Untersuchungen an menschlichen Tumoren zeigen konnte, dass Tumorzellen die dimere Form der M2-Pyruvatkinase überexprimieren. Dabei korrelierte die Malignität mit der quantitativen Determinierung der M2-PK (Eigenbrodt et al. 1992). Seither wurden viele Studien durchgeführt, die zeigten, dass der quantitative Nachweis von M2-PK zur Diagnosestellung und Therapiekontrolle bei verschiedenen Krebserkrankungen dienen kann.

Für folgende Tumorentitäten liegen diesbezüglich signifikante Ergebnisse vor:

Das Mammakarzinom (Lüftner et al. 2000, Hoopmann et al. 2002, Lüftner et al. 2003, Thomas et al. 2005), gastrointestinale Karzinome (Eigenbrodt et al. 1997, Hardt et al. 2000, Schulze 2000, Lüftner et al. 2001, Kim et al. 2003, Schneider und Schulze 2003b, Zhang et al. 2004, Schneider et al. 2005), das Zervixkarzinom (Kaura et al. 2004, Jeschke 2008), das Ovarialkarzinom (Ahmed et al. 2007), das Bronchialkarzinom (Schneider et al. 2000a, Sapoutzis und Oremek 2002, Schneider et al. 2002, Schneider et al. 2003a), das Nierenzellkarzinom (Oremek et al. 1999, Oremek et al. 2000, Roigas et al. 2000, Hegele et al. 2003), das Pankreaskarzinom (Oremek et al. 1997, Cerwenka et al. 1999, Ventrucci et al. 2004), sowie das Melanom (Ugurel et al. 2005). Hingegen konnte dem Grad der M2-PK-Expression für Schilddrüsen- (Bena-Boupda et al. 2003), Hoden- (Pottek et al. 2000), Blasen- und Prostatakarzinome (Roigas et al. 2001, Hegele et al. 2003), neuroendokrine (Pezzilli et al. 2003), sowie hämatologische Tumorerkrankungen (Oremek et al. 2003, Staib et al. 2006) keine Bedeutung beigemessen werden.

Da bereits vielversprechende Ergebnisse zur Relevanz der Tumor-M2-PK bei Brustkrebs durch die Bestimmung der Plasmakonzentration erzielt wurden, wurde in der vorliegenden Studie direkt das Mammakarzinomgewebe mittels monoklonaler Antikörper auf tumorspezifische dimere M2-PK untersucht, um zu eruieren, ob der Ausprägungsgrad zum Diagnosezeitpunkt mit dem langfristigen klinischen Verlauf in Verbindung steht (Benesch et al. 2010). Die immunhistochemische Auswertung der Gewebeproben zeigte in 70,0% (n=112) der Karzinome eine Überexpression des M2-PK Dimers (Abb. 9). Für die M2-Pyruvatkinase-Färbung in Mammakarzinomgewebe können in der gängigen Literatur keine Referenzwerte gefunden werden, da in bisherigen Studien lediglich Blutuntersuchungen vorgenommen worden sind.

Für den M2-PK/cut-off zeigte sich in der Cox-Regressionsanalyse eine grenzwertige Signifikanz als unabhängige Determinante der Mortalität und die geschätzte Überlebenszeit von Patientinnen mit übermäßig starker M2-PK-Expression im Tumorgewebe war grenzwertig signifikant länger (Abb. 18). Am Studienende waren 66,7% der M2-PK-Positiven am Leben, jedoch nur 50,0% der Negativen. Ähnliche Resultate ergaben sich auch für den M2-PK-IRS.

Patientinnen, die innerhalb des Beobachtungszeitraums verstorben sind, hatten signifikant niedrigere M2-PK-Werte (Abb. 21). Somit kommt in Betracht, dass die Rolle der M2-PK in einer verhältnismäßig langsam wachsenden Tumorentität, wie dem Mammakarzinom, eine andere ist als in schneller proliferierenden Krebsarten, wie zum Beispiel Kolon- oder Ovarialkarzinomen (Benesch et al. 2010). Für Tumorentitäten mit langsamem Erkrankungsprogress scheint die Energiegewinnung ein wichtigerer Faktor als die Zellteilung zu sein (Schmidt et al. 2010). Es ist also denkbar, dass Tumorzellen, bei denen die Energiegewinnung im Vordergrund steht, vor allem die tetramere Isoform der M2-PK aufweisen und damit die gleichen Eigenschaften wie normale, proliferierende Zellen besitzen (Mazurek et al. 2005). Dies erklärt auch, dass Mammakarzinomzellen in den relativ frühen Erkrankungsstadien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, einen niedrigeren M2-PK-Expressionsgrad aufweisen. Um die M2-PK eindeutig als unabhängigen Prognosefaktor für das Langzeitüberleben bei Brustkrebs zu identifizieren, sollten in der Zukunft Untersuchungen an größeren Kollektiven durchgeführt werden, da hier signifikante Werte zu erwarten sind.

Zwischen der Überlebenszeit und der Konformation der M2-PK konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Der Ausprägungsgrad der dimeren M2-PK (M2-PK-IRS) im Mammakarzinomgewebe fungiert zwar langfristig als prognostischer Faktor für das Überleben von Brustkrebspatientinnen, er lässt aber keine Aussagen über die Überlebenszeit zu.

Beim Vergleich der Expression der Tumor-M2-PK (M2-PK-IRS und M2-PK/cut-off) im Tumorgewebe mit weiteren Charakteristika des Kollektivs konnte für die Parameter Patientenalter, Tumorgröße, Lymphknoten-, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (Benesch et al. 2010), sowie das Auftreten von Rezidiven und Metastasen kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Für diese klinischen Daten liegen bislang keine Referenzwerte zum Mammakarzinom vor, da die bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema an kleinen Kollektiven mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien durchgeführt worden sind (Lüftner et al. 2000, Hoopmann et al. 2002, Lüftner et al. 2003, Thomas et al. 2005) und die Mehrzahl der Aussagen zur prognostischen und prädiktiven

Relevanz der Tumor-M2-PK anhand von Plasmakonzentrationen getroffen worden sind (Lüftner et al. 2000, Hoopmann et al. 2002, Lüftner et al. 2003, Thomas et al. 2005).

Von *Zwerschke* wurde anhand einer Studie an Fibroblasten beschrieben, dass es in höherem Alter vermehrt zu einer Tetramerisierung der M2-PK kommt (Zwerschke et al. 2003, Mazurek et al. 2005). Somit wäre bei höherem Patientenalter mit niedrigeren Tumor-M2-PK-Werten zu rechnen gewesen. Da kein Zusammenhang zwischen der M2-PK-Expression im Tumorgewebe und dem Alter nachweisbar war, gilt diese Beobachtung offensichtlich nicht für die M2-PK-Verteilung in Mammakarzinomzellen.

