

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Quantifizierung von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in  
Gewebeproben benigner und maligner humaner  
Mammatumoren mittels Western-Blotting**

**Promotionsschrift zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin**

vorgelegt der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

von

Jan-Mathias Patrick Schedlbauer

München 2003

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Quantifizierung von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in  
Gewebeproben benigner und maligner humaner  
Mammatumoren mittels Western-Blotting**

Jan-Mathias Patrick Schedlbauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 25.02.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.11.2003 angenommen.

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Epidemiologie des Mammakarzinoms  | 1         |
| 1.2      | Risikofaktoren  | 1         |
| 1.3      | Pathomorphologie der invasiven Mammakarzinome   | 2         |
| 1.4      | Diagnostische Verfahren   | 2         |
| 1.4.1    | Das Mammographiescreening   | 3         |
| 1.4.2    | Die Mammasonographie  | 5         |
| 1.4.3    | Die Punktionszytologie  | 5         |
| 1.4.4    | Die präoperative Vitalfärbung   | 5         |
| 1.4.5    | Zusätzliche Untersuchungen wie Computertomographie (CT),<br>Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronenemissionstomographie (PET) | 6         |
| 1.5      | Besonderheiten des Glukosestoffwechsels von Tumorzellen   | 7         |
| 1.5.1    | Glukosetransportproteine als molekulare Basis für den erhöhten 2-<br>Fluordeoxyglukoseuptake von Tumorzellen                          | 7         |
| 1.5.2    | Intrazelluläre Phosphorylierung von 2-Fluordeoxyglukose durch Hexokinase  | 10        |
| 1.6      | Problemstellung und Ziel der Arbeit   | 11        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>13</b> |
| 2.1      | Materialien   | 13        |
| 2.1.1    | Gewebeproben der Vorversuche  | 13        |
| 2.1.2    | Gewebeproben und ausgewertetes Datenmaterial der Hauptversuche  | 14        |
| 2.1.3    | Chemikalien und Antikörper  | 17        |
| 2.1.4    | Glukosetransporter-1-Antikörper und Hexokinase-1-Antikörper   | 17        |
| 2.1.5    | Radioaktive Antikörper  | 18        |
| 2.1.6    | Spezielle Verbrauchsmaterialien   | 18        |
| 2.1.7    | Verwendete Geräte   | 18        |
| 2.1.8    | Zusammensetzung der Lösungen und Puffer   | 19        |
| 2.2      | Anreicherung der Zellmembranen  | 22        |
| 2.2.1    | Allgemeines   | 22        |
| 2.2.2    | Auftauen und primäre Bearbeitung der Gewebeproben   | 22        |
| 2.2.3    | Mechanischer Zellaufschluss mit dem Dismembrator und Suspendierung des<br>Gewebepulvers   | 22        |
| 2.2.4    | Anreicherungsverfahren für die Proteine der mitochondrialen und mikrosomalen<br>Zellfraktion (Proteine der Plasmamembranen)           | 22        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>2.3</b> | <b>Proteinbestimmung</b>   | <b>24</b> |
| 2.3.1      | Prinzip der Methode  | 24        |
| 2.3.2      | Versuchsdurchführung   | 24        |
| <b>2.4</b> | <b>Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>   | <b>26</b> |
| 2.4.1      | Theoretische Grundlagen  | 26        |
| 2.4.2      | Versuchsdurchführung   | 26        |
| 2.4.2.1    | Giessen des Polyacrylamidgels  | 26        |
| 2.4.2.2    | Bereitstellen der aufzutragenden Proteinproben   | 27        |
| 2.4.2.3    | Zusammenbau der Elektrophoreseapparatur und Durchführung des Elektrophoreselaufes  | 27        |
| <b>2.5</b> | <b>Western-Blotting (Wet-Transfer der Proteine)</b>  | <b>28</b> |
| 2.5.1      | Theoretische Grundlagen  | 28        |
| 2.5.2      | Versuchsdurchführung   | 28        |
| 2.5.2.1    | Vorbereitung der Gele und Zusammenbau der Blotstapel   | 28        |
| 2.5.2.2    | Durchführung des Transfervorganges   | 28        |
| 2.5.2.3    | Beenden des Transfervorganges  | 28        |
| 2.5.2.4    | Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Primärantikörper  | 29        |
| 2.5.2.5    | Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Sekundärantikörper  | 29        |
| 2.5.2.6    | Einlegen der Nitrocellulosemembran in die Phosphorscreenkassette   | 29        |
| <b>2.6</b> | <b>Auswertung der Westernblots und Analyse der Messdaten</b>   | <b>30</b> |
| 2.6.1      | Theoretische Grundlagen und Funktionsprinzip des Phosphorscreen und des PhosphorImager 445 SI  | 30        |
| 2.6.2      | Durchführung der Messungen   | 30        |
| <b>2.7</b> | <b>Auswertung und statistische Analyse der Messdaten am Computer</b>   | <b>31</b> |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Vorversuche</b>   | <b>32</b> |
| 3.1.1      | Ergebnisse der Proteinbestimmung   | 32        |
| 3.1.2      | Western-Blotting Ergebnisse  | 36        |
| 3.1.2.1    | Nachweis von Glukosetransporter-1  | 36        |
| 3.1.2.1.1  | Darstellung eines kompletten Blotbildes des Glukosetransporter-1-Nachweises  | 37        |
| 3.1.2.1.2  | Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 3 und 4                   | 38        |
| 3.1.2.1.3  | Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5 und 6                   | 39        |
| 3.1.2.1.4  | Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5, 6 und 7                | 40        |
| 3.1.2.1.5  | Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 | 41        |
| 3.1.2.2    | Nachweis von Hexokinase-1  | 42        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 3.1.2.2.1   | Darstellung des Westernblots der mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5 und 6  | 42        |
| 3.1.2.2.2   | Darstellung des Westernblots der mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Tumorproben Nummer 5, 6 und 7  | 43        |
| <b>3.2</b>  | <b>Zusammenfassung der Vorversuche</b>  | <b>44</b> |
| <b>3.3</b>  | <b>Bestimmung von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in Mammatumoren eines ausgewählten Patientenguts</b>  | <b>45</b> |
| 3.3.1       | Ergebnisse der Proteinbestimmung  | 45        |
| 3.3.2       | Ergebnisse des Proteinnachweises mittels Western-Blotting   | 51        |
| 3.3.2.1     | Nachweis von Glukosetransporter-1   | 51        |
| 3.3.2.1.1   | Repräsentativer Glukosetransporter-1-Westernblot  | 52        |
| 3.3.2.1.2   | Messwerte der Glukosetransporter-1-Banden nach Auswertung mit dem PhosphorImager  | 53        |
| 3.3.2.2     | Nachweis von Hexokinase-1   | 55        |
| 3.3.2.2.1   | Repräsentative Hexokinase-1-Westernblot-Ergebnisse  | 55        |
| 3.3.2.2.2   | Messwerte der Hexokinase-1-Banden nach Auswertung mit dem PhosphorImager  | 56        |
| 3.3.3       | Statistische Auswertung der Glukosetransporter-1-Daten und Hexokinase-1-Daten   | 58        |
| 3.3.3.1     | Glukosetransporter-1-Messdaten: Auswertung und Vergleich mit weiteren Patientendaten  | 58        |
| 3.3.3.1.1   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den Ausgangsgewebemengen und den Gesamtausbeuten der Rohhomogenate und der 200000g- Fraktionen                                   | 59        |
| 3.3.3.1.2   | Charakterisierung der Fluorodeoxyglukose-SUV-Messdaten gruppiert nach histologischer Dignität   | 60        |
| 3.3.3.1.3   | Gegenüberstellung der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den histopathologischen Daten  | 61        |
| 3.3.3.1.3.1 | Gruppierung nach histopathologischer Dignität   | 61        |
| 3.3.3.1.3.2 | Gruppierung der invasiv wachsenden Karzinome nach histopathologischer Gewebedifferenzierung   | 62        |
| 3.3.3.1.4   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den immunhistochemischen Glukosetransporter-1-Daten  | 64        |
| 3.3.3.1.5   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den Werten von Ki-67 als Marker der Zellproliferation  | 66        |
| 3.3.3.1.6   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit dem Prognosefaktor uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und dessen Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) | 67        |
| 3.3.3.1.7   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den PET-Messdaten  | 72        |
| 3.3.3.1.8   | ROC-Kurven-Analyse zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität der vorgenommenen Messung des Glukosetransporter-1   | 75        |
| 3.3.3.1.9   | Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den Hexokinase-1-Messdaten   | 78        |
| 3.3.3.2     | Auswertung der Daten und Vergleich mit den Hexokinase-1-Messdaten   | 80        |
| 3.3.3.2.1   | Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte mit den Ausgangsgewebemengen und den Gesamtausbeuten der Rohhomogenate und der 200000g-Fraktion  | 81        |
| 3.3.3.2.2   | Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach histopathologischer Dignität  | 82        |
| 3.3.3.2.3   | Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den immunhistochemischen Glukosetransporter-1-Daten  | 83        |
| 3.3.3.2.4   | Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den Werten von Ki-67 als Marker der Zellproliferation  | 84        |

---

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 3.3.3.2.5 | Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit dem Prognosefaktor uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und dessen Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) | 85         |
| 3.3.3.2.6 | Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den PET-FDG-Messdaten  | 88         |
| <b>4</b>  | <b>DISKUSSION</b>   | <b>91</b>  |
| <b>5</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>97</b>  |
| <b>6</b>  | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>  | <b>99</b>  |
| <b>7</b>  | <b>TABELLENVERZEICHNIS</b>  | <b>101</b> |
| <b>8</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>103</b> |
| <b>9</b>  | <b>DANKSAGUNG</b>   | <b>110</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einem Anteil von 22% an allen Malignomen der Frau die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Nach heutigen Inzidenzzahlen erkranken ca. 10% der Frauen in der Bundesrepublik am Mammakarzinom (De Waal, 2001, S. 10). Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt kontinuierlich mit dem Lebensalter, wobei die Altersgipfel zwischen dem 45. und 50. Lebensjahr, sowie zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr liegen. Das Mammakarzinom ist besonders häufig in der weissen Bevölkerung der USA, in England, Skandinavien und Deutschland, selten dagegen in Japan, den romanischen Ländern und Südamerika. Im Jahr 1996 sind 45 von 100000 Frauen am Mammakarzinom verstorben (Pfleiderer, 1996, S. 534; De Waal, 2001, S. 11).

## 1.2 Risikofaktoren

Bei etwa 50% der Mammakarzinompatientinnen sind bestimmte Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms nachzuweisen. In Tabelle 1 sind die häufigsten Risikofaktoren unter den Punkten 2 bis 10 dargestellt. Beinahe 40% der weiblichen Gesamtbevölkerung weisen diese Risikofaktoren auf. Circa 30% der weiblichen Bevölkerung haben das Risikomerkmal Nullipara oder späte Erstgebärende und 10% haben das Risikomerkmal familiäre Belastung.

Tabelle 1: *Etablierte Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms (De Waal, 2001, S. 10)*

| Risikofaktor   | Relatives Risiko |
|--|------------------|
| BRCA1 und BRCA2 (breast cancer gen)-Mutationsträgerinnen             | 7,0              |
| Familiäre Belastung (Verwandschaft ersten Grades)                    | 1,4-13,6         |
| Alter ( $\geq 50$ Jahre vs. $< 50$ Jahre)                            | 6,5              |
| Gutartige Brusterkrankung: atypische Hyperplasie                     | 4,0-4,4          |
| Alter bei erster Lebendgeburt ( $> 30$ Jahre vs. $< 20$ Jahre)       | 1,3-2,2          |
| Alter bei Menopause ( $\geq 55$ Jahre vs. $< 55$ Jahre)              | 1,5-2,0          |
| Familiäre Belastung (Verwandschaft zweiten Grades)                   | 1,5-1,8          |
| Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histologischen Befund) | 1,5-1,8          |
| Alter bei Menarche ( $< 12$ Jahre vs. $\geq 14$ Jahre)               | 1,2-1,5          |
| Hormonersatztherapie (HET) bei postmenopausaler Osteoporose          | 1,0-1,5          |

Mit dem höchsten Risiko ist derzeit das Vorliegen einer Mutation des BRCA1-Gens behaftet. Diese Mutation tritt allerdings bei weniger als 0,5% (1:250 bis 1:1000 in den USA) der weiblichen Bevölkerung auf. Liegen die oben genannten Risikofaktoren alle gleichzeitig vor (ausser BRCA1 oder BRCA2), dann dürfte aus dieser Gruppe nahezu jede zweite Frau an einem Mammakarzinom erkranken. In diese Hochrisikogruppe fallen ca. 5% der weiblichen Bevölkerung (De Waal, 2001, S. 12).

### 1.3 Pathomorphologie der invasiven Mammakarzinome

Die derzeit gültige histologische Klassifikation invasiver Mammakarzinome (Lebeau, 2001, S. 20), eine Erweiterung der WHO-Klassifikation von 1981, differenziert in circa 20 verschiedene Mammakarzinomtypen als Untergruppen von zwei histologischen Hauptgruppen, den invasiven und nichtinvasiven Mammakarzinomen. Die häufigsten histologischen Typen sind:

- **nichtinvasive Karzinome**
  - intraduktales Karzinom (duktales Carcinoma in situ)
  - lobuläres Carcinoma in situ
- **invasive Karzinome**
  - invasiv duktales Karzinom
  - invasiv lobuläres Karzinom
  - invasiv muzinöses Karzinom
  - invasiv medulläres Karzinom

Den grössten Anteil an den Mammakarzinomen haben mit 65%-80% die invasiv duktales Karzinome, gefolgt von duktales in situ Karzinomen mit einem Anteil von 10%-20%. Circa 6%-15% der Karzinome haben invasiv lobulären Charakter, 1%-2% sind invasiv muzinöse Karzinome. Ein weiterer Vertreter der nichtinvasiven Karzinome, das lobuläre in situ Karzinom hat einen Anteil von 1%-6% an allen Mammakarzinomerkrankungen (Lebeau, 2001, S. 24).

### 1.4 Diagnostische Verfahren

Für die Früherkennung von Mammakarzinomen haben die ärztliche Untersuchung und die Mammographie wesentliche Bedeutung. Ab dem 20. Lebensjahr haben Frauen in Deutschland einmal jährlich die Möglichkeit, kostenlos eine ärztliche Untersuchung zur Erkennung von Krebskrankheiten durchführen zu lassen. Bestandteil dieses gynäkologischen Früherkennungsprogrammes ist die klinische Untersuchung der Brust einschliesslich der axillären, infra- und supraklavikulären Lymphknoten. Laut publizierten Daten aus kontrollierten Studien ist die häufig empfohlene Selbstuntersuchung zwar hilfreich, das Bewusstsein der Frauen für die Notwendigkeit der Krebsfrüherkennung zu verstärken, trägt aber nicht zur Früherkennung eines Mammakarzinoms bei. Lediglich für die Mammographie als Einzelmethode ist eine Mortalitätssenkung bewiesen (De Waal, 2001, S. 15). Aufgrund der Häufigkeit des Mammakarzinoms muss jeder in der Brust tastbare Tumor so lange als Mammakarzinom angesehen werden, bis das Gegenteil bewiesen ist. Dies gilt ganz besonders postmenopausal. Ein tastbarer Knoten in der Brust einer Greisin ist eigentlich immer ein Karzinom. Im Gegensatz dazu ist ein tastbarer Knoten bei einer Frau unter 20 Jahren fast immer ein Fibroadenom und zwischen 20 und 40 Jahren in der überwiegenden Zahl aller Fälle eine Zyste oder ein Fibroadenom. Am häufigsten, in 48% der Fälle (Abbildung 1), findet man den Tumor im oberen äusseren Quadranten, in etwa 20% der Fälle in der Brustmitte mehr oder weniger retromammillär.



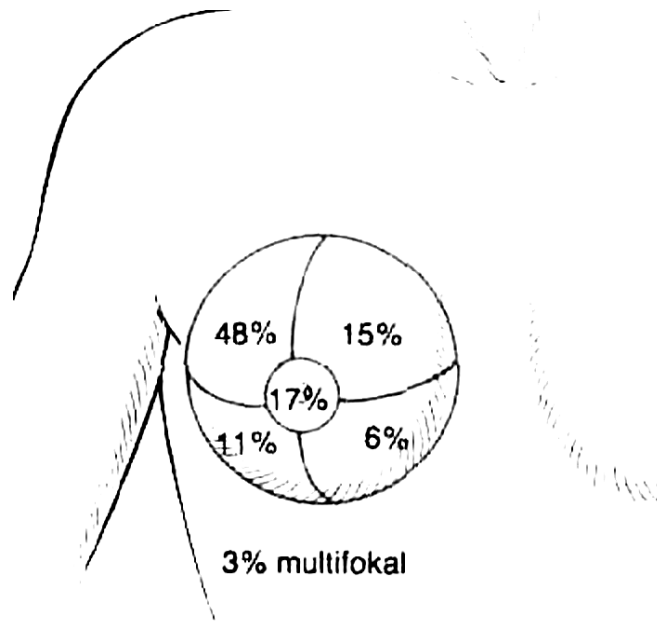


Abbildung 1: *Prozentuale Verteilung des Mammakarzinoms auf die verschiedenen Sektoren der Brust (Pfleiderer, 1996, S. 538)*

### 1.4.1 Das Mammographiescreening

Für ein Mammographiescreening gelten bis zum 50. Lebensjahr keine allgemein akzeptierten Regeln. Die American Cancer Society empfiehlt seit März 1997 im Alter zwischen 40-49 Jahren eine jährliche Mammographie. Eine Basismammographie erfolgt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Maximal 25% der Mammakarzinome treten vor dem 50. Lebensjahr auf. Ab dem 50. Lebensjahr können bei nicht hormonell substituierten Frauen mit einem zu postulierenden langsameren Tumorwachstum Intervalle von 2 Jahren als ausreichend angesehen werden. Bei Vorliegen der in Tabelle 1 aufgeschlüsselten Risikofaktoren oder bei Nachweis einer schweren Mastopathie sollte die Mammographie in jährlichem Abstand erfolgen (Pfleiderer, 1996, S. 540; De Waal, 2001, S. 13).

Die wichtigsten mammographischen Karzinomzeichen sind die sternförmigen Verschattungen mit strahligen Veränderungen in Form der sogenannten „Krebsfüße“ (Abbildung 2), seltener diffuse Mammaverdichtungen oder Rundschatten. Verdächtig können Mikroverkalkungen sein, vor allem, wenn sie in Gruppen angeordnet sind (Abbildung 3) (Pfleiderer, 1996, S. 540).



Abbildung 2: *Mammographisches Bild eines szirrhösen Mammakarzinoms mit strangartiger Verdickung der Mamille: „Warnungsstreifen“ (Pfleiderer, 1996, S. 541)*

Mikroverkalkungen kommen dadurch zustande, dass in den mit atypisch proliferierenden Zellen angefüllten Milchgängen die Epithelzellen nekrotisch werden und Kalk einlagern. Man findet derartige Mikroverkalkungen deshalb bereits beim Carcinoma in situ und hier besonders beim duktalem Carcinoma in situ (DCIS). Die Mikroverkalkungen repräsentieren somit bis heute die einzig sicheren Frühzeichen vor dem Auftreten eines invasiven Karzinoms (Pfleiderer, 1996, S. 540).

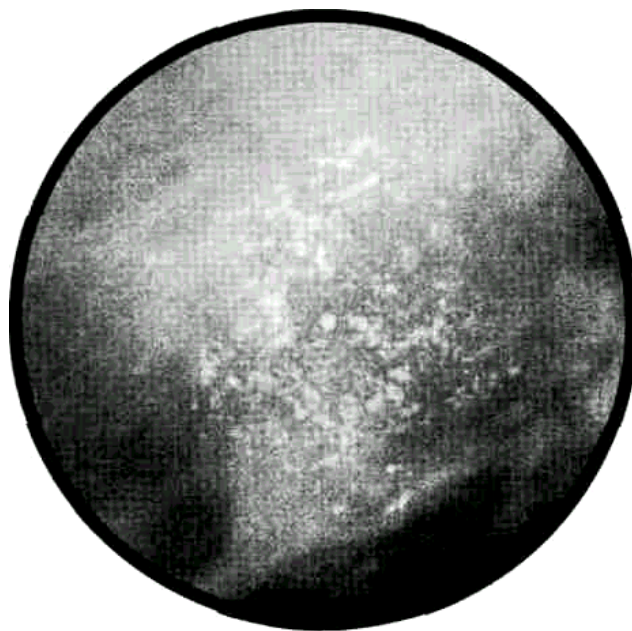


Abbildung 3: *Die intraoperative Röntgenaufnahme eines Biopsiepräparates (5fach vergrößert) zeigt den Bezirk mit den Mikrokalzifikationen am Präparatrand miterfasst. Histologie: Vorwiegend intraduktal wachsendes Mammakarzinom mit beginnender Infiltration des Gewebes. An einzelnen Stellen lobuläres Carcinoma in situ, Mastopathie (Pfleiderer, 1996, S. 542)*

Nach neueren Literaturangaben liegt die Sensitivität der Mammographie zwischen 80% und 95%. Sie beträgt bei malignen Prozessen 85%-97% und bei benignen 75%-91% (Pfleiderer, 1996, S. 540). Allerdings werden diese Zahlen von Olsen et al. (2000, S. 130) vehement angezweifelt. Es gebe keinerlei Daten aus grossen randomisierten Studien, die Mammographie-Screening-Programme stützen würden (Horton, 2000, S. 1). Die oben genannten Zahlen zur Sensitivität erscheinen nach den Untersuchungen von Olsen et al. (2000, S. 132) äusserst fraglich. Ein Mammographiescreening soll jedoch bis spätestens 2003 in Deutschland für alle Frauen zwischen 50 und 70 Jahren eingeführt werden.

#### **1.4.2 Die Mammasonographie**

Als additives diagnostisches Verfahren zu klinischem Befund und Mammographie gewinnt die Mammasonographie zunehmend an Bedeutung. Sie ist wichtig als Zusatzmethode bei tastbaren Resistenzen in der Brust oder bei schattengebenden Veränderungen bei einer Mammographie. In beiden Fällen erlaubt es die Sonographie, mit hoher Sicherheit Zysten zu erkennen und Fibroadenome von Karzinomen zu unterscheiden. Unabhängig davon wird versucht, mit der Doppler-Sonographie über den Nachweis einer Zunahme der Vaskularisation auch kleine, mammographisch nicht erkennbare Karzinome in der Brustdrüse festzustellen. Mit entsprechend hochauflösenden Geräten ist es heute möglich, auch die von einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) gefüllten Milchgänge zu erkennen. Aufgrund der hohen technischen Anforderungen kann die Dopplersonographie der Brust aber noch nicht als ein flächendeckendes Screeningverfahren bezeichnet werden (De Waal, 2001, S. 13).

#### **1.4.3 Die Punktionszytologie**

Die Feinnadelpunktionszytologie und die Stanzbiopsie sind bei allen unsicheren oder suspekten Befunden, so bei jedem tastbaren Tumor, der mit der Menstruation nicht verschwindet, sowie bei der sezernierenden Mamma dringend angezeigt. Das gilt in gleicher Weise bei jedem mammographisch oder sonographisch verdächtigen Herdbefund (De Waal, 2001, S. 13).

#### **1.4.4 Die präoperative Vitalfärbung**

Ist der Tumor nicht tastbar, so muss er präoperativ mit Hilfe von Mammographie oder Sonographie gezielt mit blauem Farbstoff markiert werden, damit er bei der Operation exakt lokalisiert werden kann. Dabei wird mit Hilfe von Mammographieaufnahmen, oder bei nur sonographisch erkennbarem Prozess, der zu entfernende Herd mit einer feinen Nadel unter stereoskopischen Bedingungen punktiert. Durch die Nadel wird Röntgenkontrastmittel und ein blauer Vitalfarbstoff (z.B. Patentblau) injiziert. Die Röntgenkontrollaufnahme gibt Auskunft über die Lage des Blaudepots in der Brust, welches den Operateur zum mammographisch verdächtigen Gebiet leitet. Das exzidierte Gewebe wird dann - wenn palpatorisch kein Herdbefund besteht - in toto fixiert und in Stufen histologisch aufgearbeitet. Lässt sich im exzidierten Gewebe ein Tumor abgrenzen, so kann von diesem Tumor ein Schnellschnitt angefertigt werden. Dieser Schnellschnitt würde es erlauben, im Falle eines invasiven Karzinoms in gleicher Narkose den endgültigen operativen Eingriff vorzunehmen (Pfleiderer, 1996, S. 542; De Waal, 2001, S. 14).

#### **1.4.5 Zusätzliche Untersuchungen wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronenemissionstomographie (PET)**

Zusätzliche Untersuchungen bei Verdacht auf ein Mammakarzinom bzw. bei Vorliegen eines Karzinoms sind die konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax, die Computertomographie bzw. Magnetresonanztomographie, die Ganzkörperknochenszintigraphie und die Sonographie des Abdomens, um möglicherweise vorhandene Metastasen entdecken zu können. Der Einsatz der Magnetresonanztomographie ist nicht als Primärdiagnostikum oder Screeningmethode von Mammatumoren geeignet, sondern ist vielmehr Zusatzmethode mit strenger Indikationsstellung. Gesicherte Indikationen für die Magnetresonanztomographie der Mamma sind zum einen die Differenzierung zwischen narbigen und karzinomatösen Läsionen bei brusterhaltend operierten Patientinnen und zum anderen die Abklärung verdächtiger Befunde nach Brustprothesenimplantation bzw. Abklärung von Implantatdefekten (De Waal, 2001, S. 16).

Seit wenigen Jahren ist eine weitere diagnostische Möglichkeit, vor allem zu Forschungszwecken, etabliert worden. Es handelt sich dabei um ein nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren, die Positronenemissionstomographie. Unter Verwendung kurzlebiger Positronenstrahler (z.B. Fluor-18, O-15; C-11) können unterschiedliche Stoffwechselmetabolite (z.B. Glukose, Wasser, Aminosäuren) markiert und ihre Verteilung sowie Konzentration im Gewebe bestimmt und dreidimensional dargestellt werden. Mit diesem Verfahren ist eine Anreicherung der zu untersuchenden Substanz in bestimmten Gewebesarealen messbar, das heisst, es können Stoffwechselfvorgänge z.B. im Brustgewebe sichtbar gemacht werden. Zur Untersuchung des Glukosestoffwechsels mithilfe der Positronenemissionstomographie wird das Fluor-18 markierte Glukoseanalogon 2-Fluordeoxyglukose (FDG) verwendet (Fischman & Alpert, 1993, S. 8; De Waal, 2001, S. 16). Zudem ermöglicht es die Positronenemissionstomographie den Therapieverlauf einer kombinierten Radiochemotherapie bei verschiedenen Karzinomen, auch dem Mammakarzinom, zu beobachten (Ichiya, 1991, S. 1655) und frühzeitig Nonresponser zu erkennen. Dadurch kann den Patienten eine nichtwirksame und belastende Therapie erspart werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit des nichtinvasiven Lymphknotenstaging durch die Verwendung der Positronenemissionstomographie und die einfachere Differenzierung zwischen Tumor- und Narbenarealen bei bereits operierten Patienten (Avril, 1996, S. 1204; Bachor, 1995, S. 138; Adler, 1995, S. 19).

## 1.5 Besonderheiten des Glukosestoffwechsels von Tumorzellen

Warburg beschrieb 1930 erstmalig, dass maligne Tumore im Vergleich zum Normalgewebe einen erhöhten Glukosestoffwechsel aufweisen (Brown, 1995, S. 1854). Dabei spielen zum einen membrangebundene Glukosetransportproteine für die zelluläre Aufnahme der Glukose aus dem Blutplasma und zum anderen die Enzymaktivität des weiteren Stoffwechsels die entscheidende Rolle (Weber, 1977, S. 541; Bustamante, 1981, S. 8699; Hawkins et al., 1991, S. 1555; Burnol, 1990, S. 277). Vom Tumorgewebe wird die bei der Positronenemissionstomographie eingesetzte 2-Fluordeoxyglukose (FDG) durch Glukosetransportproteine verstärkt aufgenommen, durch eine mitochondriengebundene Hexokinase ATP-abhängig phosphoryliert und danach, bis auf die langsam verlaufende Dephosphorylierung nicht weiter verstoffwechselt. Weil die phosphorylierte FDG die Zelle nicht verlassen kann, da sie kein Substrat für die im nächsten Glykolyse-schritt folgende Phosphohexose-Isomerase ist und ihre Dephosphorylierung durch eine geringe Konzentration von Glukose-6-Phosphatase langsam verläuft, reichert sie sich in Tumorzellen an und kann dann durch die PET registriert werden (Gardner, 1992, S. 499).

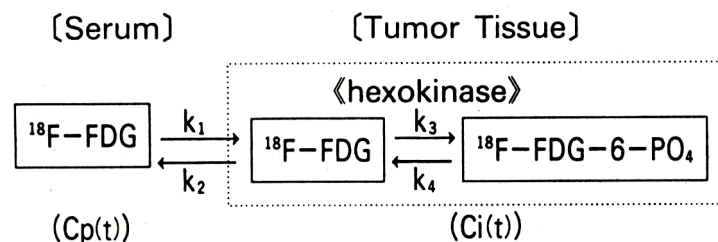


Abbildung 4: Modifizierte Modelldarstellung des FDG-Metabolismus nach Phelps M.E. et al., 1979.  $k_1$ =Transfer vom Blut in das Gewebe,  $k_2$ =Transfer vom Gewebe in das Blut,  $k_3$ =Phosphorylierung durch Hexokinase,  $k_4$ =Dephosphorylierung durch Glukose-6-Phosphatase (aus Okazumi., 1992, S. 333)

Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass zum einen die Transportproteine zur vermehrten intrazellulären Aufnahme von Glukose und zum anderen eine Erhöhung der Hexokinaseaktivität zur verstärkten Glukoseaufnahme bzw. zur erhöhten Aufnahme und Speicherung des Glukoseanalogons FDG führen können. Beide Ansätze zur Erklärung des erhöhten Glukoseuptake durch Tumorzellen wurden in zahlreichen Studien verfolgt (Okazumi, 1992, S. 333).

### 1.5.1 Glukosetransportproteine als molekulare Basis für den erhöhten 2-Fluordeoxyglukoseuptake von Tumorzellen

Erst vor wenigen Jahren konnte man die Membranproteine zur erleichterten zellulären Aufnahme von Glukose differenzieren. Seither sind mindestens 11 verschiedene Glukosetransportproteine (Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-11) beschrieben (Doege, 2001, S. 443; McVie-Wylie, 2001, S. 113; Ibberson, 2000, S. 4607; Mueckler, 1994, S. 713; Gould, 1993, S. 329). Diese Transportproteine wurden in unterschiedlicher Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Glukosetransporter-1 ist vor allem in Erythrozyten, Endothelien und der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar (Thorens, 1990, S. 286), aber auch in sehr geringen Mengen in der Leber und in verschiedenen Tumorgeweben (Mueckler, 1994, S. 713; Rhoads, 1994, S. 540).

