

Aus der Universitäts-Frauenklinik  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Das Transketolase-like-1 Protein (TKTL1)  
im Mammakarzinom**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

vorgelegt im November 2006  
von Lidija Annecke Bau  
geboren in Friedberg

Dekan	Prof. Dr. C. Peters
1. Gutachter	Prof. Dr. E. Stickeler
2. Gutachter	Prof. Dr. A. zur Hausen
Jahr der Promotion	2008

**Abkürzungsverzeichnis**

AB2	Antibody 2 (Secondary Antibody)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CA	Karzinom
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ED	Erstdiagnose
ER	Östrogenrezeptor
Erythrose-4-P	Erythrose-4-Phosphat
evtl.	eventuell
FDG	Fluor-Desoxyglukose
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Fruktose-6-P	Fruktose-6-Phosphat
G	Grading
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
G6PD	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
H.E.	Hämalaun-Eosin
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$
His	Histidin
Ig	Immunglobulin

IHC	Immunhistochemie
Inc.	Incorporation
JÜR	Jahresüberlebensrate
l	Liter
LSAB	Labeled-StreptAvidin-Biotin-Methode
Mamma-CA	Mammakarzinom
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MTA	Manual Tissue Arrayer
N	Nodalstatus
n	number (Anzahl)
NADPH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OP	Operation
PET	Positronen Emissions Tomographie
PPP	Pentosephosphatweg
PR	Progesteronrezeptor
RNS	Ribonukleinsäure
Ribose-5-P	Ribose-5-Phosphat
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
Sedoheptulose-7-P	Sedoheptulose-7-Phosphat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Tumor-Stadium
Tab.	Tabelle
Thiamin-PP	Thiaminpyrophosphat
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumorklassifizierung (Tumor-Nodus-Metastasen)
TKT	Transketolase
TKTL1	Transketolase-like 1

TKTL2	Transketolase-like 2
TRS	Target Retrieval Solution
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v.a.	vor allem
vs.	versus
WHO	World Health Organization
Xylulose-5-P	Xylulose-5-Phosphat
z.B.	zum Beispiel

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>10</b>
1.1. Übersicht: Das Mammakarzinom	10
1.2. Der Warburg-Effekt	11
1.3. Laktatbildung als Promotor des Tumorwachstums	12
1.4. Die Bedeutung des Pentosephosphatwegs für die Laktatbildung	13
1.5. Das Enzym Transketolase	15
1.5.1. Transketolase in Tumorzellen	
1.5.2. Transketolase Gene	
1.5.3. TKTL1	
1.5.4. Transketolase in Normalgeweben	
1.5.5. TKTL1 in Tumorgeweben	
1.5.6. Initiale Hypoxie und eine TKTL1 Überexpression als mögliche Erklärung des Warburg-Effektes	
1.6. Akt-Onkogene und der Einfluss einer ketogenen Diät	19
1.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	<b>22</b>
2.1. Patientenkollektiv	22
2.1.1. Beschreibung des Patientenkollektivs	

2.2.	Materialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Geräte	23
2.2.1.	Materialien, Chemikalien für den H.E.-Schnitt und Vorbereitung für die TMAs	
2.2.2.	Geräte für die TMAs	
2.2.3.	Materialien, Chemikalien und Puffer für die Immunhistochemie	
2.2.4.	Mikroskop	
2.2.5.	Statistische Auswertung	
2.3.	Methoden	26
2.3.1	Übersicht: Herstellung von Tissue Microarrays (TMAs) und immunhistologische Anfärbung (IHC)	
2.3.2.	Vorbereitung der TMAs	
2.3.2.1.	Erstellung des Spenderblockkollektivs	
2.3.2.2.	Anfertigung histologischer Schnitte	
2.3.2.3.	Markierung der Tumorareale	
2.3.2.4.	Herstellung von Empfängerblöcken	
2.3.3.	Anfertigung von TMAs	
2.3.3.1.	Beschreibung des Manual Tissue Arrayers	
2.3.3.2.	Beschreibung der Stanzen	
2.3.4.	Vorgehen bei dem Stanzen von TMAs	
2.3.4.1.	Anlegen und Stanzen des Empfängerblockes	
2.3.4.2.	Anlegen und Stanzen des Spenderblockes	
2.3.4.3.	Einsetzen der Spenderstanze	
2.3.4.4.	Vorbereitung für den Gewebeschnitt	
2.3.4.5.	Bildfolge: Die einzelnen Schritte zur Herstellung eines TMA	
2.3.5.	Aufbau eines TMA-Blockes	

- 2.3.6. Vorteile von TMAs
- 2.3.7. Immunhistochemische Färbung mit dem TKTL1 Antikörper  
Labeled-StreptAvidin-Biotin-Methode (LSAB-Immunhistochemie)
- 2.3.8. Anfärbung der TMAs zur Sicherung der ER-, PR- und Her2/neu  
Expression
- 2.3.9. Methoden bei der Auswertung
  - 2.3.9.1. Scoreeinteilung unter Mikroskopsicht
  - 2.3.9.2. Fertigstellung des Patienten Follow-ups
  - 2.3.9.3. Kategorisierung der klinisch-pathologischen Parameter
  - 2.3.9.4. Statistische Auswertung

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<hr/>	
3.1. TKTL1 in korrespondierendem nicht-neoplastischen Mammagewebe	40
3.2. TKTL1 Expression im Mamma-CA	40
3.3. Korrelation der TKTL1 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern	42
3.3.1. pT -Stadium	
3.3.2. TumorgroÙe	
3.3.3. Nodal-Status (pN)	
3.3.4. Grading (G)	
3.3.5. Hormonrezeptor-Status (ER- und PR- Status)	
3.3.6. Angioinvasion	
3.3.7. Alter der Patientinnen	
3.3.8. Her2/neu Expression	
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	47

3.5. Kaplan Meier Überlebenszeitanalyse	48
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	<b><u>59</u></b>
<b><u>6. Literatur</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>7. Danksagung</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b><u>8. Lebenslauf</u></b>	<b><u>70</u></b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Übersicht: Das Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom (Mamma-CA) ist in den westlichen Industrienationen die häufigste Krebserkrankung der Frau, es hat einen Anteil von 24% bei den Malignomen der Frau. Statistisch betrachtet erkranken 1-2 von 1.000 Frauen in Deutschland jedes Jahr an Brustkrebs. Nach den aktuellen Daten der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister gibt es hierzulande ca. 50.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas mehr als 60 Jahren (Giersiepen et al., 2005). In der Tendenz nimmt die Häufigkeit weiterhin zu (Bässler, 1997) und im Schnitt erkrankt jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mamma-CA (Engel et al., 2003). Bei der Krebssterblichkeit belegt das Mamma-CA mit 18% den ersten Rang bei den Frauen (Giersiepen et al., 2005). Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) aller Tumorstadien zusammen beträgt bei optimaler Therapie 76%, die 10-JÜR 59% (Engel et al., 2003).

Grundlage der Behandlung des Mamma-CA ist die operative Therapie, stadienabhängig ergänzt durch eine adjuvante oder primär systemische Chemotherapie, endokrine und immuntherapeutische Ansätze, sowie die Strahlentherapie. Etablierte Faktoren für die Wahl der optimalen Therapie sind die Tumorgroße (T), der Nodal-Status (N), die histologischen Eigenschaften des Tumors, die Metastasierung, die individuellen Risikofaktoren, der Menopausenstatus, sowie als Bio- beziehungsweise molekularer Marker der Hormonrezeptor- sowie der Her2/neu-Status (Harbeck et al., 2003). Her2/neu, "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2", repräsentiert ein Onkoprotein, das auf der Plasmamembran von 25-30% der Mamma-CA-Zellen überexprimiert wird. Die Her2/neu Expression geht mit einer schlechten Prognose einher (Slamon et al., 1987; Revillion et al., 1998; Vetter, 2002). Her2/neu fungiert als Wachstumsfaktor und beschleunigt die Desoxyribonukleinsäure- (DNS) Synthese und das Zellwachstum. Mit der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers (Trastuzumab) gegen Her2/neu, der an eine Domäne des Rezeptors bindet und dadurch dessen Abbau bewirkt, wurde ein neues und individuelles Therapieprinzip für Her2/neu überexprimierende Mamma-CAs entwickelt. Bislang wird Trastuzumab als Monotherapie oder in Kombination mit bestimmten Chemotherapien für das Her2/neu überexprimierende, metastasierte Mamma-CA eingesetzt (Baselga et al., 1996;

Cobleigh et al., 1999; Schattenfroh et al., 2000). Seit Mai 2006 ist Trastuzumab auch im frühen Stadium von Brustkrebs, nach Operation und abgeschlossener Chemotherapie, in der Adjuvanz zugelassen (Piccart-Gebhart et al., 2005). Durch den Einsatz von Trastuzumab konnte das rezidivfreie- und das Gesamtüberleben verbessert werden (Slamon et al., 2001; Piccart-Gebhart et al., 2005).

Gegenstand der onkologischen Grundlagenforschung ist unter anderem die Identifizierung neuer tumorspezifischer Marker, die gegebenenfalls in Zukunft für die Entwicklung neuer Therapieansätze herangezogen werden können.

In diesem Kontext untersucht die vorliegende Arbeit die Proteinexpression der Transketolase-like 1 (TKTL1) im Mamma-CA und korreliert diese mit klinischen und histopathologischen Verlaufsparemtern. In bisherigen Studien konnte bei verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression von TKTL1 mit ungünstigen klinisch-histologischen Parametern sowie einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Langbein et al., 2006). Die Expression des TKTL1 Proteins in Mamma-CAs wurde bisher noch nicht untersucht.

## **1.2. Der Warburg-Effekt**

Tumorzellen können ihre biochemischen Stoffwechselforgänge zugunsten einer vermehrten Proliferation ändern. So sind Tumorzellen zum Beispiel in der Lage, trotz vorhandenen Sauerstoffs Glukose anaerob zu Laktat abzubauen (aerobe Glykolyse; Warburg et al., 1924). Warburg postulierte, dies komme durch eine irreversible Schädigung der Atmungskette und eine kompensatorische Laktatbildung zustande. Das so in großen Mengen gebildete Laktat kann das Tumorwachstum fördern.

Der veränderte Metabolismus von Tumorzellen hat Eingang in die klinische Anwendung gefunden, beispielsweise in Form der Positronen Emissions Tomographie (PET) mit <sup>18</sup>Fluor-2-Desoxyglukose (FDG). Die PET macht sich die aerobe Glykolyse zunutzen, indem sie Bereiche mit erhöhtem Glukoseumsatz in invasiven Tumoren und Metastasen darstellt (Young et al., 1999; Czernin et al., 2002).

### 1.3. Laktatbildung als Promotor des Tumorwachstums

Trotz energetischer Insuffizienz und vorhandenen Sauerstoffs bauen Tumorzellen Glukose zu Laktat ab, wodurch sich vermutlich ein Vorteil für Tumorzellen ergibt. Ein erhöhter Glukoseumsatz sowie eine vermehrte Laktatbildung gelten als prognostisch ungünstige Parameter (Downey et al., 2004; Walenta et al., 2004). Wie die Laktatbildung das Tumorwachstum im einzelnen begünstigen kann, wird im Folgenden beschrieben:

- 1) Der verstärkte anaerobe Glukoseabbau durch Glykolyse führt zu einer großen Menge an Laktat; die Laktatdehydrogenase zeigt sich in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe hochreguliert (Walenta et al., 2004). Diese Laktatproduktion bietet den Tumorzellen einen Selektionsvorteil, sie entwickeln eine Resistenz gegenüber säure-induzierter Zelltoxizität. Durch die hochregulierte Glykolyse und die Säureresistenz haben Tumorzellen einen Wachstumsvorteil, der die Invasivität fördert (Gatenby et al., 2004). Eine hohe Laktatkonzentration ( $> 8 \mu\text{mol/g}$ ) wurde mit einer hohen Inzidenz der Fernmetastasierung und einem verstärkten malignen Verhalten von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht (Walenta et al., 2004).
- 2) Auf molekularer Ebene bewirkt die vermehrte Laktatbildung eine Aktivierung der Hyaluronsäuresynthese durch Tumor-assoziierte Fibroblasten. Hyaluronsäure ist ein Glycosaminoglycan der extrazellulären Matrix, welches für schnelles Gewebewachstum und für die Gewebereparation von Bedeutung ist. Es stimuliert die Zellmotilität und hydriert Gewebe, Bedingungen durch die eine Metastasierung erleichtert wird. In karzinomumgebendem Gewebe wurde vermehrt Hyaluronsäure nachgewiesen. Auch der prädominierende Hyaluronsäurerezeptor CD44 wird bei ansteigendem Laktat vermehrt exprimiert (Stern et al., 2002). Beispielsweise bewirkte die Gabe von Hyaluronidase in SCID Mäusen mit humanem Mamma-CA eine Tumorreduktion um 50% in vier Tagen. Eine Wirkung, die auf einen Rückgang der Hyaluronsäure und eine Modifizierung des CD44 Rezeptors zurückgeht (Shuster et al., 2002).
- 3) Bei erhöhter Laktatbildung wird ebenso eine Hochregulierung von VEGF und HIF1 $\alpha$  beschrieben. Beides sind Faktoren, welche das maligne Potential von Tumorzellen steigern (Walenta et al., 2004; Lu et al., 2002).
- 4) Die Ansäuerung der Umgebung durch Laktat wird ergänzt durch die Synthese von CO<sub>2</sub> im oxidativen Teil des PPP und die daraus folgende Produktion von H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Die

Laktatbildung sowie die  $\text{H}_2\text{CO}_3$  Produktion führen zu einem pH-Abfall der umgebenden Matrix und triggern dadurch einen p53-vermittelten Zelltod der benachbarten gesunden Zellen (Williams et al., 1999; Park et al., 2000). Tumorzellen hingegen entwickeln durch Mutationen in p53 oder einigen anderen Komponenten in der Apoptosekette die Möglichkeit zu überleben und behalten ihre proliferativen Eigenschaften in saurem, extrazellulärem pH.

5) Es wird von einem Modell säurevermittelter Tumordinvasion ausgegangen, das zur Degradation extrazellulärer Matrix, zu einem Verlust der intrazellulären Gap Junctions und zu einer Inhibition der Immunantwort auf die Tumorantigene führt (Gatenby et al., 2003).

#### **1.4. Die Bedeutung des Pentosephosphatwegs für die Laktatbildung**

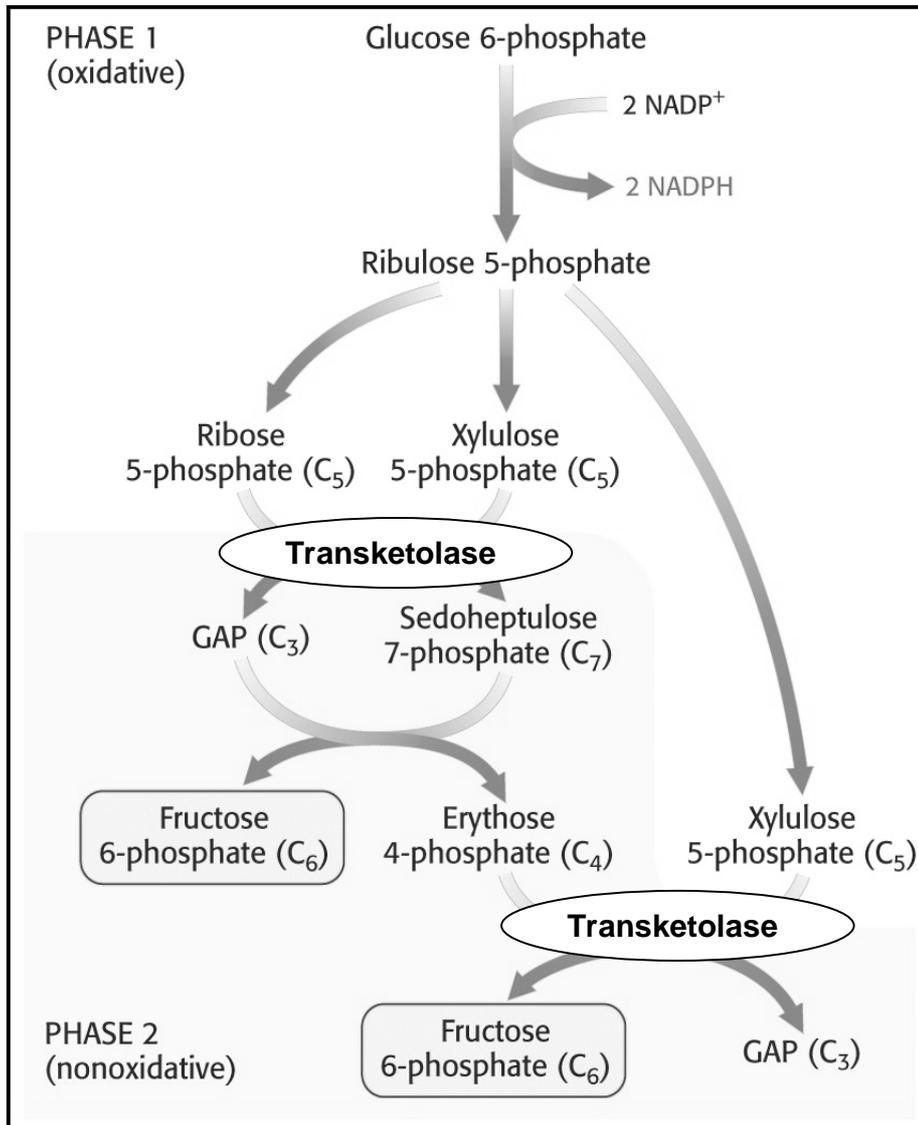
Für den Abbau von Glukose zu Laktat sind folgende zwei Stoffwechselwege zuständig:

a) Der Embden Meyerhof Weg:

Dieser beschreibt die Glykolyse von Glukose über Fruktose-1,6-Bisphosphat zu Pyruvat, welches bei Sauerstoffmangel zu Laktat reduziert wird (Boiteux et al., 1981; Pilkis et al., 1992; Löffler et al., 1998).

b) Der Pentosephosphatweg (PPP; Abb. 1; Horecker et al., 1976; Melendez-Hevia et al., 1985; Wood T, 1985; Berg et al., 2003):

Er dient der Bereitstellung von reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Koenzym für die Fettsäure- und Steroidbiosynthese und von Ribose-5-Phosphat (Ribose-5-P) zur Bildung von Nukleosiden und Nukleotiden. Er spielt daher quantitativ eine besondere Rolle in Geweben mit hohem  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  Bedarf, wie in der Leber, im Fettgewebe, in der laktierenden Mamma, in der Nebennierenrinde, in den Ovarien sowie in den Testes. Der im Zytosol ablaufende PPP wird in zwei Phasen eingeteilt. Die erste Phase besteht aus dem oxidativen Abbau von Glukose durch Dehydrierung und Decarboxylierung über Glukose-6-Phosphat, welches durch das Enzym Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD) gebildet wird, zu Ribulose-5-Phosphat (Ribulose-5-P). Dies geschieht unter Bildung von NADPH und  $\text{CO}_2$ . In der zweiten Phase katalysieren die beiden Enzyme Transketolase und Transaldolase durch Umlagerung von  $\text{C}_2$ - bzw.  $\text{C}_3$ -Körpern die Bildung von Fruktose-6-Phosphat (Fruktose-6-P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP)



**Abb. 1** Schema zum PPP: Der PPP besteht aus einer oxidativen Phase (Phase 1), in der aus Glukose-6-P Ribulose-5-P gebildet wird, aus welchem im nicht-oxidativen Teil des PPP (Phase 2) durch TKT- und Transaldolase-Reaktionen Fruktose-6-P und GAP entsteht. Diese dienen der Synthese von Glukose und Pyruvat, welches zu Laktat reduziert werden kann. Die enzymatischen Reaktionen in Phase 2 sind reversibel (modifiziert nach Berg et al., 2003).

aus Ribulose-5-P. Diese dienen der Synthese von Glukose oder Pyruvat, welches zu Laktat reduziert werden kann. Das in dieser nicht-oxidativ ablaufenden Phase gebildete Ribose-5-P wird zur Nukleinsäuresynthese verwendet (nicht-oxidative Nukleinsäuresynthese). Durch die Bereitstellung von Nukleosiden und Nukleotiden, die zur Synthese von DNS und Ribonukleinsäure (RNS) unentbehrlich sind, ist der PPP eine wichtige Voraussetzung für die

Proliferation von Zellen. Dies gilt auch für Tumorzellen, so dass durch die Nutzung des PPP die Zellteilung und damit das Tumorwachstum gefördert werden kann. Ein wichtiges Schlüsselenzym des PPP ist die Transketolase (TKT).