Eine Korrelation zwischen fortschreitendem Tumorstadium und einem Anstieg der M2-PK-Plasmakonzentration konnte bei verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Dies gilt beispielsweise für das Nierenzellkarzinom (Wechsel et al. 1999), Zervixkarzinom (Jeschke 2008) und Lungenkarzinom (Schneider et al. 2000b). *Schneider* berichtet in einer anderen Studie an Lungenkrebspatienten außerdem, dass Primärtumoren unterschiedliche Expressionsgrade bezüglich M2-PK aufweisen, während Metastasen stets durch einheitlich hohe Mengen an M2-PK charakterisiert sind (Schneider et al. 2002). Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie stimmen insofern mit dieser Aussage überein, dass aufgrund eines heterogenen Verteilungsmusters von M2-PK kein Zusammenhang zwischen dem Ausprägungsgrad von M2-PK im primären Brustkrebsgewebe und den Faktoren Tumorgröße oder Nodalstatus hergestellt werden konnte. Eine Korrelation zwischen der Plasma-M2-PK-Konzentration und positivem Lymphknotenstatus konnten *Thomas* für das Mammakarzinom sowie *Jeschke* für das Zervixkarzinom nachweisen (Thomas et al. 2005, Jeschke 2008).

Bei der Gegenüberstellung der M2-Pyruvatkinaseexpression der Patientenproben mit dem späteren Auftreten von Rezidiven oder Metastasen zeigten sich keine Hinweise auf einen signifikanten Zusammenhang. In verschiedenen Studien konnte ein signifikanter Anstieg der M2-PK-Konzentration im Blut bei Metastasierung beobachtet werden. Dies gilt für das Mammakarzinom (Schulze 2003), das Zervixkarzinom (Jeschke 2008), das Nierenzellkarzinom (Roigas et

al. 2000), das Pankreaskarzinom (Cerwenka et al. 1999, Ventrucchi et al. 2004) sowie für verschiedene gastrointestinale Krebsarten (Schulze 2000, Kim et al. 2003, Hardt et al. 2004). Lediglich beim Hodenkarzinom bestanden keine Unterschiede zwischen den metastasierten und nicht-metastasierten Stadien (Pottek et al. 2000). Beim Mammakarzinom kann die Bestimmung der M2-PK im Operationspräparat nicht als prognostisches Indiz für die Krankheitsprogredienz dienen.

Weder für den Östrogen- noch für den Progesteronrezeptorstatus konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Expression des Glykolyseindikators Tumor-M2-Pyruvatkinase aufgezeigt werden. Es liegen diesbezüglich keine verwertbaren Referenzwerte aus anderen Studien vor. Der Ausprägungsgrad der Tumor-M2-Pyruvatkinase im Brustkrebsgewebe gibt keinen Aufschluss über den Hormonrezeptorstatus.

Wie bereits erwähnt, besitzen auch Tumorzellen M2-Pyruvatkinasen mit der Fähigkeit zur Konformationsänderung, so dass es den malignen Zellen möglich ist, ihren Stoffwechsel je nach Bedarf anzupassen und gegebenenfalls vermehrt dimere M2-PK zu exprimieren (Mazurek et al. 2005). Nach derzeitigem Wissensstand konnte in Tumorzellen noch nie eine M2-PK nachgewiesen werden, die ihre Fähigkeit zur Konformationsänderung verloren hatte. Es ist also davon auszugehen, dass diese Eigenschaft zwingend notwendig für das Zellüberleben, auch in Krebszellen, ist (Mazurek et al. 2005). Berücksichtigt man nun zusätzlich, dass jede in der Studie untersuchte Gewebeprobe nur eine Momentaufnahme des Tumorstoffwechsels zum Entnahmezeitpunkt wieder spiegelt, so ist es möglich, dass der messbare Expressionsgrad der dimeren bzw. tetrameren M2-PK zeitlichen Schwankungen unterworfen ist.

4.4 Die prognostische Bedeutung der pAkt-Expression

Die Relevanz von pAkt für den Tumormetabolismus wurde bereits in mehreren Studien beschrieben und erst kürzlich zusammengefasst (Young und Anderson 2008). Die konstitutiv aktivierte Akt-Kinase wurde durch *Bellacosa* in den folgenden Tumorarten nachgewiesen: Mammakarzinome, Gliome, Schilddrüsenkarzinome, Bronchialkarzinome, Magenkarzinome, Pankreaskarzinome,

Gallengangskarzinome, Ovarialkarzinome, Prostatakarzinome, Nierenzellkarzinome, Endometriumkarzinome, sowie hämatologische Krebserkrankungen (Bellacosa et al. 2005). Dies führte zu der Frage, ob pAkt auch ein entscheidender Faktor für das Überleben von Brustkrebszellen sein könnte, denn die Bedeutung der pAkt-Expression als prognostischer und prädiktiver Faktor beim Mammakarzinom ist bislang nur in relativ wenigen Studien mit heterogenen Kollektiven untersucht worden (Stal et al. 2003, Sastre-Garau et al. 2004, Schmitz et al. 2004, Kirkegaard et al. 2005, Vestey et al. 2005, Tokunaga et al. 2006, Cannings et al. 2007, Andre et al. 2008).

Die immunhistochemische Auswertung der 160 Mammakarzinomgewebeproben ergab in 58,1% (n=93) der Fälle eine pAkt-Überexpression (Abb. 9). Für pAkt zeigten sich in vorherigen Studien unterschiedliche Ausprägungsgrade mit immunhistochemischem Nachweis von Überexpression bei 15,0% bis 81,0% der untersuchten Gewebeproben (*Andre*: 15,0% (119 von 781 Proben); *Tokunaga*: 33,3% (85 von 252 Proben); *Schmitz*: 64,6% (64 von 99 Proben); *Vestey*: 81,0% (77 von 95 Proben)).

Die Kaplan-Meier-Analyse ergab nur minimale, nicht signifikante Unterschiede für die Mortalitätsraten von Patientinnen mit und ohne pAkt überexprimierende Tumoren (Abb. 19) und auch die multivariante Cox-Regressionanalyse zeigte, dass der pAkt/cut-off nicht als unabhängiger Prognosefaktor dienen kann. Die Höhe des pAkt-IRS stand ebenfalls in keinem signifikanten Verhältnis zur Mortalität der Mammakarzinompatientinnen. *Vestey* konnte in einer Studie an Patientinnen mit invasiv duktalem Karzinomen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in den Überlebensraten abhängig vom Grad der pAkt-Expression feststellen (*Vestey et al. 2005*). Zum gleichen Ergebnis kam auch eine Studie, die zusätzlich zwischen einer Gruppe, die adjuvante Chemotherapie und einer Gruppe ohne adjuvante Therapie unterschieden hatte (*Andre et al. 2008*). Im Gegensatz dazu führten andere Studien zu dem Ergebnis, dass pAkt einen Indikator für schlechteres „Outcome“ darstellt (*Schmitz et al. 2004, Kirkegaard et al. 2005*).