Der Glukosetransporter-2 ist hauptsächlich in der Leber (Mueckler, 1994, S. 714; Thorens, 1990, S. 279), Glukosetransporter-3 im Gehirn, Glukosetransporter-4 in Muskel- und Fettgewebe und Glukosetransporter-5 (Fructosetransporter) ist im Dünndarm nachweisbar. Glukosetransporter-6 entspricht zu fast 80% der Struktur von Glukosetransporter-3 mit entsprechendem Verbreitungsgebiet und Glukosetransporter-7 entspricht zu 68% der Struktur von Glukosetransporter-2, mit dem Unterschied einer zusätzlichen Sequenz von 6 Aminosäuren am c-terminalen Ende von Glukosetransporter-7. Das Hauptvorkommen von Glukosetransporter-7 liegt wie bei Glukosetransporter-2 in der Leber (Mueckler, 1994, S. 716; Gould, 1993, S. 329; Brown, 1993, S. 2979; Yamamoto, 1990, S. 223). Alle diese Transporter ermöglichen die erleichterte passive Diffusion von extrazellulärer Glukose bzw. Fructose in das Zellinnere. Der Glukosetransporter-1 unterliegt nicht in dem Masse der physiologischen hormonellen Regulation wie es zum Beispiel bei Glukosetransporter-4 der Fall ist (Mueckler, 1994, S. 720; Burnol, 1990, S. 278; Yang, 1992, S. 815; Gould, 1993, S. 330; Baldwin, 1994, S. 815). Glukosetransporter-1 ist in der Zellmembran lokalisiert und zeigt eine asymmetrische Kinetik des Glukosetransports, wodurch bei geringer extrazellulärer Glukosekonzentration dennoch ein erhöhter intrazellulärer Glukosebedarf gedeckt werden kann (Gould, 1993, S. 331; Postic, 1994, S. 552). In Abbildung 5 ist das schematische Strukturmodell des Glukosetransporter-1 und in Abbildung 6 ist die Aminosäuresequenz des Glukosetransporter-1, neben Glukosetransporter-2 bis Glukosetransporter-5, dargestellt (Mueckler, 1994, S. 715).

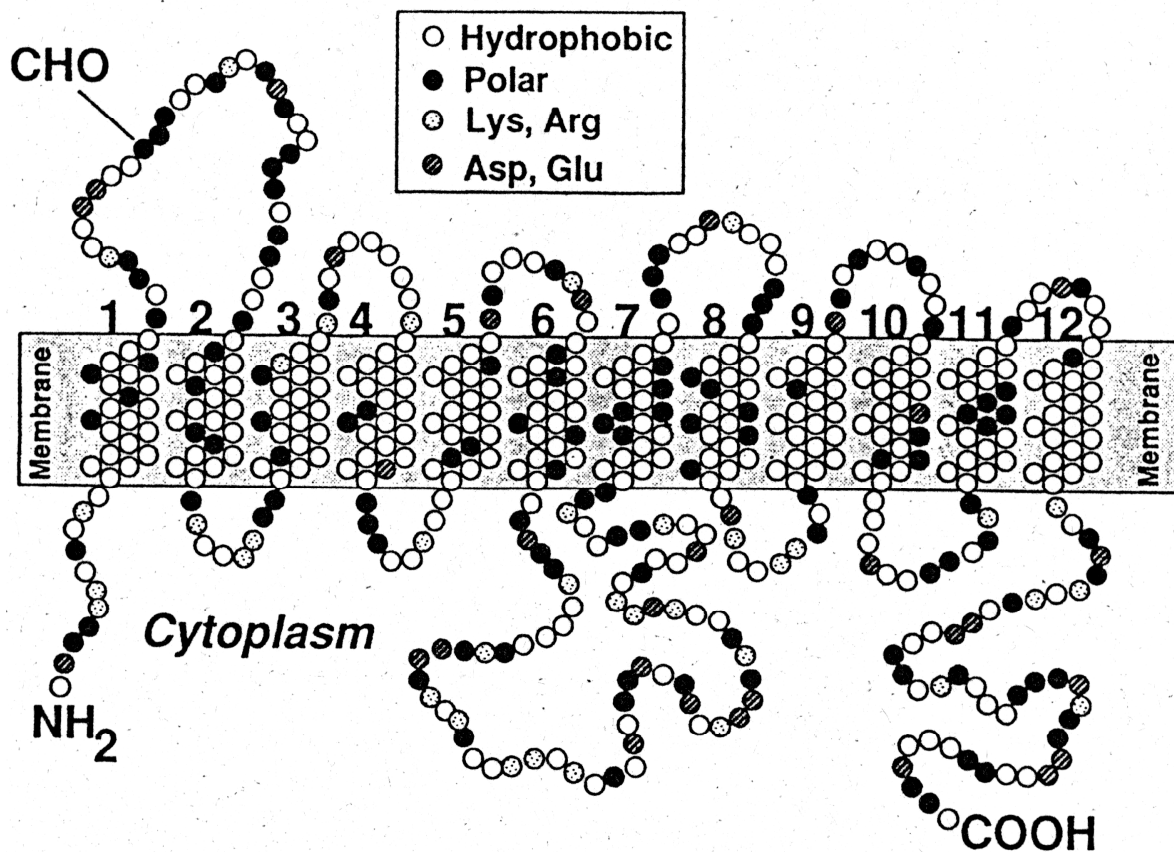


Abbildung 5: Modell des Glukosetransporter-1 (Mueckler, 1994, S 716)

|       |   |     |
|-------|---|-----|
|       | -----M1-----  |     |
| GLUT1 | MEPSSKLLGRLLAVGGAVLGS-LOFGYNTGVINAPQKVIIEEFYNQTVVHRYGESILPTT-----   | 60  |
| GLUT2 | MTEQKVTGLVFTVITAVLGS-FDFGYDIGVINAPQQVIISHYRHVGLVPLDDRKAINNYVINSTDELPTISYSMNPKPTWAEEE                      | 85  |
| GLUT3 | MGTQKVTGALFAITVAFIGS-FDFGYNTGVINAPQKIKEFINKLTDKGNAPPSEVL-----   | 58  |
| GLUT4 | MPSGFQQIGSEDEGEPQQRVTGTLVAVFSAVLGS-LOFGYNIGVINAPQKVIIEEQSYNETWLRGQGPPEGSSIPPPTG-----                      | 76  |
| GLUT5 | MEQQDQSMKEGRLLVLAALATLIAAFSSFOYGYNVAAVNSPALLMQQFYNETYGRTEGFMEDFP-----                                     | 66  |
|       | -----M2----- M3----- M4-----  |     |
| GLUT1 | -----LTLWLSLVAIFSVGGMIGSFVGLFVNRFGRNRNMLMNLAVFSAVLGFSKLGKSFEMLLGRFLIGVYCGLTGTFVPMYVGEVSTAFR               | 153 |
| GLUT2 | TVAAQAQLITLWLSLVSFSAVGGMTASFFGGNLGDTLGRKAMLVANILSLVALLMGFSKLGPSHILIIAGRISISGLYCGLISGLVPMYIIGEIAPTALR      | 185 |
| GLUT3 | -----LTLWLSLVAIFSVGGMIGSFVGLFVNRFGRNRNMLMNLAVTGGCFMGLCKVAKSVEMLILGRLVIGLFCGLCTGFVPMYIIGEISPTALR           | 151 |
| GLUT4 | -----LTLWLSLVAIFSVGGMISSFLIGIISQWLGRKRAMLVNLAVLGGSLMGLANAASVEMLILGRFLIGAYSGLTSGLVPMYIIGEIAPTHLR           | 169 |
| GLUT5 | -----LTLWLSVTVSMFPFGGFIGSSLVGLPLVNKFGKRGKALLNNIFSIIPAALMGCSRVAATFELIISRLLVGCAGVSSNVPMYIIGELAPKNLR         | 159 |
|       | -----M5----- M6-----  |     |
| GLUT1 | GALGTLHQLGTLVVGILIAQVFGLDISIMGNKDLWPLLLSIIIFIPALLOQIVLFPFEPESPRFLIINRNEENRAKSVLKKLRGTADVTHDLOEMKEESRQMMR  | 253 |
| GLUT2 | GALGTFHQLAVTGTGILISQITGLEFILGNIDLWHILLGLSGVRAHLLQSLLLFPFEPESPRFLIYIKLDEEVKAKQSLKRLRGYDDVTKDINEMRKEEAEAS   | 285 |
| GLUT3 | GAPGTLNQLGLVVGILVAQIFGLEFILGSEELWPLLGETILPAHLOSRAALPFEPESPRFLIINRKEEENAKQILQRWGDVQDQIEMKDEBARMSEQ         | 251 |
| GLUT4 | GALGTLNQLAVTGTGILIAQVFGLESLLGTASLWPLLLGLTVLPAALLOLVLLFPFEPESPRFLIYIQNLEGGPARKSLKRLTGNADVSGVLAEIKDEKRLKLER | 269 |
| GLUT5 | GALGVVPOLFITVVGILVAQIFGLRNLLANVDGWPIILLGLTGVPAALQLLLFPFEPESPRFLIYIKKDEAAAKKALQTLRGWDSVDREVAEIRQDEAEKA     | 259 |
|       | -----M7----- M8----- M9-----  |     |
| GLUT1 | EKKVTILELFRSPAYRQPIILIAVVLQLSQQLSGINAVFYYSITIFEKAGVQQP--VYATIGSSLVNNTAFTVVSFLVVERAGRRLHLIIGLAGMAGCAILM    | 351 |
| GLUT2 | EQKVSIIQLFTNSSYRQPIILVALMLHVAQQFSGINGIFYYSTISIFQTAGLSKP--VYATIGVGVANNVFTAVSVFLVEKAGRRSLFLIGMSGMFWCAIFM    | 383 |
| GLUT3 | EKQVTILELFRVSSYRQPIIISIVLQLSQQLSGINAVFYYSITIGIFKDGAVQEP--IYATIGAGVNNIIFTVVSFLVVERAGRRLHMIIGLGMMAFCSTLM    | 349 |
| GLUT4 | ERPLSLLQLLGRTHRQPLIITAVVLQLSQQLSGINAVFYYSITIFETAGVQQP--AYATIGAGVNNVFTLVSVLLVERAGRRLHLIIGLAGMCGCAILM       | 367 |
| GLUT5 | AGFISVLLKFRMRSRLWQLLSIIVLGGQQLSGINAVIYYADQIYLSAGVPEEHVQYVYTAGTAVNVMTFCVAVVVELLGRRLHLIIGLAGMCGCAILM        | 359 |
|       | -----M10----- M11----- M12-----   |     |
| GLUT1 | TIALALLLEQLPWSYLSIVAIFGFVAFFEVGPQPIPIWIVAELFSDGPRPAAAVAGVFSNWTSNFIVGMCFDYVEQLCGPYVFIIFTVLLVLVFFIFTYFK     | 451 |
| GLUT2 | SVGLVLLNKFSSWMSYVSMIAIFLVSFFFEIGPQPIPIWFMVAEFFFSDGPRPAAALIAAFSNWTSNFIVALCFDYIADFQCPYVFFIFLAGVLLAFTLFTFFK  | 483 |
| GLUT3 | TVSLLLDKNYNGMSEFVCIGAILLVFAFFEIGPQPIPIWIVAELFSDGPRPAAAVAGVFSNWTSNFIVGLLFPAAHYLYGAYVFIIFTFGLITFLAFTFFK     | 449 |
| GLUT4 | TVALLLLERVPAWSYVIVAIFGFVAFFEIGPQPIPIWIVAELFSDGPRPAAAVAGVFSNWTSNFIIIGMCFDYVAEAMGPYVFFLFAVLLGFFIFTFLR       | 467 |
| GLUT5 | TAALLALDQTVSWMPYISIVCVISYVIGHALGPEPIPALITELFLOSSRPAFVVGSSVHWLSNFTVGLIFPFIOEGLGPPYVFIIFVAVICLLTIIYIFLI     | 459 |
|       |   |     |
| GLUT1 | VPETKGRTFDEITASGFRQGGASQSDKTPPEELFHLGADSQV  | 492 |
| GLUT2 | VPETKGSFEEIAAEFDKKSQSAHRPKAAVEMKFLGATETV  | 524 |
| GLUT3 | VPETRGRTFEDITRAFEGQAHGADRSGKDGVMEMMSIEPAKETTTNV   | 496 |
| GLUT4 | VPETRGRTFDQISAAFHRTPSLLEQEVKPSLELEYLGPDEND  | 509 |
| GLUT5 | VPETKAKTFEELNQIFTKMNKVSEVYPEKEELKELPPVTSEQ  | 501 |

Abbildung 6: Darstellung der Aminosäuresequenzen der Glukosetransporter 1-5 (Mueckler, 1994, S. 715)

Wie unter Punkt 1.5 bereits erwähnt, wusste man schon um 1930 durch die Studien von Warburg, dass maligne transformierte Zellen einen erhöhten Glukosestoffwechsel aufweisen. In den Studien von Yamamoto (1990, S. 226) wurde die erhöhte mRNA-Expression der Glukosetransporter Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-5 in verschiedenen humanen Krebsgeweben untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem die mRNA von Glukosetransporter-1 in allen untersuchten Tumorgeweben im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben erhöht war. Die Glukosetransporter Glukosetransporter-2 und Glukosetransporter-3 zeigten erhöhte mRNA-Werte bei Kolon- und Lebertumoren. Zwischen den mRNA-Werten von Glukosetransporter-4 und Glukosetransporter-5 von Tumorgeweben und Normalgeweben bestanden keinerlei Unterschiede (Yamamoto, 1990, S. 228). In zahlreichen weiteren Studien wurden immunhistochemische semiquantitative Nachweise von Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-5 in Mammakarzinomgeweben durchgeführt. In einer Studie von Brown (1993, S. 2983) zeigten sich deutlich erhöhte Werte von Glukosetransporter-1 und nur mässig erhöhte Messwerte für Glukosetransporter-2. Die übrigen Glukosetransporter waren im Mammakarzinomgewebe nicht signifikant erhöht (Brown, 1993, S. 2983). In einer 1996 veröffentlichten Studie der Forschungsgruppe um Wahl wurde wiederum bestätigt, dass die erhöhte Expression von Glukosetransporter-1 mit erhöhter intrazellulärer Glukoseaufnahme einhergeht (Brown, 1996, S.

1044). Auch die Untersuchung von Karzinomgeweben bezüglich ihrer intrazellulären Glukoseaufnahme im hypoxischen Milieu zeigte eine deutlich erhöhte Exprimierung von Glukosetransporter-1 gerade unter hypoxischen Bedingungen, was insbesondere interessant ist, da in malignen Geweben eher schlechte Durchblutung und Hypoxieareale vorliegen (Clavo, 1995, S. 1629).

### **1.5.2 Intrazelluläre Phosphorylierung von 2-Fluordeoxyglukose durch Hexokinase**

Bisher sind vier Isoenzyme der Hexokinase, Hexokinase 1-4, als Enzyme zur Phosphorylierung von Glukose bekannt. Die Isoform Hexokinase-1 ist in fast allen Geweben vorhanden, da sie die Hauptrolle für den katabolen Metabolismus von Glukose in der Glykolyse spielt. Die Isoform Hexokinase-2 ist vor allem in insulinabhängigen Geweben wie der Muskulatur vorhanden und hat dort eher anabole Metabolismusfunktion zur Bildung von Glukose-6-Phosphat, das dann in die Bildung von Glykogen einfließt. Die Isoform Hexokinase-4 ist nur in Leber und Pankreas anzutreffen. Diese Isoform scheint als „Glukosesensor“ zu dienen und damit auf Schwankungen des Serumglukosespiegels mit Änderungen der pankreatischen Insulinsekretion oder des hepatischen Glukose- bzw. Glykogenstoffwechsels zu reagieren. Die physiologische Rolle der Isoform Hexokinase-3 ist noch weitgehend unklar. Diese Isoform ist in keinem Gewebe dominant und anders als Hexokinase-1 und Hexokinase-2, die mitochondrienassoziiert vorkommen, zellkerngebunden (Preller, 1992, S. 486; Postic, 1994, S. 555).

In einer Studie von Nakashima (1988, S. 916) wurde die Aktivität von Hexokinase in Lebertumoren mit der von normalem Lebergewebe der Ratte verglichen. In der Gruppe der Karzinome war die Aktivität von Hexokinase über 100fach höher als im Normalgewebe. Die Hexokinase erscheint beim Leberzellkarzinom in den Tumorzellen an der äusseren Mitochondrienmembran in deutlich erhöhter Menge (Arora, 1988, S. 17423; Smith, 1991, S. 362). In den Studien von Okazumi (1992, S. 334) zeigten Leberkarzinome eine erhöhte Hexokinaseaktivität und eine erhöhte Anreicherung von FDG-6-Phosphat. Die dabei in Lebertumoren vorherrschende Hexokinase entspricht dem Isoenzym 2. Auch in Nierentumoren wurden im Vergleich zum normalen Nierengewebe erhöhte Werte für Hexokinase-1-mRNA gemessen (Ahn, 1993, S. 744; Ahn, 1994, S. 65). Diese Studien liessen einen Zusammenhang zwischen erhöhter Hexokinaseaktivität und maligner Transformierung von Zellen und dem daraus resultierenden erhöhten Glukosestoffwechsel schliessen (Ahn, 1994, S. 67).



## 1.6 Problemstellung und Ziel der Arbeit

In den ersten PET-Studien untersuchte man aus technischen Gründen zunächst Tumore des zentralen Nervensystems. Mit der Verfügbarkeit von Ganzkörper-PET-Scannern wurde aber auch die Untersuchung anderer Primärtumore wie der Mammatumore möglich (Tse, 1992, S. 32).

Als eine der ersten Forschungsgruppen untersuchte die Gruppe um Wahl (1991, S. 765) die Möglichkeit, mittels PET primäre und metastasierte Mammakarzinome zu diagnostizieren. In dieser Studie wurden 12 Patientinnen mit insgesamt 25 durch Biopsien bekannten Tumorlokalisationen untersucht. Alle 25 Lokalisationen, darunter Primärtumore, Knochenmetastasen, Lymphknotenmetastasen und Pleurametastasen wurden durch PET mit 2-Fluorodeoxyglukose richtig erkannt. Zusätzlich entdeckte die PET 4 neue Tumorlokalisationen, die nachfolgend bioptisch bzw. computertomographisch verifiziert wurden (Wahl, 1991, S. 768). In einer prospektiven Studie, in der 14 Patientinnen mit entweder suspektem Tastbefund oder suspektem Mammogramm ohne vorherige Biopsie untersucht wurden, konnten in 12 von 14 Fällen, also in 86%, benigne von malignen Veränderungen differenziert werden (Tse, 1992, S. 32). Eine Studie von Nitzsche (1993, S. 297) kam ebenfalls aufgrund hoher Erkennungsraten der PET beim primären und bereits metastasiertem Mammakarzinom zu dem Schluss, dass die PET ein geeignetes bildgebendes Stagingverfahren ist.

Erst in den folgenden Jahren wurde gleichzeitig mit PET-Messungen eine immunhistochemische Bestimmung von Glukosetransporter-1 am Mammakarzinom durchgeführt (Wahl et al., 1993). Dabei konnte semiquantitativ ein höherer Gehalt von Glukosetransporter-1 Protein im Tumorgewebe als im umgebenden Normalgewebe nachgewiesen werden. Auch die Expression von Glukosetransporter-1-mRNA war bei den Tumoren höher als beim Normalgewebe (Wahl, 1992, S. 645).

In einer Studie von Avril (1996, S. 1204) wurde der diagnostische Wert der PET in der Erkennung von Lymphknotenmetastasen beim Mammakarzinom bestimmt. Diese Studie nannte eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 96% für die Erkennung von Metastasen mittels PET. Aus den Studien von Avril et al. lässt sich schliessen, dass die PET eine hohe diagnostische Genauigkeit bei der Erkennung von Mammakarzinomrezidiven und Mammakarzinometastasen bietet (Avril, 1999, S. 270). Zu ähnlich positiven Ergebnissen kam eine Forschergruppe um Adler (1993, S. 748), die eine Spezifität von 100% und Sensitivität von 96% für die Differenzierung in maligne und benigne Brustläsionen errechneten. Die Erkennung von Lymphknotenmetastasen gelang mit einer Sensitivität von 90%.

Wie unter Punkt 1.5.1 erwähnt wurde, scheint Glukosetransporter-1 eine bedeutende Rolle beim erhöhten Glukose- bzw. FDG-Uptake in Tumorzellen zu spielen. Auch ein erhöhter Gehalt an Hexokinase-1 könnte für den erhöhten Glukose- bzw. FDG-Uptake verantwortlich sein. Bisher wurden jedoch lediglich semiquantitative immunhistochemische Messungen bzw. Messungen der mRNA von Glukosetransporter-1 entweder am Humangewebe, meistens jedoch an Zellkulturen, durchgeführt. In dieser Arbeit soll nun eine genauere Methode etabliert werden, mit der durch Western-Blotting der Gehalt an Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in humanen

---

Mammakarzinomproben quantitativ bestimmt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen von 28 Patientinnen, die in den oben genannten Studien von Avril (1996, S. 1848; 1996, S. 1204) untersucht wurden. Die Messergebnisse werden zum einen mit Daten der PET-Studie von Avril (1996, S. 1204; 1996, S. 1848; 1999, S. 261; 2001, S. 9), nämlich dem SUV (standardized uptake values der PET-Messungen), uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp), PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1), Ki-67 (als Marker der Zellproliferation), und zum anderen mit den semiquantitativen immunhistochemischen Messwerten (Glukosetransporter-1 Score) des Glukosetransporter-1-Gehalts (Menzel, 2000) verglichen. Damit soll primär die Frage geklärt werden, ob ein bestimmter Gehalt an Glukosetransporter-1 oder Hexokinase-1 mit dem korrespondierenden gemessenen PET-FDG-Uptake (SUV) korreliert und darüber hinaus auf die Dignität des Gewebes geschlossen werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Gewebeproben der Vorversuche

Von der Klinik für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie (Leitung Prof. Dr. med. H. Höfler) am Klinikum rechts der Isar wurden freundlicherweise 12 Gewebeproben für die Etablierung der Membranpräparationsmethode und der Nachweismethode der Glukosetransportproteine überlassen. Zu diesem Probenmaterial waren mir keine histologischen Diagnosen bekannt. Laut Aussagen der Klinik für Pathologie handelte es sich bei diesen Proben um Anschnitte malignitätsverdächtiger Mammatumoren. Alle Proben wurden sofort bei Erhalt in Flüssigstickstoff bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proben wurden zur Optimierung der Methodik verwendet. Die nachfolgenden Tabellen (Tabelle 2, Tabelle 3) und Abbildung 6 charakterisieren das Untersuchungsgut.

*Tabelle 2: Ausgangsmengen der Vorversuchsgewebeproben und prozentuale Anteile von Tumor- und Fettgewebe*

| <b>CA ID</b> | <b>Ausgangsmenge der Gewebeproben [g]</b> | <b>Tumoranteil am Gesamtgewebe[%]</b> | <b>Fettanteil am Gesamtgewebe [%]</b> |
|--------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1            | 0,400                                     | 63,75                                 | 36,25                                 |
| 2            | 0,236                                     | 51,69                                 | 48,31                                 |
| 3            | 0,440                                     | 76,14                                 | 23,86                                 |
| 4            | 0,627                                     | 48,17                                 | 51,83                                 |
| 5            | 0,809                                     | 34,12                                 | 65,88                                 |
| 6            | 1,580                                     | 51,27                                 | 48,73                                 |
| 7            | 1,500                                     | 74,67                                 | 25,33                                 |
| 8            | 0,621                                     | 100,00                                | 0,00                                  |
| 9            | 0,402                                     | 100,00                                | 0,00                                  |
| 10           | 0,336                                     | 100,00                                | 0,00                                  |
| 11           | 0,316                                     | 72,78                                 | 27,22                                 |
| 12           | 0,243                                     | 100,00                                | 0,00                                  |

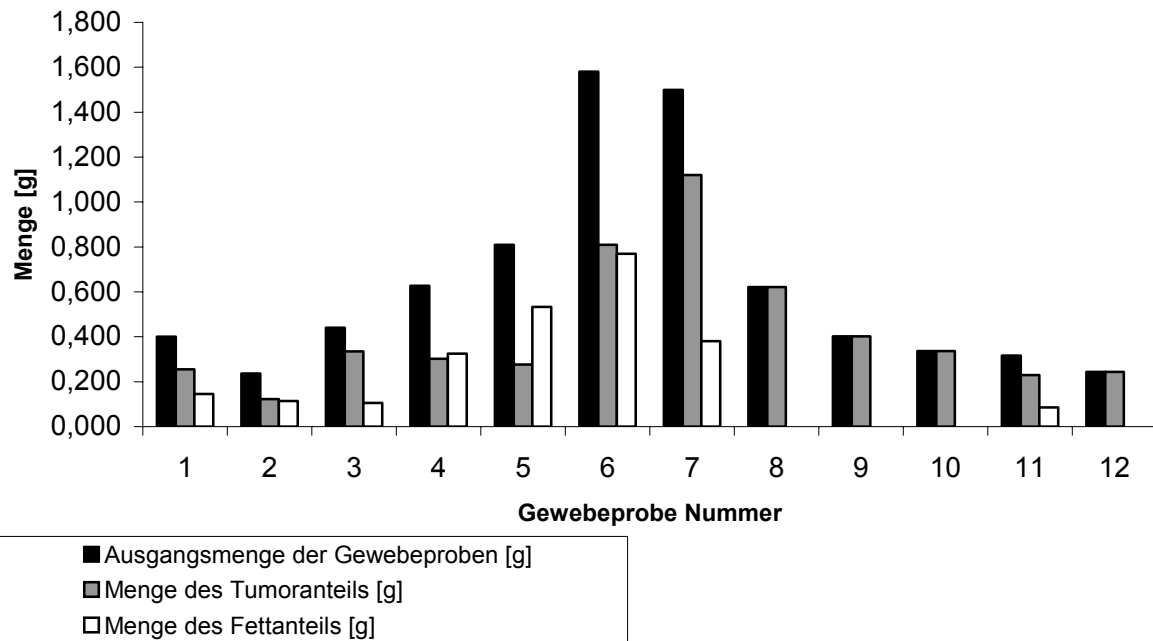


Abbildung 7: Darstellung der Ausgangsgewebemengen und der Mengen von Tumor- und Fettanteilen der Vorversuchsgewebeprouen

Tabelle 3: Charakterisierung der Ausgangsmengen und deren prozentuale Tumor- und Fettanteile der Vorversuchsgewebeprouen

|  | MW ± SD       | RANGE          |
|--|---------------|----------------|
| Ausgangsmenge der 12 Vorversuchsgewebeprouen [g] | 0,626 ± 0,459 | 0,236 – 1,580  |
| Tumoranteil [%]                                  | 72,72 ± 23,49 | 34,12 – 100,00 |
| Fettanteil [%]                                   | 27,28 ± 23,49 | 0,00 – 65,88   |

### 2.1.2 Gewebeprouen und ausgewertetes Datenmaterial der Hauptversuche

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeprouen (archiviertes, tiefgefrorenes Material) wurden mir freundlicherweise von der Frauenklinik (Leitung Prof. Dr. med. H. Graeff) und der Klinik für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie (Leitung Prof. Dr. med. H. Höfler) am Klinikum rechts der Isar für meine Untersuchungen überlassen. Es handelte sich dabei um Resektate sowohl maligner als auch benigner Mammatumore. Nach den histologischen und immunhistologischen Untersuchungen der Gewebe wurden diese in Flüssigstickstoff tiefgekühlt und in der Tumorbank der Pathologie des Forschungszentrums GSF eingelagert. Für diese Arbeit wurden Gewebeprouen von Patientinnen ausgewählt, die bereits in einer Studie von Avril (1996, S. 1204; 1996, S. 1848; 1999, S. 261; 2001, S. 9) untersucht wurden. Das vorliegende Datenmaterial wurde, mit in dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse verglichen. In der Studie von Avril (1996, 2001) wurden die Ergebnisse von PET-Messungen des FDG-Uptakes von Mammatumoren unter anderem mit den histologischen Diagnosen, den Ergebnissen anderer bildgebender Verfahren, den

laborchemischen Untersuchungsverfahren und den klinischen Befunden verglichen. Zusätzlich lagen histologische und immunhistochemische Ergebnisse der Promotionsarbeit von Manuela Menzel mit dem Titel „Pathohistologische und Immunhistochemische (Glut-1) Charakterisierung von Mammakarzinomen im Vergleich zu in vivo Stoffwechseluntersuchungen mit der Positronen-Emissions-Tomographie und Fluor-18-Deoxyglukose“ vor (Menzel, 2000).