## 1.5. Das Enzym Transketolase

Die Transketolase (TKT) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym (Schenk et al., 1998b). Es katalysiert die Übertragung von C<sub>2</sub>-Einheiten, in der Regel von einer Ketose auf den Carbonyl-Kohlenstoff einer Aldose.

Die zwei von der TKT katalysierten reversiblen Reaktionen im PPP sind:

- Ribose-5-P + Xylulose-5-P            ↔    GAP + Sedoheptulose-7-P
- Erythrose-4-P + Xylulose-5-P       ↔    GAP + Fruktose-6-P

Kofaktoren der TKT sind Thiaminpyrophosphat (Thiamin-PP) und Magnesiumionen (Lindqvist et al., 1992; Schenk et al., 1998a). Die thiaminabhängige TKT ist ein wichtiges kontrollierendes Schlüsselenzym im nicht-oxidativen Teil des PPP (Berthon et al., 1992) und hat somit eine entscheidende Rolle für die Nukleinsäuresynthese, die Voraussetzung für Wachstum und Proliferation von Tumorzellen ist.

### 1.5.1. Transketolase in Tumorzellen

In Tumorzellen stammen 85% der Ribose der Nukleinsäuren aus dem nicht-oxidativen PPP (Boros et al., 1997).

In vivo Untersuchungen von Ehrlich-Aszites-Tumor tragenden Mäusen zeigen, dass die Applikation von Thiamin die Aktivität der TKT steigert und das Tumorwachstum fördert (Comin-Anduix et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt eine Hemmung der TKT zu einer Reduktion des Tumorwachstums (Rais et al., 1999). Der TKT Enzymreaktion und ihrem Kofaktor Thiamin kommt eine wichtige Bedeutung im Rahmen der Proliferation von Tumoren zu; der molekulare Hintergrund dieser Befunde ist jedoch noch weitgehend unklar.

### 1.5.2. Transketolase Gene

Es gibt drei verschiedene Transketolase-Gene: Das Transketolase-Gen TKT, sowie 2 Varianten, Transketolase-like 1 (TKTL1) und Transketolase-like 2 (TKTL2) (Coy et al., 2005). Trotz der großen Homologie zwischen diesen 3 Genen gibt es einige Unterschiede: Die TKT und TKTL1 Gene haben die gleiche Genstruktur, während das TKTL2 Gen intronlos ist. Die TKT und TKTL2 Transkripte beinhalten Exon 3 Sequenzen bzw. Sequenzen, die homolog zu Exon 3 sind. Dem TKTL1 Transkript fehlen diese jedoch durch eine interne Deletion (Coy et al., 1996). Downstream dieser Deletion beträgt die Übereinstimmung der Sequenzen zwischen TKTL1 und TKT 66% auf DNS-Ebene und 63% auf Proteinebene. Dieser Grad der Übereinstimmung entspricht Werten wie sie bei einer Genduplikation beobachtet werden. Zwischen TKTL1 und TKTL2 sind 80% der Sequenzen auf DNS-Ebene und 77% der Sequenzen auf Proteinebene identisch. Diese hohe Übereinstimmung zwischen TKTL2 und TKTL1 lässt darauf schließen, dass in der Entwicklungsgeschichte vor der Deletion von Exon 3 die TKTL1 dupliziert wurde, und diese Kopie als TKTL2 von einer reversen Transkriptase in das Genom integriert wurde (Coy et al., 2005). Das TKT Gen codiert für das aktive Enzym Transketolase, das TKTL2 Gen wahrscheinlich ebenfalls. Es wurde angenommen, dass das TKTL1 Gen ein Pseudogen ist, aber es hat sich herausgestellt, dass auch dieses Gen für ein Transketolase-ähnliches Protein codiert (Coy et al., 1996).

### 1.5.3. TKTL1

Die TKTL1 ist eine durch Mutationen alterierte, aber funktionell aktive TKT mit veränderten enzymatischen Reaktionen. Es handelt sich um ein multifunktionales Protein, das sich hauptsächlich im Zytoplasma befindet, aber auch vereinzelt im Nukleus nachgewiesen werden konnte (Langbein et al., 2006).

Um die Transketolaseaktivität der TKTL1 nachzuweisen, wurde in einer vorausgegangenen Studie ein rekombinant hergestelltes, in E.coli exprimiertes TKTL1 Protein und ein natives TKTL1 Protein aus einer Tumorzelllinie untersucht. Dabei zeigten beide TKTL1 Proteine eine Transketolasereaktion mit Umsetzung der beiden Substrate Xylulose-5-P und

Ribose-5-P (Coy et al., 2005). In einer vorausgegangenen Untersuchung an Hefezellen, in denen die TKT eine Mutation in His103 aufwies, fiel eine Veränderung der Transketolase Aktivität mit einer vermehrten Ein-Substrat Nutzung auf (Wikner et al., 1995). Da die Mutation innerhalb der TKTL1 zu einer Deletion eines Aminosäuren-Restes führt, der einen His-Rest betrifft, der homolog zu dem His103 in Hefezellen ist, wurde die Substratnutzung der TKTL1 auch in dem von E.coli exprimierten TKTL1 Protein und dem nativen TKTL1 Protein aus einer Tumorzelllinie untersucht, mit der Fragestellung ob die TKTL1 ebenfalls eine Ein-Substrat Aktivität aufweist (Coy et al., 2005).

Es hat sich herausgestellt, dass durch die oben erwähnte Deletion des Exon 3 eine Veränderung der Substratspezifität der TKTL1 resultiert, die mit einem vermehrten Substratumsatz einhergeht. Sowohl die native TKTL1 als auch die rekombinant hergestellte TKTL1 zeigen zu der üblichen Zwei-Substrat-Reaktion eine Ein-Substrat Aktivität (42% bzw. 47%), bei der Xylulose-5-P als einziges Substrat zu GAP und Erythrulose umgesetzt wird (Bykova et al., 2001). Die Mutation innerhalb des TKTL1 Proteins betrifft demnach eine Protein Domäne, welche die Substratnutzung und den Reaktionsmodus der Transketolasen modifiziert (Coy et al, 2005).

Das TKTL1 Gen kodiert für ein Transketolase Protein mit modifizierter enzymatischer Aktivität sowie für kleine Protein Isoformen, die enzymatisch nicht aktiv sind (Coy et al., 2005).

#### **1.5.4. Transketolase in Normalgeweben**

Bei der Bestimmung der einzelnen Transketolase Gene in Normalgewebe (ZNS, Herz, Leber, Lunge, Mamma, Ovar, Niere, Testis, Milz, Magen, Kolon, Uterus, Ösophagus, Haut, Thymus, Blase, Muskel, Prostata und Retina) konnte gezeigt werden, dass die TKT Expression im Durchschnitt 60-1.000 mal höher ist als die von TKTL1 und TKTL2. Diese beiden besitzen hingegen eine ausgeprägtere Gewebespezifität, und die Expressionshöhe in Normalgewebe variiert stärker. Beispielsweise wurde in Testisgewebe im Vergleich zu Lunge, Ovar oder Haut eine 12.000 fach höhere TKTL1 Expression beobachtet. Insgesamt zeigte sich in Normalgeweben, in denen eine vermehrte aerobe Glykolyse stattfindet, wie in Testis, Thymus und Retina, auch eine hohe TKTL1 Expression (Coy et al., 2005).

### **1.5.5. TKTL1 in Tumorgeweben**

In den bisher untersuchten Tumoren wurde die TKTL1 Expression im Gegensatz zu Normalgeweben hochreguliert, wohingegen die TKT und TKTL2 nicht überexprimiert wurden. Diese Überexpression konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden (Langbein et al., 2006). Hierzu wurde ein spezifischer IgG<sub>2b</sub> Antikörper (Mab JFC12T10) gegen das C-terminale Fragment des TKTL1 Proteins verwendet. Immunhistochemisch wurde dabei die TKTL1 in ganzer Länge sowie vier kleinere Proteinisoformen in Tumorgeweben nachgewiesen (Coy et al., 2005). Es konnte für verschiedene invasive Tumoren gezeigt werden, dass eine TKTL1 Überexpression zu einem schlechteren Outcome der Patienten führt. Studien, die diese Korrelation bestätigen, gibt es derzeit zum Urothel- und Kolon-CA, bei denen die TKTL1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene überexprimiert wird, während die TKT- und TKTL2 Expression nicht hochreguliert ist (Langbein et al., 2006). Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Lokalisation des TKTL1 Gens in der Region Xq28 (Coy et al., 1996), eine von wenigen chromosomalen Regionen, die in Malignomen und während des Zellzyklus aktiviert ist. Das TKT- sowie das TKTL2 Gen sind nicht in solch einer genomischen Region lokalisiert (Coy et al., 2005). Xq28 gehört zu den "Common malignancy-associated regions of transcriptional activation" (MARTA). Diese korrespondieren zuweilen mit Regionen, in denen in Karzinomen wiederkehrende Amplifikationen stattfinden (Glinsky et al., 2003 a, b). Die Lokalisation des TKTL1 Gens in der Xq28 Region erklärt, warum in Tumoren nur eine TKTL1 Überexpression nachzuweisen ist, während TKT und TKTL2 nicht überexprimiert werden.

### **1.5.6. Initiale Hypoxie und eine TKTL1 Überexpression als mögliche Erklärung des Warburg-Effektes**

Da in Tumoren häufig anaerobe Bedingungen herrschen, v.a. während der initialen Karzinogenese, und beobachtet wurde, dass der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) mit zunehmender Entfernung zum Gefäß schneller abnimmt als der Glukosespiegel (Gatenby et al., 2004), würde als Adaptation eine Steigerung des nicht-oxidativen PPP durch eine TKTL1

Hochregulierung das Tumorwachstum begünstigen. In prämaligen Geweben ist der  $pO_2$  schon bei einem Abstand von 100  $\mu m$  zum Gefäß annähernd Null (Gatenby et al., 2004). Der nicht-oxidative PPP und die TKT als Schlüsselenzym, gewinnen somit bei anaeroben Bedingungen an Bedeutung, sie dienen der Adaption an die in Tumoren vorkommende Hypoxie. Laut einer Hypothese zur Erklärung des Warburg Effektes führt persistierende oder zyklisch auftretende Hypoxie in Tumoren zu einem Selektionsdruck, aus dem eine gesteigerte Glykolyse resultiert, die auch in Anwesenheit von Sauerstoff persistiert (Gatenby et al., 2004).

### **1.6. Akt-Onkogene und der Einfluss einer ketogenen Diät**

Akt-Onkogene bilden eine Unterfamilie der Serin/Threonin Kinasen, die eine wichtige Rolle im Zell- und Glukosestoffwechsel spielen (Elstrom et al., 2004). In neueren Studien zeigte man, dass aktivierte Akt-Onkogene einen direkten Einfluss auf die Stimulation der aeroben Glykolyse haben: Eine Aktivierung der Akt-Kinase stimuliert Glukoseaufnahme und Glukosemetabolismus in Karzinomzellen und macht diese bei Glukosemangel anfälliger für den Zelltod (Elstrom et al., 2004). Zudem inhibieren Akt-exprimierende Zellen bei Glukosemangel die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. Vermutlich erhalten Tumorzellen dadurch einen Wachstumsvorteil (Buzzai et al., 2005). Da aggressive Tumorzellen von Glukose abhängig sind und Fettsäuren nicht über die  $\beta$ -Oxidation verwerten können, könnte eine ketogene Diät mit der überwiegenden Aufnahme von mittelkettigen Fettsäuren, zu einer Inhibition von Tumoren führen. Die Anwendung einer ketogenen Diät bei zwei pädiatrischen Patienten mit der Diagnose eines fortgeschrittenen malignen Astrozytoms bestätigte diese Überlegung: es wurde eine um 21,8% verminderte Glukoseaufnahme in den malignen Tumoren beobachtet, die mittels PET dargestellt wurde (Nebeling et al., 1995; Seyfried & Mukherjee, 2005).

Langbein et al. (2006) untersuchte in verschiedenen Tumorentitäten, ob Tumoren mit einer Überexpression des TKTL1 Proteins auch eine Aktivierung des Akt-Proteins aufweisen. 83% der Tumoren zeigten eine verstärkte TKTL1 Expression und 69% zeigten eine Aktivierung des Akt-Proteins. Dies lässt darauf schließen, dass die Mehrzahl der TKTL1 exprimierenden Tumoren auch ein aktiviertes Akt-Protein aufweist.

Die biochemischen Grundlagen des Warburg-Effekts ließen sich bislang nicht erklären. In vergangenen Arbeiten konnte in Tumorzellen kein Zusammenhang zwischen der TKT Expression und dem gesteigerten anaeroben Abbau von Glukose zu Laktat nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Normalgewebe wurde die TKT in Tumorgewebe nicht verstärkt exprimiert. Erst mit der Entschlüsselung und Entdeckung verschiedener Transketolase Gene lässt sich der Effekt erklären. Es gibt drei Gene, die für die TKT, TKTL1 und TKTL2 kodieren. Dabei hat sich herausgestellt, dass in verschiedenen Tumorgeweben nur die TKTL1 überexprimiert wird. Da der Warburg-Effekt auch beim Mamma-CA eine Rolle spielt (Isodoro et al., 2005; Robey et al., 2005), stellt sich die Frage, ob sich auch im Mamma-CA eine Überexpression der TKTL1 nachweisen lässt.

### **1.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression des TKTL1 Proteins im Mamma-CA und in korrespondierendem, nicht-neoplastischen Mammagewebe. Außerdem wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der TKTL1 Überexpression und klinisch-histopathologischen Parametern geprüft.

Folgende Fragen wurden bearbeitet:

1. Ist eine Expression der TKTL1 im Mamma-CA nachweisbar?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen der qualitativen TKTL1 Expression zu
  - a) dem Tumor-Stadium (pT)
  - b) der Tumorgroße
  - c) dem Nodal-Status (pN)
  - d) dem Grading (G)
  - e) dem Hormonrezeptor-Status (Östrogenrezeptor- (ER) und Progesteronrezeptor- (PR) Status)
  - f) der Angioinvasion
  - g) dem Alter der Patientinnen

- h) der Her2/neu-Expression?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen der TKTL1 Expression und der Überlebenszeit der Patientinnen?