Schmitz berichtet in einer Studie an 99 nodalnegativen Brustkrebspatientinnen über signifikante Zusammenhänge zwischen dem Überleben und der

Überlebenszeit, in Abhängigkeit vom pAkt-Vorkommen in den Krebszellen. Je schwächer die Färbung für pAkt ausfällt, desto besser seien die Überlebensaussichten (Schmitz et al. 2004).

Die Ergebnisse vergangener Arbeiten sind kontrovers und die Bestimmung der pAkt-Ausprägung in einem Kollektiv mit nodalpositiven und nodalnegativen Patientinnen lässt keine prognostischen Aussagen bezüglich Mortalität und Überlebenszeit zu. Diese Studie unterstützt die Hypothese, dass die Akt-Expression nicht als prognostischer Indikator für schlechtere Überlebensraten einsetzbar ist.

Zwischen dem Alter bei Primärdiagnose und dem Ausprägungsgrad von pAkt (pAkt-IRS) ließ sich kein Zusammenhang feststellen. Frühere Studien an Brustkrebspatientinnen konnten ebenfalls keine eindeutige Beziehung zwischen deren Alter und der pAkt-Ausprägung herstellen (Vestey et al. 2005, Tokunaga et al. 2006, Andre et al. 2008). Im Kollektiv der UFK Würzburg zeigte sich, dass Patientinnen unterhalb des Durchschnittsalters von 52 Jahren signifikant häufiger eine pAkt-Überexpression aufweisen (positiver pAkt/cut-off). Bei den älteren Studienteilnehmerinnen war das Verhältnis zwischen pAkt/cut-off-Positiven und -Negativen ausgeglichen, so dass pAkt-Überexpression mit jüngerem Alter assoziiert werden kann, das heißt, bei jüngeren Mammakarzinompatientinnen kommt es häufiger zur konstitutiven Akt-Aktivierung (Benesch et al. 2010).

Vergleiche der pAkt-Expression (pAkt-IRS und pAkt/cut-off) mit den folgenden Charakteristika des Kollektivs ergaben keine Hinweise auf einen signifikanten Zusammenhang: Überlebenszeit, Tumorgröße, Nodal- und PR-Status, sowie das Auftreten von Rezidiven und Metastasen im Verlauf.

Unterschiede der Überlebenszeiten im Vergleich zur pAkt-Expression fielen nur gering aus und auch im Hinblick auf das Tumorstadium und den Expressionssgrad von pAkt (pAkt-IRS und pAkt/cut-off) zeigte sich kein signifikantes Resultat. Vergleichbare andere Studien kamen zu dem gleichen Ergebnis. Lediglich Vestey berichtet in seiner Publikation, an der allerdings auch mastektomierte Patientinnen teilnahmen, von einer signifikanten Relation zwischen Tumorgröße bei invasiv duktalem Mammakarzinomen und der pAkt-

Färbeintensität. In einem Kollektiv mit unterschiedlichen histologischen Mammakarzinomsubtypen und brusterhaltend operierten Patientinnen korreliert die pAkt-Expression jedoch nicht mit der TumorgroÙe.

Für die Gegenüberstellung von Lymphknotenstatus und pAkt-Färbung finden sich unterschiedliche Aussagen in der Literatur. Beim Würzburger Kollektiv stand die Ausprägung von pAkt im Tumorgewebe in keinem Bezug zum Nodalstatus. Während in einer Abhandlung über invasiv duktales Karzinom die gleichen Beobachtungen gemacht wurden (Vestey et al. 2005), berichten andere Autoren von einem signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und der Expression von pAkt (Kirkegaard et al. 2005, Tokunaga et al. 2006, Andre et al. 2008). Das Verhältnis zwischen der pAkt-Überexpression und Lymphknotenbefall beim Mammakarzinom muss noch genauer abgeklärt werden.

Zwischen dem krankheitsfreien Überleben und der pAkt-Expression konnte keine Verbindung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis passt zu früheren Untersuchungen, bei denen ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen pAkt-Positiven und -Negativen festgestellt wurden (Vestey et al. 2005, Tokunaga et al. 2006). Auch *Kirkegaard* beobachtete in keiner der beiden Gruppen signifikant häufiger Rezidive. Einzig *Pérez-Tenorio* und *Stal* stellten bei Patientinnen mit übermäßig starkem pAkt-Nachweis, die alle eine Hormontherapie erhalten hatten, signifikant häufiger Metastasen im Verlauf fest (Pérez-Tenorio und Stal 2002). Der pAkt-IRS und der pAkt/cut-off lassen als alleinige Parameter im Allgemeinen keine Aussagen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf zu.

Der pAkt-IRS und der Östrogenrezeptorstatus standen ebenfalls in keiner Beziehung zueinander, jedoch zeigte sich bei Tumoren mit pAkt-Überexpression (pAkt/cut-off) ein deutlicher Trend zu negativem ER-Status (Benesch et al. 2010). Dieses Ergebnis liefert eine Erklärung für die Beobachtung von *Clark*, dass hohe Akt-Aktivität beim Mammakarzinom mit Resistenz gegenüber Hormontherapie assoziiert ist (Clark et al. 2002). Im Gegensatz dazu wird in verschiedenen Veröffentlichungen berichtet, dass kein Zusammenhang zwischen ER- und pAkt-Expression beobachtet werden konnte

(Vestey et al. 2005, Tokunaga et al. 2006, Andre et al. 2008). Jedoch stellt *Andre* sein Ergebnis selbst in Frage, da bereits nachgewiesen worden ist, dass nur extranukleäre ER, die durch die routinemäßig Bestimmung nicht erfasst werden, mit der Akt-Signalkaskade interagieren (Kim et al. 2006). Letztendlich sollten zusätzliche Studien an einer größeren Patientenzahl durchgeführt werden, weil dann signifikante Ergebnisse zu erwarten sind und der Nachweis des phosphorylierten Akts dann zukünftig als prädiktiver Faktor beim Einsatz von Hormontherapien dienen könnte.