Die folgenden Tabellen 4-8 charakterisieren das Patienten- und Untersuchungsgut:

*Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten Gesamtmenge der einzelnen Proben und deren histologische Klassifizierung*

| <b>CA ID</b> | <b>verarbeitetes Gewebe (g)</b> | <b>Histologischer Typ</b>  | <b>Histologische Gruppe</b> | <b>Histologische Dignität</b> |
|--------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1            | 0,212                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 2            | 0,078                           | invasiv lobuläres Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 3            | 0,077                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 4            | 0,180                           | Lymphknoten (N0)           | Lymphknoten (N0)            | benigne                       |
| 5            | 0,307                           | invasiv lobuläres Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 6            | 0,183                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 7            | 0,381                           | Mastitis                   | sonstige benigne Tumoren    | benigne                       |
| 8            | 0,326                           | Lymphknoten (N0)           | Lymphknoten (N0)            | benigne                       |
| 9            | 0,445                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 10           | 0,351                           | Fibroadenom                | Fibroadenom                 | benigne                       |
| 11           | 0,219                           | invasiv lobuläres Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 12           | 1,030                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 13           | 0,425                           | Fibroadenom                | Fibroadenom                 | benigne                       |
| 14           | 0,562                           | invasiv lobuläres Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 15           | 0,597                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 16           | 0,508                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 17           | 0,875                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 18           | 0,397                           | Mastopathie Grad 1-2       | sonstige benigne Tumore     | benigne                       |
| 19           | 0,411                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 20           | 0,217                           | Lymphknoten (N0)           | Lymphknoten (N0)            | benigne                       |
| 21           | 0,277                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 22           | 0,249                           | invasiv muzinöses Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 23           | 0,154                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 24           | 0,139                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 25           | 0,316                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 26           | 0,271                           | invasiv lobuläres Karzinom | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 27           | 0,479                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |
| 28           | 0,237                           | Fibroadenom                | Fibroadenom                 | benigne                       |
| 29           | 0,331                           | invasiv duktales Karzinom  | invasiv wachsende Karzinome | maligne                       |

Tabelle 5: *Patientencharakteristik*

| Menopausenstatus | n  | %      | Alter in Jahren   |         |
|------------------|----|--------|-------------------|---------|
|                  |    |        | MW $\pm$ SD       | RANGE   |
| prämenopausal    | 11 | 39,29  | 44,73 $\pm$ 6,68  | 30 – 53 |
| perimenopausal   | 2  | 7,14   | 53,50 $\pm$ 0,71  | 53 – 54 |
| postmenopausal   | 15 | 53,57  | 61,67 $\pm$ 5,73  | 54 – 72 |
| gesamt           | 28 | 100,00 | 54,43 $\pm$ 10,05 | 30 – 72 |

Tabelle 6: *Charakterisierung der Dignität der Gewebeproben (die Gesamtzahl von 29 Proben ergibt sich durch das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Gewebeproben bei einer Patientin)*

| Dignität | n  | %      |
|----------|----|--------|
| benigne  | 8  | 27,59  |
| maligne  | 21 | 72,41  |
| gesamt   | 29 | 100,00 |

Tabelle 7: *Charakterisierung der benignen Gewebeproben*

| Benigne Brusttumore  | n | %      |
|----------------------|---|--------|
| Fibroadenom          | 3 | 37,50  |
| Lymphknoten (N0)     | 3 | 37,50  |
| Mastitis             | 1 | 12,50  |
| Mastopathie Grad 1-2 | 1 | 12,50  |
| gesamt               | 8 | 100,00 |

Tabelle 8: *Charakterisierung der malignen Gewebeproben*

| Maligne Brusttumore        | n  | %      |
|----------------------------|----|--------|
| invasiv duktales Karzinom  | 15 | 71,43  |
| invasiv lobuläres Karzinom | 5  | 23,81  |
| invasiv muzinöses Karzinom | 1  | 4,76   |
| gesamt                     | 21 | 100,00 |

### 2.1.3 Chemikalien und Antikörper

| <b>Chemikalien:</b>                                    | <b>Bestellnummer</b> | <b>Firma</b> |
|--|----------------------|--------------|
| 5-Sulfosalicylsäure                                    | S2130                | Sigma        |
| β-Mercaptoethanol                                      | M3148                | Sigma        |
| Accugel 29:1 (40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 29:1) | 900150               | Biozym       |
| Albumin Standardlösung (bovines Serumalbumin)          | 23209                | Pierce       |
| Ammoniumpersulfat                                      | A9164                | Sigma        |
| Antifoam A   | A5758                | Sigma        |
| BCA Protein Assay Reagent A                            | 23223                | Pierce       |
| BCA Protein Assay Reagent B                            | 23224                | Pierce       |
| Bromphenolblau   | 8122                 | Merck        |
| Calciumchlorid-2-hydrat zur Analyse                    | 1.02382.1000         | Merck        |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)                    | EDS                  | Sigma        |
| EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)                    | E4378                | Sigma        |
| Glycin   | G8898                | Sigma        |
| Glyzerin 100% zur Analyse                              | G5516                | Sigma        |
| Glyzerin 87% zur Analyse                               | 1.04094.1000         | Merck        |
| Magermilchpulver                                       | 902887               | ICN          |
| Methanol für die Chromatographie                       | 1.06018.2500         | Merck        |
| Natriumchlorid zur Analyse                             | 1.06404.1000         | Merck        |
| Nonidet P-40   | 155942               | ICN          |
| Ponceau S  | P3504                | Sigma        |
| Rainbow™ coloured protein molecular weight markers     | RPN756               | Amersham     |
| Saccharose   | S0389                | Sigma        |
| SDS (Natriumdodecylsulfat)                             | 161-0302             | Bio-Rad      |
| Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)               | T7024                | Sigma        |
| Trichloressigsäure zur Analyse                         | 1.00807.0250         | Merck        |
| Trispuffer   | T1503                | Sigma        |
| Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)         | P1379                | Sigma        |

### 2.1.4 Glukosetransporter-1-Antikörper und Hexokinase-1-Antikörper

| <b>Polyklonale Antikörper:</b>   | <b>Bestellnummer</b> | <b>Firma</b>    |
|--|----------------------|-----------------|
| Hexokinase-1: Mouse anti-mouse/rat Type 1 Hexokinase monoclonal antibody (Kreuzreaktion mit Humangewebe) | MAB 1532             | Chemicon        |
| Glukosetransporter-1: Rabbit anti-rat brain Glucose transporter (Kreuzreaktion mit Humangewebe)          | RaGLUTRANS           | Diagnostic Int. |

### 2.1.5 Radioaktive Antikörper

| Antikörper:                             | Bestellnummer | Firma    |
|---|---------------|----------|
| <sup>125</sup> J-Goat anti-Mouse IgG    | 68075         | ICN      |
| <sup>125</sup> J-Donkey anti-Rabbit IgG | IM134         | Amersham |

### 2.1.6 Spezielle Verbrauchsmaterialien

*NC-Membran:* Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83, 0,2 µm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

*Whatman-Papier:* Whatman Chromatographie-Papier 3MM Chr, Whatman Scientific Limited, Maidstone, England

### 2.1.7 Verwendete Geräte

*Blottingapparatur:* Bio-Rad Trans-Blot transfer cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

*Computer und Software zur Steuerung des Molecular Dynamics PhosphorImager:* Peacock Pentium 90, 32 MB Hauptspeicher, 1,2 GB SCSI Festplatte, Microsoft Windows NT 3.51, Molecular Dynamics ImageQuaNT 4.2, Microsoft Office XP, SPSS 10

*Dismembrator:* Mikro-Dismembrator II, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

*Elektrophoreseapparatur:* Bio-Rad PROTEAN II xi, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

*Hamiltonspritze:* Microliterspritze 1705 (50 µl), Hamilton Deutschland GmbH, Darmstadt

*ImageEreaser:* MD ImageEreaser, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, USA

*PhosphorImager:* MD PhosphorImager 445 SI, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, USA

*Phosphorscreen:* MD Storage Phosphor Screen (20x25 cm, 35x43 cm), Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, USA

*Photometer:* Spektrophotometer UVIKON 931, Kontron Instruments GmbH, Neufahrn

*Thermostat:* Pharmacia MultiTemp II Labor-Thermostat / Kryostat, Pharmacia LKB, Freiburg

*Zentrifugen:* Heraeus Biofuge 4000 und Heraeus Varifuge 3.2S, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode; Beckman Ultrazentrifuge L8-70M mit Beckman 70.1Ti Festwinkelrotor, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA



### 2.1.8 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 1,0 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung | 2,20 g CaCl <sub>2</sub><br>20,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>   |
| 3,0 M NaCl-Lösung               | 87,80 g NaCl<br>500,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  |
| APS-Lösung 10%                  | 120,00 mg Ammoniumpersulfat<br>1,20 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>   |
| Ponceau S-Stammfärbelösung      | 10,00 g Ponceau S<br>150,00 g Trichloressigsäure<br>150,00 g Sulfosalicylsäure<br>ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                              |
| SDS-Lösung 10%                  | 50,00 g Natriumdodecylsulfat<br>500,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  |
| Trenngel 10%                    | 43,10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>22,50 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8<br>22,50 ml Accugel 29:1<br>0,90 ml SDS 10%<br>90,00 µl Temed<br>0,90 ml APS 10% |
| Sammelgel 4%                    | 12,60 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>5,00 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8<br>2,00 ml Accugel 29:1<br>0,20 ml SDS 10%<br>20,00 µl Temed<br>0,20 ml APS 10%   |

**Pufferlösungen:**

|  |  |
|--|--|
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8   | 12,10 g Trispuffer<br>200,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 6,8  |
| 1,0 M Tris-HCl, pH 7,5   | 60,50 g Trispuffer<br>500,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 7,5  |
| 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0   | 60,50 g Trispuffer<br>500,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 8,0  |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8   | 90,80 g Trispuffer<br>500,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 8,8  |
| 2,0 M Tris-HCl, pH 6,8   | 48,40 g Trispuffer<br>200,00 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 6,8  |
| Membranpräparationspuffer<br>(modifiziert nach Burnol)<br>(Burnol, 1990, S. 277) | 1,50 g Trispuffer (25 mM)<br>51,40 g Saccharose (0,3 M)<br>0,73 g EDTA (5 mM)<br>0,38 g EGTA (2 mM)<br>ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub><br>pH 7,4 |
| Probenpuffer für SDS-PAGE<br>(modifiziert nach Laemmli)<br>(Camps, 1993, S. 924) | 6,25 ml 2 M Tris-HCl, pH 6,8<br>40,00 ml 10% SDS-Lösung<br>20,00 ml Glyzerin 100%<br>10,00 mg Bromphenolblau<br>ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  |

---

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Laufpuffer für SDS-PAGE          | 6,00 g Trispuffer<br>28,80 g Glycin<br>20,00 ml 10% SDS-Lösung<br>ad 2000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  |
| Blotting-Puffer für Wet-Transfer | 9,60 g Trispuffer<br>46,10 g Glycin<br>800,00 ml Methanol<br>ad 4000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>   |
| TBS ('tris buffered saline')     | 40,00 ml 1,0 M Tris-HCl, pH 7,5<br>100,00 ml 3,0 M NaCl<br>2,00 ml Nonidet P-40<br>ad 2000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                         |
| Blocking-Puffer                  | 25,00 g Magermilchpulver<br>25,00 ml 1,0 M Tris-HCl, pH 8,0<br>2,00 ml Tween 20<br>1,00 ml 1,0 M CaCl <sub>2</sub><br>0,10 ml Antifoam A<br>ad 500 ml mit TBS |

## **2.2 Anreicherung der Zellmembranen**

### **2.2.1 Allgemeines**

Alle Arbeiten an den Geweben wurden soweit wie möglich im Kühllabor bzw. auf Eiswasser bei 4°C durchgeführt.

### **2.2.2 Auftauen und primäre Bearbeitung der Gewebeproben**

Die aus der Tumorbank der GSF erhaltenen und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -70°C gelagerten Gewebeproben werden auf Eis in Gewebekulturschalen mit ca. 6 ml Membranpräparationspuffer aufgetaut. Das Gewicht der Proben beträgt zwischen 0,078 g und 1,030 g. Die meisten der untersuchten Proben waren weitgehend frei von makroskopisch sichtbaren Gefässanteilen und Fettgewebe. Bei den Proben, die mit bloßem Auge sichtbar vaskularisiert sind, wurden die Gefässanteile mit einem Skalpell entfernt und die Gewebe sorgfältig in Membranpräparationspuffer gewaschen und trocken getupft. Die so vorbereiteten Gewebestücke wurden vor der weiteren Bearbeitung gewogen.

### **2.2.3 Mechanischer Zellaufschluss mit dem Dismembrator und Suspendierung des Gewebepulvers**

Die Proben wurden mit einem Skalpell so weit zerkleinert, bis Gewebestückchen in der Größe von ungefähr 2 mm<sup>3</sup> vorliegen. Diese Probenstückchen wurden in dem Dismembrierbehälter durch Zugabe von Flüssigstickstoff gefroren. Der Behälter wurde verschlossen, in die Halterung des Dismembrators eingespannt und zweimal für 10 Sekunden bei 50% Leistung dismembriert, bis ein feines Gewebepulver vorlag. Das Gewebepulver wurde mit einem Spatel, je nach Menge des Pulvers, in 2 ml – 6 ml Membranpräparationspuffer aufgenommen. Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde das Pulver in der Pufferlösung mit einer 1 ml Spritze und einer Nadel vom Durchmesser 0,9 mm bis zu zehnmal resuspendiert. Von den Suspensionen wurden jeweils 250 µl Aliquots als Rohhomogenate abpipettiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.2.4 Anreicherungsverfahren für die Proteine der mitochondrialen und mikrosomalen Zellfraktion (Proteine der Plasmamembranen)**

Die Gewebesuspensionen wurden im Kühlraum für 20 Minuten mit 600g zentrifugiert. Dadurch wird die Fraktion der schweren Zellanteile – Nuclei, intakte Gewebezellen und Blutzellen – als Pellet abzentrifugiert (McNamee, 1989, S. 466). Die erhaltenen Überstände wurden vorsichtig abpipettiert, ohne die Pellets aufzuwirbeln und in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Die Pellets wurden mit 500 µl – 3000 µl Puffer resuspendiert und als 600g-Fraktion der Tumorproben bei -20°C eingefroren.

Um die Membranfraktion der postnukleären Gewebesuspensionen abzutrennen, wurden die oben erhaltenen Überstände in einer Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor bei 4°C für zwei Stunden bei 200000g zentrifugiert. Die Pellets wurden aus den Ultrazentrifugenröhrchen aufgenommen, in vorher abgewogene Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und je nach Pelletgröße mit 200 µl – 800

$\mu$ l Membranpräparationspuffer vollständig resuspendiert. Die befüllten Reaktionsgefäße wurden daraufhin gewogen, das Gewicht protokolliert und als 200000g-Fractionen der Tumorproben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die verwendeten Verfahrensschritte der Punkte 2.2.3 und 2.2.4 wurden nach den Vorlagen von Burnol, (1990, S. 277) und Camps (1993, S. 924) modifiziert durchgeführt.

## 2.3 Proteinbestimmung

### 2.3.1 Prinzip der Methode

Es wurde hier die Proteinquantifizierungsmethode nach Pierce angewendet, die im Standardprotokoll eine untere Nachweisgrenze von 20 µg Protein / ml besitzt. Proteine reduzieren gemäss der Biuret-Reaktion im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen. Die gebildeten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen können dann mit einem Chelatbildner einen Farbstoffkomplex bilden und durch die photometrisch gemessene Extinktionsänderung der Lösung kann auf die Proteinkonzentration in der Lösung rückgeschlossen werden. Im unten dargestellten Reaktionsschema (Abbildung 7) wird gezeigt, wie bei der Bindung von zwei Molekülen BCA ('bichinonic acid') an ein  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion ein purpurfarbener und wasserlöslicher Komplex entsteht, der im polarisierten Licht ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=562$  nm besitzt.

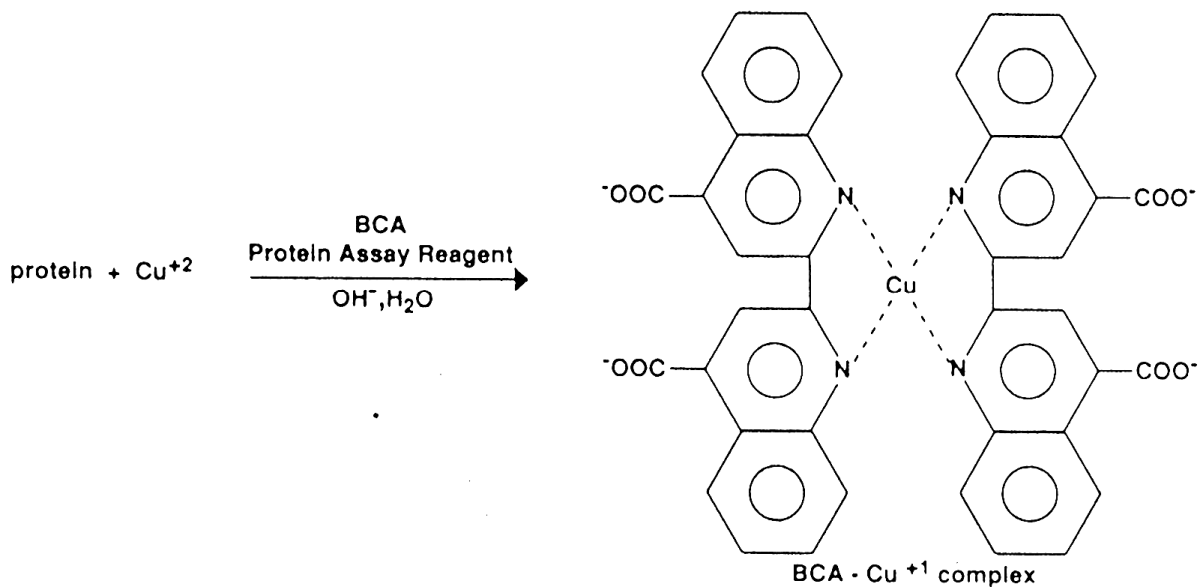


Abbildung 8: Reaktionsschema beim Proteinnachweis nach Pierce

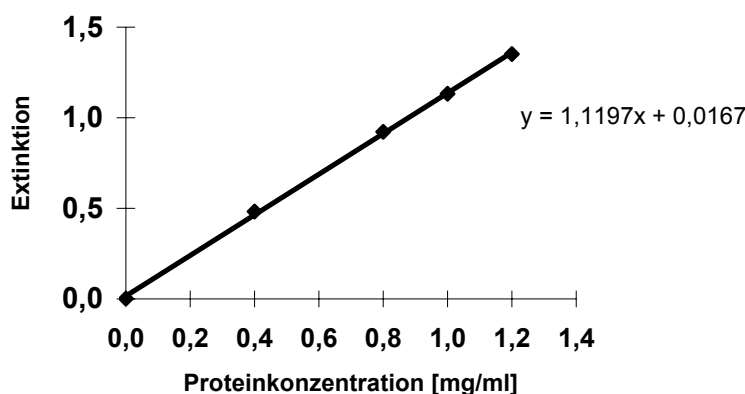
### 2.3.2 Versuchsdurchführung

Um die Konzentrationen der unbekannt Proben bestimmen zu können, muss eine Eichkurve aus bekannten Proteinstandards erstellt werden. Aus der Eichkurve wurde entsprechend den im Photometer gemessenen Extinktionen der unbekannt Probenlösungen deren Proteinkonzentration berechnet. Die Eichkurve wurde für jeden Versuchsansatz neu erstellt und die jeweiligen Konzentrationsstandards als Doppelwerte bestimmt.

Tabelle 9: *Proteinstandards zur Proteinbestimmung nach Pierce*

| Albumin Standardlösung [ml] | NaCl [ml] | Konzentration des Proteinstandard [mg Protein / ml] |
|-----------------------------|-----------|---|
| 0,0                         | 1,0       | <b>0,0</b>  |
| 0,2                         | 0,8       | <b>0,4</b>  |
| 0,4                         | 0,6       | <b>0,8</b>  |
| 0,5                         | 0,5       | <b>1,0</b>  |
| 0,6                         | 0,4       | <b>1,2</b>  |

Das Pierce-Protein-Färbereagenz besteht aus 50 Teilen BCA Protein Assay Reagent A und 1 Teil BCA Protein Assay Reagent B. Zu jeder Probe wurden 2 ml des Färbereagenz pipettiert. Gleichzeitig wurden die Gewebesuspensionen unbekannter Proteinkonzentration im Verdünnungsverhältnis 1:20 mit NaCl-Lösung verdünnt (dies entspricht 5 µl Probenvolumen und 95 µl 0,9%ige NaCl-Lösung) und dazu ebenfalls 2 ml des Färbereagenz pipettiert. Von den unbekanntem Proteinproben wurden jeweils 4 parallele Ansätze hergestellt. Alle Proben wurden gut durchmischt und im Wasserbad für 30 Minuten bei 37°C unter weiterem Schütteln inkubiert. Die Proben werden unmittelbar nach der Inkubationszeit im Eiswasser auf 4°C abgekühlt, um die Reaktion abzubremsen und anschliessend im Photometer gemessen.

Abbildung 9: *Beispiel einer Eichgeraden zur Proteinbestimmung nach Pierce*

Nach Erstellung der Eichgeraden wurden die Gesamtproteinkonzentrationen der unbekanntem Proteinsuspensionen mit dem von der Photometersoftware bestimmten Konzentrationskoeffizienten, der den Reziprokwert der Steigung der Eichgeraden darstellt, und den gemessenen Extinktionswerten in mg Protein / ml berechnet. Die Mittelwerte der Konzentrationen der einzelnen Proben mussten durch Multiplikation mit dem Faktor 20 auf die Ausgangskonzentration der Gewebesuspensionen umgerechnet werden.

## 2.4 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 2.4.1 Theoretische Grundlagen

Geladene Moleküle und Partikel wandern in einem elektrischen Gleichstromfeld jeweils in die Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Die verschiedenartigen Moleküle und Partikel eines Gemisches wandern dabei aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Massen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Bei der hier verwendeten vertikalen Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung ausschliesslich nach unterschiedlichen Molekülgrössen. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat maskiert die Eigenladungen von Proteinen, dass lediglich anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen und somit eine Auftrennung in der Reihenfolge der molaren Massen in Richtung der Anode hin erfolgt. Zusätzlich erfolgt ein Ausgleich der unterschiedlichen Molekülformen zu ähnlichen Formen, da durch die Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und durch die Streckung der Moleküle nach der Maskierung mit SDS sowohl die Tertiär- als auch die Sekundärstrukturen aufgelöst werden (Towbin, 1979, S. 4351; Burnette 1981, S. 195).

### 2.4.2 Versuchsdurchführung

#### 2.4.2.1 Giessen des Polyacrylamidgels

Der Zusammenbau der Apparatur zum Giessen der Gele erfolgt gemäss der Anleitung der Firma Bio-Rad. Zuerst wurde die Trenngellösung bis zu einer Pfeilmarkierung an den Plastikhalterungen zwischen die Glasplatten eingegossen und sofort mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  überschichtet. Dadurch wird der Kontakt von Luftsauerstoff, der die zur Polymerisation des Polyacrylamidgels notwendigen freien Radikale an der Oberfläche abfangen würde, verhindert und eine gerade Kante des Trenngels erzeugt. Nach zehn Minuten Polymerisationszeit wurde das auf dem Oberrand des Gels aufschwimmende Wasser mit Filterpapieren entfernt und die Sammelgellösung bis ca. 1 cm unter den Glasplattenoberrand gegossen. Zur Ausformung der Probentaschen, die später die aufzutrennenden Proteinproben aufnehmen, wurde der Kunststoffkamm, ohne Luftbläschen in das Gel einzubringen, in das Sammelgel eingesteckt. Eine Überschichtung des Sammelgels mit Wasser ist nicht nötig, da der Kamm das Gel luftdicht abdeckt. Nach einer Stunde ist die vollständige Polymerisation des Gels erfolgt. Während der Polymerisationszeit wurden die aufzutragenden Proteinproben aufgetaut und für die elektrophoretische Auftrennung vorbereitet.



#### 2.4.2.2 Bereitstellen der aufzutragenden Proteinproben

Pro Geltasche wurden 50 µg Protein der jeweiligen Tumorproben zur Elektrophorese aufgetragen. Dazu wurde der Probenpuffer, der jeweils frisch mit 7 µl β-Mercaptoethanol versetzt wurde, mit einem Volumenüberschuss von ca. 10 µl bis 20 µl zum errechneten Probenvolumen in Eppendorfreaktionsgefäße vorgelegt. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer gemischt. 6 µl des farbig markierten Molekulargewichtsmarkers (range: 14300 – 220000 D) wurden mit 15 µl Probenpuffer versetzt und vor der Auftragung auf das Gel für 5 Minuten gekocht. Durch das Kochen des Rainbow-Marker werden die Markersubstanzen vollständig hitzedenaturiert. Nach der Elektrophorese ist der Marker in farbige Banden mit bekannten Molekulargewichten aufgetrennt. Das β-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine und führt damit zu einer vollständigen Streckung der Proteine. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerin sorgt für ein Absinken der Proteingemische beim Beschicken des Gels. Bromphenolblau dient als Markierung für die Position der Lauffront.

#### 2.4.2.3 Zusammenbau der Elektrophoreseapparatur und Durchführung des Elektrophoreselaufes

Die Gele wurden mit ihrer Giessform an die beiden Flächen des Kühlkörpers der Elektrophoreseapparatur befestigt und die Apparatur wurde in den Elektrophoresetank eingesetzt. Der Laufpuffer für die Elektrophorese wird in die obere Elektrophoresekammer eingefüllt und an der Unterseite der Gele sitzende Luftbläschen wurden durch leichtes Schütteln der Elektrophoresevorrichtung entfernt. Die Protein-Puffer-Gemische wurden sorgfältig mit einer Hamiltonspritze in die Taschen des Gels einpipettiert. Die beiden äusseren Geltaschen wurden im Regelfall nicht mit Probenflüssigkeit beschickt, da die Proben hier nicht immer gerade laufen. Nach der Probenauftragung wurde der Elektrophoreselauf gestartet. Dazu wurden am Netzteil eine konstante Stromstärke von 0,08 A und eine maximale Spannung von 200 V bei zwei Gelen eingestellt. Um die entstehende Wärme abzuleiten, wurde mit einem Thermostat bei 10°C gekühlt. Die Laufzeit, in der die Lauffront im Trenngel ungefähr 10 cm zurückgelegt hat, betrug ca. 4,5 Stunden.

## 2.5 Western-Blotting (Wet-Transfer der Proteine)

### 2.5.1 Theoretische Grundlagen

Das Prinzip des Blotting beruht auf dem Transfer von grossen Molekülen auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran. Dabei sind die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle für grossmolekulare Liganden, wie in diesen Versuchen für Antikörper, frei zugänglich. Vor dem spezifischen Nachweis von Proteinen, hier Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1, mit Antikörpern, müssen die unspezifischen Bindungsstellen mit geeigneten Substanzen blockiert werden. Es wurde hier die Methode des elektrophoretischen Tankblottings angewendet.

### 2.5.2 Versuchsdurchführung

#### 2.5.2.1 Vorbereitung der Gele und Zusammenbau der Blotstapel

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurden das Sammelgel und die nicht benutzten seitlichen Laufstrecken vorsichtig abgeschnitten und verworfen. Das Gel wurde vermessen und für 15 – 30 Minuten im auf 4°C vorgekühlten Blottingpuffer gewässert. Währenddessen wurden 2 Whatman-Papiere und die Nitrocellulosemembran (NC-Membran) etwas über Gelgrösse zurechtgeschnitten und die NC-Membran in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  getränkt. Beim Aufbau des Blotstapels ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingelagert werden und die NC-Membran nur einmal gezielt auf dem Gel plaziert wird und beim Zusammenklappen der Blotstapelhalterung nicht verrutscht.

#### 2.5.2.2 Durchführung des Transfervorganges

Der Blotstapel wurde in den Blottingtank eingehängt und dieser bis zum Rand mit vorgekühltem Blottingpuffer gefüllt. Der Blottingvorgang erfolgte bei 4°C unter Rühren mit einer konstanten Spannung von 15 V (entspricht 80 mA) bei einem Blotstapel und 19 V (entspricht 80 mA) bei zwei Blotstapeln. Die Dauer des Transfervorganges betrug ca. 14 Stunden. Die lange Blottingzeit wurde gewählt, damit auch hochmolekulare Proteine, wie hier die Hexokinase-1 mit einem Molekulargewicht von 100 kD, quantitativ an die Nitrocellulosemembran wandern können.

#### 2.5.2.3 Beenden des Transfervorganges

Nach dem Transfer wurde der Blotstapel aus dem Tank genommen, die Nitrocellulosemembran vom Gel abgezogen und die Spur mit dem Rainbow-Molekulargewichtsmarker zum Teil abgeschnitten, so dass eine Hälfte der Markerspuren bei den Hauptspuren verbleibt. Die Nitrocellulosemembran wurde unter Schütteln 5 Minuten lang in TBS gewaschen und dann für 20 Sekunden in 100 ml Ponceau-S-Färbelösung (1:10 verdünnte Stammlösung) angefärbt. Die gefärbte Nitrocellulosemembran wurde in TBS vorsichtig gewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Dokumentation wurde die Membran fotokopiert. Dieses Vorgehen ermöglicht es bereits vor der Beschichtung mit den Antikörpern, Transferdefekte auf der

Nitrocellulosemembran sichtbar zu machen. Danach wurde die Nitrocellulosemembran in TBS unter mehrmaligem Wechseln völlig entfärbt. Der abgeschnittene Rainbow-Marker wurde auf die Kopie der Proteinbanden geklebt und bei Lokalisation von Blotting-Defekten die jeweils optimale Nitrocellulosemembran für den entsprechenden spezifischen Proteinnachweis (Glukosetransporter-1 oder Hexokinase-1) ausgesucht.

#### 2.5.2.4 Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Primärantikörper

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran mit Blockingpuffer für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C abgesättigt. Dies erfolgt durch enthaltene makromolekulare Substanzen (hier Magermilchpulver), die nicht an der Nachweisreaktion teilnehmen. Damit wird ein stärkeres Hintergrundsignal verhindert. Die Primärantikörperlösung wird 1:800 mit Blockingpuffer und den jeweiligen Antikörpern hergestellt. Die Nitrocellulosemembran wird in eine Folie eingeschweisst. Die Primärantikörperlösung wird an einer abgeschnittenen Ecke eingespritzt, vorhandene Luftbläschen werden ausgestrichen und die Folie wieder dicht verschweisst. Unter Schütteln wird die Nitrocellulosemembran zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 2.5.2.5 Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Sekundärantikörper

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Antikörperlösung wiedergewonnen und bei 4°C bis zur nächsten Verwendung gelagert. Die Nitrocellulosemembran wurde achtmal für fünf Minuten in TBS gewaschen und wiederum für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad geblockt. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweisst und weiter wie unter Punkt 2.5.2.4 verfahren. Die gegen die Glukosetransporter-1-Antikörper gerichtete Sekundärantikörperlösung, besteht aus 25 µl <sup>125</sup>J-Donkey anti-Rabbit IgG, 2 ml Humanserum und 18 ml TBS (Antikörperverdünnung 1:800). Die gegen die Hexokinase-1-Antikörper gerichtete Sekundärantikörperlösung besteht aus 25 µl <sup>125</sup>J-Goat anti-Mouse IgG, 2 ml Humanserum und 18 ml TBS (Antikörperverdünnung 1:800). Die Nitrocellulosemembran wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert.

#### 2.5.2.6 Einlegen der Nitrocellulosemembran in die Phosphorscreenkassette

Nach der Inkubation mit dem radioaktiven Sekundärantikörper wurde die Antikörperlösung verworfen und die Nitrocellulosemembran acht mal fünf Minuten lang unter Schütteln in TBS gewaschen. Danach wird die Nitrocellulosemembran getrocknet und in die Belichtungskassette des PhosphorImagers geklebt. Der Belichtungsscreen wird mit dem ImageEreaser gelöscht und dann auf die Nitrocellulosemembran in die Belichtungskassette eingelegt. Je nach Alter des radioaktiven Sekundärantikörpers erfolgt eine Exposition des Belichtungsscreens für 3 bis 8 Tage.

## 2.6 Auswertung der Westernblots und Analyse der Messdaten

### 2.6.1 Theoretische Grundlagen und Funktionsprinzip des Phosphorscreen und des PhosphorImager 445 Si

Der Belichtungsschirm enthält Speicherphosphorkristalle, die Energie einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und für eine bestimmte Zeit speichern. Nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge wird die gespeicherte Energie wieder abgegeben. Durch die Exposition des Phosphorscreens mit der  $\gamma$ -Strahlung des  $^{125}\text{J}$ -markierten Sekundärantikörpers wird äquivalent zur Lokalisation der markierten Proteinbanden Energie auf dem Screen gespeichert. Nach dem Einlegen des exponierten Phosphorscreens in den PhosphorImager tastet ein Helium-Neon Laserstrahl, der rotes Licht mit der Wellenlänge  $\lambda=633$  nm aussendet, die Speicherfläche des Screens ab. Dabei sendet die Belichtungsschicht an den abgetasteten Stellen, an denen äquivalent markierte Proteinbanden waren, blaues Licht aus. Dieses Licht wird in einem Photomultiplier detektiert und in elektrische Spannung umgewandelt und gemessen. Die Spannung schwankt mit der Intensität des eintreffenden Lichts. Es besteht also eine proportionale Abhängigkeit der gemessenen Spannung von der Radioaktivität am abgetasteten Probenort. Das Analogsignal der gemessenen Spannung wird digitalisiert und kann am Computer weiter verarbeitet werden. Dabei wird zuerst eine Darstellung des Blots errechnet, die den Orten des gebundenen  $^{125}\text{J}$ -markierten Antikörpers entspricht und somit ein Abbild des Blots mit den radioaktiv markierten Proteinbanden ergibt.