In dieser retrospektiven Studie wurde ein Kollektiv von 124 Patientinnen mit der Diagnose eines invasiven Mamma-CA untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Tissue Micro Arrays (TMAs) angefertigt, die immunhistochemisch (IHC) mit einem TKTL1 spezifischen Antikörper gefärbt wurden. Die TKTL1 Expression wurde mit klinisch-histologischen Parametern korreliert. Die Überlebenszeitanalyse erfolgte nach Kaplan Meier.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patientenkollektiv**

#### **2.1.1. Beschreibung des Patientenkollektivs**

Das Patientenkollektiv dieser retrospektiven Studie besteht aus Patientinnen der Universitäts-Frauenklinik Freiburg mit der Diagnose eines primären invasiven Mamma-CA. Es beinhaltet Patientinnen, die keine Chemotherapie, Radiotherapie oder Antihormonelle Therapie vor der Operation (OP) erhielten. Nach der Erstdiagnose (ED) wurde eine brusterhaltende OP oder eine Mastektomie durchgeführt, gefolgt von einer stadienadaptierten adjuvanten Therapie angepasst an die jeweils gültigen aktuellen onkologischen Empfehlungen. Eine adjuvante Chemotherapie erhielten überwiegend nodalpositive Patientinnen; die Therapie war v.a. Cyclophosphamid - Methotrexat - 5-Fluorouracil (CMF) basiert. Tumorgewebe wurde nach der OP in Paraffin eingebettet. Ausgeschlossen sind Patientinnen mit Fernmetastasierung, sekundärer Malignität und einem Alter über 80 Jahren bei ED. Es werden 124 Patientinnen erfasst, die zwischen dem 10. Dezember 1906 und dem 30. Dezember 1967 geboren sind. Die ED zum Mamma-CA wurde zwischen dem 1. Januar 1991 und dem 1. Mai 1999 gestellt, und das OP-Datum liegt zwischen August 1992 und März 2000. Einunddreißig Patientinnen sind im Zeitraum zwischen April 1993 und August 2001 verstorben. Zwischen Januar 1993 und Oktober 2001 sind von 113 Patientinnen die Daten des Letztkontaktes vorhanden. Histologisch sind in dem Kollektiv von 124 Mamma-CAs folgende Subtypen erfasst: 105 Tumoren sind invasiv-duktral, 10 invasiv-lobulär, drei Tumoren bestehen aus invasiv-lobulären und invasiv-duktralen Komponenten, fünf Tumoren sind invasiv-medullär und ein Tumor ist apokrin. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation der World Health Organization (WHO; Ellis et al., 2003). Laut TNM-Klassifikation haben die Primärtumoren die T-Stadien 1 bis 4, der Nodal-Status liegt zwischen N0 und N3. Das Grading der verwendeten Tumoren beträgt G1 (hochdifferenziert) bis G3 (gering differenziert), die Tumorgröße liegt zwischen 0,4 und 15 cm und das Angioinvasion-Stadium wird mit V0 (keine Veneninvasion) bis V2 (makroskopische Veneninvasion; Bässler, 1997) angegeben. Die Tumoren zeigen einen quantitativen ER- und PR-Status zwischen 0 und 100% („Allred Scoring Guideline for ER/PR“, DakoCytomation), die Her2/neu- (HerceptTest®, DakoCytomation) und TKTL1- (siehe unten) Expression werden in einem Scoresystem von

0-3 ausgedrückt. Das Kollektiv und das Follow-up mit klinisch-histologischen Parametern wurden uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. D. Watermann (Universitäts-Frauenklinik, Freiburg) überlassen. Es wurde das Tumorgewebe der 124 Patientinnen untersucht und korrespondierendes nicht-neoplastisches Mammagewebe.

## 2.2. Materialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Geräte

### 2.2.1. Materialien, Chemikalien für den Hämalaun-Eosin- (H.E.-) Schnitt und als Vorbereitung für die Tissue Microarrays (TMAs)

Objektträger	Super Frost Plus, Langenbrinck, In Vitro Diagnostic, Teningen, Deutschland
Xylol	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	nach Hausrezept, ergibt 1 l: 3,0 g Haematoxylin, 1000 ml Aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure
Eosin G gelblich	Eosinansatz: 980 ml Aqua dest., 1,5 g Eosinpulver, 10 Tropfen Eisessig (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)
Histofluid	Firma Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Deckgläschen	Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Ausgießstation	Firma Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Paraffin	Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Kunststoffkassette	Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Metallform	Firma Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte	Firma Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland

### 2.2.2. Geräte für die TMAs

Modell Manual Tissue Arrayer 1 (MTA 1)	Firma Beecher Instruments, Incorporation (Inc.), Wisconsin, USA
Arbeitsbrücke	Firma Beecher Instruments, Inc., Wisconsin, USA
Stanzen	Firma Beecher Instruments, Inc., Wisconsin, USA Stanzdurchmesser 2 mm
Inbusschlüssel	Firma Beecher Instruments, Inc., Wisconsin, USA
Wärmeschrank	Firma Memmert, Schwabach, Deutschland

### 2.2.3. Materialien, Chemikalien und Puffer für die Immunhistochemie

Linearfärber	Tissue Stainer COT 20, Firma Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Xylol	Firma Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deionisiertes Wasser	aufbereitet mit einer Seradest SD 2800 Patrone, Zitt-Thoma Laborbedarf-Glasbläserei, Freiburg, Deutschland
Dampfgarer	Multi Gourmet, Firma Braun, Kronberg, Deutschland
Kochpuffer	Target Retrieval Solution (TRS), pH 6,1, Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland (TRS wird mit deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt)
Autostainer	Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
ChemMate™ Detection Kit	Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse: Flasche A: Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) Flasche B: Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) Flasche C: Chromogen Red 1 Flasche D: Chromogen Red 2

	Flasche E: Chromogen Red 3
	Flasche F: AP Substrate Buffer
	Flasche G: Levamisole
	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Waschpuffer	DakoCytomation, Hamburg (1:10 verdünnt), Deutschland
Primärantikörper	Monoklonaler IgG <sub>2b</sub> , Maus, freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. J.F. Coy, Darmstadt, Deutschland
Verdünnungsmedium	Antibody Diluent, Firma Zymed, Wien, Österreich
Hämalaun	s.o.
Folieneindecker	Tissue-Tek. SCA, Firma Vogel, Gießen, Deutschland

#### **2.2.4. Mikroskop**

Mikroskop	Axioskop, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland
-----------	---

#### **2.2.5. Statistische Auswertung**

SPSS-Software-Paket Version 13.0	SPSS for windows, SPSS, Chicago, USA
----------------------------------	--------------------------------------

## 2.3. Methoden

### 2.3.1 Übersicht: Herstellung von Tissue Microarrays (TMAs) und immunhistologische Anfärbung (IHC)

- Vorbereitung der TMAs:
  - Heraussuchen und Erstellen des Spenderblockkollektivs
  - Anfertigung Histologischer Schnitte
  - Markierung der zu stanzenden Tumorareale
  - Herstellung von Nativblöcken (Empfängerblöcken)
- Stanzen von TMAs
- IHC mit dem TKTL1 IgG<sub>2b</sub> Antikörper (AK)
- Auswertung (unter Mikroskopsicht, Einteilung in Scores)

### 2.3.2. Vorbereitung der TMAs

#### 2.3.2.1. Erstellung des Spenderblockkollektivs

In dem Archiv der Abteilung Pathologie werden die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke unter einer zugeteilten Journalnummer gelagert. Die histologischen Befunde geben Aufschluss über die Journalnummer des Gewebelockes, der für die geplante IHC geeignetes Tumormaterial enthält. Diese Gewebelöcke dienen hier als Spenderlöcke.

#### 2.3.2.2. Anfertigung histologischer Schnitte

Damit ein aktuelles Bild des Tumorgewebes zur Verfügung steht, müssen als Vorbereitung für die TMAs frische Hämalaun-Eosin (H.E.)-Schnitte angefertigt werden.

H.E.-Schnitte nach Standardprotokoll:

Zuerst wird mit dem Schlittenmikrotom ein aktueller Schnitt der Dicke 3 µm von dem Spenderblock angefertigt. Nach der Streckung auf einem warmen Wasserbad wird der histologische Schnitt auf den Objektträger gezogen und im Brutschrank bei 60° getrocknet.

Die anschließende H.E.-Färbung beginnt mit der Entparaffinierung durch zweimaliges Xylol für 10 Min. Es folgt eine absteigende Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%), wobei der Objektträger in jeder Stufe 2 Min. verweilen sollte. Danach wird der Alkohol mit Wasser 2 Min. lang abgewaschen. Die Kernfärbung erfolgt 8-10 Min. lang mit Hämalaun. Die Schnitte werden daraufhin für 10 Min. gewässert und mit Eosin unter Sichtkontrolle höchstens 1 Min. lang gefärbt. Mit dem zweimaligen Eintauchen in die aufsteigende Alkoholreihe (Konzentrationen in umgekehrter Reihenfolge, s.o.) wird das Entwässern der Schnitte und eine bessere Differenzierung bezweckt. Anschließend werden die Schnitte für je mindestens 2 Min. zweimal in Xylol getaucht. Xylol dient als Intermedium, es ist sowohl in Alkohol als auch in dem Einschlussmedium löslich. Zum Schluss werden die histologischen Schnitte unter Zusatz eines Einschlussmittels (Histofluid) eingedeckt.

#### **2.3.2.3. Markierung der Tumorareale**

Der H.E.-Schnitt wird als Übersicht verwendet, um die richtige Entnahmestelle der Stanze festzulegen. Die Tumorareale, die bestimmt sind, auf dem TMA erfasst zu werden, werden unter Mikroskopsicht auf den aktuellen H.E.-Schnitten markiert.

#### **2.3.2.4. Herstellung von Empfängerblöcken**

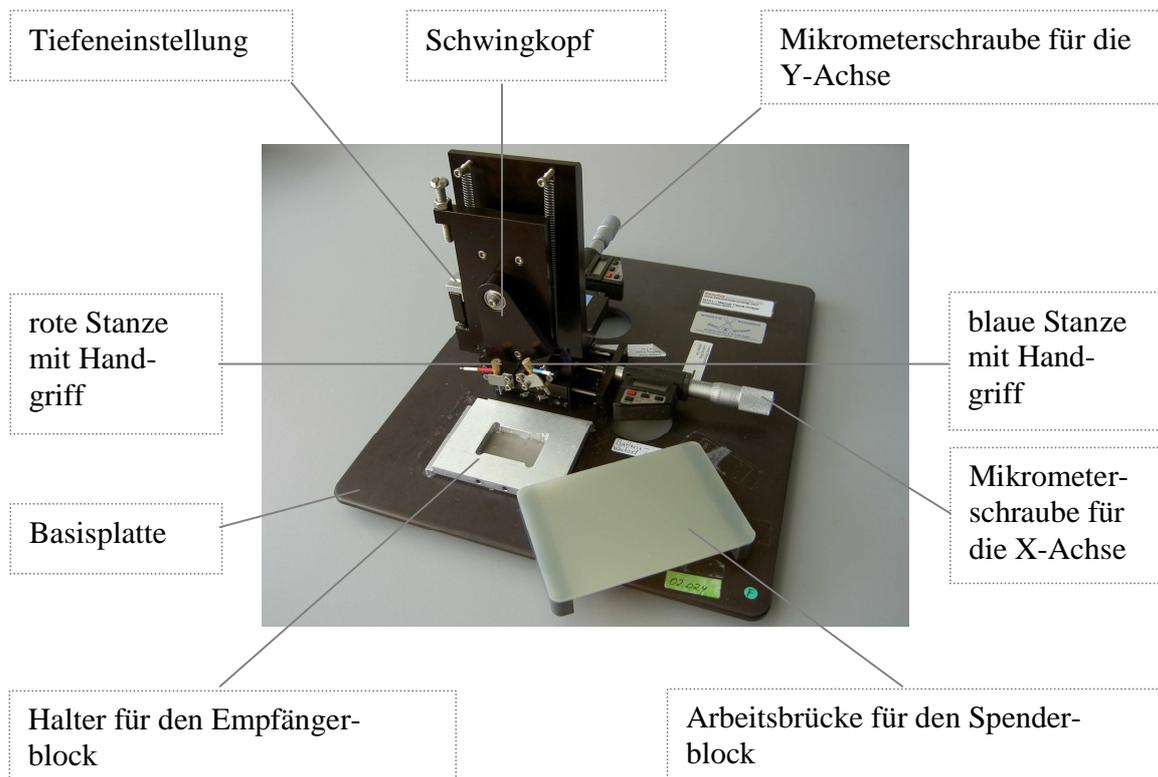
Als Empfängerblock dienen reine Paraffinblöcke ohne Gewebe, die auf einer Ausgießstation hergestellt werden. Dazu wird Paraffin aufgeschmolzen (55-58°) und in eine Metallform gegossen. Danach lässt man den Block auf einer Kühlplatte für ca. 20 Min. abkühlen und aushärten. Zur Fertigstellung wird der festgewordene Paraffinblock mit dem Mikrotom angeschnitten, um die Oberfläche zu glätten.

### **2.3.3. Anfertigung von TMAs**

#### **2.3.3.1. Beschreibung des Manual Tissue Arrayers**

Mit dem Manual Tissue Arrayer (MTA; Abb.1) werden die TMAs gestanzt. Bei dieser Arbeit wurde ein MTA 1 verwendet. Das Gerät besteht aus einer Basisplatte, einem Halter für den Empfängerblock, einer Arbeitsbrücke für den Spenderblock, zwei Stanzen, einer Tiefeneinstellung, einem Schwingkopf zum Umschalten zwischen den einzelnen Stanzen und

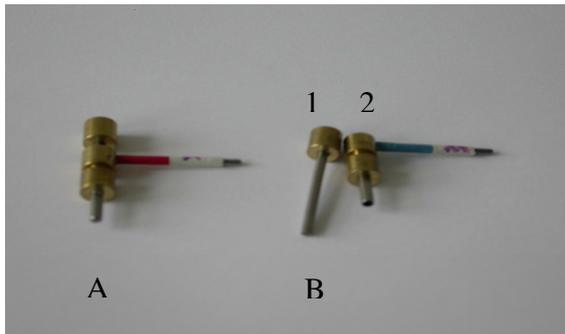
X- und Y- Präzisionsführungen. Die Führungen bewegen sich, wenn die Einstellschrauben an den Mikrometerschrauben gedreht werden. Die Anzeige der Mikrometerschrauben zeigt dann die Position der Führung an. Sie wird in Millimeter (mm) eingestellt (AlpaMetrix Biotech 2005, Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, 2.Aufl. Rödermark, S.1-24).



**Abb. 2** Aufbau und Beschriftung des Manual Tissue Arrayer, mit dem die TMAs gestanzt werden.

### 2.3.3.2. Beschreibung der Stanzen

Der Durchmesser der Stanzen beträgt 2 mm, die Stanztiefe ist mit 5 mm eingestellt. Die Stanzen (Abb. 3) besitzen eine geschliffene Hohnadel, in der ein Stempel steckt. Durch Drücken auf das Stempelende ist Gewebe oder Paraffin, welches gestanzt wurde, nach vorne auswerfbar. Mithilfe des Schwingkopfes wird die Stanze senkrecht in den Spender-/



**Abb. 3** Stanzen: A - rote Stanze zum Stanzen des Paraffinblockes B - blaue Stanze, zum Stanzen des Gewebeblockes; Beide Stanzen bestehen aus zwei Komponenten: einem Stempel (1), der in die Hohlzylinder (2) eingeführt wird.



**Abb. 4** von links nach rechts: (1) Nativblock (2) Gewebeblock mit Mamma-CA aus dem die Gewebestanden für die TMAs entnommen werden (3) H.E.-Schnitt mit markiertem Tumormaterial

Empfängerblock gedrückt. Durch Hin- und Herdrehen des Handgriffes am Stempel erreicht man ein leichteres Ablösen des Stanzzylinders aus dem Paraffin-/Gewebeblock. Danach wird die Stanze wieder senkrecht herausgezogen. Das gestanzte Material wird durch Druck auf das Stempelende abgestreift.

#### 2.3.4. Vorgehen bei dem Stanzen von TMAs

##### 2.3.4.1. Anlegen und Stanzen des Empfängerblockes

Der Empfängerblock wird in den Halter gelegt und mit dem Inbusschlüssel eingespannt. Die Oberfläche des Blockes sollte parallel zur Arbeitsplatte liegen, die Seite zur Beschriftung zeigt nach links, die Paraffinseite zeigt nach oben. Der Herstellungsprozess startet mit dem Stanzen eines Lochs in der ersten Position. Zu diesem Zeitpunkt werden die Mikrometer auf Null gesetzt. Die linke (rote) Stanze wird eingestellt. Um eine Rissbildung im Ansatz zu vermeiden, wird zu den Rändern ein Abstand von 3 bis 4 mm eingehalten. Das erste Loch wird in die linke obere Ecke gestanzt. Dabei drückt man die Stanze durch Herunterbewegen des Schwingkopfes in den Paraffinblock. Ist die Einstichtiefe von 5 mm erreicht, wird die Stanze blockiert. Mithilfe von Drehbewegungen des Handgriffes nahe der Stanze wird die Paraffinstanze aus dem Block gelöst. Durch Loslassen des Druckes auf den Schwingkopf wird

dieser durch eine Rückzugsfeder wieder nach oben in die Ausgangsposition gezogen. Nun wird durch Druck auf den Stempel das gestanzte Material als Paraffinstanzzylinder ausgeworfen.

#### **2.3.4.2. Anlegen und Stanzen des Spenderblockes**

Die Arbeitsbrücke wird auf den Blockhalter gestellt und der Schwingkopf wird so in Position gebracht, dass die rechte (blaue) Stanze eingestellt ist. Der Spenderblock mit dem Tumormaterial wird auf der Arbeitsbrücke positioniert. Mithilfe des korrespondierenden markierten H.E.-Schnittes wird die entsprechende Stelle auf dem Spenderblock lokalisiert. Danach wird die blaue Stanze nach unten gedrückt, um das gewünschte Areal zu entnehmen. Auch hier wird die Lösung des Gewebezylinders vom Block durch Drehbewegungen des Handgriffes erleichtert.

#### **2.3.4.3. Einsetzen der Spenderstanze**

Die Brücke wird beiseite genommen und der Gewebestanzzylinder in das zuvor gestanzte Loch des Empfängerblocks eingesetzt.

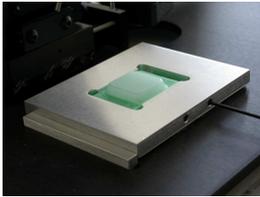
Die beschriebenen Schritte wiederholen sich bis der Empfängerblock mit Gewebestanzungen gefüllt ist. Zur späteren Orientierung wird in der letzten Reihe ein Areal nicht gestanzt und die Reihenfolge der Patientenfälle auf einem Protokoll festgehalten. Die Stanzung erfolgt mäanderförmig. Der Abstand zwischen den Stanzen beträgt 3,5 mm zu allen Seiten, dies wird mit den X- und Y- Präzisionsführungen anhand der Mikrometerschraube eingestellt.