Der Zusammenhang zwischen der Expression von Progesteronrezeptoren und pAkt (IRS und cut-off) wurde noch nicht oft untersucht. Für das vorliegende Kollektiv ergab sich kein signifikantes Ergebnis. *Tokunaga* konnte bei Patientinnen, die eine adjuvante Hormontherapie erhalten haben, eine inverse Korrelation zwischen der PR-Expression und dem pAkt-Nachweis im Brustkrebsgewebe aufzeigen (Tokunaga et al. 2006). Derzeit gibt es keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der pAkt-Expression und dem PR-Status in einem heterogenen Kollektiv.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die beiden Glykolysemarker pAkt und M2-PK für prospektive diagnostische Methoden geeignet sein könnten. Die Anwendung von Glykolyseinhibitoren für therapeutische Zwecke erscheint sinnvoll.

Um die M2-PK-Überexpression eindeutig als unabhängigen Prognosefaktor für das Langzeitüberleben von Mammakarzinompatientinnen zu bestätigen, sollten Untersuchungen an einem noch größeren Kollektiv durchgeführt werden. Die routinemäßige Untersuchung des Brustkrebsgewebes auf M2-PK könnte beim Entscheidungsfindungsprozess für individuelle Therapiekonzepte hilfreich sein.

Da die Mortalitätsrate bei Patientinnen mit positivem M2-PK/cut-off niedriger ist, stellt sich auch die Frage, welche Rolle die aerobe Glykolyse beim Mammakarzinom tatsächlich spielt. Zur weiteren Klärung müssen Forschungsmethoden angewandt werden, die die Stoffwechselforgänge und deren Änderungen im Zeitverlauf sichtbar machen. Mit den bisher genutzten

Methoden waren nur Momentaufnahmen möglich, es bleibt somit unklar, wann die Konformationsänderung der M2-PK erfolgt. Es wäre sinnvoll, Vergleiche zwischen der Plasmakonzentration der Tumor-M2-PK und deren Expression im Primärtumor zum Operationszeitpunkt durchzuführen, sowie die Expression der M2-PK in den Metastasen des Mammakarzinoms zu untersuchen.

Der Zuckerstoffwechsel bietet mannigfaltige Möglichkeiten für Therapieansätze. Die Überlegungen reichen vom Glukoseentzug durch ketogene Diät, über Glukoseinhibitoren wie 3-Brompyruvat und Lonidamine, Glukoseanaloga, wie 2-Desoxyglukose, Hemmern des Glukosetransports wie Phloretin oder dem Tyrosinkinasehemmer Imatinib bis hin zu verschiedenen HIF-Inhibitoren. Aufgrund der Erkenntnisse, die in dieser Studie gewonnen werden konnten, sollte die Relevanz dieser Glykolyseinhibitoren für die Mammakarzinomtherapie weiter erforscht werden.

Die statistischen Vergleiche zwischen etablierten Prognosefaktoren und pAkt konnten pAkt nicht als prognostisch relevanten Faktor für das Mammakarzinom identifizieren. Jedoch zeigten sich Hinweise, dass die pAkt-Überexpression mit negativem Östrogenrezeptorstatus assoziiert ist. Um diese Beobachtung zu konkretisieren und aufgrund der kontroversen Datenlage anderer Arbeiten, sind diesbezüglich Studien an einem größeren Kollektiv erforderlich.

Bestätigt sich das Ergebnis, so hätte dies weitreichende Folgen für die Brustkrebstherapie, was etwa den Einsatz von Tamoxifen betrifft, und würde mit früheren Beobachtungen einhergehen, wonach Patientinnen mit negativem Akt-Status einen signifikanten Nutzen aus der Aromataseinhibitor- bzw. Tamoxifen-Therapie ziehen (Stal et al. 2003).

Die Resultate können auch Auswirkungen auf die Anwendung anderer Therapiemethoden haben, die in Akt-medierte Stoffwechselwege eingreifen. In verschiedenen Publikationen wurde beispielsweise für Anthracycline wie Doxorubicin, sowie Rapamycin und -Analoga (mTOR-Inhibitoren), Chemotherapieresistenz im Zusammenhang mit der pAkt-Expression beschrieben (zusammengefasst durch (Thompson und Thompson 2004, Andre et al. 2008)). Die vorliegenden Studienergebnisse in Zusammenschau mit der Literatur lassen vermuten, dass sowohl pAkt als auch M2-PK prädiktive

Faktoren für den Erfolg verschiedener Therapien sind. Um Aufschluss über den Vorhersagewert der Expression der Glycolysemarker pAkt und M2-PK für den Therapieerfolg zu erhalten, sollten diese im Rahmen großer Therapiestudien untersucht werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind von erheblicher klinischer Relevanz, da sie in Zukunft eine individuellere Therapie der Brustkrebspatientinnen ermöglichen können (Benesch et al. 2010).

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Neoplasie bei Frauen. Die Überlebensaussichten haben sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert, was auf sensiblere Untersuchungsmethoden und die Therapieoptimierung zurückzuführen ist. Eine große Rolle spielt auch der Einsatz von Prognosefaktoren. Trotz allen Fortschritts ist Brustkrebs weiterhin die führende Todesursache unter den Krebserkrankungen bei Frauen. Große Hoffnung wird in neue Therapiemethoden gesetzt, die in den Glukosestoffwechsel eingreifen. In letzter Zeit erlangten Glykolysemarker, die als Indikatoren für den veränderten Kohlenhydratstoffwechsel in Tumorzellen dienen, wachsendes Interesse. Obwohl Brustkrebs eine bereits häufig untersuchte Tumorentität ist, ist der Einfluss des Glukosestoffwechsels auf die Fähigkeit zur Metastasierung und die Überlebenszeit unbekannt.

Für diese Studie wurde eine Gruppe von 160 Patientinnen ausgewählt, die vor mehr als 13 Jahren wegen einer Brustkrebsneuerkrankung behandelt wurden. Das bei der Operation entnommene Gewebe des primären Mammakarzinoms wurde immunhistochemisch auf die Expression von Tumor-M2-PK und pAkt, zweier ausgewählter Schlüsselenzyme der Tumorglykolyse, untersucht. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die spezifisch an die dimere Isoform der M2-PK und das pAkt binden, wurden von jeder Probe der Expressionsgrad dieser beiden Marker sowie der immunreaktive Score bestimmt.

Die Ergebnisse der Färbungen wurden mit klinisch-pathologischen- und Überlebensdaten der Patientinnen abgeglichen, um Informationen über die prognostische Relevanz dieser Marker zu erhalten.

Eine Überexpression konnte in 58% der Fälle für M2-PK- und in 70% für pAkt nachgewiesen werden. Die übermäßig starke Expression der dimeren M2-Pyruvatkinase konnte als unabhängiger Prognosefaktor für das Langzeitüberleben beim Mammakarzinom identifiziert werden und die Mortalitätsrate bei Patientinnen mit positivem M2-PK/cut-off war deutlich geringer (Benesch et al. 2010). Bei Frauen unter 52 Jahren und im Zusammenhang mit negativem Östrogenrezeptorstatus wurde häufiger die konstitutive Akt-Aktivierung beobachtet (Benesch et al. 2010).