### 2.6.2 Durchführung der Messungen

Zum Abtasten des Belichtungsschirms wird in der Steuersoftware des PhosphorImagers die durch den Blot exponierte Fläche festgelegt und der Scanvorgang gestartet. Nach Abschluss der Messung zeigt sich auf dem Computermonitor ein Abbild des Blots. Durch Variieren der Anzeigeparameter kann die Darstellung des Blots so optimiert werden, dass möglichst wenig Hintergrund dargestellt wird, dafür aber die Proteinbanden exakt abgrenzbar erscheinen. Die digitale Gesamtinformation bleibt von den Bildeinstellungen unbeeinflusst. Im Bereich von ca. 46 kD bzw. 100 kD treten die Proteinbanden für Glukosetransporter-1 bzw. Hexokinase-1 (Thorens, 1990, S. 279; Bramwell, 1990, S. 100; Postic, 1994, S. 555; Smith, 1991, S. 168) auf und konnten mit der ImageQuANT-Software durch eine genaue Umrahmung mit einem rechteckigen Areal, quantifiziert werden. Eine exakte Lokalisation der spezifischen Banden war durch den mitgeführten Molekulargewichtsmarker möglich. Für alle Blots wurde das gleiche Hintergrundkorrekturverfahren eingesetzt. Die Grösse des Auswertungsareals war bei allen Proteinproben eines Blots fast identisch. Zwischen den verschiedenen Blots ergaben sich natürlich Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Laufzeiten bei der Elektrophorese. Nach der Auswertung der markierten Areale wurden die Ergebnisse, die aufgrund des äquimolaren Bindungsverhältnisses der Antikörper der Menge an Glukosetransporter-1 bzw. Hexokinase-1 entsprechen, in Microsoft Excel exportiert.

---

## **2.7 Auswertung und statistische Analyse der Messdaten am Computer**

Die in Microsoft Excel exportierten Messwerte für Glukosetransporter-1 bzw. Hexokinase-1 mussten auf eine vergleichbare Basis umgerechnet werden. Dies war erforderlich, da alle Blots zum einen mit Antikörpern verschiedenen Alters inkubiert wurden und die Expositionszeiten und damit auch die gesamte Radioaktivität pro exponiertem Belichtungsscreen verschieden waren. Ermöglicht wurde die Umrechnung auf eine vergleichbare Basis durch eine Referenzprobe, die in allen Blots vorhanden war. Als Bezugsblot wurde der mit der höchsten gemessenen Zählrate für die Referenzprobe verwendet. Alle normierten Messwerte für Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 wurden zusammen mit allen anderen relevanten Daten in einem Datenblatt zusammengefasst. Die weitere statistische Auswertung des Datenbestandes erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 10 für Windows.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorversuche

#### 3.1.1 Ergebnisse der Proteinbestimmung

Es wurden 12 Proben von Mammatumoren unbekannter Histologie, zur Optimierung der Verfahrensschritte wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, aufgearbeitet. Die Proteinbestimmung erfolgte gemäss Punkt 2.3. Die Vorversuchsgewebeproben hatten zum Teil – anders als die eigentlichen Gewebeproben des Hauptversuches – einen hohen Fettanteil. Dieser konnte makroskopisch problemlos von der Tumormasse abgetrennt werden. Bei den einzelnen Zentrifugationsschritten reicherte sich aber stets in der 600g-Fraktion eine aufschwimmende Fettfraktion an, die vor der Abnahme des Überstandes vollständig entfernt wurde, um eine Verunreinigung der folgenden 200000g-Fraktionen zu vermeiden. Die Tabelle 10 charakterisiert die Tumoranteile und die 200000g-Tumorfraktionen der Vorversuchsgewebeproben. In Tabelle 11 werden die Fettanteile und die 200000g-Fettfraktionen der Vorversuchsgewebeproben charakterisiert.

*Tabelle 10: Gesamtgewebemenge, Menge des Tumoranteils, Resuspendierungsvolumina der 200000g-Tumorpellets, Proteinbestimmungsergebnisse der nach Anreicherung erhaltenen Proteinsuspensionen der Gewebeproben und Gesamtausbeute an Protein in der 200000g-Tumorfraktion (die gemessene Proteinkonzentration der 200000g-Tumorfraktion bezieht sich auf die nach der Anreicherung vorliegenden Proteinsuspensionen)*

| CA ID | Gesamtgewebe [g] | Menge Tumoranteil [g] | Resuspendierungsvolumina der 200000g-Tumorpellets [ml] | Proteinkonzentrationen der Suspensionen der 200000g-Tumorfraktion [mg/ml] | Proteinausbeuten der 200000g-Tumorfraktion [mg] |
|-------|------------------|-----------------------|--|---|---|
| 1     | 0,400            | 0,255                 | 0,300  | 1,74  | 0,522   |
| 2     | 0,236            | 0,122                 | 0,300  | 1,74  | 0,522   |
| 3     | 0,440            | 0,335                 | 0,200  | 5,14  | 1,028   |
| 4     | 0,627            | 0,302                 | 0,100  | 1,71  | 0,171   |
| 5     | 0,809            | 0,276                 | 0,200  | 6,74  | 1,348   |
| 6     | 1,580            | 0,810                 | 0,500  | 7,00  | 3,500   |
| 7     | 1,500            | 1,120                 | 1,100  | 8,61  | 9,471   |
| 8     | 0,621            | 0,621                 | 0,500  | 9,07  | 4,535   |
| 9     | 0,402            | 0,402                 | 0,200  | 6,70  | 1,340   |
| 10    | 0,336            | 0,336                 | 0,300  | 10,13   | 3,039   |
| 11    | 0,316            | 0,230                 | 0,500  | 6,58  | 3,290   |
| 12    | 0,243            | 0,243                 | 0,500  | 7,09  | 3,545   |

Tabelle 11: Gesamtgewebemenge, Menge des Fettanteils, Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fettpellets, Proteinbestimmungsergebnisse der nach Anreicherung erhaltenen Proteinsuspensionen der Gewebeproben und Gesamtausbeute an Protein in der 200000g-Fettfraktion (die gemessene Proteinkonzentration der 200000g-Fettfraktion bezieht sich auf die nach der Anreicherung vorliegenden Proteinsuspensionen)

| CA ID | Gesamtgewebe [g] | Menge Fettanteil [g] | Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fettpellets [ml] | Proteinkonzentrationen der Suspensionen der 200000g-Fettfraktion [mg/ml] | Proteinausbeuten der 200000g-Fettfraktion [mg] |
|-------|------------------|----------------------|---|--|--|
| 1     | 0,400            | 0,145                | 0,400   | 1,640  | 0,656  |
| 2     | 0,236            | 0,114                | 0,200   | 0,820  | 0,164  |
| 3     | 0,440            | 0,105                | 0,200   | 1,680  | 0,336  |
| 4     | 0,627            | 0,325                | 0,200   | 2,000  | 0,400  |
| 5     | 0,809            | 0,533                | 0,200   | 3,710  | 0,742  |
| 6     | 1,580            | 0,770                | 0,400   | 5,440  | 2,176  |
| 7     | 1,500            | 0,380                | 0,500   | 9,460  | 4,730  |
| 8     | 0,621            | 0,000                | 0,000   | 0,000  | 0,000  |
| 9     | 0,402            | 0,000                | 0,000   | 0,000  | 0,000  |
| 10    | 0,336            | 0,000                | 0,000   | 0,000  | 0,000  |
| 11    | 0,316            | 0,086                | 0,200   | 1,450  | 0,290  |
| 12    | 0,243            | 0,000                | 0,000   | 0,000  | 0,000  |

Bei den Vorversuchsgewebeproben Nummer 8-10 und 12 liegt kein verwertbarer Fettanteil vor.

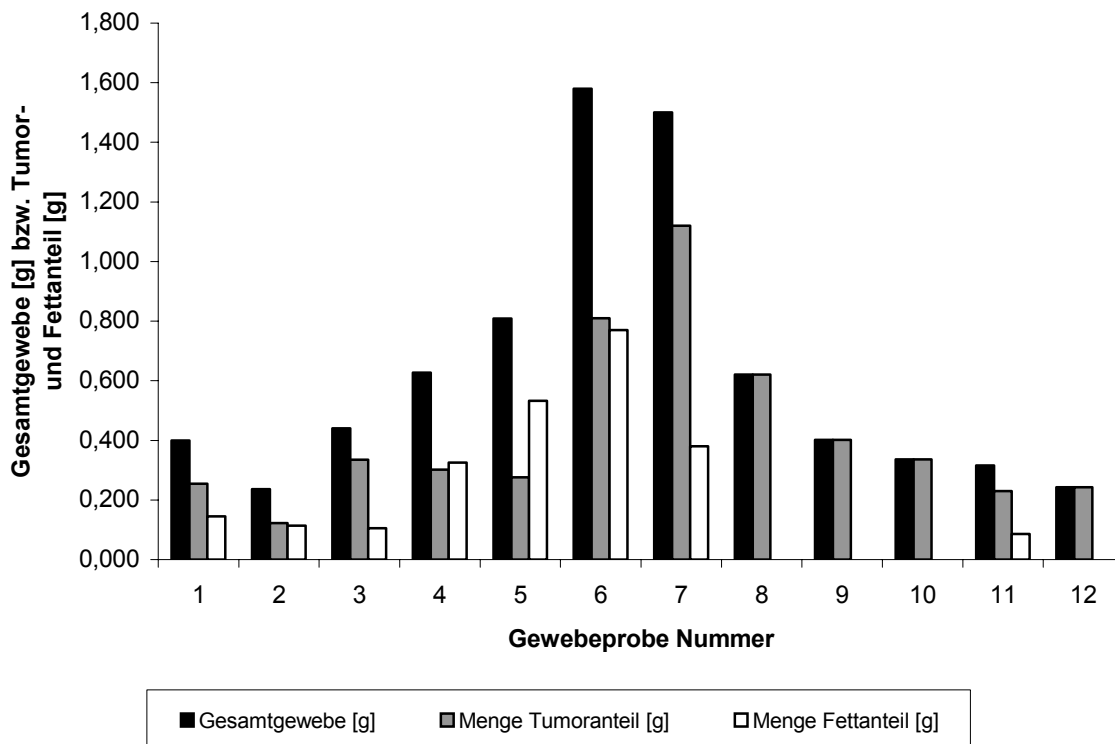


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Proteingesamtmengen [g] und die jeweiligen Anteile von Fettfraktion [g] und Tumorfraktion [g] bei den Gewebeproben der Vorversuche

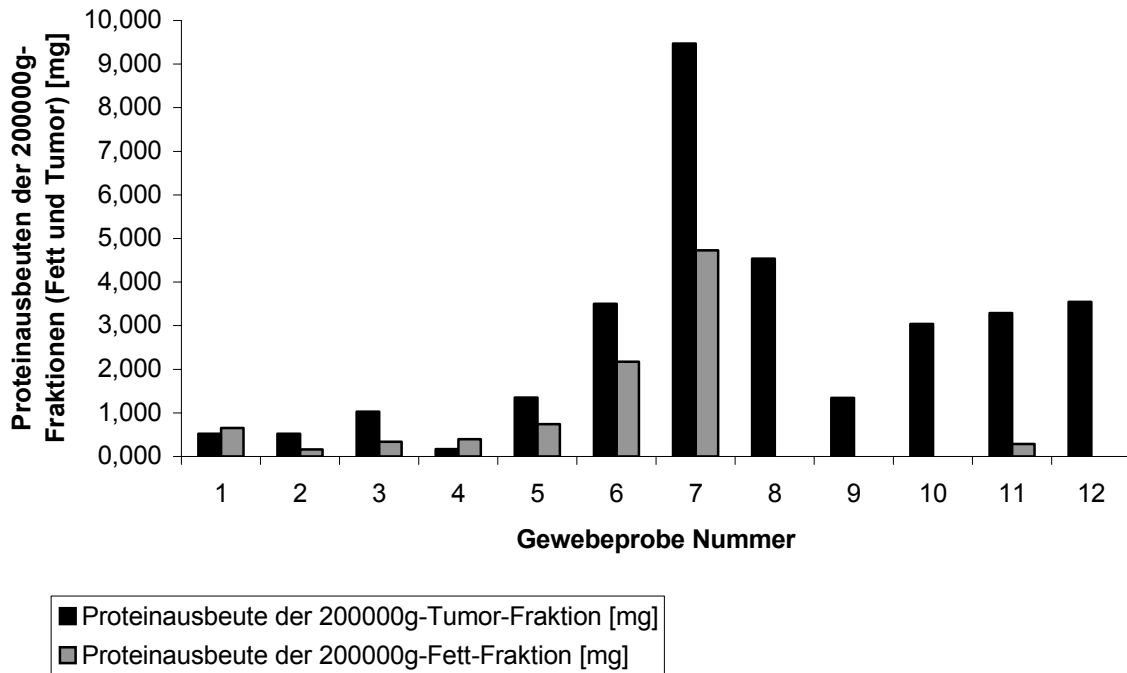


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Proteinausbeute [mg] bei den 200000g-Tumorfractionen

Bei den Anreicherungsschritten gemäss Punkt 2.2 wurden die Resuspensionsvolumina der 600g-Fractionen im Gegensatz zu den 200000g-Fractionen nicht protokolliert. Beim nachfolgenden Nachweis der zu untersuchenden Glukosetransporter zeigte sich in den 600g-Fettfraktionen kaum eine spezifische Anreicherung dieser Transportproteine. In den 200000g-Fractionen waren die gesuchten Proteine zu erwarten, da es sich ja um Membranproteine handelt. Bei den 200000g-Fractionen wird in Zusammenschau mit Abbildung 10 der Einfluss der verbesserten Präparationstechnik auf die erhöhten Anreicherungswerte der Proteine deutlich. Dies gilt besonders in Anbetracht der kleiner werdenden Ausgangsgewebemengen des Tumoranteils, nachfolgend Ausgangsgewebe genannt (siehe Abbildung 9).

Tabelle 12: Charakterisierung des Untersuchungsmaterials und der Proteinausbeuten der 200000g-Fractionen

|  | N  | MW ± SD       | RANGE         |
|--|----|---------------|---------------|
| Gesamtgewebe [g]                               | 12 | 0,626 ± 0,459 | 0,236 – 1,580 |
| Tumoranteil [g]                                | 12 | 0,421 ± 0,288 | 0,122 – 1,120 |
| Fettanteil [g]                                 | 12 | 0,205 ± 0,248 | 0,000 – 0,770 |
| Proteinausbeute der 200000g-Tumorfraction [mg] | 12 | 2,693 ± 2,583 | 0,171 – 9,471 |
| Proteinausbeute der 200000g-Fettfraktion [mg]  | 12 | 0,791 ± 1,380 | 0,000 – 4,730 |



Tabelle 13: Korrelation der Proteinausbeuten der 200000g-Fractionen mit den Mengen an verarbeitetem Ausgangsgewebe mit durchgeführter Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|  |                          | Ausgangs-<br>menge [g] | Tumor-<br>anteil [g] | Fettanteil<br>[g] | Proteinausbeute<br>200000g-Tumor-<br>fraktion [mg] |
|--|--------------------------|------------------------|----------------------|-------------------|--|
| Tumoranteil [g]                                    | Korrelation nach Pearson | 0,879**                |                      |                   |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,002                  |                      |                   |  |
|  | N                        | 12                     |                      |                   |  |
| Fettanteil [g]                                     | Korrelation nach Pearson | 0,831**                | 0,465                |                   |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,01                   | 0,128                |                   |  |
|  | N                        | 12                     | 12                   |                   |  |
| Proteinausbeute<br>200000g-Tumor-<br>fraktion [mg] | Korrelation nach Pearson | 0,596                  | 0,830**              | 0,139             |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,41                   | 0,01                 | 0,668             |  |
|  | N                        | 12                     | 12                   | 12                |  |
| Proteinausbeute<br>200000g-Fett-<br>fraktion [mg]  | Korrelation nach Pearson | 0,858**                | 0,857**              | 0,592             | 0,756*   |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,004                  | 0,004                | 0,43              | 0,04   |
|  | N                        | 12                     | 12                   | 12                | 12   |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Nach Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für die Ausgangsmengen an Protein und für die Proteinausbeuten, zeigte sich, dass mit hoher Ausgangsgewebemenge lediglich hohe Proteinausbeuten für die 200000g-Fettfraktion erzielt wurden. Ein statistischer Zusammenhang zwischen den Ausgangsgewebemengen und der Proteinausbeute der Tumorfraktion besteht nicht. Der statistische Vergleich der in Tumoranteil und Fettanteil separierten Ausgangsgewebe ergibt statistische Zusammenhänge zwischen hohem Tumoranteil und hoher Proteinausbeute der Tumorfraktion. Bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p=0,01$  ergibt sich für die Korrelation von Tumoranteil [g] mit der Proteinausbeute der 200000g-Tumorfraktion [mg] ein Korrelationskoeffizient von  $r=0,830$ , was eine hohe positive Korrelation bedeutet. Dies bedeutet, dass viel Gewebe zu hoher Proteinausbeute führt. Allerdings fällt in Zusammenschau obiger Ergebnisse (Tabelle 13) mit den Abbildungen 9 und 10 auf, dass auch bei geringen Tumorausgangsmengen hohe Proteinanreicherungen möglich waren. Der statistische Vergleich der Ausbeuten der 200000g-Fettfraktionen mit der gesamten Ausgangsmenge ergibt im Gegensatz zur Tumorfraktion einen statistischen Zusammenhang mit  $r=0,858$  bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p=0,01$  (siehe Tabelle 13). Auch zwischen Tumoranteil und Proteinausbeute der Fettfraktion besteht mit  $r=0,857$  und einem zweiseitigen Signifikanzniveau mit  $p=0,01$  ein signifikanter statistischer Zusammenhang. Zu Beginn der Vorversuche wurde deshalb auch eine separate elektrophoretische Auftrennung einer Fettfraktion erwogen und durchgeführt. Wie im weiteren noch gezeigt werden wird, ist aber der Anteil an Glukosetransportern, die mit dieser Präparationsmethode aus dem Fettgewebe freigesetzt werden können, im Vergleich zu den Tumorfraktionen der 600g- bzw. 200000g-Fractionen so gering, dass eine exakte Messung, wie oben unter Punkt 2.4 und 2.5 beschrieben, unmöglich ist. Es hat sich zudem gezeigt, dass die späteren Tumorproben des Hauptversuches makroskopisch völlig frei von Fettgewebe waren und somit eine Unterscheidung in Tumoranteil und Fettanteil nicht nötig war.

### **3.1.2 Western-Blotting Ergebnisse**

Zweck dieses Versuchsteils war die Optimierung der aufzutragenden Proteinmenge pro Probe und der Darstellung der Proteinbanden von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 durch geeignete Antikörper. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinsuspensionen und der Nachweis der Glukosetransporter erfolgten wie unter den Punkten 2.4, 2.5 und 2.6 beschrieben. Da bei diesen Vorversuchen immer nur eine Tumorpräparation/Blot und keine Standardproteinprobe ausgewertet wurden, war eine Quantifizierung der Glukosetransporter zwischen den einzelnen Tumorproben nicht möglich. Aufgrund der Bandenqualität und deren Intensität konnte innerhalb eines Blots auf die Ausbeuten geschlossen werden. Bei den Blots der Hauptversuche wurde in jedem Blot eine Standardproteinprobe aufgetragen und gemessen, so dass ein Vergleich zwischen den einzelnen Blots möglich war.

#### **3.1.2.1 Nachweis von Glukosetransporter-1**

Mit den beiden Tumorproben Nummer 1 und 2 wurden keine befriedigenden Blotergebnisse erreicht. Ab der dritten Tumorprobe war die Methode so weit optimiert, dass auswertbare Ergebnisse vorlagen, die spezifisch Glukosetransporter-1 zeigten. Laut Literaturangaben zum Glukosetransporter-1-Antikörper ist zwischen 42 kD und 46 kD eine markierte Bande zu erwarten (siehe Abbildung 12).

### 3.1.2.1.1 Darstellung eines kompletten Blotbildes des Glukose-transporter-1-Nachweises

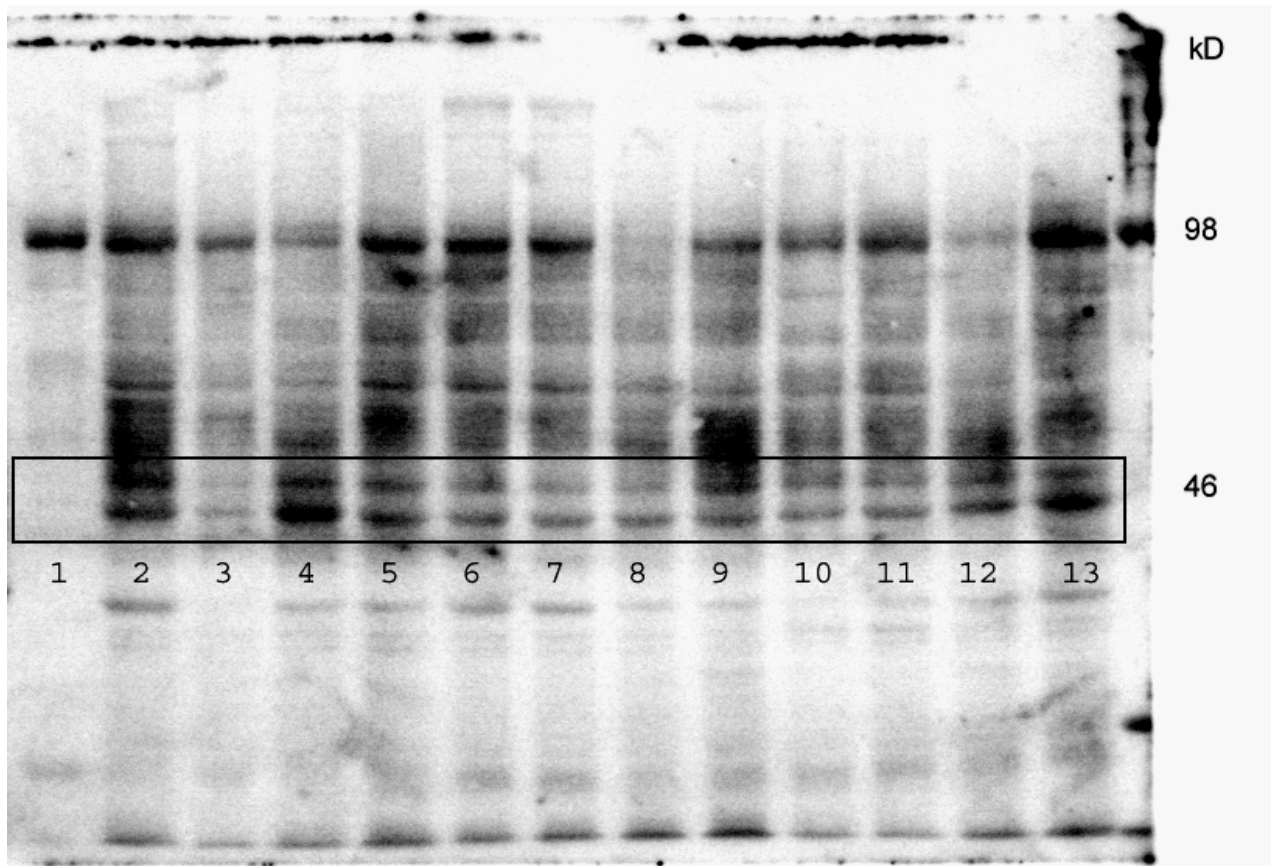


Abbildung 12: Beispiel eines gesamten Blotbildes nach dem Nachweis von Glukose-transporter-1. Die Doppelbanden mit einem Molekulargewicht um 46 kD stellen Glukose-transporter-1 dar. Die Nummern 1-13 kennzeichnen verschiedene Vorversuchsproteinproben. Rechts aussen befindet sich die Markierungen des Proteinmarkers.

### 3.1.2.1.2 Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 3 und 4

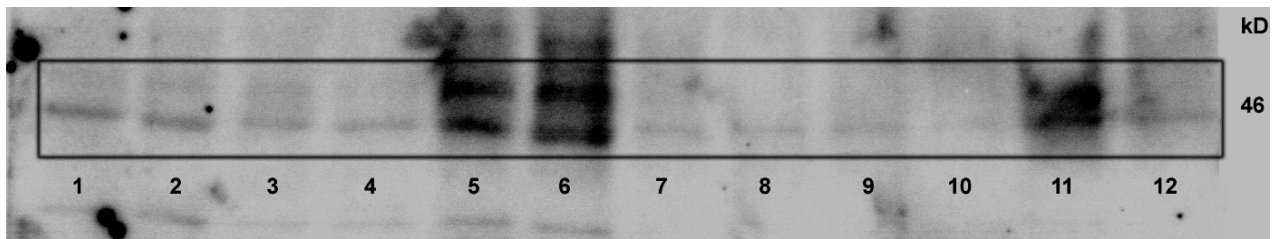


Abbildung 13: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 3 und 4. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen

1. Probe 3, Rohhomogenat, Fettanteil, 50 µg Protein
2. Probe 3, Rohhomogenat, Tumoranteil, 50 µg Protein
3. Probe 3, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50 µg Protein
4. Probe 3, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
5. Probe 3, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
6. Probe 4, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
7. Probe 4, Rohhomogenat, Fettanteil, 50 µg Protein
8. Probe 4, Rohhomogenat, Tumoranteil, 50 µg Protein
9. Probe 4, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50 µg Protein
10. Probe 4, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
11. Probe 4, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50 µg Protein, defekte Spur
12. Probe 4, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein, defekte Spur

In den Abbildungen 13 und 14 ist deutlich zu erkennen, dass die Banden der 200000g-Fractionen der Tumoranteile die höchsten Intensitäten zeigen, hier also jeweils der höchste Gehalt an Glukosetransporter-1 vorliegt. Bei den 600g-Fractionen sind kaum eindeutige Banden im Bereich von 40 - 46 kD zu identifizieren. Bei den Laufspuren der Rohhomogenate ist eine gering stärkere Intensität der Banden im Bereich von 42 - 46 kD als bei den 600g-Fractionen ersichtlich. Dies zeigte erstmalig, dass das gewählte Anreicherungsverfahren für Membranproteine geeignet ist, Glukosetransporter-1 in der 200000g-Fraktion so anzureichern, dass dessen Proteinbande mittels Westernblot überhaupt dargestellt werden konnte. Des Weiteren ist gut ersichtlich, dass der verwendete Primärantikörper, obwohl es sich hier um einen „rabbit anti-glucose transporter“ Antikörper handelt, eine ausreichend hohe Affinität zum Glukosetransporter-1 des Humangewebes zeigt. Daneben sind auf der gesamten Laufstrecke des Blots auch Banden durch unspezifische Bindung des Antikörpers zu sehen. Die beiden Banden im Bereich von 42 - 46 kD zeigen jedoch die stärkste Intensität, so dass hier anhand der Lage der Proteinmarkerbande und der in der Literatur angegebenen Molekülmasse von einer spezifischen Bindung ausgegangen werden kann (Produktdatenblatt East Acres Biologicals; Brown, 1993, S. 2980). Dieses Bandenmuster im Bereich von 42 - 46 kD tritt bei allen in dieser Untersuchung erstellten Blots auf.

### 3.1.2.1.3 Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5 und 6

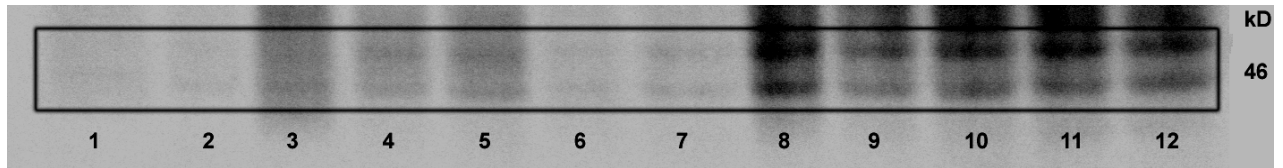


Abbildung 14: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5 und 6. Bei den Spuren (8) und (10-12) wurden 75  $\mu$ g Protein aufgetragen, sonst jeweils 50  $\mu$ g

1. Probe 5, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
2. Probe 5, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
3. Probe 5, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
4. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
5. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
6. Probe 6, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
7. Probe 6, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
8. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
9. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
10. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
11. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
12. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein

### 3.1.2.1.4 Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5, 6 und 7

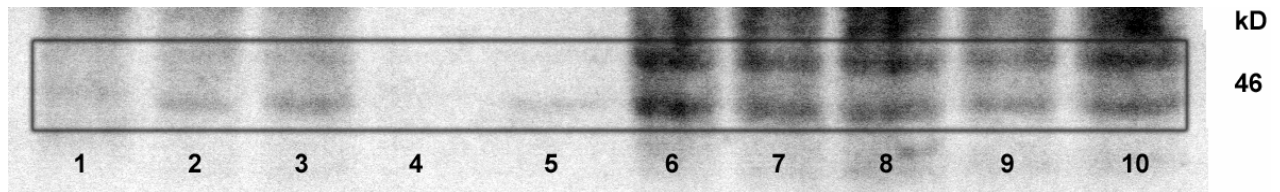


Abbildung 15: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5, 6 und 7

1. Probe 5, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
2. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
3. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
4. Probe 6, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
5. Probe 6, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
6. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
7. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
8. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
9. Probe 7, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
10. Probe 7, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein

In Abbildung 15 zeigen die Banden der 200000g-Fractionen der Tumoranteile die höchsten Intensitäten. Wie man ausserdem sehen kann, ist die Auftragung von 50  $\mu$ g Protein ausreichend, um ein gutes Bandensignal zu erhalten. Eine Auftragung von höheren Proteinmengen hatte den Nachteil, dass auch mehr Volumen in die Geltaschen geladen werden muss, wodurch die Laufspur oftmals breiter und unschärfer wird.

### 3.1.2.1.5 Darstellung des Westernblots der mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12

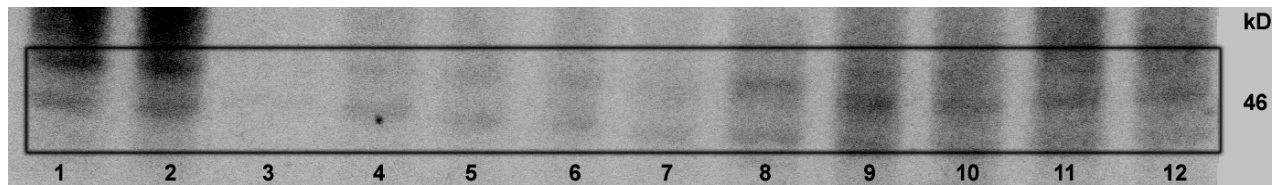


Abbildung 16: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12

1. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
2. Probe 7, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
3. Probe 11, Rohhomogenat, Fettanteil, 50 µg Protein
4. Probe 11, Rohhomogenat, Tumoranteil, 50 µg Protein
5. Probe 12, Rohhomogenat, Tumoranteil, 50 µg Protein
6. Probe 11, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
7. Probe 12, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
8. Probe 8, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
9. Probe 9, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
10. Probe 10, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
11. Probe 11, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein
12. Probe 12, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50 µg Protein

Der Vergleich der Blotabbildung 16 mit den Abbildungen 13 bis 15 zeigt, dass nicht nur die steigende Ausbeute bei der Proteinanreicherung für die Qualität der Banden entscheidend ist, sondern auch das Alter des Primär- und Sekundärantikörpers. Beide Antikörper waren bei Anfertigung des obigen Blots in Abbildung 16 bereits 4 Wochen alt, so dass die Qualität im Vergleich zu den vorigen Blots deutlich abnahm. Dies sieht man eindrucksvoll im direkten Vergleich der Spuren 6 – 10 aus Abbildung 15 mit den entsprechenden Banden des obigen Blots in Abbildung 16. Für die Hauptversuche wurde deshalb bei zunehmendem Alter des Primär- und Sekundärantikörpers die Belichtungszeit im Phosphorscreen bis auf eine Woche verlängert um eine klare und scharfe Bandendarstellung zu erreichen. Ausserdem wurden Primär- und Sekundärantikörper während der Durchführung der Hauptversuche lediglich bis zu drei Wochen verwendet.