#### **2.3.4.4. Vorbereitung für den Gewebeschnitt**

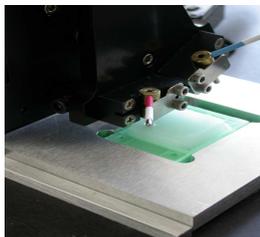
Ist ein TMA fertig gestanzt, wird die Oberfläche des Arrays auf einem geraden Untergrund geebnet, damit alle Stanzzylinder die gleiche Höhe haben. Abschließend wird der Block für 10 Min. bei 58-60° in einen Wärmeschrank gestellt. Dadurch wird das Paraffin erwärmt und die Gewebestanzungen mit dem Paraffin besser verbunden. Danach lässt man den Array langsam abkühlen. Anschließend können Schnitte für die IHC gewonnen werden.

### 2.3.4.5. Abb. 5-12 Bildfolge: Die einzelnen Schritte zur Herstellung eines TMA

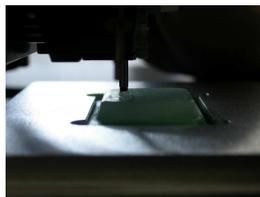
#### Anlegen und Vorbereitung des Empfängerblockes



**Abb. 5** Anbringen und Fixieren des Empfängerblockes, Paraffinseite nach oben zeigend



**Abb. 6** Linke (Rote) Stanze auf entsprechenden Bereich einstellen (erste Stanze in Ecke links oben, circa 4 mm Abstand nach links und oben)

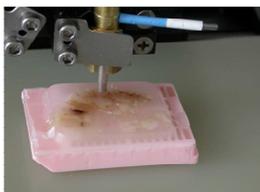


**Abb. 7** Herausstanzen des eingestellten Bereichs, gestanztes Material (Paraffinstanzzyylinder) auswerfen

#### Anlegen und Stanzen des Spenderblockes

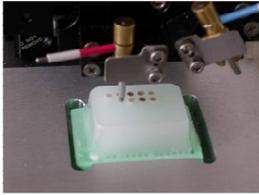


**Abb. 8** Übertragen der Markierung des bestimmten Tumormaterials von dem H.E.-Schnitt auf den dazugehörigen Spenderblock

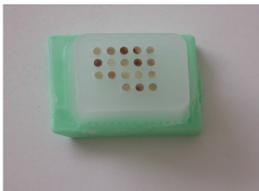


**Abb. 9** Anbringen und Fixieren des Blockes mit Tumormaterial, Gewebematerial nach oben zeigend, rechte (blaue) Stanze einstellen, markiertes Tumormaterial herausstanzen

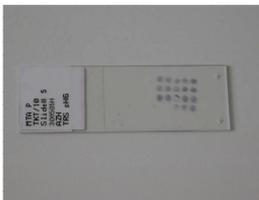
### Einsetzen der Spenderstanze in den TMA



**Abb. 10** Einsetzen des Tumormaterials (Stanzzylinder) aus dem Spenderblock in den Empfängerblock



**Abb. 11** Aufbau eines fertigen TMA - Blockes



**Abb. 12** TMA nach der immunhistochemischen Färbung mit dem TKTL1-AK

#### 2.3.5. Aufbau eines TMA-Blockes

Es befinden sich fünf Stanzzylinder in der horizontalen Reihe und vier in der vertikalen Reihe. Insgesamt werden von jedem Patienten zwei bis drei Stanzzylinder auf das TMA eingebracht, in ganz seltenen Fällen bei ungenügendem Material nur eine, zudem gibt es auf jedem TMA zwei Negativkontrollen. Dabei handelt es sich um peritumorales, nicht-neoplastisches Mammagewebe. Auf einem TMA befinden sich zwischen 14 und 19 Stanzzylindern bzw. jeweils das Tumormaterial von vier bis sieben Fällen. Es wurden insgesamt 23 TMAs angefertigt, diese sind von MTA A bis W durchnummeriert.

#### 2.3.6. Vorteile von TMAs

TMAs sind eine gute Methode zur Darstellung von immunhistochemischen Färbungen. Sie haben den Vorteil, dass Material von vielen Patienten auf einem Block ersichtlich ist und dadurch eine gleichzeitige Untersuchung verschiedener Gewebeproben möglich ist. Sie gewährleisten zudem eine Standardisierung der angewandten Methoden, weil alle Gewebe auf

einem Block unter völlig identischen Bedingungen gefärbt werden (Beecher Instruments Inc. 1998, Manual Tissue Arrayer MTA-1, 2.Aufl. Wisconsin, S.1-14; Kononen et al., 1998).

### **2.3.7. Immunhistochemische Färbung mit dem TKTL1 Antikörper Labeled-StreptAvidin-Biotin-Methode (LSAB-Immunhistochemie)**

Als Methode zur Darstellung der zytoplasmatischen TKTL1 wird die LSAB-Methode als indirekte IHC verwendet.

**Gewebevorbereitung:** Mit dem Mikrotom werden 2 bis 4 µm dicke Gewebeschnitte von den TMA-Blöcken angefertigt. Danach inkubieren die Schnitte zur Fixierung an den Objektträger über Nacht bei 58° in einem Heißluft-/Umluftbrutschrank.

**Entparaffinierung:** Die Entparaffinierung erfolgt in einem Linearfärber (Tissue Stainer). Der Tissue Stainer besteht aus insgesamt 23 aufeinanderfolgenden Küvetten mit unterschiedlichen Lösungen, in denen die Gewebeschnitte nacheinander automatisch 1½ Min. verweilen. Fünfzehn Küvetten sind mit Xylol gefüllt. In der anschließenden absteigenden Alkoholreihe beinhalten 3 Küvetten 100% Ethanol, je eine Küvette 96% und 70% Ethanol gefolgt von drei Küvetten mit deionisiertem Wasser. Nachdem die Gewebeschnitte die letzte Küvette erreicht haben, ertönt ein akustisches Signal.

**Antigendemaskierung:** Zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung werden die Gewebeschnitte in einem Wasserbad in einem Dampfgerät (Multi Gourmet) behandelt. Der Dampfgerät besitzt eine Wasserauffangschale und einen Aufsatz für die Küvetten. Als Kochpuffer wird Target Retrieval Solution (TRS, pH 6,1) verwendet. Diese wird 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt, in eine 200 ml fassende Küvette gefüllt und 20 Min. in dem Dampfgerät bei 96-99° vorgeheizt. Danach werden die Objektträger in den heißen Puffer gesetzt und in der verschlossenen Küvette für 30 Min. bei konstant bleibender Temperatur mit Dampf inkubiert. Durch dieses Verfahren werden die durch Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzungen wieder aufgehoben, so dass potentiell maskierte Antigene freigelegt werden. Zum langsamen Abkühlen wird die Küvette mit den Gewebeschnitten eröffnet und

ca. 10 Min. in kaltes Wasser gestellt bis der Puffer klar wird. Anschließend werden die Gewebeschnitte in deionisiertes Wasser umgesetzt.

**Immunhistochemische Färbung:** Für die IHC wurde das ChemMate Detection Kit Alkaline Phosphatase/RED (DakoCytomation 2003, 2.Aufl. Glostrup, S.32-45) verwendet. Es wird ein Autostainer benutzt, der Platz für insgesamt 48 Objektträger besitzt und den man zuvor programmiert (s.u. Schritt 1-4). Pro Gewebeschnitt werden 200 µl der nachfolgenden Reagenzien verwendet. Insgesamt dauert ein entsprechender Durchgang im Autostainer 2 ½ bis 3 Stunden.

Die Objektträger werden eingelegt und vorbereitend mit einem 1:10 verdünnten Waschpuffer benetzt.

### **1. Schritt: Inkubation mit dem Primärantikörper**

Bei dem Primärantikörper handelt es sich um einen monoklonalen IgG<sub>2b</sub> Maus Antikörper (AK). Dieser wird 1:10 mit einem Antibody Diluent (Verdünnungsmedium) verdünnt und auf die Objektträger pipettiert. Die Einwirkzeit beträgt 60 Min. Danach wird mit dem Waschpuffer gewaschen.

### **2. Schritt: Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

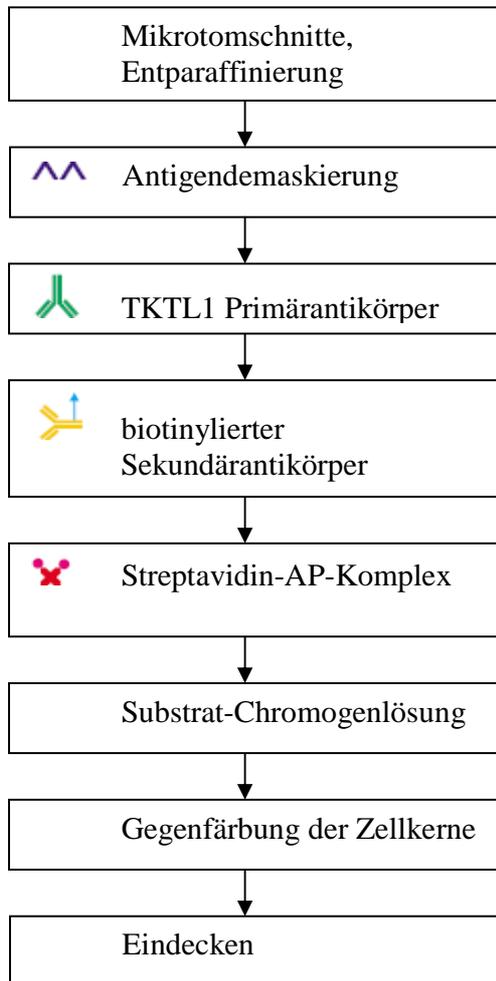
Als Sekundär-AK werden biotinylierte Anti-Maus Immunglobuline (AB2, Flasche A) als Brückenantikörper verwendet. Die Inkubation erfolgt 15 Min. lang. Danach wird mit dem Waschpuffer gewaschen.

### **3. Schritt: Inkubation mit Streptavidin AP**

Die Inkubation mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Komplex (AP, Flasche B) dauert 15 Min. Danach wird mit dem Waschpuffer gewaschen

### **4. Schritt: Blockieren der endogenen alkalischen Phosphatase und Färbung mit Substrat-Chromogenen**

Zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase wird Levamisol (Flasche G) verwendet. Ein Tropfen Levamisol wird auf 10 ml „AP Substrate Buffer“ (Flasche F) gegeben.



#### LSAB-Methode

Zunächst bindet der Primär-AK an das Antigen. Ein biotinylierter Sekundär-AK bindet an den Primär-AK. Streptavidin wird im Komplex mit Alkalischer Phosphatase gegeben und bindet an den Sekundär-AK. Mit dem Chromogen RED erfolgt die Rotfärbung des Substrats.

**Abb. 13** LSAB-Färbeprinzip: Reihenfolge der Arbeitsschritte und molekulare Bestandteile (aus: Boenisch T, 2003, Handbuch immunhistochemische Färbemethoden. 3.Aufl. DakoCytomation, Carpinteria Hamburg, S.34-39)

Die Gewebeschnitte werden 10 Min. mit dem Substrat-Chromogen RED gefärbt. Dies setzt sich zusammen aus je 400 µl Chromogen Red 1 (Flaschen C), Chromogen Red 2 (Flasche D), Chromogen Red 3 (Flasche E), die im „AP Substrate Buffer“ (Flasche F) verdünnt werden. Abschließend werden die Gewebeschnitte mit deionisiertem Wasser gespült.

Die folgenden Schritte werden extern des Autostainers durchgeführt.

**Zellkernfärbung:** Die Kernfärbung erfolgt in einem Objektträgerständer durch sechsminütige Inkubation in Hämalaun. Die entstehende Blaufärbung wird intensiviert durch das Spülen der Objektträger mit fließendem Leitungswasser.

**Eindecken:** Nachdem die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%) durchlaufen haben und zweimal in Xylol getaucht wurden, bis dieses glatt abläuft, folgt das Eindecken in Xylolfolie. Dazu wurde ein Folieneindecker (Tissue-Tek SCA) verwendet, der die Objektträger mit Xylol benetzt und mit einer Folie bedeckt.

### **2.3.8. Anfärbung der TMAs zur Bestimmung der ER-, PR- und Her2/neu Expression**

Zwecks der Fragestellung, ob die TKTL1 Expression in Mamma-CAs mit der ER- bzw. PR-Expression korreliert und zur Sicherung des Her2neu-Status werden die TMAs in der Pathologie zusätzlich angefärbt und unter Mikroskopsicht ausgewertet. Zu diesen Parametern waren in unserem Patientenkollektiv bisher keine Daten vorhanden.

Hierbei wird eine quantitative Erfassung der nukleär positiven Tumorzellen (von 0-100%) für die Expression des ER- und PR- Hormonrezeptors durchgeführt. Die Auswertung erfolgt anhand der „Allred Scoring Guideline for ER/PR“ (DakoCytomation; Allred et al., 1998; Harvey et al., 1999; Fitzgibbons et al., 2000; Rhodes et al., 2000; Mohsin et al., 2004).

Die Auswertung der Her2/neu-Expression erfolgt anhand der „Guidelines for Scoring HercepTest®“ (DakoCytomation 2004, 6.Aufl. Glostrup, Denmark, S.1-72). Es wird die Intensität der membranständigen Färbung beurteilt: Score 0 - keine Anfärbung beobachtbar oder membranständige Färbung bei weniger als 10% der Tumorzellen, Score 1 - schwache inkomplette membranständige Färbung von mehr als 10% der Tumorzellen, Score 2 - schwache bis mittelgradige komplette membranständige Färbung von mehr als 10% der Tumorzellen, Score 3 - starke komplette membranständige Färbung von mehr als 10% der Tumorzellen.

### 2.3.9. Methoden bei der Auswertung

#### 2.3.9.1. Scoreeinteilung unter Mikroskopsicht

Die immunhistochemischen Anfärbungen der TKTL1 werden unter Mikroskopsicht qualitativen Scores von 0 bis 3 zugeordnet. Von Bedeutung ist hierbei die Intensität der zytoplasmatischen Färbung:

- Score 0: Es zeigte sich keinerlei Anfärbung.  
 Score 1: Es zeigte sich eine leichte Anfärbung.  
 Score 2: Es zeigte sich eine mittelstarke Anfärbung.  
 Score 3: Es zeigte sich eine starke Anfärbung.

#### 2.3.9.2. Fertigstellung des Patienten Follow-ups

Die bereits bestehende Excel-Tabelle mit dem Patienten Follow-up wird umgearbeitet, so dass sie folgende klinisch-pathologische Parameter enthält: Identifikation, Geburtstag, Datum der ED, Tumorgroße, OP-Datum, Angioinvasion (Bässler, 1997), pT-Stadium, pN-Status (WHO: Ellis et al., 2003), Grading (Bässler, 1997), Letztkontakt und Todesdatum. Die Excel-Tabelle wird ergänzt durch die neu gewonnenen Daten zu der TKTL1 Expression (Scoreeinteilung s.o.), der ER- und PR- Expression („Allred Scoring Guideline for ER/PR“, DakoCytomation) und dem Her2/neu-Status (HercepTest®, DakoCytomation).

#### 2.3.9.3. Kategorisierung der klinisch-pathologischen Parameter

Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Daten kategorisiert und zu Subtypen zusammengefasst. Diese Kategorisierung ist im Folgenden beschrieben:

Klinisch-pathologische Parameter	Klassifikation	Kategorisierung
TKTL1	Score 0	Geringe TKTL1 Expression
	Score 1	
	Score 2	Hohe TKTL1 Expression
	Score 3	
pT-Stadium	pT1	T1
	pT2	T2
	pT3	T3 + T4
	pT4	

Tumorgroße	≤ 2 cm	1
	> 2 cm	2
pN-Status	pN0	Negativ (0)
	pN1	Positiv (1)
	pN2	
	pN3	
Grading	G1	G1 + G2
	G2	
	G3	G3
Angioinvasion	V0	Negativ (0)
	V1	1
	V2	2
Alter der Patientinnen	≤ 50 Jahre	0
	> 50 Jahre	1
ER-/PR-Status	≤ 10%	Negativ (0)
	> 10%	Positiv (1)
Her2/neu-Status	Score 0	Negativ (0): keine Her2/neu Überexpression
	Score 1	
	Score 2	Positiv (1): Her2/neu Überexpression
	Score 3	

**Tab. 1** Kategorisierung der klinisch-pathologischen Parameter zur besseren Vergleichbarkeit

#### 2.3.9.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mittels SPSS-Software-Paket Version 13.0 (SPSS for windows, SPSS, Chicago, USA). Zur Korrelation der TKTL1 Expression mit den klinisch-histologischen Parametern wird der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und der Fishers Exact Test verwendet. Es wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  angenommen. Die Darstellung der Signifikanz wird mit Angabe des p-Wertes erreicht. Als signifikant werden Ergebnisse mit  $p \leq 5\%$  angenommen. Das Gesamtüberleben der Patientinnen wird nach Kaplan Meier (1958) berechnet und grafisch dargestellt. Das Gesamtüberleben ist definiert als Zeitraum zwischen OP und Todeszeitpunkt, bzw. zwischen OP und Letztkontakt. Ziel ist die Fragestellung, ob es in unserem Patientenkollektiv mit Diagnose eines invasiven Mamma-CA einen Unterschied in der Überlebenszeit gibt, abhängig davon, ob die TKTL1 gering- oder hochexprimiert wird. Die Gesamtwahrscheinlichkeit dafür, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben, lässt sich dann darstellen als Produkt der entsprechenden bedingten Wahrscheinlichkeiten (Ziegler et al., 2002). Verstirbt eine Patientin, wird dies als Status 1 notiert, Zensierungen werden als Status 0 notiert.