Die routinemäßige Bestimmung der M2-PK könnte in Zukunft bei der Entwicklung individueller Behandlungskonzepte zum Einsatz kommen und die pAkt könnte als prädiktiver Faktor für die adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms dienen (Benesch et al. 2010).

6 Literaturverzeichnis

Ahmed AS, Dew T, Lawton FG, Papadopoulos AJ, Devaja O, Raju KS, Sherwood RA. „Tumour M2-PK as a predictor of surgical outcome in ovarian cancer, a prospective cohort study.“ *Eur J Gynaecol Oncol*, 2007: 28:103-8.

Andre F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan LX, Meslin F, Spielmann M, Tomasic G, Pusztai L, Hortobagyi GN, Michiels S, Delaloge S, Esteva FJ. „Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer.“ *Ann Oncol*, 2008: 19:315-20.

Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. „Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period.“ *Cancer*, 2006: 106:743-50.

Avril N, Menzel M, Dose J, Schelling M, Weber W, Jaenicke F, Nathrath W, Schwaiger M. „Glucose Metabolism of Breast Cancer Assessed by 18F-FDG PET: Histologic and Immunohistochemical Tissue Analysis.“ *J Nucl Med*, 2001: 42:9-16.

Bacus SS, Altomare DA, Lyass L, Chin DM, Farrell MP, Gurova K, Gudkov A, Testa JR. „AKT2 is frequently contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival.“ *Oncogene*, 2002: 21:3532-40.

Barnes K, McIntosh E, Whetton AD, Daley GQ, Bentley J, Baldwin SA. „Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation.“ *Oncogene*, 2005: 24:3257-67.

Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, haberland J, Wolf U. „Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.“ In *6. überarbeitete Auflage*. Berlin: RKI und die Gesellschaft der

epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2008.

Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB. „ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation.“ *Oncogene*, 2005: 24:6314-22.

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsihchlis P. „Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain.“ *Oncogene*, 1998: 17:313-25.

Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. „A portrait of AKT kinases: Human cancer and animal models depict a family with strong individualities.“ *Cancer Biol Ther*, 2004: 3:267-75.

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. „Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting.“ *Adv in Cancer Res*, 2005: 94:29-86.

Bena-Boupda NF, Rezai SS, Klett R, Eigenbrodt E, Bauer R. „Value of tumor M2-PK in thyroid carcinoma: a pilot study.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:5237-40.

Benesch C, Schneider C, Voelker HU, Kapp M, Caffier H, Krockenberger M, Dietl J, Kammerer U, Schmidt M. „The clinicopathological and prognostic relevance of pyruvate kinase M2 and pAkt expression in breast cancer.“ *Anticancer Res*, 2010: 30:1689-94.

Bjornsti MA, Houghton PJ. „Lost in translation: Dysregulation of cap-dependent translation in cancer.“ *Cancer Cell*, 2004: 5:519-23.

Bryson JM, Coy PE, Gottlob K, Hay N, Robey RB. „Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death.“ *J Biol Chem*, 2002: 277:11392-400.

Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deerardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, Thompson CB. „The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β -oxidation.“ *Oncogene*, 2005: 24:4165-73.

Cañizares F, De Las Heras M, Péreza M, Tovar I, Sola J, Viñals I, Salinas J, Martínez P. „Temporary dependency of steroid-receptor prognostic value in breast cancer.“ *Med Clin*, 2001: 117:761-5.

Cannings E, Kirkegaard T, Tovey SM, Dunne B, Cooke TG, Bartlett JM. „Bad expression predicts outcome in patients treated with tamoxifen.“ *Breast Cancer Res Treat*, 2007: 102:173-9.

Cantley LC. „The phosphoinositide 3-kinase pathway.“ *Science*, 2002: 296:1655-7.

Carter CL, Allen C, Henson DE. „Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases 3.“ *Cancer*, 1989: 63:181-7.

Cerwenka H, Aigner R, Bacher H, et al. „TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions.“ *Anticancer Res*, 1999: 19:849-51.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. „The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth.“ *Nature*, 2008: 452:230-3.

Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. „Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells.“ *Mol Cancer Ther*, 2002: 1:707-17.

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y, und Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). „Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.“ *Lancet*, 2005: 366:2087-106.

Cluze C, Colonna M, Remontet L, Poncet F, Sellier E, Seigneurin A, Delafosse P, Bossard N. „Analysis of the effect of age on the prognosis of breast cancer.“ *Breast Cancer Res Treat*, 2009: 117:121-9.

Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M. „Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up.“ *Eur J Cancer*, 2002: 38:1329-34.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. „Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.“ *Nature*, 1995: 378:785-9.

Cross DA, Watt PW, Shaw M, van der Kaay J, Downes CP, Holder JC, Cohen P. „Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue.“ *FEBS Lett*, 1997: 406:211-5.

Dang CV, Semenza GL. „Oncogenic alterations of metabolism.“ *Trends Biochem Sci*, 1999: 24:68-72.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. „Cellular survival: a play in three Akts.“ *Genes Dev*, 1999: 13:2905-27.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Thompson CB. „Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth.“ *J Biol Chem*, 2006: 281:37372-80.

Decker T, Hungermann D, Böcker W. „Prognostische und prädiktive Faktoren invasiver Mammakarzinome - Update 2009.“ *Pathologe*, 2009: 30:49-55.

Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. „Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades.“ *J Biol Chem*, 1997: 272:17269-75.

Di Cristophano A, Pandolfi PP. „The multiple roles of PTEN in tumor suppression.“ *Cell*, 2000: 100:387-90.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. „Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.“ *Science*, 1997: 275:661-5.

Eigenbrodt E, Fister P, Reinacher M. „New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells.“ In *Regulation of carbohydrate metabolism*, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1985: 2:141-79.

Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis RR. „Double role of pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells.“ *Crit Rev Oncog*, 1992: 3:91-115.

Eigenbrodt E, Basenau D, Holthusen S, Mazurek S, Fischer G. „Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas.“ *Anticancer Res*, 1997: 17:3153-6.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. „Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells.“ *Cancer Res*, 2004: 64:3892-9.

Engel M, Mazurek S, Eigenbrodt E, Welter C. „Phosphoglycerate mutase derived polypeptide inhibits glycolytic flux and induces cell growth arrest in tumor cell lines.“ *J Biol Chem*, 2004: 279:35803-12.

Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. „Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06.“ *Cancer*, 2001: 91:1679-87.

Gambhir SS. „Molecular imaging of cancer with positron emission tomography.“ *Nat Rev Cancer*, 2002: 2:891-99.

Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C. „Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Heft 25 - Brustkrebs.“ Robert Koch-Institut, Statistisches Bundesamt, 2005.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, Members P. „Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.“ *Ann Oncol*, 2007: 18:1133-44.

Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. „Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase.“ *Genes Dev*, 2001: 15:1406-18.

Grosclaude P, Colonna M, Hedelin G, Tretarre B, Arveux P, Leseq'h JM, Raverdy N, Sauvage-Machelard M. „Survival of women with breast cancer in France: variation with age, stage and treatment.“ *Breast Cancer Res Treat*, 2001: 70:137-43.

Guminska M, Ignacak J, Kedryna T, Stachurska B. „Tumor-specific pyruvate kinase isoenzyme M2 involved in biochemical strategy of energy generation in neoplastic cells.“ *Acta Biochim Pol*, 1997: 44:711-24.

Hahn WC, Weinberg RA. „Rules for making human tumor cells.“ *N Engl J Med*, 2002: 347:1593-603.

Hanahan D, Weinberg RA. „The hallmarks of cancer.“ *Cell*, 2000: 100: 57-70.

Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. „Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:4965-8.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr, und American Society of Clinical Oncology. „American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.“ *J Clin Oncol*, 2007 : 25:5287-312.

Hatteville L, Mahe C, Hill C. „Prediction of the long-term survival in breast cancer patients according to the present oncological status.“ *Stat Med*, 2002: 21:2345-54.

Hawkins RA, Hoh CK. „PET FDG Studies in Oncology.“ *Ncl Med Biol*, 1994: 5:739-47.

Hegele A, Varga Z, Kosche B, Stief T, Heidenreich A, Hofmann R. „Pyruvate kinase type tumor M2 in urological malignancies.“ *Urol Int*, 2003: 70:55-8.

Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. „Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer.“ *Breast Cancer Res Treat*, 1998: 52:227-37.

Hoopmann M, Warm M, Mallmann P, Thomas A, Göhring UJ, Schöndorf T. „Tumor M2 pyruvate kinase - determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy.“ *Cancer Let*, 2002: 187:223-8.

Hsueh EC, Turner RR, Glass EC, Brenner RJ. „Sentinel Node Biopsy in Breast Cancer.“ *American College of Surgeons 84th Annual Clinical Congress*. Orlando, FL, USA, 1998.

Jackson RC, Lui MS, Boritzki TJ, Morris HP, Weber G. „Purine and pyrimidine nucleotide patterns of normal, differentiating, and regenerating liver and of hepatomas in rats.“ *Cancer Res*, 1980: 40:1286-91.

Jeschke, S. „Evaluierung der Tumor M2-Pyruvatkinase (Tu M2-PK) als Tumormarker beim Zervixkarzinom.“ *Dissertation; Medizinische Fakultät der Charité*. Berlin, 2008.

Kaufmann M, Jonat W, von Minckwitz G. „Primäre Therapie operabler Mammakarzinome: Ergebnisse der 9. internationalen Konferenz in Sankt Gallen.“ *Dtsch Ärztebl*, 2005: 102: A-1596 / B-1341 / C-1265.

Kaura B, Bagga R, Patel FD. „Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma.“ *J Obstet Gynaecol Res*, 2004: 30:193-6.

Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. “Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer.” *J Lipid Res*, 2008: 49: 2545-56.

Kim CW, Kim JI, Park SH. „Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer.“ *Korean J Gastroenterol*, 2003: 42:387-93.

Kim R, Kaneko M, Arihiro K, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Osaki A, Inai K. „Extranuclear expression of hormone receptors in primary breast cancer.“ *Ann Oncol*, 2006: 17:1213-20.

Kini VR, White JR, Horwitz EM, Dmuchowski CF, Martinez AA, Vicini FA. „Long term results with breast-conserving therapy for patients with early stage breast carcinoma in a community hospital setting.“ *Cancer*, 1998: 82:127-33.

Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Bartlett JM. „AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen.“ *J Pathol*, 2005: 207:139-46.

Klein PS, Melton DA. „A molecular mechanism for the effect of lithium on development.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996: 93:8455-9.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. „Expression of a constitutive active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation.“ *J Biol Chem*, 1996: 271:31372-8.

Krag D, Ashikaga T. „The design of trials comparing sentinel-node surgery and axillary resection.“ *N Engl J Med*, 2003: 349:603-5.

Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, Du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Holzner D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kuhn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Luck HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, Von Minckwitz G, Nas-Griegoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreier I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J, Zemmler T. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Deutsche Krebsgesellschaft e. V., 2008.

Krockenberger M, Honig A, Rieger L, Coy J, Sutterlin M, Kapp M, Horn E, Dietl J, Kämmerer U. „Transketolase-like 1 (TKTL1) expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases.“ *Int J Gyn Oncol*, 2007:17:101-6.

Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. „Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study .“ *BMJ*, 2000: 320:474-8.

Levi F, Randimbison L, La Vecchia C. „Breast cancer survival in relation to sex and age.“ *Oncology*, 1992: 49:413-7.

Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Travelin B, Bergh J, Grankvist K, Henriksson R. „Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers.“ *Clin Breast Cancer*, 2003: 4:340-7.

Lüftner D, Mazurek S, Henschke P, Mesterharm J, Schildhauer S, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K. „Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine-phosphorylated metabolite in advanced breast cancer.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:991-7.

Lüftner D, Mesterharm J, Akrivakis C, Geppert R, Petrides PE, Wernecke KD, Possinger K. „Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:5077-82.

Lüftner D, Schweigert M, Geppert R, Possinger K. „Tumor Type M2 Pyruvate Kinase in Colorectal Cancer: A Predictive Activity Marker versus Clasical Mass Tumor Markers.“ *Abstract of the 3rd International Conference – Perspectives in Colorectal Cancer, Dublin, Ireland, 2001.*

Luo J, Manning BD, Cantley LC. „Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise.“ *Cancer Cell*, 2003: 4:257-62.

Maggard MA, O'Connell JB, Lane KE, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY. „Do young breast cancer patients have worse outcomes?“ *J Surg Res*, 2003: 113:109-13.

Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N. „Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence of Bax and Bak.“ *Mol Cell*, 2004: 16:819-30. (a)

Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. „Akt Inhibits Apoptosis Downstream of BID Cleavage via a Glucose-Dependent Mechanism Involving Mitochondrial Hexokinases.“ *Mol Cell Biol*, 2004: 24:730-40. (b)

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.

Marie J, Kahn A, Boivin P. „Pyruvate kinase isozymes in man. I. M type isozymes in adult and foetal tissues, electrofocusing and immunological studies.“ *Hum Genet*, 1976: 31:35-45.

Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E. „The role of phosphometabolites on cell proliferation, energy metabolism and tumor therapy.“ *J Bioenerg Biomembr*, 1997: 29:315-30.

Mazurek S, Grimm H, Oehmke M, Weisse G, Teigelkamp S, Eigenbrodt E. „Tumor M2-PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:5151-4.

Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E. „Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7.“ *Oncogene*, 2001: 20:6891-8.

Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. „Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome.“ *Brit J Nutr*, 2002: 87:23-9.

Mazurek S, Eigenbrodt E. „The tumor metabolome.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:1149-54.

Mazurek S, Boschek BC, Hugo F, Eigenbrodt E. „Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading.“ *Cancer Biol*, 2005: 15:300-8.

McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Clark GM. „How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients.“ *J Natl Cancer Inst*, 1990: 82:1006-15.

McKeehan WL. „Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation.“ *Cell Biol Int Rep*, 1982: 6:635-50.

Oremek GM, Eigenbrodt E, Rädle J, Zeuzem S, Seiffert UB. „Value of the serum levels of the tumor marker TUM2-PK in pancreatic cancer.“ *Anticancer Res*, 1997: 17:3031-3.

Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W, Eigenbrodt E, Usadel KH. „The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma.“ *Anticancer Res*, 1999: 19:2599-601.

Oremek GM, Sapoutzis N, Kramer W, Bickeböller R, Jonas D. „Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:5095-8.

Oremek GM, Rox S, Mitrou P, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. „Tumor M2-PK levels in haematological malignancies.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:1135-8.

Pass H, Vicini FA, Kestin LL, Goldstein NS, Decker D, Pettinga J, Ingold J, Benitez P, Neumann K, Rebner M, Dekhne N, Martinez A. „Changes in management techniques and patterns of disease recurrence over time in patients with breast carcinoma treated with breast-conserving therapy at a single institution.“ *Cancer*, 2004: 101:713-20.

Pasteur L. „Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations.“ *Comp Rend Acad Sci*, 1861: 52:1260-4.

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. „Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis.“ *J Biol Chem*, 2002: 277:7610-8.

Pelicano H, Xu Rh, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P. „Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism.“ *J Cell Biol*, 2006: 175:913-23. (a)

Pelicano H, Marin DS, Xu RH, Huaang P. „Glycolysis inhibiion or anticancer treatment.“ *Oncogene*, 2006: 25:4633-46. (b)

Pérez-Tenorio G, Stal O. Southeast Sweden breast cancer group. „Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients.“ *Br J Cancer*, 2002: 86:540-5.

Pezzilli R, Migliori M, Morselli-Labate AM, et al. „Diagnostic value of tumor M2-pyruvate kinase in neuroendocrine tumors. A comparative study with chromogranin A.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:2969-72.

Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A. „PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP.“ *Oncogene*, 2005: 24:6465-81.

Pottek T, Müller M, Blum T, Hartmann M. „Tu-M2-PK in the blood of testicular and cubital veins in men with testicular cancer.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:5029-33.

Presek P, Reinacher M, Eigenbrodt E. „Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by rous sarcoma virus.“ *FEBS Lett*, 1988: 242:194-8.

Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S. „Natural history of node-negative breast-cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up.“ *J Clin Oncol*, 1995: 13:1144-51.

Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. „Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005: 102:5992-7.

Rapiti E, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schäfer P, Sappino AP, Kurtz J, Neyroud-Caspara I, Bouchardy C. „Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990 to 2001.“ *Eur J Cancer*, 2005: 41:1446-52.

Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammermann PS, Cinalli RM, Thompson CB. „Akt-Directed Glucose Metabolism Can Prevent Bax Conformation Change and Promote Growth Factor-Independent Survival.“ *Mol Cell Biol*, 2003: 23:7315-28.

Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J. „The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of

prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years.“ *Cancer*, 2000: 88:804-13.

Reinacher M, Eigenbrodt E. „Immunohistochemical demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-PK) in tumors of chicken and rat.“ *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1981: 37:79-88.

Remmele W, Stegner HE. „Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.“ *Pathologe*, 1987: 8:138-40.

Robey RB, Hay N. „Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt.“ *Oncogene*, 2005: 25:4683-96.

Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. „Tumor-M2-Pyruvatkinase beim Nierenzellkarzinom. Untersuchungen im Plasma von Patienten.“ *Urologe*, 2000: 39:554-6.

Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. „Tumor M2 pyruvate kinase in plasma of patients with urological tumors.“ *Tumour Biol*, 2001: 22:282-5.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. „Factors influencing prognosis in node-negative breast-carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up.“ *J Clin Oncol*, 1993: 11:2090-100.

Sapoutzis N, Oremek et al.. „Evaluation of Tumor M2 Pyruvatekinase Values in Patients with Lung Diseases.“ In *8th Central European Lung Cancer Conference* von Pirker R (ed), 2002, Vienna, Austria. Monduzzi Editore S.p.A. - Medimond Inc, 2002: 75-80.

Sastre-Garau X, Genin P, Rousseau A, Al Ghuzlan A, Nicolas A, Fréneaux P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, Couturier J, Thiery JP, Magdelénat H, Vincent-Salomon A. „Increased cell size and Akt activation in HER-2/neu-overexpressing invasive ductal carcinoma of the breast.“ *Histopathology*, 2004: 45:142-7.

Schmidt M, Kammerer U, Segerer S, Cramer A, Kohrenhagen N, Dietl J, Voelker HU. „Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: activation of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF.“ *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008: 139:72-8.

Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Krockenberger M, Dietl J, Kammerer U. „Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK.“ *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010: 136:219-25.

Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, Levkau B, Hölscher M, Hoffmann O, Grabellus F, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA. „Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases.“ *Mod Pathol*, 2004: 17:15-21.

Schneider J, Morr H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. „Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases.“ *Cancer Detect Prev*, 2000: 24:531-5. (a)

Schneider J, Velcovsky HG, Morr H, Katz N, Neu K, Eigenbrodt E. „Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:5053-8. (b)

Schneider J, Neu K, Grimm H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. „Tumor-M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring.“ *Anticancer Res*, 2002: 22:311-8.

Schneider J, Neu K, Grimm H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. „Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study.“ *Cancer Lett*, 2003: 193:91-8. (a)

Schneider J, Schulze G. „Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:5089-93. (b)

Schneider J, Bitterlich N, Schulze G. „Improved sensitivity in the diagnosis of gastrointestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles including the tumor M2-PK.“ *Anticancer Res*, 2005: 25:1507-15.

Schön D, Bertz J, Görsch B et al. „Die Dachdokumentation Krebs.“ *Gesundheitsbl - Gesundheitsforsch, Gesundheitsschutz*, 2004: 47:429-36.

Schulze G. „The tumor marker tumor M2-PK: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer.“ *Anticancer Res*, 2000: 20:4961-4.