Des Weiteren fällt in Abbildung 16 ein leicht kurvenförmiger Verlauf der Lauffront auf, wodurch die Glukosetransporter-1-Banden der Spuren 5 – 12 ein geringeres Molekulargewicht zu haben scheinen als die Proben der Spuren 1 – 4. Dies ist jedoch nicht der Fall, da diese Bandenverschiebung auch bei allen übrigen Banden dieses Blots auftritt. Ursächlich dafür war vermutlich eine Störung in der Zusammensetzung des Gels oder ein nicht gerade polymerisierter Trenngelbeginn.

### 3.1.2.2 Nachweis von Hexokinase-1

Ebenso wie unter Punkt 3.1.2.1 beschrieben, wurden bei den Vorversuchstumorproben Nummer 1 bis 4 keine auswertbaren Blotergebnisse erzielt. Eine exakte Abgrenzung von Banden war bei hohem Hintergrundrauschen nicht möglich. Gerade beim Nachweis von Hexokinase-1 waren die spezifischen Bandensignale deutlich schwächer als beim Nachweis von Glukosetransporter-1. Der Grund dafür ist vermutlich der „mouse anti-type 1 hexokinase“ Antikörper. Obwohl auch der Primärantikörper zum Glukosetransporter-1-Nachweis nicht primär gegen Humangewebe sondern gegen Rattengewebe gerichtet ist, scheint seine Kompatibilität mit humanem GluT-1-Protein dennoch grösser zu sein als im Falle des Hexokinase-1-Antikörpers, der gegen Mäuse-/Ratten-/Rindergewebe gerichtet ist. Laut den Literaturangaben (Produktdatenblatt Chemicon International Inc.; Preller, 1992, S. 484) zum Hexokinase-1-Antikörper ist bei 100 kD eine markierte Bande zu erwarten.

#### 3.1.2.2.1 Darstellung des Westernblots der mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Vorversuchstumorproben Nummer 5 und 6

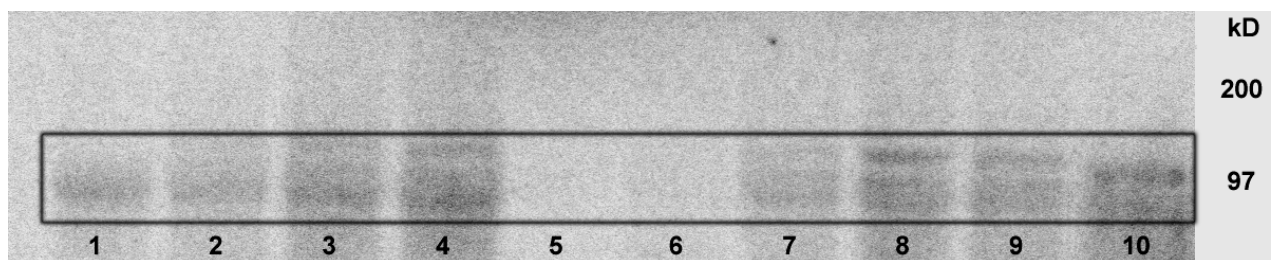


Abbildung 17: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5 und 6

1. Probe 5, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
2. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
3. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
4. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 100  $\mu$ g Protein
5. Probe 6, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
6. Probe 6, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
7. Probe 6, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
8. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
9. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
10. Probe 8, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 100  $\mu$ g Protein



### 3.1.2.2.2 Darstellung des Westernblots der mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Tumorproben Nummer 5, 6 und 7

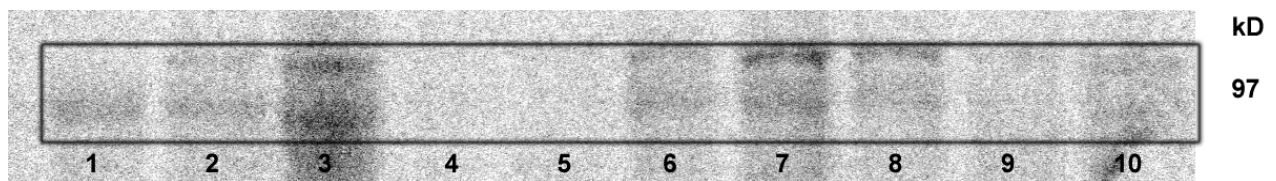


Abbildung 18: Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5,6 und 7

1. Probe 5, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
2. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
3. Probe 5, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
4. Probe 6, 600g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
5. Probe 6, 600g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
6. Probe 6, 200000g-Fraktion, Fettanteil, 50  $\mu$ g Protein
7. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
8. Probe 6, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein
9. Probe 7, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 50  $\mu$ g Protein
10. Probe 7, 200000g-Fraktion, Tumoranteil, 75  $\mu$ g Protein

Wie aus den Abbildungen Nummer 17 und 18 ersichtlich ist, scheint die Bindung des Antikörpers zum Hexokinase-1-Protein relativ schwach. Ursächlich dafür ist höchstwahrscheinlich die Aminosäuresequenz der Bindungsregion des verwendeten Hexokinase-1-Antikörpers welcher primär gegen Maus, Ratte, Rind gerichtet ist, aber in Ermangelung einer Alternative jedoch weiterverwendet werden musste. Aufgrund der schlechten Bindungsfähigkeit konnten nur bei den Proben Nummer 5 bis 7 differenzierbare Banden dargestellt werden. Bei den Hauptversuchen war die Bindung jedoch deutlich besser, so dass eine quantitative Auswertung der Hexokinase-1-Banden im Bereich von 100 kD eindeutig möglich war.

### **3.2 Zusammenfassung der Vorversuche**

Mit den Vorversuchen wurde eine methodische Optimierung erreicht, die sich in einer Zunahme der spezifischen Blotting-Signale äusserte (vgl. Abbildungen 13 bis 15). Es konnte gezeigt werden, dass das Proteinanreicherungsverfahren und der gewählte Antikörper geeignet sind, um das Protein Glukosetransporter-1 nachzuweisen. Der zum Nachweis von Hexokinase-1 verwendete Antikörper brachte im Rahmen der Vorversuche ausreichende Ergebnisse. In Ermangelung einer Alternative wurde mit ihm in den Hauptversuchen weitergearbeitet.

Um einen Vergleich aller Tumorproben untereinander zu ermöglichen, ist bei den Hauptversuchen eine auf allen Blots enthaltene Standardproteinprobe notwendig. Dadurch können alle Proteinproben quantitativ miteinander in Beziehung gesetzt werden, denn das Alter der Antikörper und die Expositionszeiten sind bei jedem Blot unterschiedlich.

---

### **3.3 Bestimmung von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in Mammatumoren eines ausgewählten Patientenguts**

#### **3.3.1 Ergebnisse der Proteinbestimmung**

Es wurden 29 Proben von Mammatumoren gemäss Punkt 2.2.3 aufgearbeitet. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Punkt 2.3. Alle Gewebe waren frei von makroskopisch sichtbarem Fettanteil, was die Membranpräparationsschritte im Vergleich zu den Vorversuchen erleichterte. Es wurden ausserdem die Rohhomogenate der Proteinproben mituntersucht um die Anreicherung von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 darzustellen.

Die folgenden Tabellen 14 bis 16 und die Abbildungen 19 und 20 charakterisieren das Gewebematerial und die Proteinfractionen der Hauptversuche.

Tabelle 14: Ausgangsgewebemengen der Tumorproben [g], gemessene Proteinkonzentrationen der Rohhomogenate [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der Rohhomogenate [ml], Gesamtproteinmengen der Rohhomogenate [mg]

| CA ID | Gewebe [g] | Proteinkonzentrationen der Rohhomogenate [mg/ml] | Resuspendierungsvolumina der Rohhomogenate [ml] | Gesamtproteinmengen der Rohhomogenate [mg] |
|-------|------------|--|---|--|
| 1     | 0,212      | 3,847  | 4,0   | 15,388                                     |
| 2     | 0,078      | 3,313  | 3,0   | 13,250                                     |
| 3     | 0,077      | 2,986  | 3,0   | 11,942                                     |
| 4     | 0,180      | 0,535  | 4,0   | 2,138                                      |
| 5     | 0,307      | 2,067  | 4,0   | 8,266                                      |
| 6     | 0,183      | 4,133  | 3,0   | 16,532                                     |
| 7     | 0,381      | 4,016  | 5,0   | 16,064                                     |
| 8     | 0,326      | 2,686  | 4,0   | 10,742                                     |
| 9     | 0,445      | 3,423  | 6,0   | 13,690                                     |
| 10    | 0,351      | 5,853  | 3,0   | 23,413                                     |
| 11    | 0,219      | 4,249  | 3,0   | 16,994                                     |
| 12    | 1,030      | 6,766  | 6,0   | 27,065                                     |
| 13    | 0,425      | 6,372  | 3,0   | 25,488                                     |
| 14    | 0,562      | 7,821  | 3,0   | 31,282                                     |
| 15    | 0,597      | 9,411  | 4,0   | 37,642                                     |
| 16    | 0,508      | 8,648  | 4,0   | 34,590                                     |
| 17    | 0,875      | 13,761   | 4,0   | 55,044                                     |
| 18    | 0,397      | 5,215  | 4,0   | 20,858                                     |
| 19    | 0,411      | 15,239   | 2,0   | 60,956                                     |
| 20    | 0,217      | 4,480  | 2,0   | 17,920                                     |
| 21    | 0,277      | 4,256  | 3,0   | 17,024                                     |
| 22    | 0,249      | 9,161  | 2,0   | 36,642                                     |
| 23    | 0,154      | 5,916  | 2,0   | 23,662                                     |
| 24    | 0,139      | 4,324  | 2,0   | 17,294                                     |
| 25    | 0,316      | 1,651  | 3,0   | 6,602                                      |
| 26    | 0,271      | 7,820  | 3,0   | 31,280                                     |
| 27    | 0,479      | 11,088   | 3,0   | 44,350                                     |
| 28    | 0,237      | 5,390  | 3,0   | 21,560                                     |
| 29    | 0,331      | 9,820  | 3,0   | 39,280                                     |

Tabelle 15: Proteinkonzentrationen der 600g-Proteinsuspensionen [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der 600g-Fraktion [ml], Proteinausbeuten der 600g-Fraktion [mg], prozentualer Anteil der 600g-Proteinfraktion an der Rohhomogenat-Proteinausgangsmenge [%]

| CA ID | Proteinkonzentrationen der 600g-Fraktion [mg/ml] | Resuspendierungsvolumina der 600g-Fraktion [ml] | Proteinausbeuten der 600g-Fraktion [mg] | Prozentanteil der 600g-Fraktion von den Rohhomogenat-ausgangsmengen [%] |
|-------|--|---|---|---|
| 1     | 5,531  | 0,500   | 2,765                                   | 17,97   |
| 2     | 4,785  | 0,500   | 2,392                                   | 24,07   |
| 3     | 2,576  | 0,500   | 1,288                                   | 14,38   |
| 4     | 0,439  | 0,500   | 0,220                                   | 10,27   |
| 5     | 2,990  | 0,500   | 1,495                                   | 18,09   |
| 6     | 5,435  | 0,500   | 2,718                                   | 21,92   |
| 7     | 5,549  | 0,500   | 2,774                                   | 13,82   |
| 8     | 3,694  | 0,500   | 1,847                                   | 17,19   |
| 9     | 5,059  | 0,500   | 2,530                                   | 12,32   |
| 10    | 4,533  | 1,000   | 4,533                                   | 25,81   |
| 11    | 3,692  | 1,000   | 3,692                                   | 28,96   |
| 12    | 6,318  | 1,000   | 6,318                                   | 15,56   |
| 13    | 6,130  | 1,000   | 6,130                                   | 32,07   |
| 14    | 5,529  | 1,500   | 8,293                                   | 35,35   |
| 15    | 8,309  | 1,000   | 8,309                                   | 22,07   |
| 16    | 6,336  | 1,000   | 6,336                                   | 18,32   |
| 17    | 10,722   | 1,000   | 10,722                                  | 19,48   |
| 18    | 3,764  | 2,000   | 7,528                                   | 36,09   |
| 19    | 6,655  | 1,000   | 6,655                                   | 21,83   |
| 20    | 2,609  | 1,000   | 2,609                                   | 29,12   |
| 21    | 3,543  | 1,000   | 3,543                                   | 27,75   |
| 22    | 3,850  | 1,000   | 3,850                                   | 21,01   |
| 23    | 3,357  | 0,500   | 1,678                                   | 14,19   |
| 24    | 3,219  | 0,500   | 1,610                                   | 18,61   |
| 25    | 1,245  | 0,500   | 0,623                                   | 12,57   |
| 26    | 6,240  | 0,500   | 3,120                                   | 13,30   |
| 27    | 8,216  | 0,500   | 4,108                                   | 12,35   |
| 28    | 4,639  | 0,500   | 2,320                                   | 14,34   |
| 29    | 0,108  | 0,500   | 0,054                                   | 0,18  |

Tabelle 16: Proteinkonzentrationen der 200000g-Proteinsuspensionen [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fraktion [ml], Proteinausbeuten der 200000g-Fraktion [mg], prozentualer Anteil der 200000g-Proteinfraktion an der Rohhomogenat-Proteinausgangsmenge [%]

| CA ID | Proteinkonzentrationen der 200000g-Fraktion [mg/ml] | Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fraktion [ml] | Proteinausbeuten der 200000g-Fraktion [mg] | Prozentanteil der 200000g-Fraktion von den Rohhomogenatausgangsmengen [%] |
|-------|---|--|--|---|
| 1     | 4,065   | 0,300  | 1,219                                      | 7,92  |
| 2     | 4,532   | 0,200  | 0,906                                      | 9,12  |
| 3     | 3,999   | 0,300  | 1,200                                      | 13,39   |
| 4     | 1,013   | 0,200  | 0,203                                      | 9,48  |
| 5     | 2,013   | 0,400  | 0,805                                      | 9,74  |
| 6     | 4,463   | 0,200  | 0,893                                      | 7,20  |
| 7     | 3,766   | 0,300  | 1,130                                      | 5,63  |
| 8     | 2,929   | 0,400  | 1,172                                      | 10,91   |
| 9     | 3,298   | 0,300  | 0,989                                      | 4,82  |
| 10    | 5,417   | 0,300  | 1,625                                      | 9,26  |
| 11    | 5,430   | 0,300  | 1,629                                      | 12,78   |
| 12    | 9,340   | 0,800  | 7,472                                      | 18,40   |
| 13    | 6,117   | 0,300  | 1,835                                      | 9,60  |
| 14    | 6,766   | 0,300  | 2,030                                      | 8,65  |
| 15    | 13,474  | 0,400  | 5,390                                      | 14,32   |
| 16    | 10,022  | 0,500  | 5,011                                      | 14,49   |
| 17    | 20,301  | 0,600  | 12,180                                     | 22,13   |
| 18    | 3,760   | 0,300  | 1,128                                      | 5,41  |
| 19    | 13,702  | 0,500  | 6,851                                      | 22,48   |
| 20    | 2,403   | 0,300  | 0,721                                      | 8,05  |
| 21    | 3,228   | 0,200  | 0,646                                      | 5,06  |
| 22    | 6,164   | 0,600  | 3,698                                      | 20,19   |
| 23    | 7,328   | 0,200  | 1,466                                      | 12,39   |
| 24    | 4,587   | 0,200  | 0,917                                      | 10,61   |
| 25    | 1,339   | 0,200  | 0,268                                      | 5,41  |
| 26    | 7,261   | 0,300  | 2,178                                      | 9,29  |
| 27    | 8,917   | 0,800  | 7,134                                      | 21,45   |
| 28    | 1,363   | 0,200  | 0,273                                      | 1,69  |
| 29    | 9,962   | 0,500  | 4,981                                      | 16,91   |

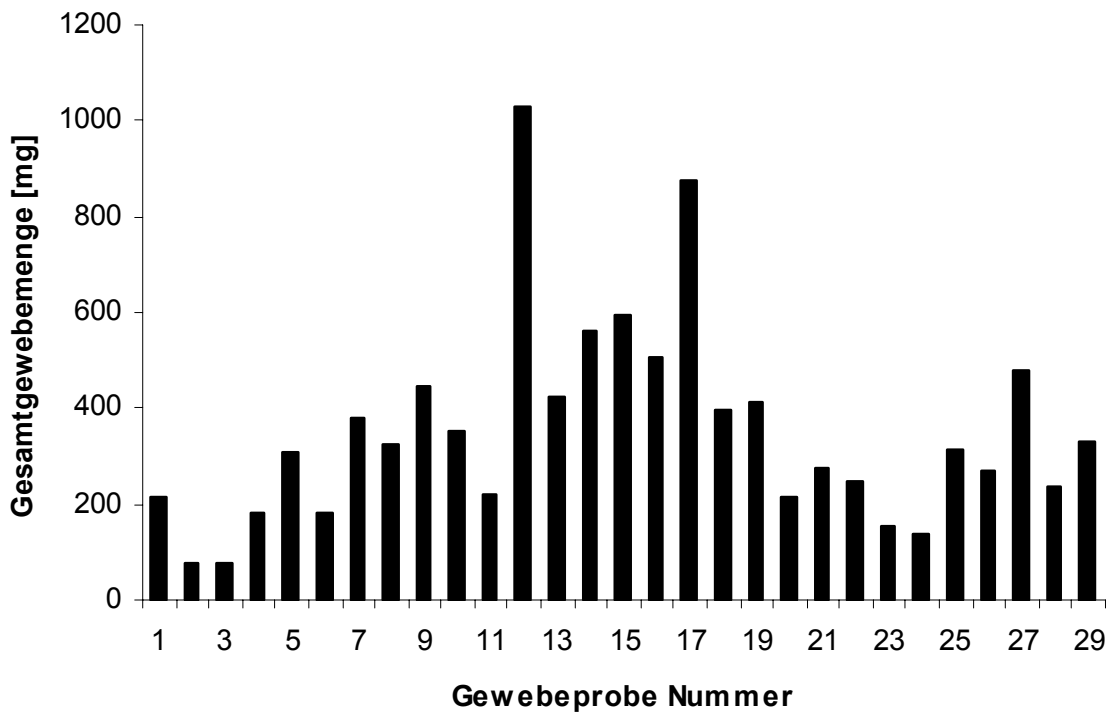


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Gewebeprobenausgangsmengen der Hauptversuche [mg]

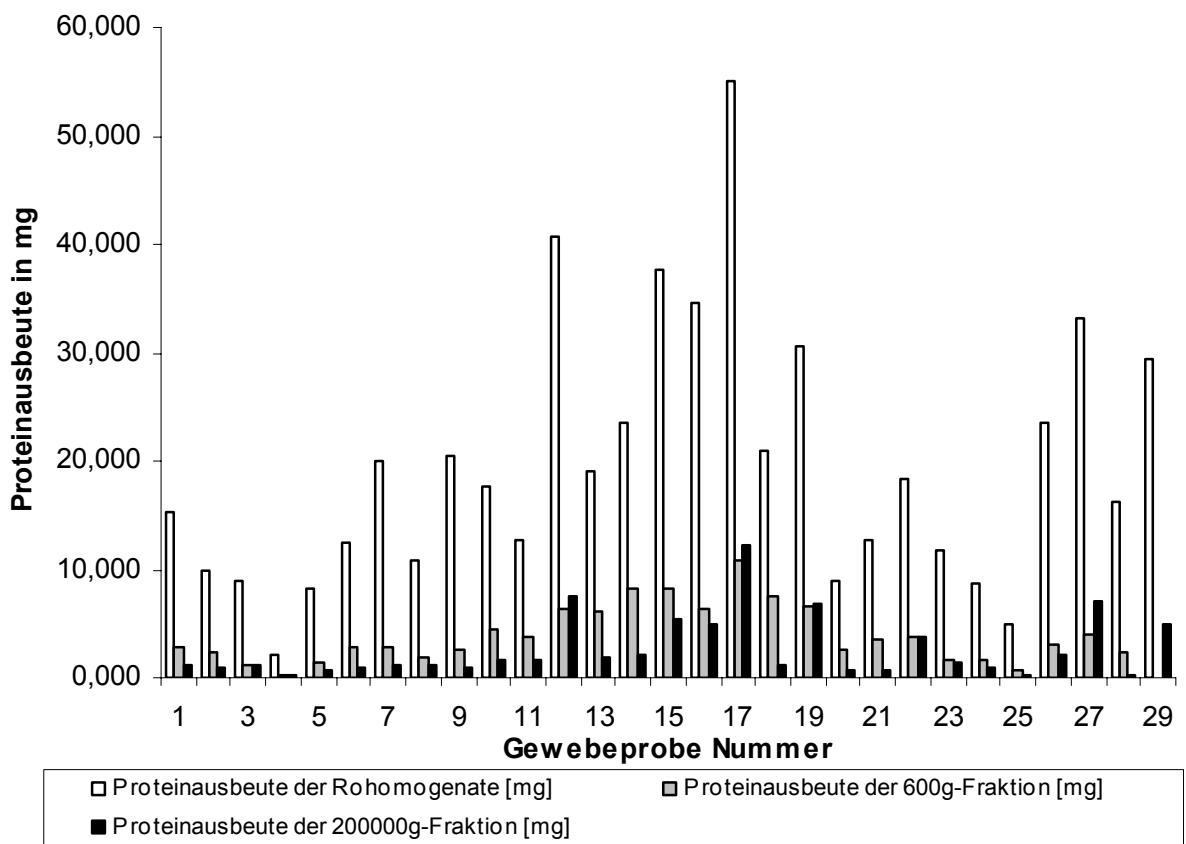


Abbildung 20: Darstellung der Proteinausbeuten der Rohhomogenate, und der 600g- und 200000g-Anreicherungsfraktionen.

Aus Abbildung 20 sind die Proteinausbeuten in den verschiedenen Präparationsfraktionen des Untersuchungsmaterials ersichtlich. In Zusammenschau mit der Abbildung 19 wird deutlich, dass die Proteinausbeuten in der 600g-Fraktion und der 200000g-Fraktion von den Ausgangsgewebemengen abhängig sind (siehe auch Tabelle 18). In der folgenden Tabelle 17 wird die grosse Schwankungsbreite der Proteinausbeuten in allen drei gemessenen Fraktionen ersichtlich, wobei eine Steigerung der Anreicherung von den Rohhomogenaten hin zu den 200000g-Fraktionen erkennbar ist.

Tabelle 17: Charakterisierung des Untersuchungsmaterials und der Proteinbestimmungsergebnisse

|   | N  | MW ± SD         | RANGE            |
|---|----|-----------------|------------------|
| Ausgangsgewebe [mg]                       | 29 | 352,90 ± 214,43 | 77,00 – 1030,00  |
| Proteinausbeute der Rohhomogenate [mg]    | 29 | 19,599 ± 12,086 | 2,138 – 55,044   |
| Proteinausbeute der 600g-Fraktion [mg]    | 29 | 3,795 ± 2,686   | 0,0540 – 10,7220 |
| Proteinausbeute der 200000g-Fraktion [mg] | 29 | 2,619 ± 2,850   | 0,2026 – 12,1803 |

Tabelle 18: Korrelation der Proteinausbeuten mit der Menge an verarbeitetem Ausgangsgewebe mit durchgeführter Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|                                       |                          | Ausgangsgewebe [g] | Proteinausbeute Rohhomogenate [mg] | Proteinausbeute 600g-Fraktion [mg] |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Proteinausbeute Rohhomogenate [mg]    | Korrelation nach Pearson | 0,844**            |                                    |                                    |
|                                       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,00000005         |                                    |                                    |
|                                       | N                        | 29                 |                                    |                                    |
| Proteinausbeute 600g-Fraktion [mg]    | Korrelation nach Pearson | 0,734**            | 0,766**                            |                                    |
|                                       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,00003526         | 0,00000752                         |                                    |
|                                       | N                        | 29                 | 29                                 |                                    |
| Proteinausbeute 200000g-Fraktion [mg] | Korrelation nach Pearson | 0,757**            | 0,919**                            | 0,652**                            |
|                                       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,00001181         | 0,00000000001                      | 0,00076932                         |
|                                       | N                        | 29                 | 29                                 | 29                                 |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Die Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten zwischen der Ausgangsmenge an Protein bzw. der Proteinausbeute der Rohhomogenate und den Ausbeuten der einzelnen Proteinfractionen zeigt, dass hohe Mengen an Ausgangsgewebe und hohe Ausbeuten der Rohhomogenate zu hohen Proteinausbeuten in den 600g- und 200000g-Fractionen führen. Alle gebildeten Korrelationskoeffizienten zwischen der Ausgangsgewebemenge und den einzelnen Fractionen der Proteinausbeuten zeigen eine positive Korrelation dieser Werte untereinander auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  an.



### **3.3.2 Ergebnisse des Proteinnachweises mittels Western-Blotting**

Die elektrophoretische Auftrennung der Einzelproben und der Nachweis der Glukosetransporter erfolgten wie unter den Punkten 2.4, 2.5 und 2.6 beschrieben. Bei der Beladung der Gele mit den Proteinfraktionen der zu untersuchenden Tumore wurden zwei Proteinproben (Probe Nummer 19 bei den für den Hexokinase-1-Nachweis vorgesehenen Blots und Probe Nummer 27 bei den für den Glukosetransporter-1-Nachweis vorgesehenen Blots) als Standardproben in jedem Gel mitgeladen. Dadurch sind Berechnungen und Vergleiche zwischen den einzelnen Blots möglich. Es wurden nur Blots, mit einwandfreiem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran ausgewertet.

#### **3.3.2.1 Nachweis von Glukosetransporter-1**

Die Qualität der Glukosetransporter-1-Banden auf den Blots mit Proben des Hauptuntersuchungsmaterials ist nach den Vorversuchen deutlich optimiert. Dies hängt vor allem mit der Homogenität und Anreicherung der aufgetragenen Proteinsuspensionen zusammen (Abbildungen 13-16 im Vergleich mit Abbildungen 21-23). Dennoch konnten Defekte bei den Transfervorgängen nicht völlig ausgeschlossen werden. Im Folgenden werden repräsentative Immunoblots der Tumorproben dargestellt. Es wird lediglich die Region um 46 kD mit dem typischen Doppelbandenmuster des Glukosetransporter-1 dargestellt (Produktdatenblatt East Acres Biologicals, Brown, 1993, S. 2980). Wegen unzureichender Proteinmenge konnte bei Probe Nummer 25 kein Glukosetransporter-1-Gehalt bestimmt werden. Es liegt daher für diese Probe nur ein Hexokinase-1-Wert vor.