Kaplan Meier Schätzer für die Wahrscheinlichkeit, einen Zeitpunkt  $t$  (Zeitpunkt  $t$  liegt zwischen  $t_i$  und  $t_{i+1}$ ) nach Randomisation ereignisfrei zu überleben (aus Schuhmacher et al., 2002):

$$\hat{S}(t) = \frac{n_1 - d_1}{n_1} \times \frac{n_2 - d_2}{n_2} \times \dots \times \frac{n_i - d_i}{n_i}$$

- $\hat{S}(t)$  = Überlebenswahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt  $t$   
 $t_i$  = der Größe nach angeordnete, beobachtete verschiedene Ereigniszeitpunkte  
 $n_i$  = Anzahl der Patienten unter Risiko unmittelbar vor Zeitpunkt  $t_i$   
 $d_i$  = Anzahl der Ereignisse (Todesfälle) zu einem Zeitpunkt  $t_i$

Die Berechnung der Überlebenszeit wird mithilfe der Kaplan Meier Methode bei Patientinnen mit geringer TKTL1 Expression illustriert: Bis zum ersten Todesfall ( $t_1$ ) im neunten Monat gibt es vier Zensierungen, also werden nur noch 63 von 67 Patientinnen beobachtet. Die Rechnung sieht folgendermaßen aus:  $63 - 1 / 63 = 0,984$ . Bis zum nächsten Todeszeitpunkt ( $t_2$ ) im 12. Monat gibt es keine Zensierungen, es werden 62 Patientinnen beobachtet, von denen eine verstirbt. Daher ist die bedingte Wahrscheinlichkeit, den zwölften Monat zu überleben, wenn der neunte Monat überlebt wurde,  $62 - 1 / 62 = 0,984$ . Die Gesamtwahrscheinlichkeit, den zwölften Monat zu überleben, ist  $0,984 \times 0,984 = 0,968$ . So wird für alle weiteren Zeitpunkte verfahren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. TKTL1 in korrespondierendem nicht-neoplastischen Mammagewebe

Bei der Untersuchung von 41 Negativkontrollen weisen 37 Proben (90,24%) keine oder eine schwache TKTL1 Expression auf: 29 Proben (70,73%) zeigen Score 0 und 8 Proben (19,51%) Score 1. Nur 4 Proben (9,75%) mit nicht-neoplastischem Mammagewebe haben eine hohe TKTL1 Expression: 3 Proben (7,31%) zeigen eine mittelstarke (Score 2) und eine Probe (2,44%) zeigt eine starke Anfärbung für TKTL1 (Score 3).

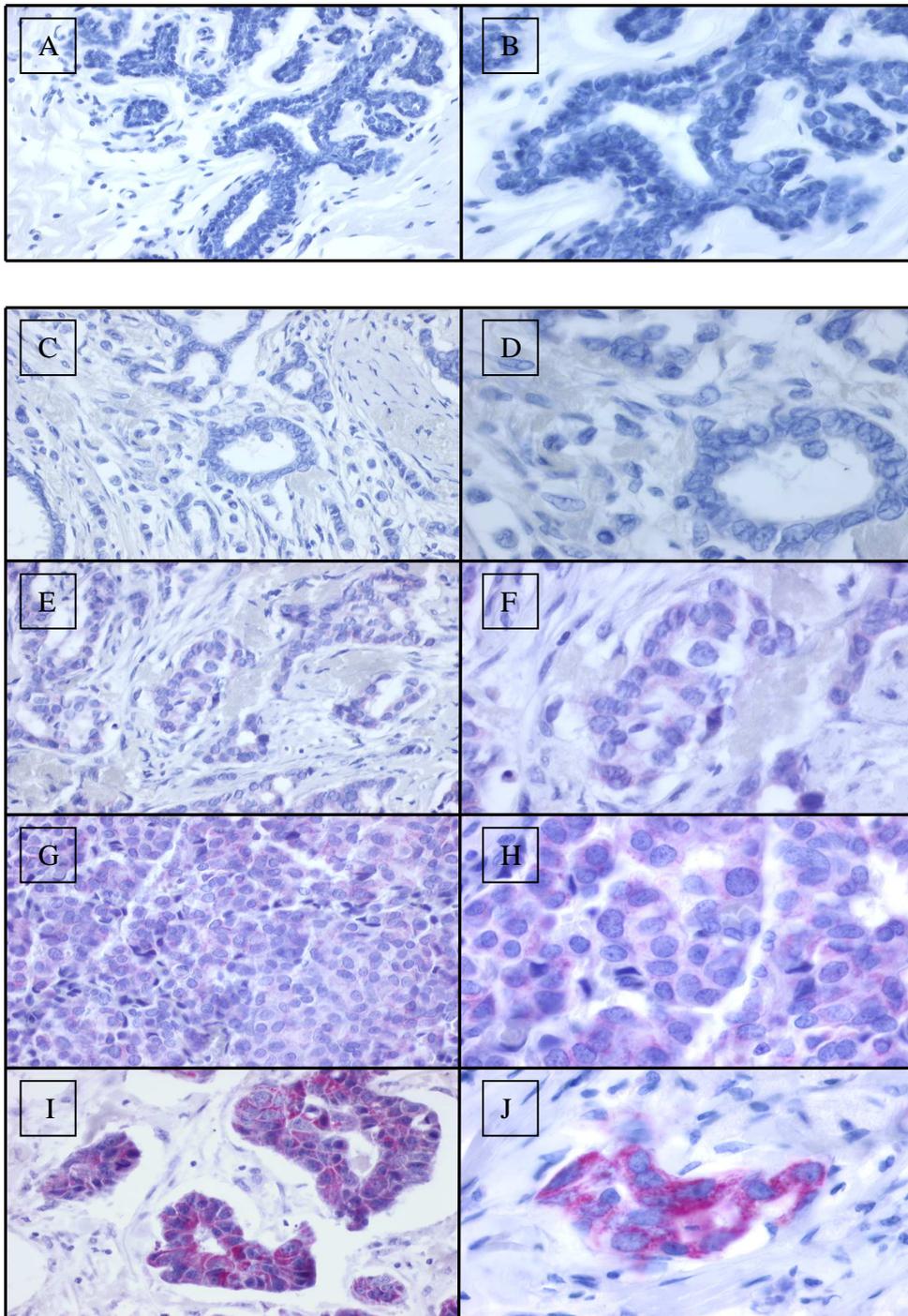
#### 3.2. TKTL1 Expression im Mamma-CA

Von 124 untersuchten Mamma-CAs haben 107 Proben (86,3%) eine positive immunhistochemische Färbung für TKTL1. Unter diesen exprimieren 51 Mamma-CAs (41,13%) Score 1, 37 (29,84%) Score 2, und 19 Mamma-CAs (15,32%) Score 3. Lediglich 17 Proben (13,71%) sind TKTL1 negativ (Score 0).

Zusammengefasst in zwei Gruppen, kann bei 68 Mamma-CAs (54,84%) eine geringe (Score 0 und 1) und bei 56 Mamma-CAs (45,16%) eine hohe TKTL1 Expression (Score 2 und 3) nachgewiesen werden.

TKTL1		Anzahl der Mamma-CAs	% der Gesamtzahl	Einteilung
Score	0	17	13,71%	Geringe TKTL1 Expression (54,84%)
	1	51	41,13%	
	2	37	29,84%	Hohe TKTL1 Expression (45,16%)
	3	19	15,32%	
gesamt		124		

**Tab. 2** Ergebnisse der TKTL1 Anfärbung und Einteilung in Scores (0-3)



**Abb. 14** Beispiele zur TKTL1 spezifischen zytoplasmatischen Anfärbung (rot) im nicht-neoplastischen Mammagewebe (A-B) und im invasiven Mamma-CA (C-J)

A-B: Keine Anfärbung der TKTL1 in nicht-neoplastischem Mammagewebe (Score 0)

C-D: Keine Anfärbung der TKTL1 in Zellen eines invasiven Mamma-CA (Score 0)

E-F: Schwache Anfärbung der TKTL1 im invasiven Mamma-CA (Score 1)

G-H: Mittelstarke Anfärbung der TKTL1 im invasiven Mamma-CA (Score 2)

I-J: Starke zytoplasmatische Anfärbung der TKTL1 im invasiven Mamma-CA (Score 3)

### 3.3. Korrelation der TKTL1 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

#### 3.3.1. pT -Stadium

Dreiundfünfzig Tumoren (42,7%) haben ein pT1-, 51 Proben (41,1%) ein pT2- und 20 Proben (16,1%) ein pT3- oder pT4-Stadium. Betrachtet man das Tumorstadium pT1, exprimieren 22 Tumoren (17,7%) TKTL1 schwach, 31 (25%) dagegen stark. Im Stadium pT2 wird die TKTL1 in 34 Fällen (27,4%) schwach, in 17 Fällen (13,7%) stark exprimiert. In 12 Mamma-CAs (9,7%) des Stadiums pT3 + pT4 findet man eine niedrige und in acht Fällen (6,4%) eine hohe TKTL1 Expression. Es zeigt sich eine schwache, aber nicht signifikante Korrelation zwischen einer geringen TKTL1 Expression und dem pT-Stadium: in der Tendenz weist ein niedriges pT-Stadium (pT1) eine höhere TKTL1 Expression auf. Der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,052.

		TKTL1		Gesamt	
		0 + 1	2 + 3		
<b>pT-Stadium</b>	1	Anzahl	22	31	53
		% der Gesamtzahl	17,7%	25%	42,7%
	2	Anzahl	34	17	51
		% der Gesamtzahl	27,4%	13,7%	41,1%
	3 + 4	Anzahl	12	8	20
		% der Gesamtzahl	9,7%	6,4%	16,1%
Gesamt		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			p = 0.052		

**Tab. 3** Korrelation von pT-Stadium und TKTL1 Expression

#### 3.3.2. Tumorgröße

Das Kollektiv umfasst 45 Tumoren (36,3%), die kleiner-gleich 2 cm sind, und 79 Tumoren (63,7%) größer 2 cm. In Bezug auf die Größe der Mamma-CAs stellt sich heraus, dass bei einer Tumorgröße kleiner-gleich 2 cm in 20 Tumoren (16,1%) eine schwache und in 25 Tumoren (20,2%) eine starke TKTL1 Expression stattfindet. Bei einer Tumorgröße über 2 cm wird die TKTL1 in 48 Fällen (38,7%) gering exprimiert; in 31 Fällen (25%) kommt es zu einer mittel- bis starken TKTL1 Expression. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der Tumorgröße und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,079.

		TKTL1		Gesamt	
		0 + 1	2 + 3		
<b>Tumorgröße</b>	1	Anzahl	20	25	45
		% der Gesamtzahl	16,1%	20,2%	36,3%
	2	Anzahl	48	31	79
		% der Gesamtzahl	38,7%	25%	63,7%
<b>Gesamt</b>		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			p = 0,079		

**Tab. 4** Korrelation von Tumorgröße und TKTL1 Expression

### 3.3.3. Nodal-Status (pN)

In 68 Fällen (54,8%) ist der Nodal-Status negativ, in 56 Fällen (45,2%) positiv. In 33 (26,6%) der nodalnegativen Mamma-CAs lässt sich eine niedrige TKTL1 Expression nachweisen, wohingegen sich in 35 Fällen (28,2%) eine erhöhte TKTL1 Expression zeigt. Bei nodalpositiven Tumoren exprimieren 35 Tumoren (28,2%) die TKTL1 gering, und in 21 Fällen (16,9%) lässt sich eine vermehrte TKTL1 Expression zeigen. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem Nodal-Status und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,120.

		TKTL1		Gesamt	
		0 + 1	2 + 3		
<b>pN-Status</b>	0	Anzahl	33	35	68
		% der Gesamtzahl	26,6%	28,2%	54,8%
	1	Anzahl	35	21	56
		% der Gesamtzahl	28,2%	16,9%	45,2%
<b>Gesamt</b>		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			p = 0,120		

**Tab. 5** Korrelation von pN-Status und TKTL1 Expression

### 3.3.4. Grading (G)

Dreiundsechzig Mamma-CAs (50,8%) weisen ein Grading von G1 oder G2 auf, 61 Mamma-CAs (49,2%) sind schlecht differenzierte G3 Tumoren. Bezogen auf das histopathologische Grading, zeigen sich folgende Ergebnisse: Bei einem gut bis mäßig differenzierten Mamma-CA (G1 + G2) ist in 32 Fällen (25,8%) die TKTL1 niedrig und in 31 Fällen (25%) stark exprimiert. Betrachtet man G3 Tumoren, findet man in 36 Fällen (29%) eine schwache und in 25 Fällen (20,2%) eine mittel- bis starke TKTL1 Expression. Es zeigt sich keine Korrelation

zwischen dem Grading und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,358.

			TKTL1		Gesamt
			0 + 1	2 + 3	
<b>Grading</b>	1 + 2	Anzahl	32	31	63
		% der Gesamtzahl	25,8%	25%	50,8%
	3	Anzahl	36	25	61
		% der Gesamtzahl	29,0%	20,2%	49,2%
<b>Gesamt</b>		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			$p = 0,358$		

**Tab. 6** Korrelation von Grading und TKTL1 Expression

### 3.3.5. Hormonrezeptor- (ER- und PR-) Status

Betrachtet man den ER-Status sind 41 Tumorproben (33,1%) ER negativ und 83 Tumorproben (66,9%) ER positiv. Von den ER-negativen Tumoren zeigen 23 Tumoren (18,5%) eine schwache und 18 Tumoren (14,5%) eine starke TKTL1 Expression. Ist der Tumor ER-positiv, wird die TKTL1 in 45 Fällen (36,3%) gering und in 38 Fällen (30,6%) hoch exprimiert. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem ER-Status und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,843.

			TKTL1		Gesamt
			0 + 1	2 + 3	
<b>ER-Status</b>	0	Anzahl	23	18	41
		% der Gesamtzahl	18,5%	14,5%	33,1%
	1	Anzahl	45	38	83
		% der Gesamtzahl	36,3%	30,6%	66,9%
<b>Gesamt</b>		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			$p = 0,843$		

**Tab. 7** Korrelation von ER-Status und TKTL1 Expression

Im Hinblick auf die PR-Expression sind 34 Mamma-CAs (27,4%) PR negativ und 90 Mamma-CAs (72,6%) PR positiv. Bei den PR-negativen Tumoren wird die TKTL1 in 16 Fällen (12,9%) schwach und in 18 Fällen (14,5%) stark exprimiert. Bei PR-positiven Tumoren findet sich bei 52 Tumoren (41,9%) eine geringe und bei 38 Tumoren (30,6%) eine

hohe TKTL1 Expression. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem PR-Status und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,285.

			TKTL1		Gesamt
			0 + 1	2 + 3	
<b>PR-Status</b>	0	Anzahl	16	18	34
		% der Gesamtzahl	12,9%	14,5%	27,4%
	1	Anzahl	52	38	90
		% der Gesamtzahl	41,9%	30,6%	72,6%
Gesamt		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			$p = 0,285$		

**Tab. 8** Korrelation von PR-Status und TKTL1 Expression

### 3.3.6. Angioinvasion

Das Kollektiv umfasst 111 Proben (90,2%) ohne Angioinvasion. Elf Proben (8,9%) weisen Stadium 1 und eine Probe (0,8%) Stadium 2 der Angioinvasion auf. Bei den Tumoren ohne Angioinvasion findet in 61 Fällen (49,6%) eine geringe und in 50 Fällen (40,7%) eine hohe TKTL1 Expression statt. Im Stadium 1 der Angioinvasion zeigen sechs Tumoren (4,9%) eine schwache und fünf Tumoren (4,1%) eine starke TKTL1 Expression. Im Stadium 2 der Angioinvasion wird die TKTL1 in keinem Fall schwach exprimiert, nur in einem Fall (0,8%) wird sie stark exprimiert. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem Stadium der Angioinvasion und der TKTL1 Expression, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,547.

			TKTL1		Gesamt
			0 + 1	2 + 3	
<b>Angio-invasion</b>	0	Anzahl	61	50	111
		% der Gesamtzahl	49,6%	40,7%	90,2%
	1	Anzahl	6	5	11
		% der Gesamtzahl	4,9%	4,1%	8,9%
	2	Anzahl	0	1	1
		% der Gesamtzahl	0%	0,8%	0,8%
Gesamt		Anzahl	67	56	123 *
		% der Gesamtzahl	54,5%	45,5%	100%
Chi-Quadrat nach Pearson			$p = 0,547$		

**Tab. 9** Korrelation von Angioinvasion-Stadien und TKTL1 Expression  
(\* Datensatz ist für eine Patientin unvollständig)

### 3.3.7. Alter der Patientinnen

Fünfunddreißig Patientinnen (28,2%) waren bei ED jünger oder gleich 50 Jahre (0), die Mehrzahl, 89 Patientinnen (71,8%), war bei ED älter als 50 Jahre (1). Bei Patientinnen, bei ED jünger oder gleich 50 Jahre, ist in 22 Tumoren (17,7%) eine schwache und in 13 Tumoren (10,5%) eine starke TKTL1 Anfärbung zu beobachten. Ist das Patientinnenalter höher als 50 Jahre bei ED, weisen 46 Tumoren (37,1%) eine schwache und 43 Tumoren (34,7%) eine starke TKTL1 Expression auf. Zwischen dem Alter bei ED und der TKTL1 Expression gibt es keine Korrelation, der Korrelationskoeffizient  $p$  beträgt 0,261.

		TKTL1		Gesamt	
		0 + 1	2 + 3		
<b>Alter</b>	0	Anzahl	22	13	35
		% der Gesamtzahl	17,7%	10,5%	28,2%
	1	Anzahl	46	43	89
		% der Gesamtzahl	37,1%	34,7%	71,8%
<b>Gesamt</b>		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100%
<b>Chi-Quadrat nach Pearson</b>			$p = 0,261$		

**Tab. 10** Korrelation von Patientenalter bei ED und TKTL1 Expression

### 3.3.8. Her2/neu-Expression

Das Patientenkollektiv beinhaltet 111 (89,5%) Her2/neu negative Tumoren (Score 0 und 1). Dreizehn Tumoren (10,5%) weisen eine Her2/neu Überexpression (Score 2 und 3) auf. Wir können eine signifikante Korrelation der Her2/neu Expression mit der TKTL1 Expression nachweisen: Tumoren, die Her2/neu hoch exprimieren, zeigen auch eine signifikant erhöhte TKTL1 Expression, während Tumoren mit einer geringen Her2/neu Expression auch mit einer niedrigen TKTL1 Anfärbung korrelieren ( $p = 0,015$ ).