Schulze G. „HER-2/neu gene product in serum - an oncoprotein in the diagnosis and therapy of breast carcinoma.“ *Anticancer Res*, 2003: 23:1007-10.

Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. „'The metabolism of tumours': 70 years later.“ *Novartis Found Symp*, 2001: 240:251-64.

Shaw RJ. „Glucose metabolism and cancer.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 2006: 18:598-608.

Shim H, Chun YS, Lewis BC, Dang CV. „A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998: 95:1511-6.

Simonesi T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al. „Interaction of oestrogen receptor with regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH-kinase.“ *Nature*, 2000: 407:538-41.

Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. „Review - An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer.“ *Breast Cancer Res Treat*, 2008: 107:309-30.

Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. „Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977: 74:3065-7.

Staal SP, Huebner K, Croec CM, Parsa NZ, Testa JR. „The AKT1 protooncogene maps to human chromosome 14, band q32.“ *Genomics*, 1988: 2:96-8.

Staib P, Hoffmann M, Schinköthe T. „Plasma levels of tumor M2-pyruvate kinase should not be used as a tumor marker for hematological malignancies and solid tumors.“ *Clin Chem Lab Med*, 2006: 44:28-31.

Stal O, Pérez-Tenorio G, Akerberg L, et al. „Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy.“ *Breast Cancer Res*, 2003: 5:R37-44.

Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsihchlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. „AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells.“ *AmJ Pathol*, 2001: 159:431-7.

Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJT, Kroon BBR. „History of sentinel node and validation of the technique.“ *Breast Cancer Res*, 2001: 3:109-112.

Testa JR, Bellacosa A. „AKT plays a central role in tumorigenesis.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001: 98:10983-5.

Thomas A, Fischer T, Winzer HJ, Wegner B, Korlach S, Blohmer JU, Lichtenegger W, Kuemmel S. „Tumor M2-Pk as predictive factor in primary systemic chemotherapy in breast cancer.“ *J Clin Oncol*, 2005: 23:891.

Thompson JE, Thompson CB. „Putting the rap on Akt.“ *J Clin Oncol*, 2004: 22:4217-26.

Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. „Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients.“ *Int J Cancer*, 2006: 118:284-9.

Touboul E, Buffat L, Belkacémi Y, Lefranc JP, Uzan S, Lhuillier P, Faivre C, Huart J, Lotz JP, Antoine M, Pène F, Blondon J, Izrael V, Laugier A, Schlienger M, Housset M. „Local recurrences and distant metastases after breast-conserving surgery and radiation therapy for early breast cancer.“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999: 43:25-38.

Ugnat AM, Xie L, Morriss J, Semenciw R, Mao Y. „Survival of women with breast cancer in Ottawa, Canada: variation with age, stage, histology, grade and treatment.“ *Br J Cancer*, 2004: 90:1138-43.

Ugurel S, Bell N, Sucker A, Zimpfer A, Rittgen W, Schadendorf D. „Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma.“ *Int J Cancer*, 2005: 117:825-30.

Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C, Casadei R, Simoni P, Gullo L. „Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer.“ *Dig Dis Sci*, 2004: 49:1149-55.

Veronesi U, Marubini E, Del Vecchio M, Manzari A, Andreola S, Greco M, Luini A, Merson M, Saccozzi R, Rilke F, et al. „Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: partly independent events.“ *J Natl Cancer Inst*, 1995: 87:19-27.

Veronesi U, Paganelli G, Viale Get et al. „A randomised comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer.“ *N Engl J Med*, 2003: 349:546-53.

Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. „Activated Akt expression in breast cancer: correlation with p53, Hdm2 and patient outcome.“ *Eur J Cancer*, 2005: 41:1017-25.

Vincent-Salomon A, Carton M, Zafrani B, Fréneaux P, Nicolas A, Massemin B, Fourquet A, Clough K, Pouillart P, Sastre-Garau X. „Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases.“ *Cancer*, 2001: 92:249-56.

Vivanco I, Sawyers CL. „The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer.“ *Nat Rev Cancer*, 2002: 2:489-501.

Vorgias G, Koukouras D, Paleogianni V, Tzoracoeleftherakis E. „Prognostic significance of factors affecting disease free interval and overall survival for Stage II breast cancer in Greece. A multivariate cohort study.“ *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001: 95:100-4.

Wapnir IL, Anderson SJ, Mamounas EP, Geyer CE Jr, Jeong JH, Tan-Chiu E, Fisher B, Wolmark N. „Prognosis after ipsilateral breast tumor recurrence and locoregional recurrences in five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project node-positive adjuvant breast cancer trials.“ *J Clin Oncol*, 2006: 24:2028-37.

Warburg O. „Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.“ *Die Naturwissenschaften*, 1924: 50:1131-7.

Warburg O. „The metabolism of tumors.“ London: Constable, 1930.

Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G. „Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK).“ *Anticancer Res*, 1999: 19:2583-90.

Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. „The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age.“ *Cancer*, 1996: 78:1838-43.

Xia C, Meng Q, Cao Z, Shi X, Jiang BH. „Regulation of angiogenesis and tumor growth by p110 Alpha and AKT1 via VEGF expression.“ *J Cell Physiol*, 2006: 209: 56-66.

Young CD, Anderson SM. „Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors.“ *Breast Cancer Res*, 2008: 10:202.

Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P. „Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls.“ *World J Gastroenterol*, 2004: 10:1643-6.

Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E. „Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999: 96:1291-6.

Zwerschke W, Mazurek S, Stöckl P, Hütter E, Eigenbrodt E, Jansen-Dürr P. „Metabolome analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for adenosine monophosphate in cellular aging.“ *Biochem J*, 2003: 376:403-11.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, allen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders danke ich

Herrn Prof. Dr. med. J. Dietl für Möglichkeit diese Arbeit an der Frauenklinik der Universität Würzburg anzufertigen,

Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes, konstruktive Kritik und stetige Hilfsbereitschaft,

Frau Priv.-Doz. Dr. med. M. Schmidt für die Korrektur dieser Arbeit, aufschlussreiche Diskussionen und kontinuierliche Unterstützung,

Herrn Prof. Dr. A. Rosenwald für die Übernahme des Korreferates,

Herrn Dr. med. H.-U. Völker vom pathologischen Institut für die wertvolle Unterstützung und Anleitung bei der Auswertung der immunhistochemischen Präparate,

der medizinisch technischen Angestellten Frau M. Kapp für die Anleitung und Hilfestellung bei der Herstellung der histologischen Präparate und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft,

sowie meiner Kollegin Frau C. Schneider für die engagierte Mitarbeit bei der Beschaffung von Patientendaten.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Mutter und meinem Bruder, die mich immer unterstützt haben.