## 3.3.2.1.1 Repräsentativer Glukosetransporter-1-Westernblot

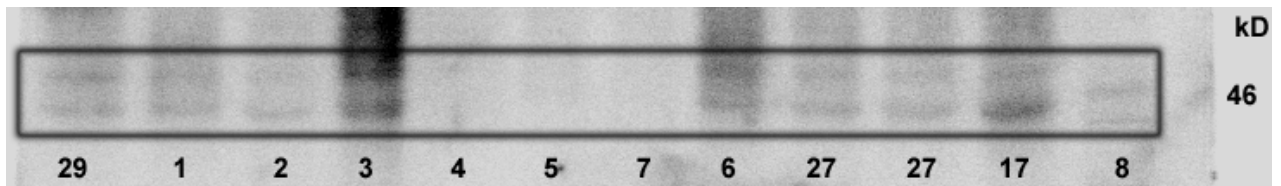


Abbildung 21: Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 26.05.97 auf Höhe um 46 kD (Proben 1 bis 8 und 17, 27, 29)

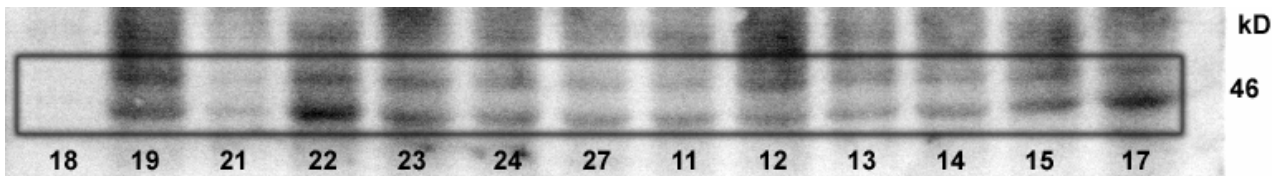


Abbildung 22: Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 27.05.97 auf Höhe um 46 kD (Proben 11 bis 27 ohne 16, 20, 25, 26)

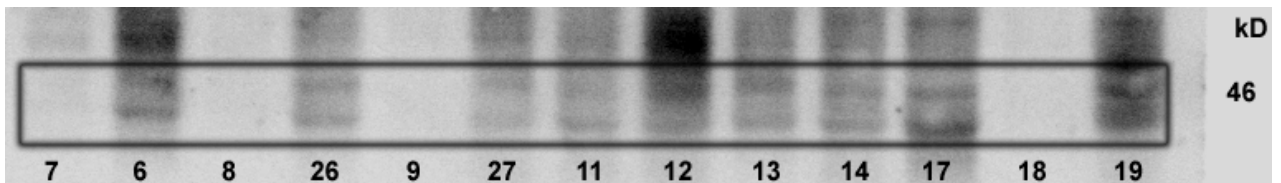


Abbildung 23: Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 21.05.97 auf Höhe um 46 kD (aufgetragen sind die Proben 6 bis 19 und 27 ohne 10, 15, 16)

### 3.3.2.1.2 Messwerte der Glukosetransporter-1-Banden nach Auswertung mit dem Phosphorlimer

Tabelle 19: Messwerte von Glukosetransporter-1 und Charakterisierung der Messwerte (n.v. = nicht vorhanden)

| Probe | Messwert Glukosetransporter-1 [counts/area] | Anzahl Proben (n)            | Mittelwert Glukosetransporter-1 [counts/area] | Standardabweichung         |
|-------|---|------------------------------|---|----------------------------|
| 1     | 347706                                      | 28                           | 344773,71                                     | 296171,63                  |
| 2     | 175830                                      |                              |   |                            |
| 3     | 997430                                      | <b>Minimum [counts/area]</b> | <b>Maximum [counts/area]</b>                  | <b>Range [counts/area]</b> |
| 4     | 56734                                       |                              |   |                            |
| 5     | 47634                                       | 8757                         | 997430  | 988673                     |
| 6     | 605751                                      |                              |   |                            |
| 7     | 71307                                       |                              |   |                            |
| 8     | 33321                                       |                              |   |                            |
| 9     | 21046                                       |                              |   |                            |
| 10    | 146557                                      |                              |   |                            |
| 11    | 291044                                      |                              |   |                            |
| 12    | 710263                                      |                              |   |                            |
| 13    | 384204                                      |                              |   |                            |
| 14    | 393612                                      |                              |   |                            |
| 15    | 654833                                      |                              |   |                            |
| 16    | 114627                                      |                              |   |                            |
| 17    | 821985                                      |                              |   |                            |
| 18    | 11071                                       |                              |   |                            |
| 19    | 918162                                      |                              |   |                            |
| 20    | 8757  |                              |   |                            |
| 21    | 157163                                      |                              |   |                            |
| 22    | 438974                                      |                              |   |                            |
| 23    | 639382                                      |                              |   |                            |
| 24    | 548704                                      |                              |   |                            |
| 25    | n.v.  |                              |   |                            |
| 26    | 399453                                      |                              |   |                            |
| 27    | 295976                                      |                              |   |                            |
| 28    | 12375                                       |                              |   |                            |
| 29    | 349763                                      |                              |   |                            |

### Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] in Prozent des maximalen Messwertes

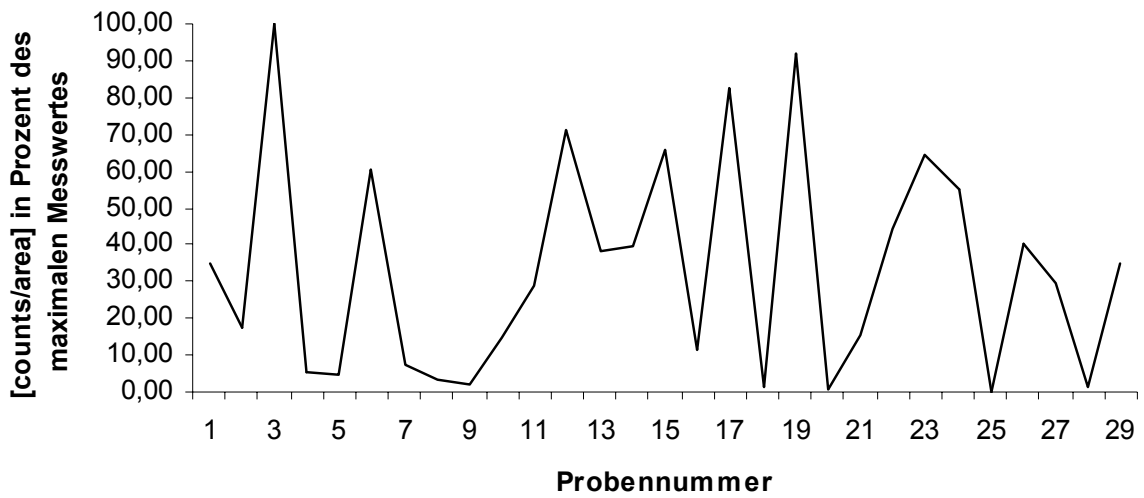


Abbildung 24: Graphische Darstellung des Glukosetransporter-1-Messwertes der einzelnen Proben [counts/area] in Prozent des maximalen Glukosetransporter-1-Messwertes

### Vergleich der GluT-1-Messwerte von Tumorproben die mehrfach geblottet wurden

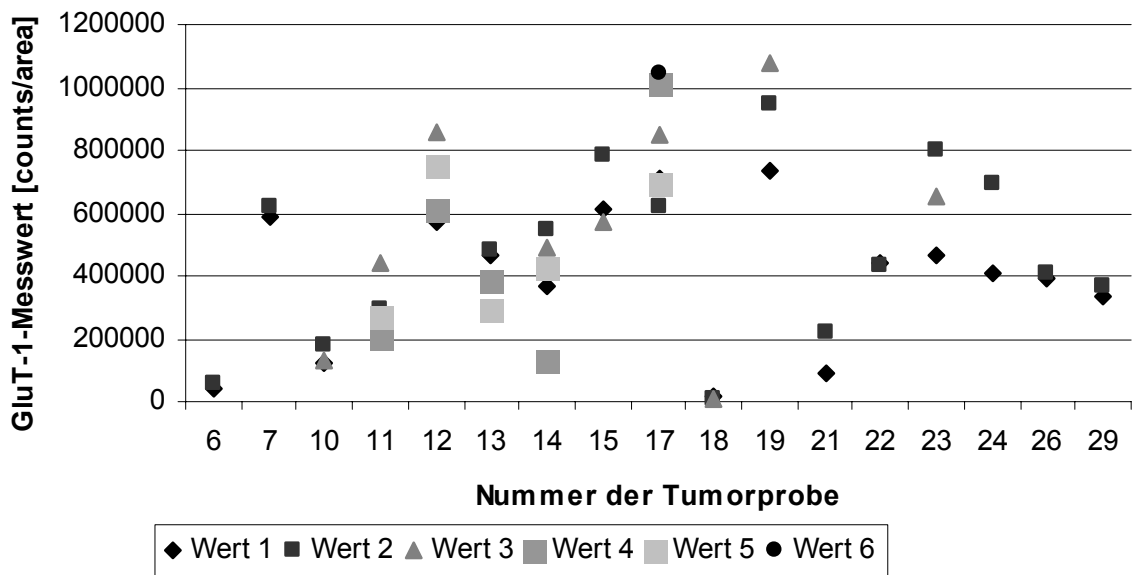


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Glukosetransporter-1-Messwerte (GluT-1) aller Gewebeproben die mehrfach geblottet worden sind (mindestens 2 und maximal 6 unterschiedliche Werte sind bei diesen Proben vorhanden). Aufgrund der vorhandenen Probenmengen konnten nur bei diesen Tumorproben Mehrfachmessungen durchgeführt werden.

Aus Abbildung 25 wird die Messgenauigkeit von Glukosetransporter-1-Parallelmessungen einzelner Gewebeproben in verschiedenen Blots deutlich. Zur Auswertung wurden bei mehrfach vorhandenen Glukosetransporter-1-Messwerten Mittelwerte berechnet.

### 3.3.2.2 Nachweis von Hexokinase-1

Die Auftrennung und Blotqualität der spezifischen Hexokinase-Proteinbanden sind nach Optimierung der Methodik deutlich besser als die der Vorversuchsblots. Es wurden alle aufgetragenen Proben für die Berechnungen verwendet. Repräsentativ wird aus der Menge der Hauptversuchsblots eine Auswahl an Blots abgedruckt.

#### 3.3.2.2.1 Repräsentative Hexokinase-1-Westernblot-Ergebnisse

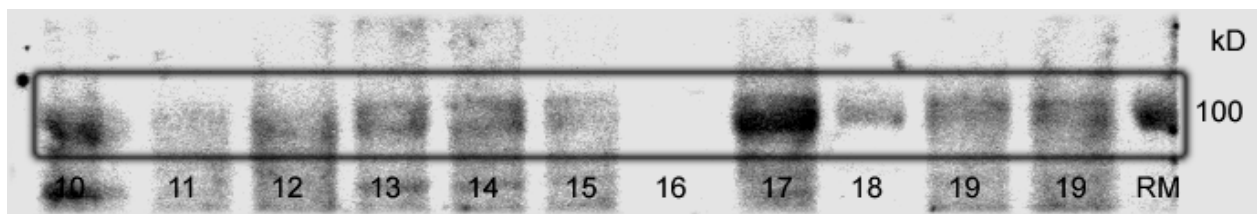


Abbildung 26: Ausschnitt des mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Blot vom 13.05.97 in Höhe von 100 kD (Proben 10 bis 19; RM=Regenbogenmarker).

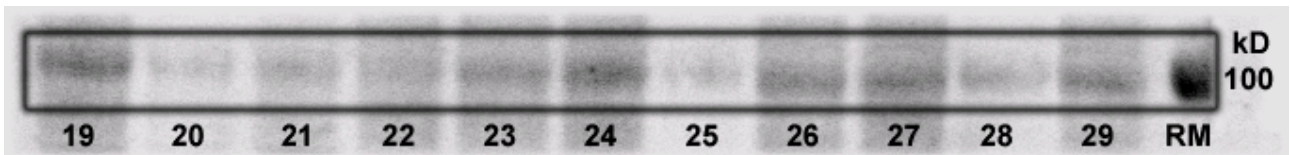


Abbildung 27: Ausschnitt des mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Blot vom 21.04.97 in Höhe von ca. 100 kD (Proben 19 bis 29; RM=Regenbogenmarker).

In den Abbildungen 26 und 27 werden die typischen Banden in Höhe von 100 kD dargestellt. Im Gegensatz zum Glukosetransporter-1-Nachweis liegen keine Doppelbanden vor. Die Bindungsfähigkeit des Hexokinase-1-Antikörpers, der primär gegen Rattengewebe gerichtet ist, an humane Hexokinase-1 ist relativ schlecht (Produktdatenblatt Chemicon International Inc., Preller, 1992, S. 485).

### 3.3.2.2.2 Messwerte der Hexokinase-1-Banden nach Auswertung mit dem Phosphorlmager

Tabelle 20: *Hexokinase-1-Messwerte und Charakterisierung der Messwerte*

| Probe | Messwert Hexokinase-1 [counts/area] | Anzahl Proben (n)            | Mittelwert Hexokinase-1 [counts/area] | Standardabweichung         |
|-------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 1     | 144213                              | 29                           | 109537,24                             | 70387,09                   |
| 2     | 116483                              |                              |                                       |                            |
| 3     | 30696                               | <b>Minimum [counts/area]</b> | <b>Maximum [counts/area]</b>          | <b>Range [counts/area]</b> |
| 4     | 30444                               |                              |                                       |                            |
| 5     | 127328                              | 3195                         | 345574                                | 342379                     |
| 6     | 99963                               |                              |                                       |                            |
| 7     | 345574                              |                              |                                       |                            |
| 8     | 213320                              |                              |                                       |                            |
| 9     | 66292                               |                              |                                       |                            |
| 10    | 151901                              |                              |                                       |                            |
| 11    | 47486                               |                              |                                       |                            |
| 12    | 66179                               |                              |                                       |                            |
| 13    | 127621                              |                              |                                       |                            |
| 14    | 79692                               |                              |                                       |                            |
| 15    | 70712                               |                              |                                       |                            |
| 16    | 3195                                |                              |                                       |                            |
| 17    | 196940                              |                              |                                       |                            |
| 18    | 167431                              |                              |                                       |                            |
| 19    | 156934                              |                              |                                       |                            |
| 20    | 34864                               |                              |                                       |                            |
| 21    | 78937                               |                              |                                       |                            |
| 22    | 92265                               |                              |                                       |                            |
| 23    | 91924                               |                              |                                       |                            |
| 24    | 174954                              |                              |                                       |                            |
| 25    | 38418                               |                              |                                       |                            |
| 26    | 117951                              |                              |                                       |                            |
| 27    | 132316                              |                              |                                       |                            |
| 28    | 45591                               |                              |                                       |                            |
| 29    | 126956                              |                              |                                       |                            |

### Hexokinasesmesswerte [counts/area] in Prozent des maximalen Messwertes

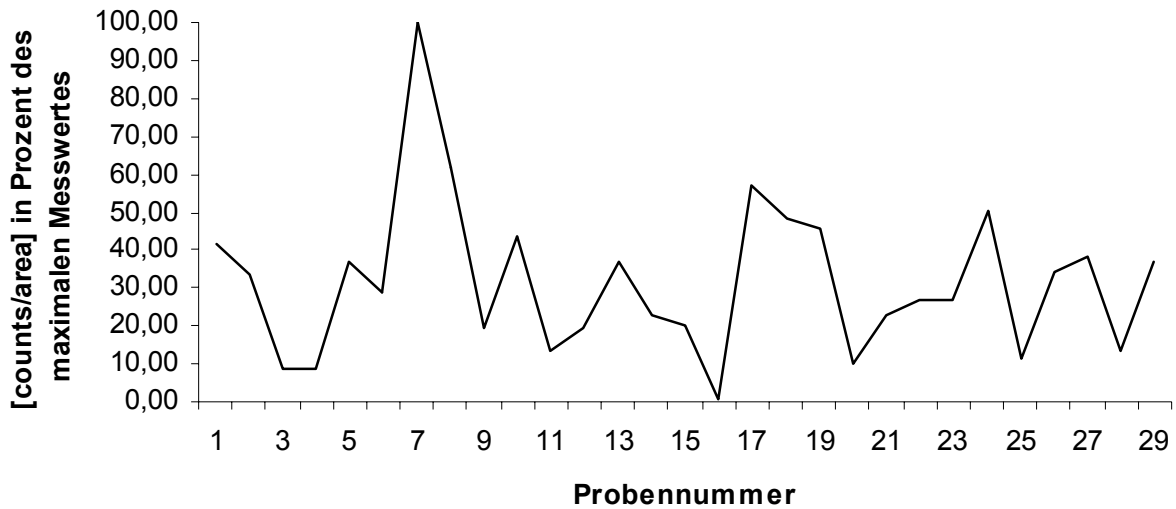


Abbildung 28: Graphische Darstellung des Hexokinase-1-Messwertes der einzelnen Proben [counts/area] in Prozent des maximalen Hexokinase-1-Messwertes

### Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte von Tumorproben die mehrfach geblottet wurden

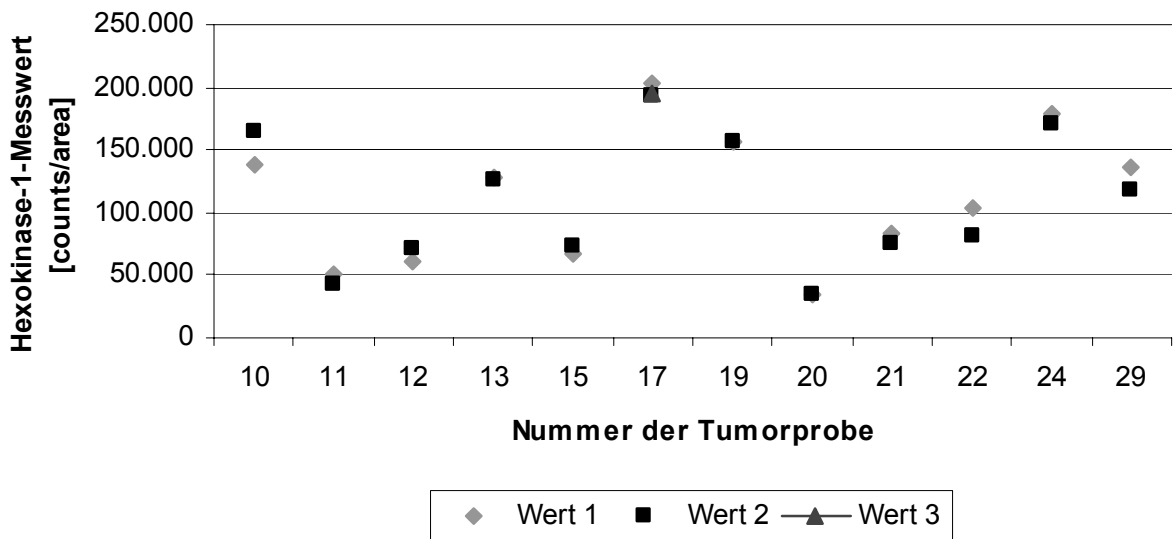


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Hexokinase-1-Messwerte aller Gewebeproben die mehrfach geblottet worden sind (mindestens 2 und maximal 3 unterschiedliche Werte sind bei diesen Proben vorhanden, die Tumorproben 1-9 wurden aufgrund der vorliegenden Probenmengen jeweils nur einmal geblottet)

Die Bestimmung der Hexokinase-1-Gehalte durch Mehrfachmessung zeigt keine starke Schwankungsbreite der Einzelmessungen (vgl. Abbildung 29). Zur weiteren Auswertung der Hexokinase-1-Messwerte wurden Mittelwerte bestimmt.

### 3.3.3 Statistische Auswertung der Glukosetransporter-1-Daten und Hexokinase-1-Daten

#### 3.3.3.1 Glukosetransporter-1-Messdaten: Auswertung und Vergleich mit weiteren Patientendaten

In Tabelle 21 wird neben den in dieser Arbeit erhobenen Daten ein Überblick über die Patientendaten gegeben, die in die weitere Auswertung einbezogen sind. Es handelt sich dabei um Daten der Studie von Avril (1996, 2001).

Diese zusätzlich verwendeten Daten sind die bei den PET-Messungen erhobenen standardisierten Fluorodeoxyglukose-Aufnahmewerte,  $SUV_{\text{koriert}}$  und die Scorewerte des immunhistochemisch semiquantitativ bestimmten Glukosetransporter-1, Glukosetransporter-1-Score. Zusätzlich lagen bei bestimmten Proben die erhobenen Werte des Markers für die Zellproliferation in Tumorgeweben, Ki-67 vor. Daneben waren bei einigen Proben immunhistochemisch gemessene Werte des Prognosefaktors Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, uPA und dessen Inhibitor Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1, PAI-1 vorhanden.

Tabelle 21: Charakterisierung der verschiedenen Daten und Messwerte der hier untersuchten Tumorproben

|   | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>        | <b>RANGE</b>  |
|---|----------|-----------------------|---------------|
| Ausgangsgewebemenge [g]                     | 29       | 0,34972 ± 0,21726     | 0,077 – 1,030 |
| Glukosetransporter-1-Messwert [counts/area] | 28       | 344773,71 ± 296171,63 | 8757 – 997430 |
| $SUV_{\text{koriert}}$                      | 25       | 3,116 ± 2,215         | 0,3 – 10,2    |
| Glukosetransporter-1-Score                  | 19       | 3,79 ± 1,99           | 2 – 8         |
| Ki-67                                       | 19       | 25,84 ± 20,17         | 0 – 70        |
| uPA   | 18       | 2,8461 ± 2,5482       | 0,18 – 6,74   |
| PAI-1                                       | 18       | 11,9172 ± 9,8790      | 1,52 – 36,85  |

Bei einigen der untersuchten Tumorproben sind bestimmte Daten nicht erhoben worden. In den nachfolgenden statistischen Auswertungen werden daher nur die vorhandenen Datenpaare zu statistischen Vergleichsberechnungen herangezogen. Dazu wurde im verwendeten Statistikprogramm SPSS 10 der automatische paarweise Fallausschluss bei fehlenden Werten aktiviert.



### 3.3.3.1.1 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den Ausgangsgewebemengen und den Gesamtausbeuten der Rohhomogenate und der 200000g- Fraktionen

Tabelle 22: Statistischer Vergleich der Proteinausgangsgewebemenge und dem Glukosetransporter-1-Messwert mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|  |                          | Messwert<br>GluT-1<br>[counts/area] | Ausgangs-<br>gewebe [g] | Proteinausbeute<br>Rohhomogenate<br>[mg] | Proteinausbeute<br>600g-Fraktion<br>[mg] |
|--|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--|--|
| Ausgangsgewebe [g]                       | Korrelation nach Pearson | 0,233                               |                         |  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 2,32                                |                         |  |  |
|  | N                        | 28                                  |                         |  |  |
| Proteinausbeute<br>Rohhomogenate [mg]    | Korrelation nach Pearson | 0,397                               | 0,844**                 |  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,36                                | 0,00000009              |  |  |
|  | N                        | 28                                  | 29                      |  |  |
| Proteinausbeute 600g-<br>Fraktion [mg]   | Korrelation nach Pearson | 0,316                               | 0,734**                 | 0,766**                                  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 1,01                                | 0,00005876              | 0,00001254                               |  |
|  | N                        | 28                                  | 29                      | 29                                       |  |
| Proteinausbeute<br>200000g-Fraktion [mg] | Korrelation nach Pearson | 0,535*                              | 0,757**                 | 0,919**                                  | 0,652**                                  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 0,03                                | 0,00001968              | 0,0000000002                             | 0,001282202                              |
|  | N                        | 28                                  | 29                      | 29                                       | 29                                       |

\*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

\*\*.. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] (Tabelle 22) mit den Ausgangsgewebemengen ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,233$ , was einer sehr geringen positiven Korrelation entspricht. Es besteht ein zweiseitiges Signifikanzniveau von  $p=2,32$ , was bei  $p>0,05$  einem nichtsignifikanten Ergebnis entspricht. Dies bedeutet, dass kein statistischer Zusammenhang und somit auch kein direkter Zusammenhang zwischen dem gemessenen Wert für Glukosetransporter-1 und der Ausgangsmenge der verwendeten Tumorgewebeprobe.

Zwischen dem Glukosetransporter-1-Messwert [counts/area] und den Gesamtausbeuten der Rohhomogenate besteht mit einem Korrelationskoeffizient von  $r=0,397$  und  $p=0,36$  kein statistischer Zusammenhang. Zwischen Glukosetransporter-1-Messwert [counts/area] und den Gesamtausbeuten der 200000g-Fraktion [mg] besteht mit  $r=0,535$  bei  $p=0,03$  ein statistischer Zusammenhang (Tabelle 22). Die weiteren in Tabelle 22 dargestellten hohen und mittleren positiven Korrelationen auf Signifikanzniveaus von 1% geben nochmals die bereits erwähnten Ergebnisse von Tabelle 18 wieder. Damit wird verdeutlicht, dass hohe Ausgangsgewebemengen zu hohen Proteinausbeuten führen. Aber Ausgangsmengen und Ausbeuten in den Proteinfractionen der Rohhomogenate und der 600g-Fraktion stehen in keinem statistischen Zusammenhang mit den Messwerten für Glukosetransporter-1 [counts/area]. Lediglich die Proteinausbeute der 200000g-Fraktion [mg] korreliert mit dem Messwert für GluT-1 [counts/area] auf einem Signifikanzniveau von 5%.

### 3.3.3.1.2 Charakterisierung der Fluorodeoxyglukose-SUV-Messdaten gruppiert nach histologischer Dignität

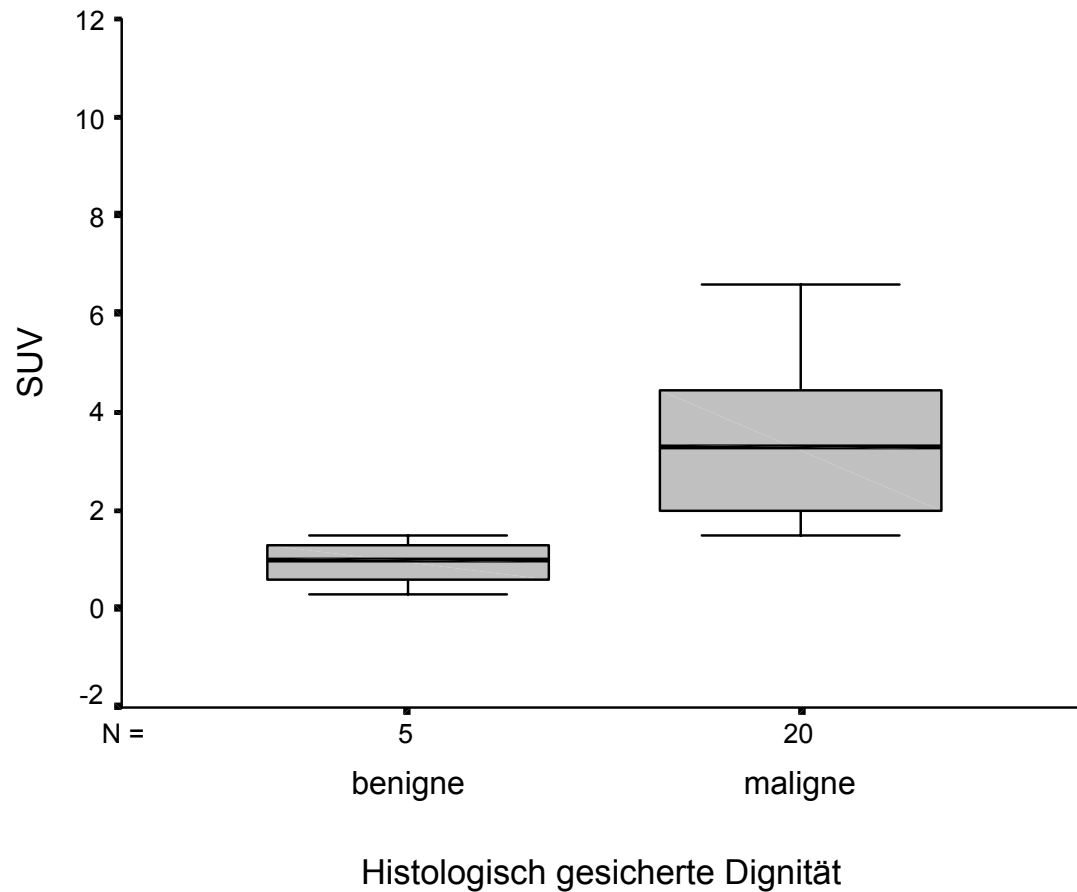


Abbildung 30: Boxplot mit Vergleich der SUV von benignen und malignen Tumoren

Von fünf der hier untersuchten und als benigne eingestuften Gewebeproben sind dimensionslose PET-SUV-Messwerte der zugehörigen Patientinnen vorhanden. Bei 37,5% der benignen Tumorproben fehlen zugehörige PET-FDG-Messwerte (Abbildung 30). Bei den als maligne eingestuften Tumorproben sind in zwanzig Fällen korrespondierende PET-FDG-Messwerte vorhanden. Der Mittelwert für den FDG-Uptake beträgt bei den malignen Tumoren 3,660 und bei den benignen Tumoren 0,940 (Tabelle 23).

Tabelle 23: Mittelwertvergleich der SUV-Messwerte gruppiert nach der Dignität

|                | Dignität | N  | MW    | SD    | Standardfehler des MW |
|----------------|----------|----|-------|-------|-----------------------|
| SUV korrigiert | benigne  | 5  | ,940  | ,493  | ,220                  |
|                | maligne  | 20 | 3,660 | 2,142 | ,479                  |

### 3.3.3.1.3 Gegenüberstellung der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den histopathologischen Daten

#### 3.3.3.1.3.1 Gruppierung nach histopathologischer Dignität

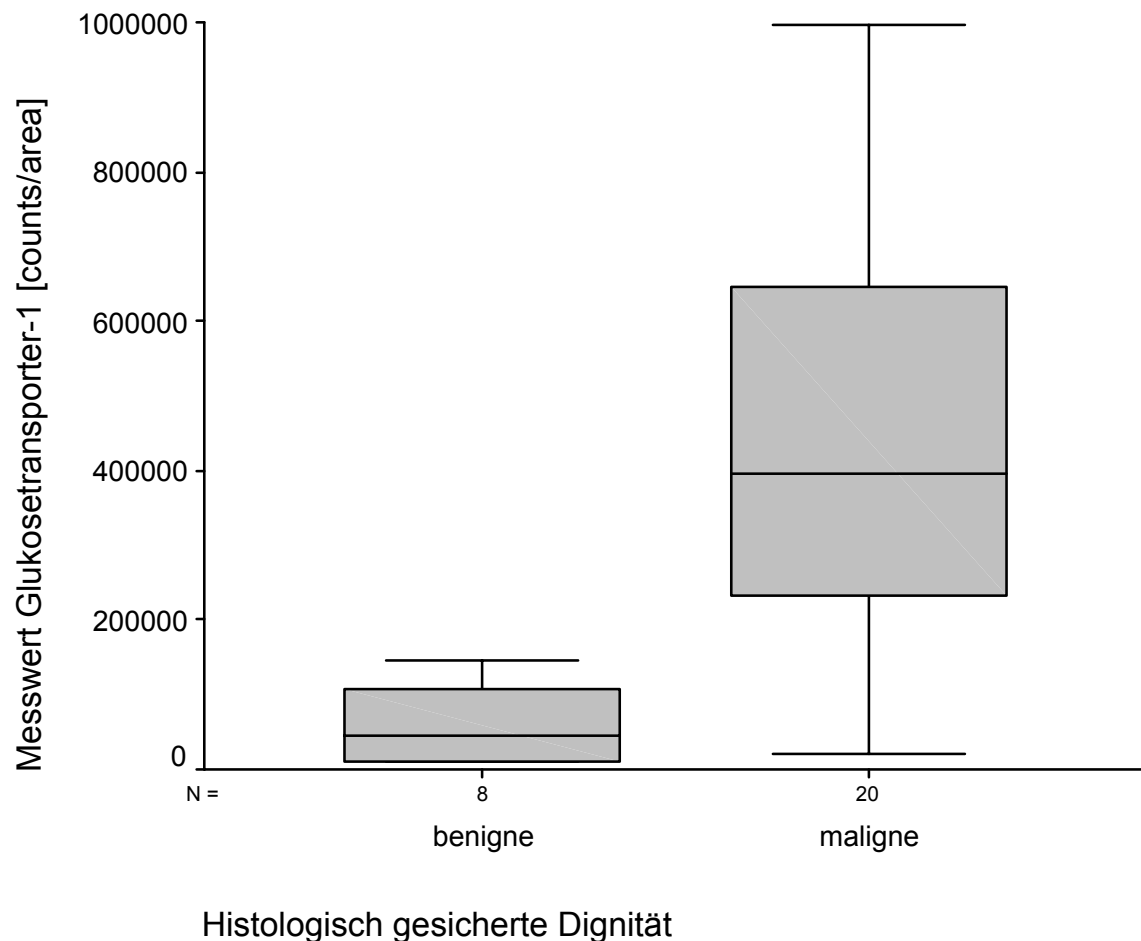


Abbildung 31: Boxplot mit Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte von benignen und malignen Tumoren

Bei allen acht als benigne eingestuftem Gewebeproben konnte der Glukosetransporter-1-Gehalt bestimmt werden. Eine Tumorprobe der als maligne eingestuftem Gewebeproben konnte aufgrund zu geringer Menge nicht zur Glukosetransporter-1-Bestimmung verwendet werden.

Der Mittelwert für den Glukosetransporter-1-Messwert beträgt für die benignen Gewebeproben 90540,75 und für die malignen Gewebeproben 446466,90 (Abbildung 31, Tabelle 24).