Bei Mamma-CAs mit einer negativen Her2/neu Expression zeigen 65 Tumoren (52,4%) eine geringe TKTL1 Expression, wohingegen in 46 Tumoren (37,1%) eine hohe Expression der TKTL1 zu beobachten ist. Wird Her2/neu hoch exprimiert, findet sich in 10 Proben (8,1%) ebenfalls eine hohe Expression der TKTL1, und bei nur drei Patientinnen (2,4%) wird die TKTL1 gering exprimiert.

			TKTL1		Gesamt
			0 + 1	2 + 3	
<b>Her2/neu</b>	0 + 1	Anzahl	65	46	111
		% der Gesamtzahl	52,4%	37,1%	89,5%
	2 + 3	Anzahl	3	10	13
		% der Gesamtzahl	2,4%	8,1%	10,5%
Gesamt		Anzahl	68	56	124
		% der Gesamtzahl	54,8%	45,2%	100,0%
Chi-Quadrat nach Pearson			p = 0,015		

**Tab. 11** Korrelation von Her2/neu- und TKTL1 Expression

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigt sich eine schwache, aber nicht signifikante Korrelation zwischen einer geringen TKTL1 Expression und dem pT-Stadium: in der Tendenz weist ein niedriges pT-Stadium eine höhere TKTL1 Expression auf ( $p = 0,052$ ).

Eine signifikante Korrelation ist zwischen der Her2/neu- und der TKTL1 Expression zu beobachten,  $p = 0,015$ .

Die anderen klinisch-pathologischen Parameter weisen keine Korrelation zu der TKTL1 Expression auf.

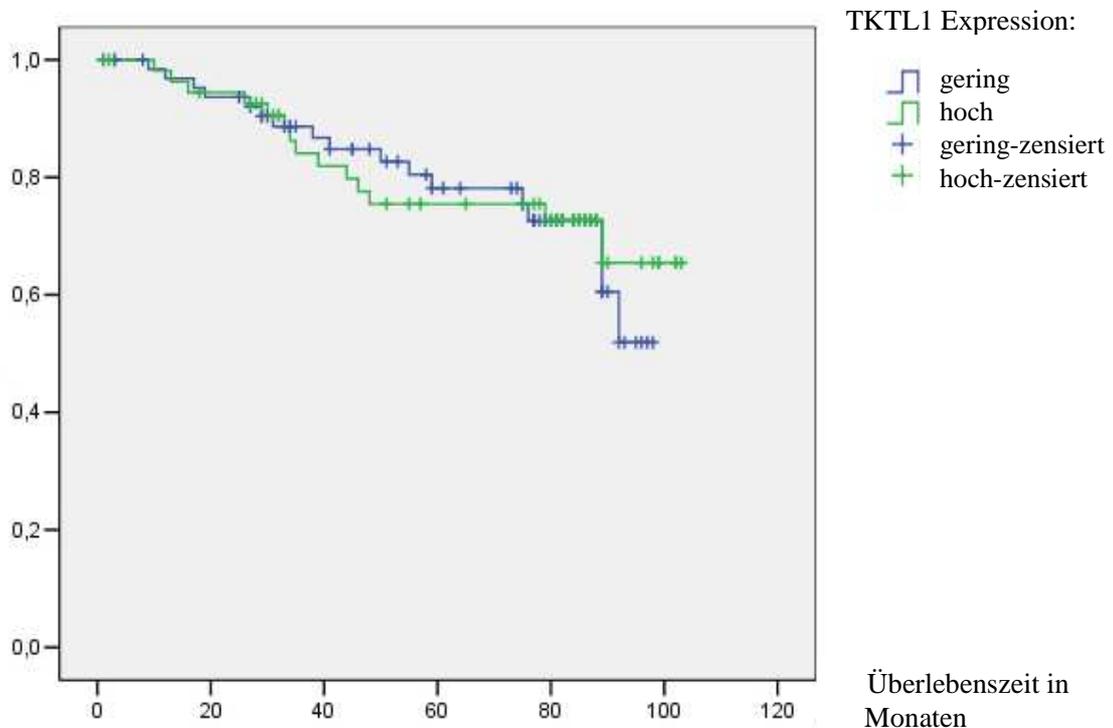
### 3.5. Kaplan Meier Überlebenszeitanalyse

Tab.12 zeigt die Daten der Überlebenszeit von Patientinnen mit der Diagnose eines invasiven Mamma-CA. Die Kaplan Meier Überlebenszeitanalyse zeigt keinen Unterschied im Überleben von Patientinnen mit einem Mamma-CA geringer (Score 0 + 1) bzw. hoher (Score 2 + 3) TKTL1 Expression. In der Gruppe der Tumoren mit einer geringen TKTL1 Expression sind Daten von 67 Patientinnen mit einer mittleren Follow-up Zeit von 74,2 Monaten vorhanden (gesamte Beobachtungszeit 98 Monate). In dieser Gruppe traten innerhalb dieser Follow-up Zeit 17 (25,4%) Ereignisse (Todesfälle) auf. Unter den Patientinnen mit Tumoren, die TKTL1 hoch exprimieren, sind Daten von 56 Patientinnen mit einer mittleren Follow-up Zeit von 75,1 Monaten vorhanden (gesamte Beobachtungszeit 103 Monate). In dieser Gruppe starben 14 Patientinnen (25%) innerhalb dieser Follow-up Zeit.

TKTL1	Gesamte Beobachtungszeit (Monate)	Mittlere Beobachtungszeit (Monate)	Gesamtzahl (n)	Anzahl der Ereignisse (Todesfälle)	Anzahl der Zensurierungen
0 + 1	98	74,2	67	17 (25,4%)	50
2 + 3	103	75,1	56	14 (25%)	42
Gesamt			123 *	31	92

**Tab.12** Kaplan Meier Analyse: Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen geringer bzw. hoher TKTL1 Expression und der Überlebenszeit; die Anzahl der Ereignisse unterscheidet sich prozentual nicht. (\*Datensatz ist für eine Patientin unvollständig)

### Überlebenswahrscheinlichkeit



**Abb. 15** Geschätzte Überlebenskurve  $\hat{S}(t_i)$  nach Kaplan Meier für Patientinnen mit einem invasiven Mamma-CA. Vergleich der geschätzten progressionsfreien Überlebenswahrscheinlichkeit bei geringer- (Score 0 + 1) und hoher TKTL1 Expression (Score 2 + 3): hier zeigt sich kein Unterschied in der Überlebenszeit. Zensierungszeitpunkte sind auf der Abszisse gekennzeichnet.

#### 4. Diskussion

Aus der vorliegenden Studie sind vier Ergebnisse ableitbar:

- 1) Im Vergleich zu nicht-neoplastischem Mammagewebe (29,3%) ist in der Mehrzahl der Mamma-CAs (86,3%) eine TKTL1 Expression nachzuweisen. Eine hohe TKTL1 Expression ist bei 45,16% der Mamma-CAs zu finden, aber nur bei 9,75% der untersuchten nicht-neoplastischen Mammagewebe.
- 2) Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der TKTL1 Expression und der Her2/neu Expression ( $p = 0,015$ ).
- 3) Entgegen den Ergebnissen anderer Arbeiten, bei denen durch statistische Analyse eine Korrelation der TKTL1 Expression zu klinisch-histologischen Parametern, die eine schlechte Prognose bedeuten, herausgearbeitet wurde (Langbein et al., 2006; Földi et al., unpublizierte Daten), ist in dem hier untersuchten Kollektiv kein Unterschied zwischen klinisch-histologischen Parametern, wie T-Stadium, Tumorgröße, Nodal-Status, Grading, Angioinvasion-Stadium, Alter bei ED, Hormonrezeptorstatus und der TKTL1 Expression nachweisbar.
- 4) In dem untersuchten Kollektiv korreliert, nach Analyse der Kaplan Meier Kurven, eine vermehrte TKTL1 Expression nicht mit einem schlechteren Outcome der Patientinnen.

In der Literatur wird die TKTL1 Überexpression mit einer verstärkten Aggressivität von Tumoren assoziiert. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass die TKTL1 Expression im Mamma-CA eventuell nicht die gleiche Relevanz besitzt wie in anderen Tumorentitäten, z.B. im Kolon- bzw. Urothel-CA (Langbein et al., 2006) oder im Ovarial-CA (Földi et al., unpublizierte Daten), oder dass die fehlende statistische Korrelation mit klinisch-histologischen Parametern eine Besonderheit innerhalb unseres verwendeten Patientenkollektivs ist. Beispielsweise findet man in unserem Kollektiv nur bei 10,5% der Mamma-CAs eine Her2/neu Überexpression statt den zu erwartenden 25-30% (Cobleigh et al., 1999; Slamon et al., 2001). Um diese Fragen zu klären, sind weitere Untersuchungen zur TKTL1 Expression im Mamma-CA erforderlich.

In einigen nicht-neoplastischen Geweben wurde eine TKTL1 Expression beobachtet, besonders in Geweben mit einer vermehrten aeroben Glykolyse (Coy et al., 2005). Daher ist es nicht verwunderlich, dass 29,3% der in unserer Studie verwendeten Proben aus nicht-neoplastischem Mammagewebe eine TKTL1 Expression aufweisen. Zudem handelt es sich bei diesen Proben um peritumorales Gewebe. Möglicherweise zeigen nicht-neoplastische Zellen in der unmittelbaren Umgebung von malignen Tumorzellen genetische Veränderungen. Man kann argumentieren, dass die beobachtete TKTL1 Expression in einigen unserer nicht-neoplastischen Proben auf einen veränderten Zellmetabolismus als initiale Phase der Tumorigenese hinweist, wie dies auch für andere Marker, wie p53, FAS und GLUT1 diskutiert wird (Alo et al., 2001; Mottolese et al., 2005). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die TKTL1 Expression in prämaligen Läsionen zu untersuchen. Beobachtungen zeigen, dass Tumorzellen durch die initiale Hypoxie Adaptationsvorgänge entwickeln (Gatenby et al., 2004).

Grundsätzlich ist das Mammagewebe ein Ort hoher Fettsäuresynthese (Löffler et al., 1998), wozu die Bildung von NADPH durch den PPP essentiell ist. Damit wird die TKT wahrscheinlich auch höher als in einigen anderen Geweben exprimiert.

Die Her2/neu Überexpression korreliert in anderen Studien mit ungünstigen klinischen Parametern sowie einem schlechteren Outcome der Patientinnen (Revillion et al., 1998; Vetter et al., 2002). Das Auffällige unserer Studie ist, dass eine hohe TKTL1 Protein Expression nicht mit schlechten klinisch-histologischen Parametern einhergeht, aber mit einer Her2neu Überexpression. Zu bemerken ist, dass in unserem Kollektiv eine Her2/neu Überexpression nicht signifikant mit einem schlechteren Outcome der Patientinnen korreliert. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in unserem Kollektiv nur 13 Mamma-CAs (10,5%) eine Her2/neu Überexpression aufweisen, wohingegen im Durchschnitt 25-30% der invasiven Mamma-CAs Her2/neu positiv sind und damit die Zahl von 13 untersuchten Mamma-CAs zu gering ist. Hinzu kommt, dass während der Überlebenszeitanalyse nur wenige Ereignisse aufgetreten sind (s.u.); es ist anhand der geringen Datenmenge schwierig, eine Aussage zu treffen. Zu berücksichtigen ist auch die Tatsache, dass die Her2/neu Überexpression in unserer Studie ausschließlich immunhistochemisch ermittelt wurde und ein Score 2 nicht zusätzlich mittels einer FISH-Analyse als Her2/neu positiv bestätigt wurde (Lebeau et al., 2003).

Im Gegensatz zum Kolon- und Urothel-CA (Langbein et al., 2006) zeigt unsere Studie an primären Mamma-CAs keine Korrelation zwischen einer TKTL1 Überexpression und der Überlebenszeit. Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, dass in unserer Studie eine TKTL1 Expression mit keinem prognostisch relevanten Parameter außer mit einer Her2/neu Expression korreliert. Insgesamt haben Patientinnen mit einem Mamma-CA eine gute Prognose (5-JÜR beträgt 76%; Engel et al., 2003). Eine Aussage bezüglich der Überlebenszeit ist durch die niedrige Zahl der Patientinnen, die in der mittleren Follow-up Zeit von 74 bzw. 75 Monaten verstorben sind, nur eingeschränkt möglich, da die Anzahl der Ereignisse (Todesfälle) gering ist. In unserer Studie sind insgesamt nur 31 Ereignisse aufgetreten: Bei einer geringen TKTL1 Expression (n = 67) sind 17 Ereignisse (25,4%) aufgetreten, bei einer hohen TKTL1 Expression (n = 56) traten 14 Ereignisse (25%) auf. Möglicherweise ist die Beobachtungszeit von 98 bzw. 103 Monaten in der Kaplan-Meier Analyse für das prognostisch günstige Kollektiv nicht lange genug. Um hier eine valide Aussage treffen zu können, müsste die Überlebenszeitanalyse in einer Studie mit einer größeren Anzahl von Ereignissen wiederholt werden.

Die Differenzierung der TKTL1 Anfärbung in einem qualitativen Scoresystem zeigt ebenfalls keinen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf und dem Überleben. Deutlich wird jedoch, im Vergleich zu nicht-neoplastischem Mammagewebe, die hohe Rate an TKTL1-Positivität (86,3%). Damit unterstützt unsere Analyse die Beobachtung, dass in Mamma-CA-Zellen TKTL1 vermehrt exprimiert wird. Ergänzend zu bisherigen Studien lässt sich vermuten, dass eine TKTL1 Expression nicht auf eine bestimmte Tumorentität begrenzt ist (Langbein et al., 2006; Földi et al., unpublizierte Daten). Es lässt sich die Hypothese formulieren, dass die vermehrte Expression der TKTL1 eventuell ein generelles Phänomen in der Tumorgenese darstellt. Gleichzeitig wirft dies die Frage nach dem möglichen diagnostischen sowie therapeutischen Potential der TKTL1 Expression in Mamma-CAs auf.

Zusammenfassend legen unsere Daten den Schluss nahe, dass die TKTL1 im Mamma-CA keine Aussage über die Prognose der betroffenen Patientinnen hat. Dies steht im Widerspruch zu den durch Langbein et al. (2006) erhobenen Daten beim Kolon- und Urothel-CA. Vor dem Hintergrund von metabolischen Veränderungen, die in Tumorzellen und Metastasen

beobachtet werden können, könnte die TKTL1 Überexpression im Mamma-CA dennoch von biologischer, ggf. auch therapeutischer Bedeutung sein (s.u.).

Die Tatsache, dass in Tumoren auch in der Anwesenheit von Sauerstoff nicht-oxidativ Laktat gebildet wird, ist schon seit langem bekannt (Warburg et al., 1924). Die Gründe und Konsequenzen wurden kontrovers diskutiert, blieben aber lange Zeit ungeklärt.

Die Karzinogenese ist ein Prozess, der initial mit einer Hypoxie verbunden ist. In prä-malignen Läsionen besteht durch die Entfernung zum Gefäßsystem zuerst ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ). Eine wichtige Rolle bei Hypoxie kommt dem Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) zu (Semenza, 1998). HIF1 $\alpha$  wird bei Hypoxie gebildet und vermittelt die Transkription verschiedener Gene, welche die Sauerstoffversorgung beeinflussen, u.a. die Transkription des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), der zur Stimulierung der Kapillarisation führt, sowie von hämatopoetischen Faktoren (z.B. Erythropoetin; Carmeliet et al., 1998). Desweiteren stimuliert HIF1 $\alpha$  die Expression von Enzymen, welche die anaerobe Energiebereitstellung begünstigen, beispielsweise von Glukosetransportern und Glykolyseenzymen. Unter aeroben Bedingungen wurden in metastasierten Mamma-CA Zellen im Gegensatz zu nicht-metastasierten Mamma-CA Zellen eine erhöhte Glykolyse und eine hohe Expression von HIF1 $\alpha$  gefunden. Eine Hypothese ist, dass durch eine Dysregulation von HIF1 $\alpha$  der Warburg Effekt induziert wird (Robey et al., 2005).

Gegenwärtige Studien unterstreichen die Bedeutung von TKTL1 als wichtiges Enzym für die Erklärung des Warburg Effektes. Kürzlich erst hat der Glukosestoffwechsel in Tumorzellen viel Aufmerksamkeit erhalten (Gatenby et al., 2004). Auch die klinische Anwendung der Positronen Emissions Tomographie (PET) zur Darstellung eines verstärkten Glukosestoffwechsels in invasiven Tumoren und Metastasen hat den Warburg Effekt wieder aufleben lassen. Bei einer Analyse von proliferierenden MCF-7 Mamma-CA-Zellen wurde demonstriert, dass 65 % der totalen ATP-Umsetzung aus bisher nicht identifizierten Quellen stammt (Guppy et al., 2002). Ramanathan et al. (2005) hat gezeigt, dass es in vollständig transformierten Tumorzelllinien nicht zu einer Reduktion des ATP-Spiegels kommt, auch wenn die mitochondriale ATP-Produktion inhibiert wird. Diese Tumorzelllinie war aber hochsensitiv gegenüber einer Inhibition der Laktatdehydrogenase. Eine Inhibition der aeroben Glykolyse führt zu einem Verlust von ATP in Tumorzellen, zu einem Absterben von

untersuchten Kolon-CA-Zellen und zu einer induzierten Apoptose von Chemotherapie resistenten Zellen (Xu et al., 2005).