Tabelle 24: Mittelwertvergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität

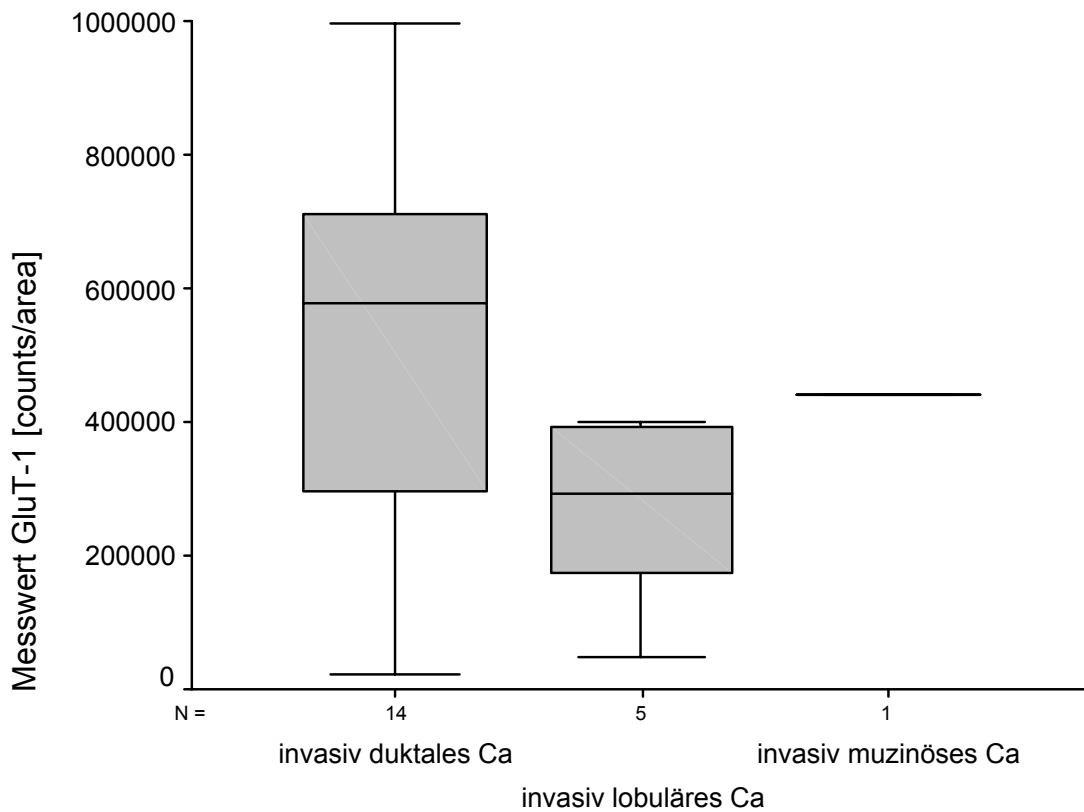
|                               | Dignität | N  | Mittelwert | Standardabweichung |
|-------------------------------|----------|----|------------|--------------------|
| Messwert GluT-1 [counts/area] | benigne  | 8  | 90540,75   | 127210,04          |
|                               | maligne  | 20 | 446466,90  | 283882,30          |

Tabelle 25: U-Test nach Mann und Whitney zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität

|                               | Messwert Glukosetransporter-1 [counts/area] |
|-------------------------------|---|
| Mann-Whitney-U                | 17,000                                      |
| Wilcoxon-W                    | 53,000                                      |
| Z                             | -3,204                                      |
| Exakte Signifikanz (2-seitig) | ,001  |

Tabelle 25 zeigt, dass zwischen den beiden Dignitätsgruppen „benigne Tumore“ und „maligne Tumore“ bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p=0,001$  ein höchst signifikanter Unterschied bezüglich ihrer Glukosetransporter-1-Messwerte besteht.

### 3.3.3.1.3.2 Gruppierung der invasiv wachsenden Karzinome nach histopathologischer Gewebedifferenzierung



### Gruppierung der invasiven Karzinome

Abbildung 32: Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte der 3 histopathologischen Gruppen der untersuchten invasiv wachsenden Karzinome (das in nur einer Gewebeprobe vorliegende invasiv muzinöse Karzinom wurde in der Abbildung vollständigshalber auch dargestellt)

Bei 95,2% der untersuchten invasiv wachsenden Karzinome wurde der Glukosetransporter-1-Gehalt bestimmt. Bei den anderen histologischen Gruppen konnte bei allen Tumorproben der Gehalt an Glukosetransporter-1 bestimmt werden.

Tabelle 26: *H-Test nach Kruskal und Wallis zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte innerhalb der 3 histologischen Gruppen der invasiv wachsenden Karzinome - Rangplätze in den einzelnen Gruppen*

|                               | Gruppen der invasiv wachsenden Karzinome | N  | Mittlerer Rang |
|-------------------------------|--|----|----------------|
| Messwert GluT-1 [counts/area] | invasiv duktales Karzinom                | 14 | 11,71          |
|                               | invasiv lobuläres Karzinom               | 5  | 6,80           |
|                               | invasiv muzinöses Karzinom               | 1  | 12,00          |
|                               | Gesamt                                   | 20 |                |

Tabelle 27: *H-Test nach Kruskal und Wallis zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte innerhalb der 3 histologischen Gruppen der invasiv wachsenden Karzinome - Teststatistik*

|                    | Messwert Glukosetransporter-1 [counts/area] |
|--------------------|---|
| Chi-Quadrat        | 2,610                                       |
| df                 | 2   |
| Exakte Signifikanz | ,301  |

Bei  $p=0,301$  als Irrtumswahrscheinlichkeit für den Test in Tabelle 27 liegt kein signifikanter Unterschied innerhalb der 3 histologischen Gruppen bezüglich ihrer Glukosetransporter-1-Messwerte vor. Eine Differenzierung in den histologischen Typ eines invasiv wachsenden Karzinoms anhand des mit dieser Methode gemessenen Glukosetransporter-1-Wertes [counts/area] ist somit innerhalb dieser Studie nicht möglich (Abbildung 32, Tabelle 26 und 27).

Eine Differenzierung der benignen Gewebeproben in ihre histologischen Gruppen und ihre statistische Auswertung war bei der geringen Fallzahl nicht sinnvoll. Die in dieser Studie verwendeten benignen Gewebe bestehen aus 3 Lymphknotenproben, 3 Fibroadenomproben, 1 Probe entzündlich veränderten Gewebe und 1 Mastopathieprobe.

### 3.3.3.1.4 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den immun-histochemischen Glukosetransporter-1-Daten

Tabelle 28: Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Glukosetransporter-1-Score-Werte

|  | N  | MW $\pm$ SD                                | RANGE                          |
|--|----|--|--------------------------------|
| Glukosetransporter-1-Messwert<br>[counts/area] | 28 | 344773,71 $\pm$ 296171,63<br>[counts/area] | 8757 – 997430<br>[counts/area] |
| Glukosetransporter-1-Score                     | 19 | 3,79 $\pm$ 1,99                            | 2 – 8                          |

Tabelle 29: Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Score-Werte und der Glukosetransporter-1-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

|  |                    | Messwert GluT-1 [counts/area] | GluT-1-Score |
|--|--------------------|-------------------------------|--------------|
| N  |                    | 28                            | 19           |
| Parameter der<br>Normalverteilung <sup>a,b</sup> | Mittelwert         | 344773,72                     | 3,79         |
|  | Standardabweichung | 296171,63                     | 1,99         |
| Kolmogorov-Smirnov-Z                             |                    | ,764                          | 1,262        |
| Exakte Signifikanz (2-seitig)                    |                    | ,555                          | ,066         |

<sup>a</sup>. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

<sup>b</sup>. Aus den Daten berechnet.

Beim Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (Tabelle 29) liegt eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vor, wenn das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ist. Hier sind die Messwerte von Glukosetransporter-1 mit  $p = 0,555$  und die Werte des Glukosetransporter-1-Score mit  $p = 0,066$  grösser als das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Die gemessenen Werte sind daher normalverteilt.

Tabelle 30: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 [counts/area] und die Werte des Glukosetransporter-1-Score

|                            |                          | Messwert GluT-1 [counts/area] |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Glukosetransporter-1-Score | Korrelation nach Pearson | ,802**                        |
|                            | Signifikanz (2-seitig)   | ,00006                        |
| N                          |                          | 18                            |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den Glukosetransporter-1-Score-Werten (Tabelle 30) ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,802$ , was einer hohen positiven Korrelation entspricht. Gleichzeitig besteht ein zweiseitiges Signifikanzniveau von  $p=0,00006$ . Dies bedeutet, dass ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Messwert für Glukosetransporter-1 und dem für den jeweiligen Tumor immunhistochemisch bestimmten Glukosetransporter-1-Score besteht. Graphisch ist dieser Zusammenhang mit dem Scatter-Plot in Abbildung 33 dargestellt. Die hohe positive Korrelation wird durch den Verlauf der Regressionsgeraden verdeutlicht, das Bestimmtheitsmass der Geraden beträgt  $R^2=0,6436$ .

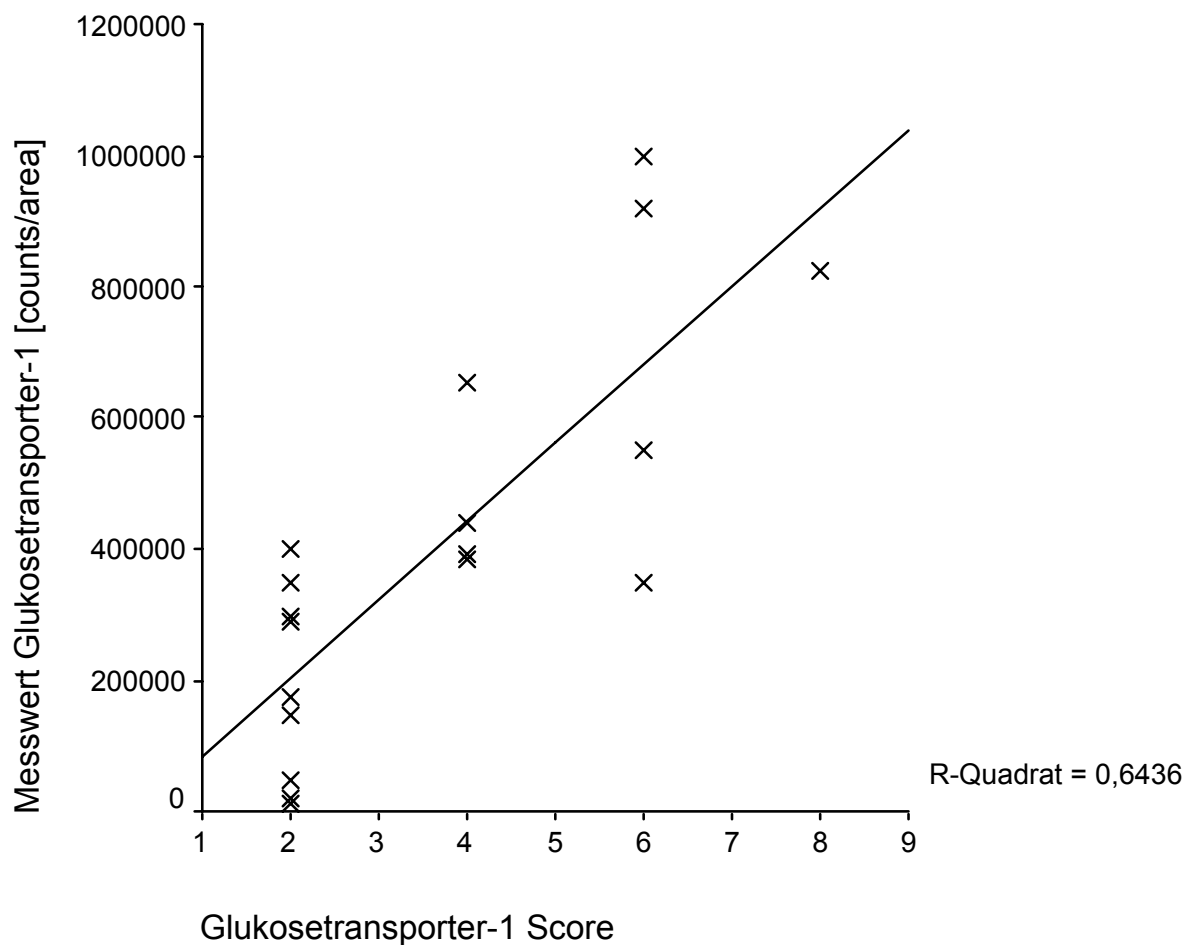


Abbildung 33: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Glukosetransporter-1-Score-Werten

Das Bestimmtheitsmass  $R^2$  ist ein Mass für die Güte der Anpassung des linearen Modells an die vorliegenden Daten. Die Werte liegen zwischen 0 und 1. Niedrige Werte kennzeichnen eine schlechte Anpassung des Datenmaterials an das lineare Modell.

### 3.3.3.1.5 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den Werten von Ki-67 als Marker der Zellproliferation

Tabelle 31: Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Ki-67-Werte

|  | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>                         | <b>RANGE</b>                   |
|--|----------|--|--------------------------------|
| Messwert Glukosetransporter-1<br>[counts/area] | 28       | 344773,71 ± 296171,63<br>[counts/area] | 8757 – 997430<br>[counts/area] |
| Ki-67  | 19       | 25,84 ± 20,17                          | 0 – 70                         |

Tabelle 32: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und die Werte von Ki-67

|   |                          | Ki-67 |
|---|--------------------------|-------|
| Messwert Glukosetransporter-1 [counts/area] | Korrelation nach Pearson | ,384  |
|   | Signifikanz (2-seitig)   | ,116  |
|   | N                        | 18    |

Beim Vergleich von 18 Glukosetransporter-1-Messwerten mit ihren korrespondierenden Ki-67-Werten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,384$ , und ein p-Wert von  $p=0,116$ . Es kann daher im Rahmen dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten von Glukosetransporter-1 und dem Marker für Zellproliferation, Ki-67 festgestellt werden (Tabelle 31 und 32).



### 3.3.3.1.6 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit dem Prognosefaktor uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und dessen Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1)

Tabelle 33: Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Werte der Prognosefaktoren uPA und PAI-1

|  | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>                         | <b>RANGE</b>                   |
|--|----------|--|--------------------------------|
| Glukosetransporter-1-Messwert<br>[counts/area] | 28       | 344773,71 ± 296171,63<br>[counts/area] | 8757 – 997430<br>[counts/area] |
| uPA  | 18       | 2,8461 ± 2,5482                        | 0,18 – 6,74                    |
| PAI-1  | 18       | 11,9172 ± 9,8790                       | 1,52 – 36,85                   |

Die tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA und sein Inhibitor PAI-1 sind am Abbau des Tumorstromas und der Basalmembran beteiligt und tragen so zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen bei. Beide Werte werden als Prognosefaktoren verwendet (Tabelle 33).

Tabelle 34: Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Werte von uPA und PAI-1 mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

|   |                    | Messwert GluT-1 [counts/area] | uPA    | PAI-1  |
|---|--------------------|-------------------------------|--------|--------|
| N   |                    | 28                            | 18     | 18     |
| Parameter der Normalverteilung <sup>a,b</sup> | Mittelwert         | 344773,72                     | 2,8461 | 11,92  |
|   | Standardabweichung | 296171,63                     | 2,5482 | 9,8790 |
| Kolmogorov-Smirnov-Z                          |                    | ,764                          | ,856   | ,912   |
| Exakte Signifikanz (2-seitig)                 |                    | ,555                          | ,402   | ,328   |

<sup>a</sup>. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

<sup>b</sup>. Aus den Daten berechnet.

In Tabelle 34 liegt mit  $p=0,555$  für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und  $p=0,402$  bzw.  $p=0,328$  für die uPA-Werte bzw. die PAI-1-Werte eine Normalverteilung vor und die Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten ist im Weiteren möglich.

Tabelle 35: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und die Werte von uPA und PAI-1 mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|       |                          | Messwert GluT-1 [counts/area] | uPA     |
|-------|--------------------------|-------------------------------|---------|
| uPA   | Korrelation nach Pearson | 0,626*                        |         |
|       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,021                         |         |
|       | N                        | 17                            |         |
| PAI-1 | Korrelation nach Pearson | 0,346                         | 0,687** |
|       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,522                         | 0,006   |
|       | N                        | 17                            | 18      |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den uPA-Werten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,626$  und einem p-Wert von  $p=0,021$ . Folglich besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen den Messwerten von Glukosetransporter-1 und dem Prognosefaktor uPA. Der Vergleich zwischen den Glukosetransporter-1-Messwerten und den PAI-1 ergibt einen Pearson'schen Korrelationskoeffizient von  $r=0,346$  und zeigt mit  $p=0,522$  keinen signifikanten statistischen Zusammenhang. Der Vergleich der Werte für uPA und den Werten seines Inhibitors PAI-1 ergibt einen Pearson'schen Korrelationskoeffizienten von  $r=0,687$  und  $p=0,006$ . Ein hoher Wert von uPA bedingt also statistisch gesehen auch einen hohen Wert seines Inhibitors, PAI-1. Obwohl die Werte von Glukosetransporter-1 und uPA positiv korrelieren, ist dies bei den Werten von Glukosetransporter-1 und PAI-1 nicht der Fall. Die statistischen Zusammenhänge werden in den folgenden Scatter-Plots der Abbildungen 34 bis 36 dargestellt.

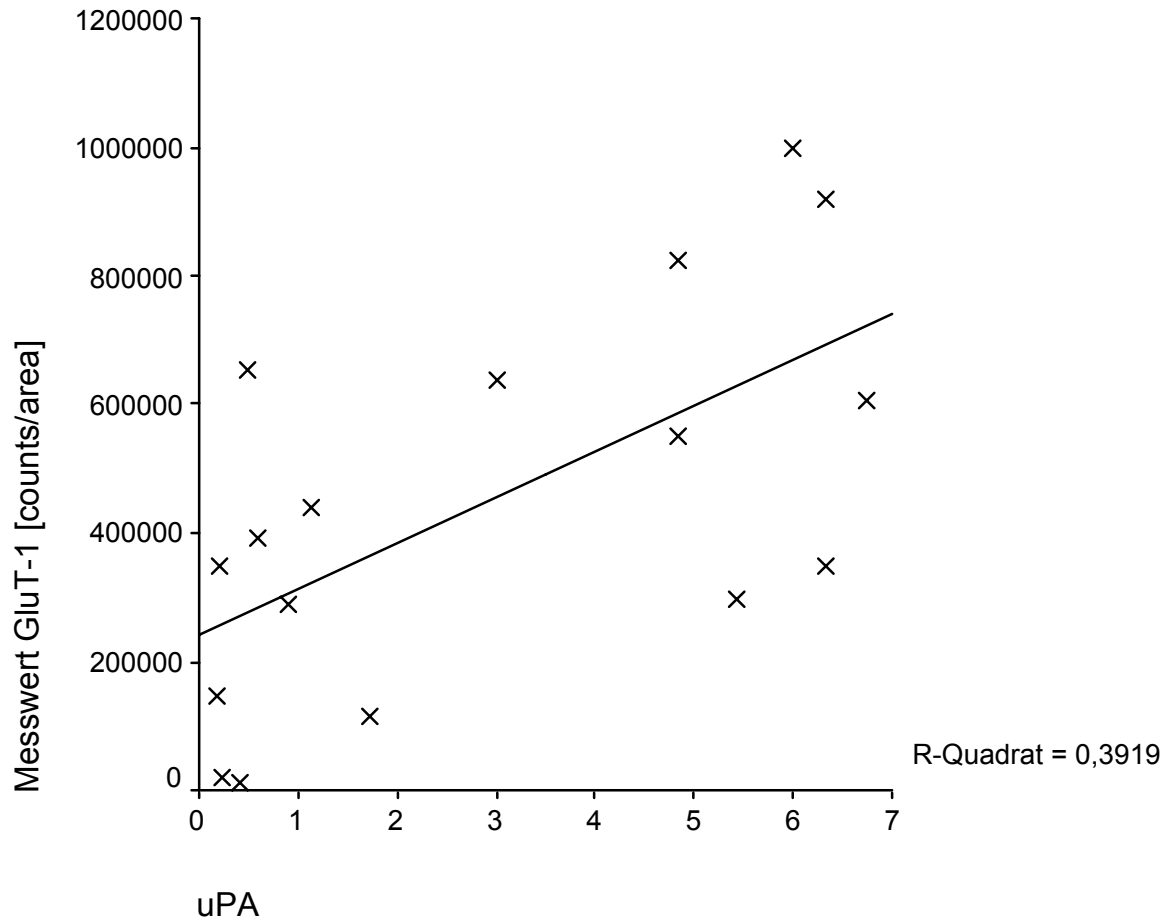


Abbildung 34: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Werten des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)

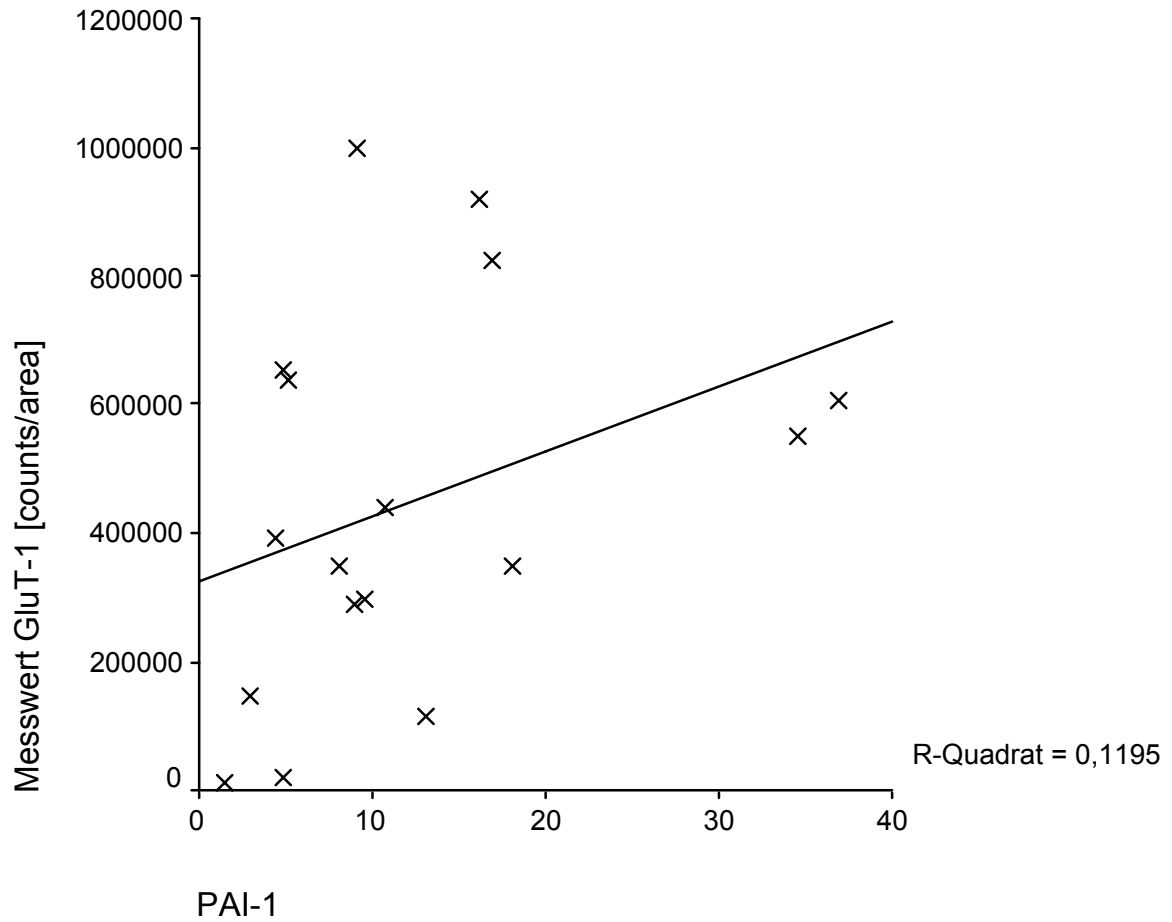


Abbildung 35: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Werten des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

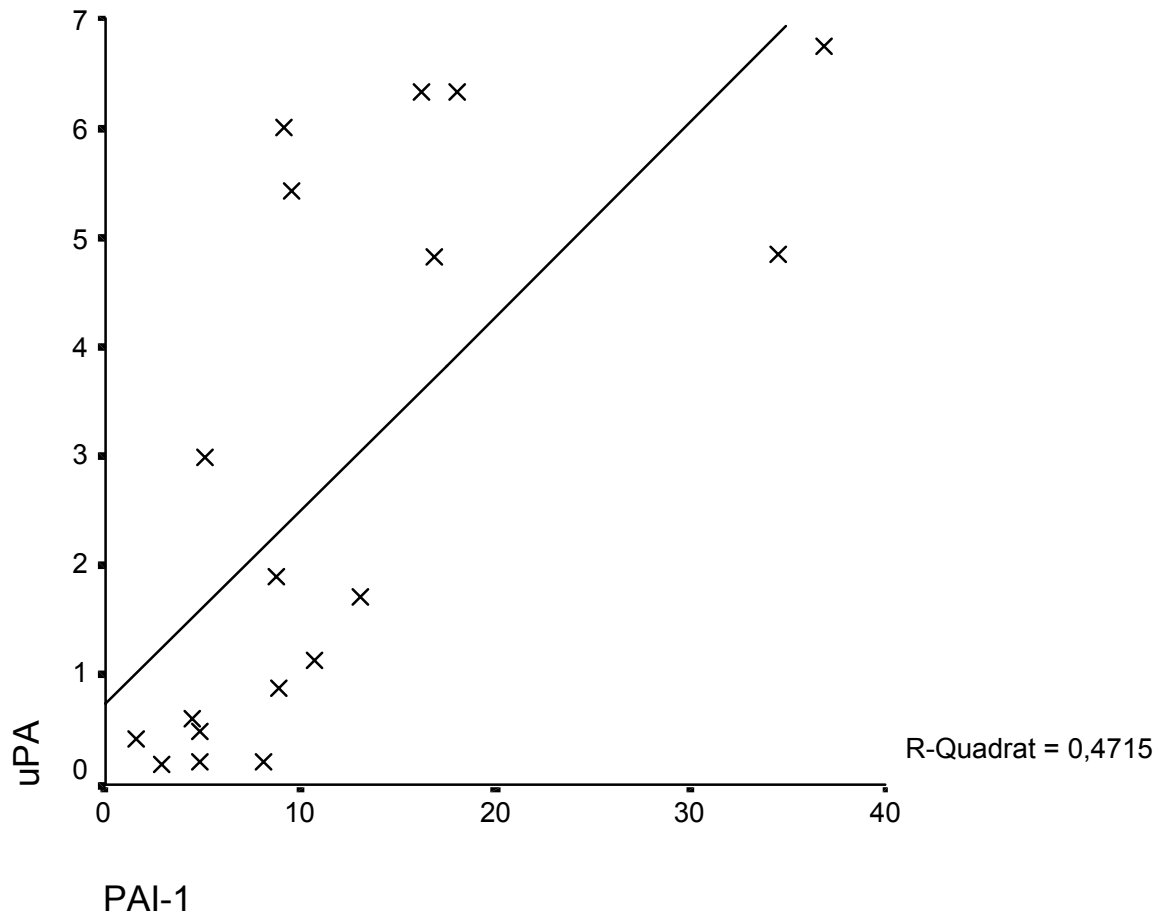


Abbildung 36: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Werten von uPA und dessen Inhibitor PAI-1

In Abbildung 36 ist der statistische Zusammenhang zwischen den beiden Prognosefaktoren bei diesen Tumorproben ersichtlich.

## 3.3.3.1.7 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den PET-Messdaten

Tabelle 36: Glukosetransporter-1-Messwerte und FDG-standard uptake values (n.v. = nicht vorhanden)

| Probennummer | Messwert Glukosetransporter-1<br>[counts/area] | FDG-standard uptake values<br>(SUV) |
|--------------|--|-------------------------------------|
| 1            | 347706   | 2,3                                 |
| 2            | 175830   | 1,5                                 |
| 3            | 997430   | 5,9                                 |
| 4            | 56734  | n.v.                                |
| 5            | 47634  | 2,7                                 |
| 6            | 605751   | 5,4                                 |
| 7            | 71307  | 1,3                                 |
| 8            | 33321  | n.v.                                |
| 9            | 21046  | 3,0                                 |
| 10           | 146557   | 1,0                                 |
| 11           | 291044   | 3,6                                 |
| 12           | 710263   | 4,5                                 |
| 13           | 384204   | 1,5                                 |
| 14           | 393612   | 3,9                                 |
| 15           | 654833   | 1,9                                 |
| 16           | 114627   | 4,0                                 |
| 17           | 821985   | 2,2                                 |
| 18           | 11071  | 0,3                                 |
| 19           | 918162   | 6,6                                 |
| 20           | 8757   | n.v.                                |
| 21           | 157163   | 1,8                                 |
| 22           | 438974   | 2,1                                 |
| 23           | 639382   | n.v.                                |
| 24           | 548704   | 10,2                                |
| 25           | n.v.   | 1,8                                 |
| 26           | 399453   | 1,7                                 |
| 27           | 295976   | 3,7                                 |
| 28           | 12375  | 0,6                                 |
| 29           | 349763   | 4,4                                 |

In Tabelle 36 werden die Glukosetransporter-1-Messwerte mit den korrespondierenden „standardized uptake values“ der vorhandenen Proben dargestellt.

Tabelle 37: Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und der SUV

|  | N  | MW ± SD                                | RANGE                          |
|--|----|--|--------------------------------|
| Messwert Glukosetransporter-1<br>[counts/area] | 28 | 344773,71 ± 296171,63<br>[counts/area] | 8757 – 997430<br>[counts/area] |
| Messwert SUV <sub>korrigiert</sub>             | 25 | 3,116 ± 2,215                          | 0,3 – 10,2                     |

Tabelle 38: Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und der FDG-SUV-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

|   |                    | Messwert GluT-1 [counts/area] | SUV korrigiert |
|---|--------------------|-------------------------------|----------------|
| N   |                    | 28                            | 25             |
| Parameter der Normalverteilung <sup>a,b</sup> | Mittelwert         | 344773,72                     | 3,116          |
|   | Standardabweichung | 296171,63                     | 2,215          |
| Kolmogorov-Smirnov-Z                          |                    | ,764                          | ,819           |
| Exakte Signifikanz (2-seitig)                 |                    | ,555                          | ,466           |

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

Aus den nicht signifikanten p-Werten für GluT-1 und SUV (Tabelle 37 und 38) geht hervor, dass die Messwerte für Glukosetransporter-1 und die SUV-Messwerte normalverteilt sind.

Tabelle 39: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und die SUV-Messwerte

|                |                          | Messwert GluT-1 [counts/area] |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|
| SUV korrigiert | Korrelation nach Pearson | ,558**                        |
|                | Signifikanz (2-seitig)   | ,005                          |
| N              |                          | 24                            |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den SUV-Messwerten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,558$  und  $p=0,005$ . Dies bedeutet, dass ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Messwert für Glukosetransporter-1 und dem für den jeweiligen Tumor gemessenen FDG-standard-uptake-value besteht. Graphisch ist der Zusammenhang zwischen  $SUV_{\text{korrigiert}}$  und den Messwerten für Glukosetransporter-1 in Abbildung 37 dargestellt. Dabei wird die positive Korrelation durch den Verlauf der Regressionsgeraden verdeutlicht.