Diese genannten Beobachtungen bestätigen den Warburg Effekt, indem sie die wichtige Rolle des anaeroben Glukoseabbaus, der zu Laktat führt, hervorheben. Die wichtige Bedeutung der TKT Reaktion für die Bildung von Laktat wurde schon beschrieben (Braun et al., 1997; Lee et al., 1998). Mit der Identifizierung von drei TKT Genen (TKT, TKTL1, TKTL2), die für drei aktive TKT Enzyme kodieren, und mit der Feststellung, dass speziell die TKTL1 in Tumorzellen überexprimiert wird, konnten die früheren Beobachtungen erklärt werden (Coy et al., 2005). Die TKT ist das Schlüsselenzym des nicht-oxidativen PPP. Der PPP liefert mit der Bildung von Ribose-5-P u.a. einen wichtigen Baustein für Nukleinsäuren und ATP, und über GAP kann Pyruvat für die Bildung von Laktat bereitgestellt werden. Außerdem entsteht im PPP NADPH für die Fettsäuresynthese (Löffler et al., 1998). RNS Analysen von kultivierten Zervix- und Pankreas-CA Zellen zeigen, dass Glukose-Kohlenstoffe zu über 90% zur Synthese von Ribose beitragen und die Ribose in Malignomen zu über 70% durch den TKT-Weg gebildet wird (Boros, 1998). Ist die TKTL1 in Tumorzellen überexprimiert, führt der nicht-oxidative PPP sowohl zu einer vermehrten Bereitstellung von Ribose-5-P für die Bildung von Nukleinsäuren als auch zu einem verstärkten Abbau von Glukose. Charakteristisch für Tumorzellen ist die aerobe Glykolyse, die in Anwesenheit von Sauerstoff stattfindet und zu einer großen Menge an Laktat führt (Warburg Effekt). Aber warum finden in Tumorzellen auch dann noch sauerstoffsparende Vorgänge, wie eine aerobe Glykolyse und Bildung von Laktat, statt, obwohl Sauerstoff vorhanden ist und sich dieser Weg zudem als energetisch ungünstig darstellt? Es werden unter anaeroben Bedingungen nur zwei Moleküle ATP pro Glukose produziert, während unter aeroben Bedingungen, v.a. durch die Oxidation von Pyruvat, in der Atmungskette 38 ATP generiert werden (Gatenby et al., 2004). Warburg beobachtete, dass eine vermehrte Glykolyse mit einer vermehrten Aggressivität und Metastasierung von Tumoren einhergeht (Warburg et al., 1924). Eine wichtige Bedeutung kommt hierbei der Laktatproduktion zu, durch die Tumorzellen über verschiedene Mechanismen einen Selektionsvorteil entwickeln (Gatenby et al., 2004). Die Metastasierung wird erleichtert (Walenta et al., 2004; Stern et al., 2002) und in benachbarten Zellen wird durch den pH-Abfall die Apoptose eingeleitet (Williams et al., 1999; Park et al., 2000). Die für die Laktatbildung wichtige Rolle des TKT Enzyms in Normalgewebe wurde schon gezeigt (Lee et al., 1998). In gegenwärtigen Studien

konnte eine signifikante Korrelation zwischen einer Überexpression des TKTL1 Enzyms und schlechteren klinisch-histologischen Parametern sowie einem ungünstigeren Outcome der Patienten gezeigt werden (Langbein et al., 2006; Földi et al., unpublizierte Daten). Wir beschäftigen uns mit der Rolle des TKTL1 Enzyms im invasiven Tumorgewebe im Hinblick auf die Laktatbildung. Der Zusammenhang zwischen TKTL1 Überexpression, gesteigertem Laktatumsatz sowie malignem Potential sollte in weiterführenden funktionellen Untersuchungen für verschiedene Tumorentitäten geprüft werden.

In unserer Studie zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der TKTL1 Überexpression und einer Überexpression des „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (Her2/neu). Her2/neu, ein molekularer Biomarker in der Therapie des Mamma-CA, ist ein Protein auf der Zellmembran, das eine Schlüsselkomponente in der Regulierung des Zellwachstums darstellt. Her2/neu wird in 25-30% der Mamma-CAs überexprimiert (Cobleigh et al., 1999; Slamon et al., 2001). Eine Überexpression von Her2/neu korreliert mit einem aggressiven Verhalten von Tumoren (Revillion et al., 1998) und einer schlechten Prognose (Slamon et al., 1987). Eine Her2/neu Überexpression geht einher mit einer häufigen und aggressiven Metastasenbildung, einem erhöhten Risiko der Erkrankung der kontralateralen Brust (Vetter et al., 2002) und einer inversen Korrelation zu dem ER-Status und tumorfreien Intervall. Her2/neu positive Tumoren zeigen ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie (Bezwoda et al., 2000). Eine etablierte therapeutische Option beim Her2/neu positiven Mamma-CA ist die gezielte Gabe von Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen eine extrazelluläre Domäne des Her2/neu Rezeptors, sowohl als First Line (Vogel et al., 2002) als auch Second und Third Line-Behandlung (Slamon et al., 2001; Baselga et al., 1996; Cobleigh et al., 1999) in Kombination mit Chemotherapie. Seit Mai 2006 ist Trastuzumab im frühen Stadium von Brustkrebs im Anschluss an eine Operation und abgeschlossene Chemotherapie auch in der Adjuvanz zugelassen (Piccart-Gebhart et al., 2005). Internationale Studien zeigten, dass die mit Trastuzumab behandelte Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger Mamma-CA spezifische Ereignisse (127 vs. 220 von 347) und ein längeres krankheitsfreies Überleben aufwies. Als Ereignis wurde ein Mamma-CA Rezidiv, ein kontralaterales Mamma-CA, ein Zweitmalignom oder das Versterben eines Patienten definiert (Piccart-Gebhart et al., 2005).

Analog zu Her2/neu konnten wir eine vermehrte Expression des Transketolase Proteins TKTL1 in einer Subgruppe von Mamma-CA nachweisen. Allerdings war die TKTL1 Protein Expression im Mamma-CA ohne prognostischen Wert. Eine Verwendung von TKTL1 im Mamma-CA als neuer Biomarker oder potentielles Target für eine individuelle Anti-Tumor Therapie ist daher fraglich.

Da die TKTL1 allerdings das einzige der TKT Proteine darstellt, welches im Mamma-CA überexprimiert wird, sollten weiterführende Studien an anderen Kollektiven eine potentielle tumorbiologische Bedeutung weiter abklären. Mehrere Analysen an verschiedenen Tumorentitäten fanden eine vermehrte Expression der TKTL1 ohne parallele Überexpression der TKT und TKTL2 (Langbein et al., 2006). Über dies hinaus zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der TKTL1 Expression und der Überlebensrate im Kolon- (n = 70) und Urothel-CA (n = 64): Eine stärkere TKTL1 Anfärbung war mit einer kürzeren Überlebenszeit und Metastasierung assoziiert (Langbein et al., 2006).

In diesem Zusammenhang ergeben sich erste Hinweise in Studien zur Hemmung des TKT-Enzyms durch Oxythiamin, einer chemisch modifizierten Form von Thiamin (Boros et al., 1997; Comin-Anduix et al., 2001).

Ein weiteres potentielles Anwendungsgebiet für TKTL1 stellt die bildgebende Diagnostik beim Mamma-CA dar. Die Positronen Emissions Tomographie (PET) nutzt den veränderten Glukosestoffwechsel in Tumoren. Als analoger Glukose Tracer wird 2-[<sup>18</sup>F]Fluoro-2 Desoxy-D-Glucose (<sup>18</sup>FDG) verwendet (Hoh et al., 1993). Obwohl der molekulare Hintergrund für den veränderten Glukosestoffwechsel bislang unklar war, findet die PET Untersuchung klinische Anwendung. Malignes Tumorgewebe und die überwiegende Mehrzahl der Metastasen sind hoch glykolytisch (Hoh et al., 1993). Mit der Entdeckung der TKTL1 Überexpression könnte das TKT-Modell eine Erklärung für diesen erhöhten Glukoseumsatz liefern: Durch eine Überexpression der TKTL1 in Tumoren und eine Steigerung des non-oxidativen PPP wird mehr Glukose umgesetzt und über Pyruvat zu Laktat umgebaut. Ein Vorteil der PET Untersuchung ist, dass sich ohne Invasivität in vivo Stoffwechselforgänge darstellen lassen. Die Aufnahme des Tracers <sup>18</sup>FDG in die Zellen ist direkt proportional zum Glukosemetabolismus der Zellen (Kumar et al., 2005). Da dieser in Malignomen vielfach erhöht ist, hat die PET eine hohe Sensitivität (Kumar et al., 2005). Die meisten Studien belegen, dass eine hohe <sup>18</sup>FDG Aufnahme mit einem klinisch aggressiven

Verhalten von Tumoren und einer ausgeprägten Hypoxie einhergeht (Crippa et al., 1998; Oshida et al., 1998; Rajendran et al., 2004). Dies kann dadurch erklärt werden, dass Hypoxie die Glykolyse in Tumoren steigert und die  $^{18}\text{F}$ FDG Aufnahme proportional zu der Rate des Glukosestoffwechsels ist. Das  $^{18}\text{F}$ FDG-PET kann beim Staging und der Evaluation des Therapieansprechens auch beim Mamma-CA angewendet werden (Kumar et al., 2005; Eubank et al., 2005) und hat weitere Indikationen zur Diagnostik eines Tumorrezidivs bzw. von Metastasen, insbesondere in den Lymphknoten (Abe et al., 2005; Eubank et al., 2005). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die FDG Aufnahme mit dem histologischen Tumortyp, dem Grading, dem p53-Spiegel (Crippa et al., 1998) und mit der Tumorzellproliferation (Avril et al., 2001) sowie mit der Prognose der Patienten korreliert (Oshida et al., 1998). Interessanterweise konnte jedoch, analog zu unserer Studie, keinerlei Korrelation zwischen FDG Aufnahme und Hormonrezeptorstatus (Crippa et al., 1998; Avril et al., 2001) sowie Tumorgröße und Nodal-Status (Avril et al., 2001) beobachtet werden.

Damit wird ein Zusammenhang zwischen der Hypoxie in Tumorzellen (Rajendran et al., 2004) und metabolischen Veränderungen mit erhöhtem Glykolysestoffwechsel durch eine TKTL1 Überexpression wahrscheinlich, was in der Konsequenz mit einer verstärkten  $^{18}\text{F}$ FDG Aufnahme in der PET Untersuchung einhergeht. Klinisch korrelieren diese Zellveränderungen mit einem erhöhten malignen Potential und einer schlechten Prognose beim Mamma-CA.

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Erkenntnisse über metabolische Veränderungen in Tumorzellen (Boros et al., 1997; Walenta et al., 2004; Elstrom et al., 2004), der Schlüsselrolle der TKT-Enzymreaktion sowie der Tatsache, dass lediglich TKTL1 in verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression gegenüber korrespondierendem nicht-neoplastischem Gewebe zeigt, stellt sich die Frage, inwieweit eine Beeinflussung der TKT bei malignen Tumoren therapeutisch nutzbar sein könnte. Das Schlüsselenzym TKT ist Thiamin-PP abhängig.

Als Thiamininhibitoren kommen z.B. Oxythiamin und Hydroxythiamin in Frage. Oxythiamin ist eine chemisch modifizierte Form von Thiamin und ein irreversibler (Comin-Anduix et al., 2001), nicht-kompetitiver Inhibitor der TKT (Boros et al., 1997). Oxythiamin limitiert in untersuchten Tumortiermodellen die Synthese von Thiamin-PP, inhibiert die TKT Aktivität (Trebukhina et al., 1987) und induziert einen Arrest des Zellzyklus in der G0-G1 Phase (Rais

et al., 1999). Oxythiamin hemmt *in vitro* und *in vivo* signifikant die Nukleinsäuresynthese (Gorbach et al., 1977; Khokha et al., 1984) und die Tumorzellproliferation (Boros et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass lediglich das Transketolase Protein TKTL1 in Tumoren überexprimiert wird, liegt der Schluss nahe, dass diese Oxythiamin-Wirkung durch eine Beeinflussung des TKTL1 Enzyms vermittelt wird.

Derzeit befindet sich als Therapiekonzept beim Kolorektalen-CA der fermentierte Weizenkeimextrakt MSC in einer klinischen Phase-II-Studie. MSC ist ein frei verkäufliches Nahrungsergänzungsmittel und ein biologisches, Benzoquinon beinhaltendes Wirkstoffgemisch (Nichelatti et al., 2002). Wirkmechanismen sind die Hemmung der TKT-Enzymreaktion (Comin-Anduix et al., 2002) sowie immunologische Modulation (Hidvegi et al 1998; Hidvegi et al., 1999; Fajka-Boja et al., 2002). MSC scheint die Apoptose zu fördern sowie einen inhibierenden Einfluss auf die Tumorzellproliferation und die Zelladhäsion zu haben (Boros et al., 1998). In der Studie zur Wirkung von MSC beim Kolorektalen-CA zeigten sich in der unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zur MSC behandelten Gruppe sechsmal häufiger Rezidive, dreimal häufiger Fernmetastasen mit konsekutive dreifach höherer Tumorsterblichkeit (Jakab et al., 2003). Der antimetastatische Effekt konnte auch in anderen Studien bestätigt werden (Hidvegi et al., 1998; Hidvegi et al., 1999; Jakab et al., 2000; Comin-Anduix et al., 2002; Jakab et al., 2003). MSC wird derzeit als potentielle adjuvante Therapie zusätzlich zur Chemotherapie bei verschiedenen Tumorentitäten, wie Kolon-, Lungen-, Prostata- und Mamma-CA erforscht (Boros et al., 2001).

Sowohl Oxythiamin als auch MSC zeigen *in vitro* und *in vivo* keine nennenswerten trophischen oder toxischen Nebenwirkungen (Geng et al., 1995; Hidvegi et al., 1999; Rais et al., 1999; Jakab et al., 2003), die selektive Hemmung der TKT führt nicht zu einem Ribosemangel in gesunden Zellen. Dadurch dass die G6PD ebenfalls an der Nukleinsäuresynthese beteiligt ist, wird die normale Zellproliferation nicht beeinträchtigt. Die Therapie mit Oxythiamin, die nur die nicht-oxidative Ribosesynthese inhibiert, richtet sich damit selektiv und effektiv gegen Tumorzellen (Cascante et al., 2000). Die Rolle der thiaminabhängigen TKT in Tumorzellen wird auch durch ein natürlich vorkommendes Thiamin-abbauendes Enzym, Thiaminase, dessen Expression prognostisch günstig erscheint, unterstrichen (Cascante et al., 2000). Vor diesem Hintergrund erscheint eine Thiaminsubstitution bei malignen Tumoren als überdenkenswert (Torosian et al., 1992; Boros et al., 1998; Comin-Anduix et al., 2001): Mamma-CA Patientinnen haben ein hohes

Risiko einen Thiaminmangel zu entwickeln, weil Thiamin nicht in die aktive Form Thiamin-PP umgewandelt wird (Basu et al., 1976). Dieser Hintergrund stellt eine potentielle Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen vermehrter TKTL1 Expression und schlechtem Outcome dar. Das Enzym wird zwar überexprimiert, seine Aktivität aber durch den Mangel an aktivem Koenzym (Thiamin-PP) supprimiert.

Zusammenfassend stellt die TKTL1 zwar ein klassisches „small compound“ als therapeutisches Target dar, welches erste vielversprechende Ergebnisse im Rahmen des MSC Studien erbrachte. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Inhibition der Transketolase durch Oxythiamin bzw. MSC einen Einfluss auf das tumorbiologische Potential von Mamma-CAs hätte. Einerseits fand sich eine Überexpression der TKTL1 in 86,3% der Mamma-CAs, die signifikant mit der Her2/neu Expression korrelierte, welche wiederum einen starken Prognosefaktor darstellt (Revillion et al., 1998; Bezwoda, 2000; Vetter et al., 2002). Zudem wurde der tumorbiologische Vorteil einer TKTL1 Expression für die Tumoren und der therapeutisch günstige Effekt der TKT Inhibition dargestellt. Andererseits jedoch ergab sich in unserer Untersuchung für die TKTL1 Expression beim Mamma-CA keine Korrelation zu ungünstigen klinisch-histologischen Parametern oder einem schlechten Outcome. Weiterführende Analysen an weiteren Mammakarzinomkollektiven werden diese Frage abschließend klären müssen.

## 5. Zusammenfassung

Maligne Tumoren sind in der Lage, auch in Anwesenheit von Sauerstoff Glukose zu Laktat abzubauen (aerobe Glykolyse; Warburg Effekt). Eine entscheidende Rolle kommt hierbei dem Pentosephosphatweg (PPP) zu. Der nicht-oxidative Teil des PPP wird von dem thiaminabhängigen Enzym Transketolase kontrolliert. Eine Überexpression des Transketolase-like-1 Gens (TKTL1) im Urothel- und Kolonkarzinom ist assoziiert mit einem schlechten Outcome der Patienten.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Fragestellung, ob eine vermehrte TKTL1 Expression auch im Mammakarzinom (Mamma-CA) vorhanden ist, und ob diese mit ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern und einer schlechteren Überlebenszeit korreliert.

Wir untersuchen die Expression des TKTL1 Enzyms im invasiven Mamma-CA in einer retrospektiv angelegten Studie. Es werden Tissue Microarrays von 124 Mamma-CA Fällen angefertigt, die immunhistochemisch nach der Labeled-StreptAvidin-Biotin- (LSAB) Methode mit einem spezifischen gegen TKTL1 gerichteten monoklonalen Antikörper (IgG<sub>2b</sub>) gefärbt werden.

Unsere Studie zeigt in 86,3% der Mamma-CAs eine TKTL1 Expression, darunter zeigen 45,16% der Mamma-CAs eine hohe TKTL1 Expression. Im Gegensatz dazu sind nur 29,3% der korrespondierenden nicht-neoplastischen Mammagewebe TKTL1 immunopositiv, von denen 9,75% eine hohe TKTL1 Expression zeigen. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der TKTL1 Expression und der Her2/neu Expression ( $p = 0,015$ ). Andere klinisch-pathologische Parameter (Tumor-Stadium, Tumorgröße, Nodal-Status, Grading, Angioinvasion, ER- bzw. PR-Status und Alter bei ED) korrelieren nicht mit einer TKTL1 Expression. Die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan Meier zeigt, dass die Höhe der TKTL1 Expression keinen Einfluss auf das Überleben hat.

Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Bedeutung der TKTL1 im Mamma-CA diskutiert. Der Schluss liegt nahe, dass die TKTL1 im Mamma-CA keine prognostische Bedeutung für die betroffenen Patientinnen hat. Vor dem Hintergrund metabolischer Veränderungen, die in Tumorzellen und Metastasen beobachtet werden können, beispielsweise die Laktatproduktion sowie die Aktivierung von Akt-Onkogenen und die klinische Anwendung der PET, könnte die TKTL1 Überexpression im Mamma-CA dennoch von biologischer, ggf. auch therapeutischer Bedeutung sein.

## 6. Literatur

Abe K, Sasaki M, Kuwabara Y, Koga H, Baba S, Hayashi K, Takahashi N, Honda H (2005) Comparison of 18FDG-PET with 99mTc-HMDP scintigraphy for the detection of bone metastases in patients with breast cancer. *Ann Nucl Med* 19: 573-579

AlpaMetrix Biotech (2005) Bedienungsanleitung Manueller Tissue Arrayer MTA-1, 2.Aufl. Rödermark, S.1-24

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11: 155-168

Alo PL, Visca P, Botti C, Galati GM, Sebastiani V, Andreano T, Di Tondo U, Pizer ES (2001) Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. *Am J Clin Pathol* 116: 129-134

Avril N, Menzel M, Dose J, Schelling M, Weber W, Janicke F, Nathrath W, Schwaiger M (2001) Glucose metabolism of breast cancer assessed by 18F-FDG PET: histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med* 42: 9-16

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14: 737-744

Bässler R (1997) Mammakarzinom. In: Remmele W (Hg.) *Pathologie*. Band 4, 2.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S.237-281

Basu TK, Dickerson JW (1976) The thiamin status of early cancer patients with particular reference to those with breast and bronchial carcinomas. *Oncology* 33: 250-252.

Beecher Instruments Inc. (1998) *Manual Tissue Arrayer MTA-1*. 2.Aufl, Wisconsin, S.1-14

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) Der Calvin-Zyklus und der Pentosephosphatweg. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (Hg.) *Biochemie*. 5.Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, S.616-629

Berthon HA, Kuchel PW, Nixon PF (1992) High control coefficient of transketolase in the nonoxidative pentose phosphate pathway of human erythrocytes: NMR, antibody, and computer simulation studies. *Biochemistry* 31: 12792-12798

Bezwoda WR (2000) c-erb-B2 expression and response to treatment in metastatic breast cancer. *Med Oncol* 17: 22-28

Boenisch T (2003) Färbemethoden-Detektionssysteme. In: Boenisch T (Hg.) *Handbuch immunhistochemische Färbemethoden*. 3.Aufl. DakoCytomation, Carpinteria Hamburg, S.34-39

Boiteux A, Hess B (1981) Design of glycolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293: 5-22

Boros LG, Lapis K, Szende B, Tomoskozi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M, Hidvegi M (2001) Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* 23: 141-147

Boros LG, Brandes JL, Lee WN, Cascante M, Puigjaner J, Revesz E, Bray TM, Schirmer WJ, Melvin WS (1998) Thiamine supplementation to cancer patients: a double edged sword. *Anticancer Res* 18: 595-602

Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, Lee WN, Brandes JL, Bassilian S, Yusuf FI, Williams RD, Muscarella P, Melvin WS, Schirmer WJ (1997) Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* 57: 4242-4248

Braun L, Puskas F, Csala M, Meszaros G, Mandl J, Banhegyi G (1997) Ascorbate as a substrate for glycolysis or gluconeogenesis: evidence for an interorgan ascorbate cycle. *Free Radic Biol Med* 23: 804-808

Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, Thompson CB (2005) The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid betaoxidation. *Oncogene* 24: 4165-4173

Bykova IA, Solovjeva ON, Meshalkina LE, Kovina MV, Kochetov GA (2001) One-substrate transketolase-catalyzed reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 845-847

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490

Cascante M, Centelles JJ, Veech RL, Lee WN, Boros LG (2000) Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutr Cancer* 36: 150-154

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648

Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S, Cascante M (2002) Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem* 277: 46408-46414

- Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, Moro C, Centelles JJ, Trebukhina R, Petushok N, Lee WN, Boros LG, Cascante M (2001) The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur J Biochem* 268: 4177-4182
- Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P (2005) Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* 51: 257-273
- Coy JF, Dubel S, Kioschis P, Thomas K, Micklem G, Delius H, Poustka A (1996) Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* 32: 309-316
- Crippa F, Seregini E, Agresti R, Chiesa C, Pascali C, Bogni A, Decise D, De Sanctis V, Greco M, Daidone MG, Bombardieri E (1998) Association between [18F]fluorodeoxyglucose uptake and postoperative histopathology, hormone receptor status, thymidine labelling index and p53 in primary breast cancer: a preliminary observation. *Eur J Nucl Med* 25: 1429-1434
- Czernin J, Phelps ME (2002). Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annu Rev Med* 53: 89-112
- DakoCytomation (2004) Guidelines for Scoring HercepTest®. 6.Aufl. Glostrup, Denmark, S.1-72
- DakoCytomation (2003) ChemMate Detection Kit Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse. 2.Aufl. Glostrup, S.32-45
- Downey RJ, Akhurst T, Gonen M, Vincent A, Bains MS, Larson S, Rusch V (2004) Preoperative F-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography maximal standardized uptake value predicts survival after lung cancer resection. *J Clin Oncol* 22: 3255–3260
- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabar L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, Scasc AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Børresen-Dale AL, van't Veer L, Sapino A (2003) Tumours of the Breast: Invasive Breast Cancer. In: Tavassoli FA, Devilee P (Hg.) World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 1. Aufl., International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, Lyon, pp. 11-59
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892– 3899
- Engel J, Hölzel D, Kerr J, Schubert-Fritschle G (2003) Epidemiologie. In: Sauer H, Tumorzentrum München (Hg.) Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 9.Aufl. W. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, S.1-11
- Eubank WB, Mankoff DA (2005). Evolving role of positron emission tomography in breast cancer imaging. *Semin Nucl Med* 35: 84-99

Fajka-Boja R, Hidvegi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tomoskozi-Farkas R, Vizler C, Telekes A, Resetar A, Monostori E (2002) Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int J Oncol* 20: 563-570

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000) Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 124: 966-978

Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-899

Gatenby RA, Gawlinski ET (2003) The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res* 63: 3847-3854

Geng MY, Saito H, Katsuki H (1995) The effects of thiamine and oxythiamine on the survival of cultured brain neurons. *Jpn J Pharmacol* 68: 349-352

Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C (2005) Brustkrebs. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25, Robert Koch Institut, Berlin, S.7-14

Glinsky GV, Ivanova YA, Glinskii AB (2003a.) Common malignancy-associated regions of transcriptional activation (MARTA) in human prostate, breast, ovarian, and colon cancers are targets for DNA amplification. *Cancer Lett* 201: 67-77

Glinsky GV, Krones-Herzig A, Glinskii AB (2003b.) Malignancy-associated regions of transcriptional activation: gene expression profiling identifies common chromosomal regions of a recurrent transcriptional activation in human prostate, breast, ovarian, and colon cancers. *Neoplasia* 5: 218-228

Gorbach ZV, Ostrovskii IuM (1977) Possible mechanism of action of oxythiamine on nucleic acid metabolism. *Biokhimiia* 42: 531-533

Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V (2002) Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 364: 309-315

Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Lebeau A, Permanetter W, Raab G, Untch M, Zenzoum I (2003) In: Sauer H, Tumorzentrum München (Hg.) Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 9.Aufl. W. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, S.67-71

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1474-1481

- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Szende B, Paku S, Pronai L, Bocsi J, Lapis K (1999) MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect. *Cancer Biother Radiopharm* 14: 277–289
- Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, Paku S, Lapis K, Szende B (1998) Effect of Avemar and Avemar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals. *Anticancer Res* 18: 2353-2358
- Hoh CK, Hawkins RA, Glaspy JA, Dahlbom M, Tse NY, Hoffman EJ, Schiepers C, Choi Y, Rege S, Nitzsche E (1993) Cancer detection with whole-body PET using 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *J Comput Assist Tomogr* 17: 582-589
- Horecker BL (1976) Unravelling the Pentose Phosphate Pathway. In: Kornberg A, Cornudella L, Horecker BL, Oro J (Hg.) *Reflections on Biochemistry*. Pergamon, Oxford, S.65-72
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara JA, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, Cuezva JM (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26:2095-2104
- Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh A, Nichelatti M, Hoffmann A, Kahan Z, Lapis K, Mayer A, Sapy P, Szentpetery F, Telekes A, Thurzo L, Vagvolgyi A, Hidvegi M (2003) A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. *Br J Cancer* 89: 465–469
- Jakab F, Mayer A, Hoffmann A, Hidvegi M (2000) First clinical data of a natural immunomodulator in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47: 393-395
- Kaplan GL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481
- Khokha AM, Fustochenko BP, Nefedov LI (1984) Synthesis of nucleic RNA in hydroxythiamine-induced vitamin B1 deficiency. *Biokhimiia* 49: 1166-1170
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847
- Kumar R, Nadig MR, Chauhan A (2005) Positron emission tomography: clinical applications in oncology. Part 1. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 1079-1094
- Langbein S, Zerilli M, Zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, Popa J, Ternullo MP, Steidler A, Weiss C, Grobholz R, Willeke F, Alken P, Stassi G, Schubert P, Coy JF (2006) Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* 94: 578-585

Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W (2003) Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In: Sauer H, Tumorzentrum München (Hg.) Mammakarzinome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 9.Aufl. W. Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, S.52-55

Lee WN, Boros LG, Puigjaner J, Bassilian S, Lim S, Cascante M (1998) Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]glucose. *Am J Physiol* 274: E843-851

Lindqvist Y, Schneider G, Ermler U, Sundstrom M (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J* 11: 2373-2379

Löffler G (1998) Glykolyse. Hexosemonophosphat-Weg. In: Löffler G, Petrides PE (Hg.) Biochemie und Pathobiochemie. 6.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S.378-384, 387-389

Lu H, Forbes RA, Verma (2002) A Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111-23115

Melendez-Hevia E, Isidoro A (1985) The game of the pentose phosphate cycle. *J Theor Biol* 117: 251-263

Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC (2004) Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol* 17: 1545-1554

Mottolese M, Nadasz EA, Botti C, Cianciulli AM, Merola R, Buglioni S, Benevolo M, Giannarelli D, Marandino F, Donnorso RP, Ventura I, Natali PG (2005) Phenotypic changes of p53, HER2, and FAS system in multiple normal tissues surrounding breast cancer. *J Cell Physiol* 204: 106-112

Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E (1995) Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports. *J Am Coll Nutr* 14: 202-208

Nichelatti M, Hidvegi M (2002) Experimental and clinical results with Avemar (a dried extract from fermented wheat germ) in animal cancer models and cancer patients. *Nőgyogyaszati Onkologia* 7: 180-185

Oshida M, Uno K, Suzuki M, Nagashima T, Hashimoto H, Yagata H, Shishikura T, Imazeki K, Nakajima N (1998) Predicting the prognoses of breast carcinoma patients with positron emission tomography using 2-deoxy-2-fluoro[<sup>18</sup>F]-D-glucose. *Cancer* 82: 2227-2234

Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW (2000) Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment. *Cell Death Differ* 7: 729-738

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD (2005) Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 353: 1659-1672

Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909

Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, Ennamany R, Lee WN, Boros LG, Cascante M (1999) Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* 456: 113-118

Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, Peterson LM, Schwartz DL, Conrad EU, Spence AM, Muzi M, Farwell DG, Krohn KA (2004) Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 10: 2245-2252

Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL (2005) Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5992-5997

Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34: 791-808

Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD (2000) Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol* 53: 292-301

Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ (2005) Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 7: 324-330

Schattenfroh S (2000) Herceptin bei Mammakarzinom: Test entdeckt Frauen, die von der Therapieform profitieren, *Deutsches Ärzteblatt* 97(50): A-3447 / B-2797 / C-2521

Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF (1998a) Heterologous expression of human transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 369-378

Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF (1998b) Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1297-1318

Schuhmacher M, Olschewski M (2002) Analyse von Ereigniszeiten-Teil I: Der Kaplan-Meier-Schätzer. In: Schuhmacher M, Schulgen G (Hg.) *Methodik klinischer Studien-Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung*. 1.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S.71-78

Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594

Seyfried TN, Mukherjee P (2005) Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis. *Nutr Metab (Lond)* 2: 30

Shuster S, Frost GI, Csoka AB, Formby B, Stern R (2002) Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer* 102: 192-197.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182

Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B (2002) Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 276: 24–31

Torosian MH (1992) Stimulation of tumor growth by nutrition support. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16: 72S-75S

Trebukhina RV, Kravchuk RI, Mikhail'tsevich GN, Petushok VG, Nikitin VS (1987) Effect of thiamine and its antimetabolite oxythiamine on the proliferative activity of carcinosarcoma Walker 256 cells. *Eksp Onkol* 9: 60-63

Vetter C (2002) Mammakarzinom: Bluttest ermöglicht Therapiekontrolle. *Deutsches Ärzteblatt* 99(46): A-3076 / B-2600 / C-2429

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726

Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2004) Lactate in solid malignant tumours: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11: 2195–2204

Warburg O, Posener K, Negelein E (1924) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z* 152: 309–344

Wikner C, Meshalkina L, Nilsson U, Backstrom S, Lindqvist Y, Schneider G (1995) His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur J Biochem* 233: 750-755

Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C (1999) An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18: 3199–3204

Wood T (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*. Academic Press, London New York

Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P (2005) Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65: 613-621

Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, Pruim J, Price P (1999) Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *Eur J Cancer* 35: 1773-1782

Ziegler A, Lange S, Bender R (2002) *Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode*. *Dtsch Med Wochenschr* 127: T 14–T 16, Thieme, Stuttgart New York

## **7. Danksagung**

Mein Dank gilt all jenen, die mir bei der Unterstützung der Dissertation behilflich waren! Auch will ich all denen ein Dankeschön aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt werden!

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Martha Földi für die Bereitstellung des interessanten Themas, die außergewöhnliche Unterstützung meiner Arbeit, die Korrektur meines Manuskripts,... und die stets freundschaftliche und persönliche Atmosphäre, durch die mir die Arbeit sehr viel Spaß gemacht hat! Danke Martha - es war eine perfekte Betreuung!!!

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Elmar Stickeler für die Übernahme des Themas als Doktorvater, die unkomplizierte Zusammenarbeit und seinen sehr hilfreichen und engagierten Einsatz bei der Korrektur meiner Arbeit!

Für die Betreuung und Hilfe in der Pathologie und für die Erstellung des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Axel zur Hausen. Dank seiner wertvollen Anregungen, seiner Hilfsbereitschaft und seines Einsatzes verbrachte ich eine super Zeit im Pathologischen Institut!

Danke Frau Marlies Thome für die Einführung in die Welt der Archive und histologischen Schnitte. Danke allen Mitarbeitern im Pathologischen Institut für das tolle Arbeitsklima, eure Hilfe und eure Zeit – besonderer Dank geht an Frau Evelyn Wätzig, Frau Viola Doktorowski, Herrn Dr. Gean Kayser, Frau Dr. Ulrike Gerlach, Frau Anja Schöpflin und Herrn Dr. Jens Neumann! Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn Markus Jäger!

Herrn PD Dr. Dirk Watermann danke ich für die Überlassung des Kollektivs und die statistische Auswertung! Für die Hilfe bei der Literaturrecherche nach Volltexten danke ich Herrn PD Dr. Oliver Kretz! Ein Dank geht natürlich auch an Herrn Dr. Johannes Coy für die Bereitstellung des TKTL1 Antikörpers!

Ich danke meiner Familie, Matthias und meinen Freunden – für alles!!!

## 8. Lebenslauf

21. Januar 1981	Geburt in Friedberg
09/1987-06/1991	Besuch der Grundschulen Heuchelheim/Langgöns
08/1991-06/2000	Besuch des Weidiggymnasiums Butzbach Besuch der Vikoriaschule Darmstadt
06/2000	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/2000-05/2001	Achtmonatiger Auslandsaufenthalt in Malawi (Afrika): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Praktikum an einem Aufbauprojekt (Cultural &amp; Museum Centre Karonga) der Gesellschaft für Technischen Zusammenarbeit und Europäischen Union in Karonga</li> <li>- Praktikum im „College of Forestry and Wildlife“ in Dedza</li> <li>- Praktikum an der MIRACLE-Technical-School für Waisenkinder in Karonga</li> </ul>
08/2001-09/2001	Zweimonatiges Krankenpflegepraktikum im Elisabethenstift in Darmstadt, Abteilung für Innere Medizin
10/2001	Beginn des Medizinstudiums an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
09/2003	Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Freiburg im Breisgau
03/2004	Einmonatige Famulatur im Ev. Diakoniekrankenhaus in Freiburg im Breisgau, Abteilung für Allgemein- und Visceralchirurgie
09/2004	Einmonatige Famulatur im Städtischen Krankenhaus Dresden-Neustadt in Dresden, Abteilung für Innere Medizin

- 11/2004 Beginn der Dissertation in der Universitäts-Frauenklinik, Freiburg im Breisgau (Thematik: Das Transketolase-like-1 Protein (TKTL1) im Mammakarzinom)
- 08/2005-09/2005 Einmonatige Famulatur im Hospital Civil in Guadalajara (Mexiko), Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
- 02/2006-03/2006 Einmonatige Famulatur in einer Praxis für Kinder- und Jugendheilkunde, Herbolzheim
- 08/2006-07/2007 Praktisches Jahr im Schwarzwald-Baar-Klinikum, Villingen-Schwenningen, Lehrkrankenhaus der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Erstes Tertial im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe
- Zweites Tertial im Fach Innere Medizin (Allgemeine Innere Medizin, Kardiologie und Onkologie)
- Drittes Tertial als Auslandstertial im Fach Chirurgie
- Department of Trauma and Orthopaedic Surgery, Newcastle General Hospital, Newcastle upon Tyne, England
  - Kreisspital Männedorf, Männedorf, Schweiz
- 05/2008 Ärztliche Prüfung, Freiburg im Breisgau

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Földi M, Stickeler E, *Bau L*, Kretz O, Watermann D, Gitsch G, Kayser G, Zur Hausen A, Coy JF (2007) Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep* 17: 841-845.