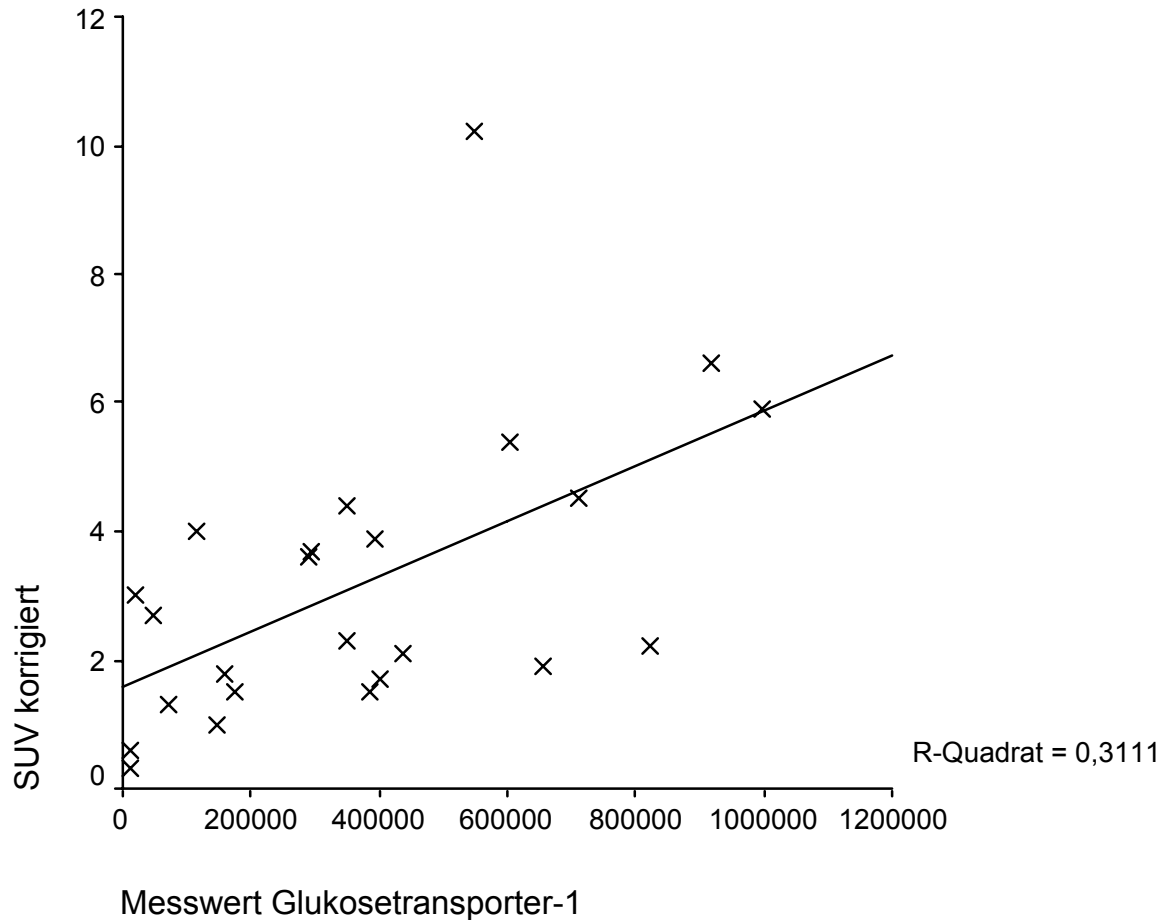


Abbildung 37: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Messwerten der FDG-SUV



### 3.3.3.1.8 ROC-Kurven-Analyse zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität der vorgenommenen Messung des Glukosetransporter-1

Mit der ROC-Kurve wird die Sensitivität gegen den Komplementärwert der Spezifität zu 1 aufgetragen. Ein diagnostischer Wert ohne jede Vorhersagekraft ergäbe hier eine 45°-Linie (Diagonale in Abbildung 38). Je bauchiger die ROC-Kurve ist, desto grösser ist die Vorhersagekraft des Tests. Ein Mass dafür ist die Fläche unterhalb der ROC-Kurve, die bei einem Test ohne jede Vorhersagekraft bei 0,5 und im Maximalfall bei 1 liegt.

Beim hier durchgeführten ROC-Testverfahren für die Messwerte von Glukosetransporter-1 gruppiert nach histologischer Dignität (ein höherer Messwert für Glukosetransporter-1 tendiert mehr Richtung maligner Tumor) ergibt sich ein Wert von 0,894, wobei ein 95%-Konfidenzintervall von 0,767 bis 1,020 angegeben wird. Die folgende Tabelle 40 stellt die Zahlen der richtig und falsch erkannten Tumordignitäten in einer Kreuztabelle dar. Sensitivität und Spezifität können aus den erhaltenen Daten errechnet werden (Tabelle 41).

Tabelle 40: Kreuztabelle zur Darstellung der, mit Messung des Glukostransporter-1 richtig erkannten malignen und benignen Tumore und der falsch positiv bzw. falsch negativ erkannten Tumore

|                                  |         | Vorhersagegruppe |         |                           |
|----------------------------------|---------|------------------|---------|---------------------------|
|                                  |         | Dignität         |         | Prozentsatz der Richtigen |
|                                  |         | benigne          | maligne |                           |
| Histologisch gesicherte Dignität | benigne | 6                | 2       | 75,0                      |
|                                  | maligne | 3                | 17      | 85,0                      |
| Gesamtprozentsatz                |         |                  |         | 82,1                      |

Von den 20 malignen Tumoren werden 17 richtig als maligne vorhergesagt („Richtig Positive“, RP) und 3 fälschlich als benigne eingestuft („Falsch Negative“, FN). Von den 8 tatsächlich benignen werden 6 richtig als benigne vorhergesagt („Richtig Negative“, RN) und 2 fälschlich als maligne eingestuft („Falsch Positive“, FP).

Als Sensitivität des Tests bezeichnet man den Anteil der Richtig Positiven an der Gesamtzahl der Tumore. Man versteht hierunter die Eignung des Tests, maligne Tumore möglichst vollständig herauszufiltern:

$$\text{Sensitivität} = \text{RP} / (\text{RP} + \text{FN}) = 17 / (17 + 3) = 0,850$$

Als Spezifität des Tests bezeichnet man den Anteil der Richtig Negativen unter den benignen Tumoren. Man versteht hierunter die Eignung des Tests, ausschliesslich maligne Tumore zu erfassen:

$$\text{Spezifität} = \text{RN} / (\text{RN} + \text{FP}) = 6 / (6 + 2) = 0,750$$

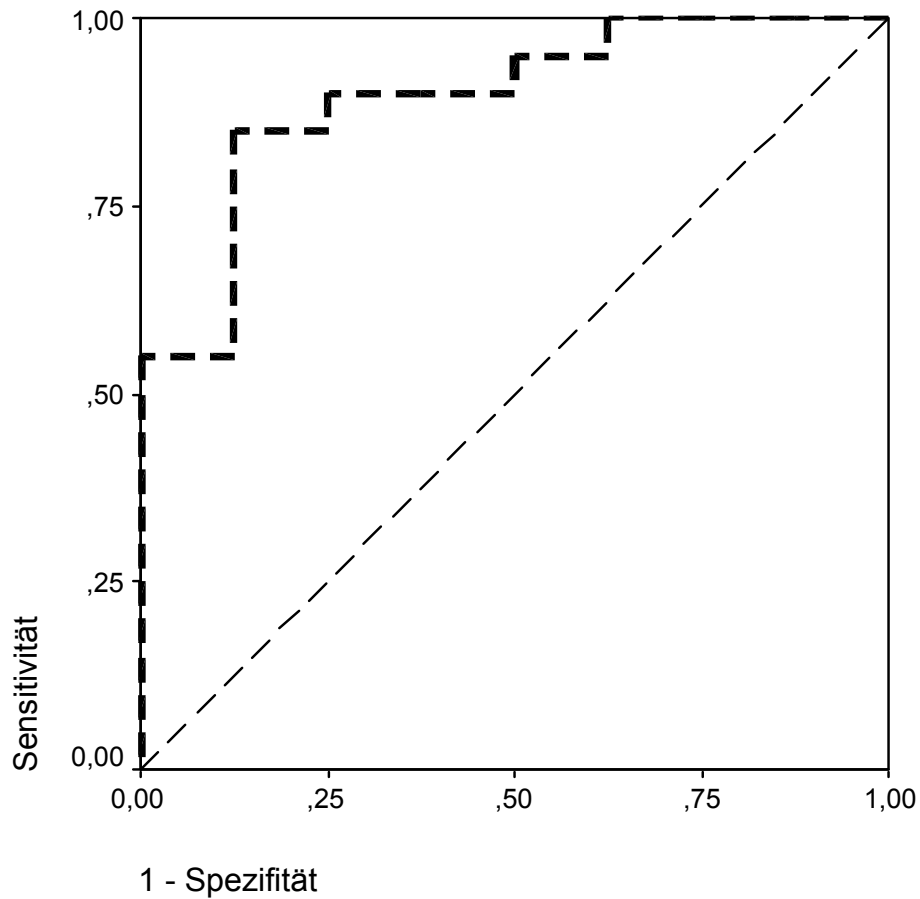


Abbildung 38: ROC-Kurve zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität des hier angewendeten Messverfahrens von Glukosetransporter-1

Tabelle 41: Fläche unter der ROC-Kurve aus Abbildung 38 zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität

| Variable(n) für Testergebnis: Messwert Glukosetransporter-1 |                             |  |                                       |            |  |
|---|-----------------------------|--|---------------------------------------|------------|--|
| Fläche  | Standardfehler <sup>a</sup> | Asymptotische Signifikanz <sup>b</sup> | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |            |  |
|   |                             |  | Untergrenze                           | Obergrenze |  |
| ,894  | ,065                        | ,001                                   | ,767                                  | 1,020      |  |

a. Unter der nichtparametrischen Annahme

b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Tabelle 42: Koordinaten der ROC-Kurve aus Abbildung 38

Variable(n) für Testergebnis: Messwert Glukosetransporter-1

| Positiv, wenn größer<br>oder gleich <sup>a</sup> | Sensitivität | 1 - Spezifität |
|--|--------------|----------------|
| 8756,00  | 1,000        | 1,000          |
| 9914,00  | 1,000        | ,875           |
| 11723,00   | 1,000        | ,750           |
| 16710,50   | 1,000        | ,625           |
| 27183,50   | ,950         | ,625           |
| 40477,50   | ,950         | ,500           |
| 52184,00   | ,900         | ,500           |
| 64020,50   | ,900         | ,375           |
| 92967,00   | ,900         | ,250           |
| 130592,00  | ,850         | ,250           |
| 151860,00  | ,850         | ,125           |
| 166496,50  | ,800         | ,125           |
| 233437,00  | ,750         | ,125           |
| 293510,00  | ,700         | ,125           |
| 321841,00  | ,650         | ,125           |
| 348734,50  | ,600         | ,125           |
| 366983,50  | ,550         | ,125           |
| 388908,00  | ,550         | ,000           |
| 396532,50  | ,500         | ,000           |
| 419213,50  | ,450         | ,000           |
| 493839,00  | ,400         | ,000           |
| 577227,50  | ,350         | ,000           |
| 622566,50  | ,300         | ,000           |
| 647107,50  | ,250         | ,000           |
| 682548,00  | ,200         | ,000           |
| 766124,00  | ,150         | ,000           |
| 870073,50  | ,100         | ,000           |
| 957796,00  | ,050         | ,000           |
| 997431,00  | ,000         | ,000           |

<sup>a</sup>. Der kleinste Trennwert ist der kleinste beobachtete Testwert minus 1, und der größte Trennwert ist der größte beobachtete Testwert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinanderfolgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

In Tabelle 42 können Sensitivität und Spezifität bei verschiedenen Grenzwerten für den Messwert von Glukosetransporter-1 verfolgt werden. Beim Grenzwert von 130592,00 findet man die aus Tabelle 40 errechneten Werte wieder.

### 3.3.3.1.9 Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten mit den Hexokinase-1-Messdaten

Nachdem in den vorhergehenden statistischen Vergleichen und grafischen Darstellungen gezeigt werden konnte, dass die vorliegenden Messwerte für Glukosetransporter-1 mit den SUV-Werten und Glukosetransporter-1-Score-Werten statistische Zusammenhänge zeigen, erfolgt in den folgenden Punkten die statistische Auswertung der Hexokinase-1-Messwerte mit dem vorliegenden Datenmaterial (Tabelle 43).

Tabelle 43: Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Hexokinase-1-Messwerte

|  | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>                        | <b>RANGE</b>                   |
|--|----------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Messwert Glukosetransporter-1<br>[counts/area] | 28       | 34773,71 ± 296171,63<br>[counts/area] | 8757 – 997430<br>[counts/area] |
| Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area]         | 29       | 109537,24 ± 70387,09<br>[counts/area] | 3195 – 345574<br>[counts/area] |

Tabelle 44: Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Hexokinase-1-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

|   |                    | Messwert GluT-1<br>[counts/area] | Messwert HK-1<br>[counts/area] |
|---|--------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| N   |                    | 28                               | 29                             |
| Parameter der Normalverteilung <sup>a,b</sup> | Mittelwert         | 344773,72                        | 109537,24                      |
|   | Standardabweichung | 296171,63                        | 70387,09                       |
| Kolmogorov-Smirnov-Z                          |                    | ,764                             | ,524                           |
| Signifikanz (2-seitig)                        |                    | ,555                             | ,922                           |

<sup>a</sup>. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

<sup>b</sup>. Aus den Daten berechnet.

In Tabelle 44 wird gezeigt, dass eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  vor. In diesem Beispiel liegt mit  $p = 0,555$  für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und  $p = 0,922$  für die Hexokinase-1-Messwerte eine hinreichende Normalverteilung vor.

Tabelle 45: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1

|  |                             | Messwert Glukosetransporter-1<br>[counts/area] |
|--|-----------------------------|--|
| Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | Korrelation nach<br>Pearson | -,039  |
|  | Signifikanz (2-seitig)      | ,843   |
|  | N                           | 28   |

Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den Hexokinase-1-Messwerten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=-0,039$  und damit kein statistischer Zusammenhang zwischen den Messwerten von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 (Tabelle 45). Graphisch ist dies in folgendem Scatter-Plot in Abbildung 39 dargestellt.

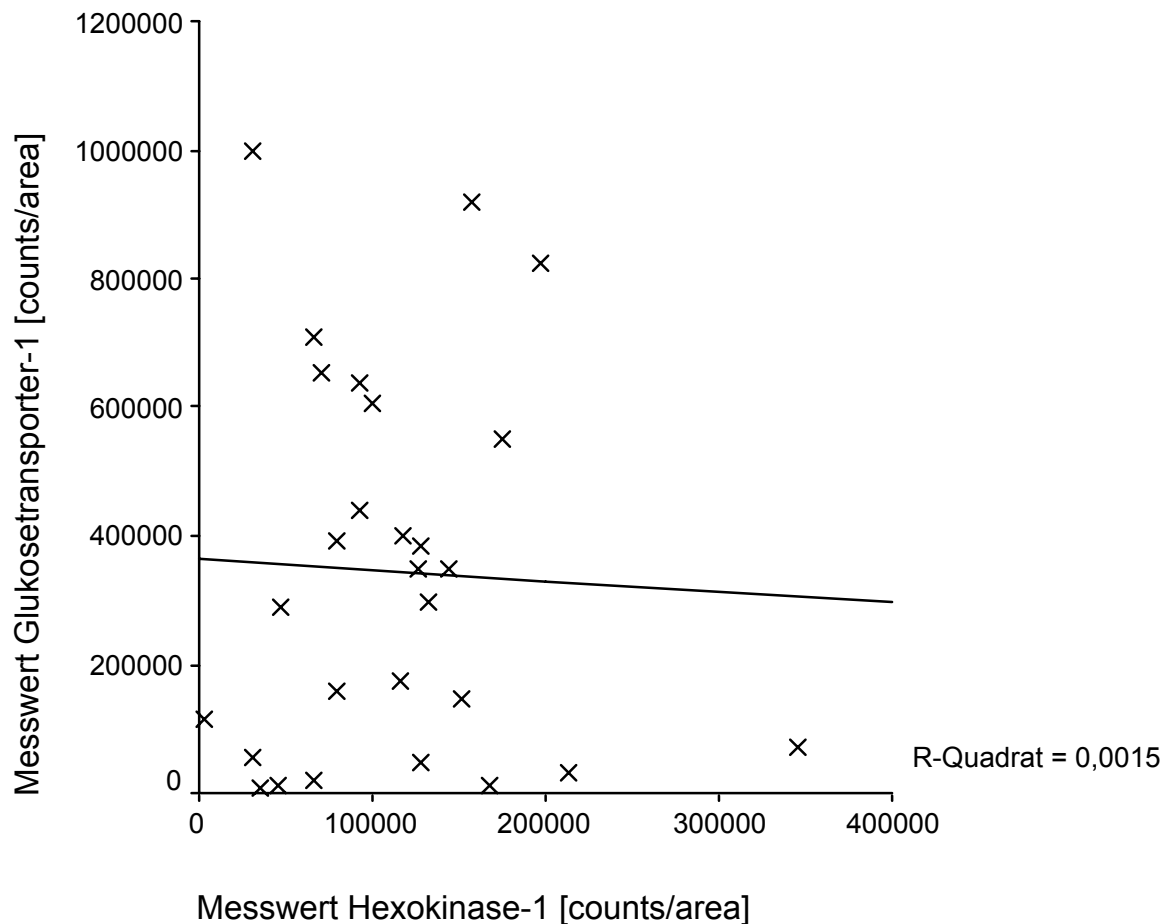


Abbildung 39: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1

### 3.3.3.2 Auswertung der Daten und Vergleich mit den Hexokinase-1-Messdaten

Die Tabelle 46 stellt ähnlich Punkt 3.3.3.1 die Daten für die weiteren Auswertungen im Zusammenhang mit den Hexokinase-1-Messwerten dar. Die Daten wurden zum einen während dieser Arbeit gewonnen und zum anderen einer Studie von Avril (1996, 2001) entnommen.

Tabelle 46: *Charakterisierung der verschiedenen Daten und Messwerte der Tumore*

|                                     | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>       | <b>RANGE</b>  |
|-------------------------------------|----------|----------------------|---------------|
| Proteinausgangsmenge [g]            | 29       | 0,34972 ± 0,21726    | 0,077 – 1,030 |
| Hexokinase-1-Messwert [counts/area] | 29       | 109537,24 ± 70387,09 | 3195 – 345574 |
| SUV <sub>korrigiert</sub>           | 25       | 3,116 ± 2,215        | 0,3 – 10,2    |
| Glukosetransporter-1-Score          | 19       | 3,79 ± 1,99          | 2 – 8         |
| Ki-67                               | 19       | 25,84 ± 20,17        | 0 – 70        |
| uPA                                 | 18       | 2,8461 ± 2,5482      | 0,18 – 6,74   |
| PAI-1                               | 18       | 11,9172 ± 9,8790     | 1,52 – 36,85  |

Bei einigen der untersuchten Tumorproben sind bestimmte Daten nicht vorhanden. In den nachfolgenden statistischen Auswertungen werden nur vorhandene Datenpaare zu statistischen Vergleichsberechnungen herangezogen. Dazu wurde im verwendeten Statistikprogramm SPSS 10 der automatische paarweise Fallausschluss bei fehlenden Werten aktiviert.

### 3.3.3.2.1 Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte mit den Ausgangsgewebemengen und den Gesamtausbeuten der Rohhomogenate und der 200000g-Fraktion

Tabelle 47: Vergleich der Proteinausgangsgewebemenge und dem Hexokinase-1-Messwert mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|  |                          | Messwert<br>Hexokinase-1<br>[counts/area] | Ausgangs-<br>gewebe [g] | Proteinausbeute<br>Rohhomogenate<br>[mg] | Proteinausbeute<br>600g-Fraktion<br>[mg] |
|--|--------------------------|---|-------------------------|--|--|
| Ausgangsgewebe [g]                       | Korrelation nach Pearson | 0,104                                     |                         |  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 5,93                                      |                         |  |  |
|  | N                        | 29  |                         |  |  |
| Proteinausbeute<br>Rohhomogenate [mg]    | Korrelation nach Pearson | 0,166                                     | 0,844**                 |  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 3,90                                      | 0,00000009              |  |  |
|  | N                        | 29  | 29                      |  |  |
| Proteinausbeute 600g-<br>Fraktion [mg]   | Korrelation nach Pearson | 0,115                                     | 0,734**                 | 0,766**                                  |  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 5,52                                      | 0,00005876              | 0,00001254                               |  |
|  | N                        | 29  | 29                      | 29                                       |  |
| Proteinausbeute<br>200000g-Fraktion [mg] | Korrelation nach Pearson | 0,133                                     | 0,757**                 | 0,919**                                  | 0,652**                                  |
|  | Signifikanz (2-seitig)   | 4,92                                      | 0,00001968              | 0,00000000002                            | 0,001282202                              |
|  | N                        | 29  | 29                      | 29                                       | 29                                       |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Beim Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte [counts/area] (Tabelle 47) mit den Ausgangsgewebemengen ergibt sich mit  $p=5,93$  kein statistischer Zusammenhang zwischen dem gemessenen Wert für Hexokinase-1 und der Ausgangsmenge der verwendeten Tumorgewebeproben. Mit den in Tabelle 47 dargestellten hohen und mittleren positiven Korrelationen auf Signifikanzniveaus von 1% wird deutlich, dass hohe Ausgangsmengen und hohe Ausbeuten in den jeweiligen Proteinfractionen nicht zu hohen Messwerten für Hexokinase-1 [counts/area] führen.

3.3.3.2.2 Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach histopathologischer Dignität

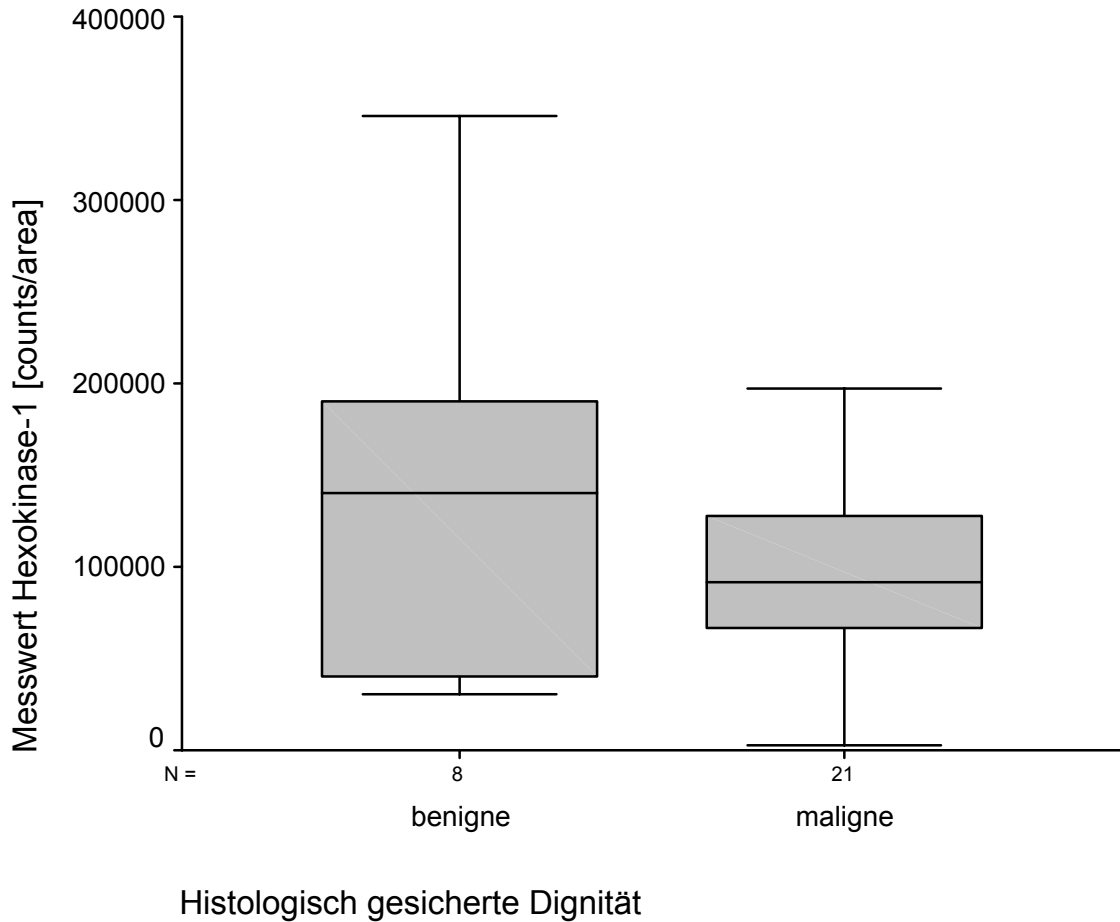


Abbildung 40: Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte von benignen und malignen Tumoren

Tabelle 48: Mittelwertvergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität

|                                     | Dignität | N  | Mittelwert | Standardabweichung |
|-------------------------------------|----------|----|------------|--------------------|
| Messwert Hexokinase-1 [counts/area] | benigne  | 8  | 139593,3   | 107339,02          |
|                                     | maligne  | 21 | 98087,33   | 49035,66           |

Tabelle 49: U-Test nach Mann und Whitney zum Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität

|                        | Messwert Hexokinase-1 [counts/area] |
|------------------------|-------------------------------------|
| Mann-Whitney-U         | 67,000                              |
| Wilcoxon-W             | 298,000                             |
| Signifikanz (2-seitig) | ,429                                |



Der Teststatistik der Tabellen 48, 49 und Abbildung 40 ist zu entnehmen, dass zwischen den beiden Dignitätsgruppen „benigne Tumore“ und „maligne Tumore“ kein statistischer Unterschied bezüglich ihrer Hexokinase-1-Messwerte besteht. Das zweiseitige Signifikanzniveau beträgt  $p=0,429$ .

### 3.3.3.2.3 Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den immunhistochemischen Glukosetransporter-1-Daten

Tabelle 50: *Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Glukosetransporter-1-Score-Werte*

|  | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>                        | <b>RANGE</b>                   |
|--|----------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | 29       | 109537,24 ± 70387,09<br>[counts/area] | 3195 – 345574<br>[counts/area] |
| Glukosetransporter-1-Score             | 19       | 3,79 ± 1,99                           | 2 – 8                          |

Tabelle 51: *Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte des Glukosetransporter-1-Score*

|  |                             | Glukosetransporter-1 Score |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | Korrelation nach<br>Pearson | ,091                       |
|  | Signifikanz (2-seitig)      | ,710                       |
|  | N                           | 19                         |

Beim Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte mit den Glukosetransporter-1-Score-Werten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,091$ , was keiner statistisch signifikanten Korrelation entspricht (Tabelle 51).

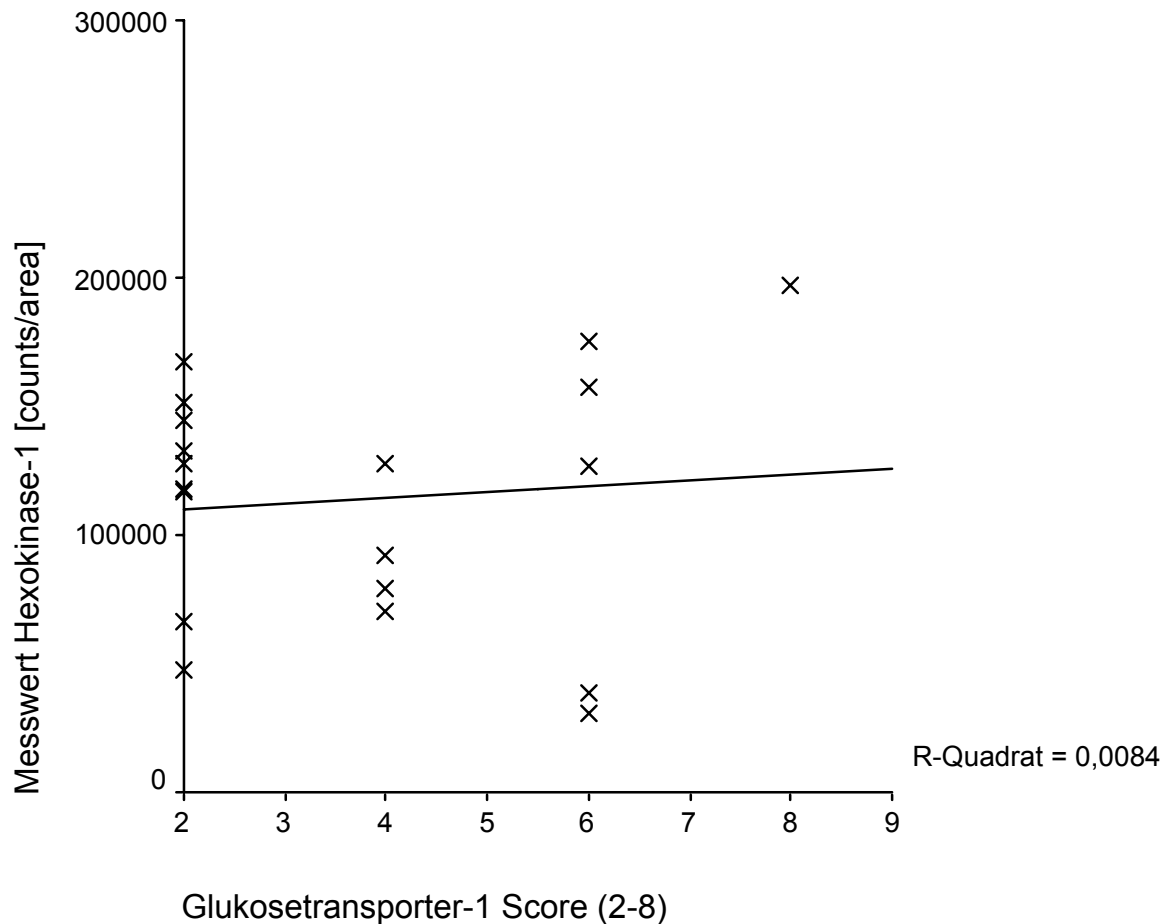


Abbildung 41: Zusammenhang zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Glukosetransporter-1-Score-Werten

Der fehlende statistische Zusammenhang zwischen den gemessenen Hexokinase-1-Werten [counts/area] und dem immunhistochemisch bestimmten Glukosetransporter-1-Score wird graphisch in Abbildung 41 verdeutlicht.

### 3.3.3.2.4 Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den Werten von Ki-67 als Marker der Zellproliferation

Tabelle 52: Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Ki-67-Werte

|                                     | N  | MW ± SD              | RANGE         |
|-------------------------------------|----|----------------------|---------------|
| Messwert Hexokinase-1 [counts/area] | 29 | 109537,24 ± 70387,09 | 3195 – 345574 |
| Ki-67                               | 19 | 25,84 ± 20,17        | 0 – 70        |

Tabelle 53: Berechnung der Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte von Ki-67

|                                     |                          | Ki-67 |
|-------------------------------------|--------------------------|-------|
| Messwert Hexokinase-1 [counts/area] | Korrelation nach Pearson | ,098  |
|                                     | Signifikanz (2-seitig)   | ,689  |
|                                     | N                        | 19    |

Beim Vergleich von 19 Hexokinase-1-Messwerten mit ihren korrespondierenden Ki-67-Werten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r=0,098$  und  $p=0,689$ . Es kann daher im Rahmen dieser Arbeit kein statistischer Zusammenhang zwischen den Messwerten von Hexokinase-1 und dem Marker für Zellproliferation, Ki-67 festgestellt werden (Tabelle 52 und 53).

### 3.3.3.2.5 Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit dem Prognosefaktor uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und dessen Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1)

Tabelle 54: Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Werte der Prognosefaktoren uPA und PAI-1

|                                     | N  | MW ± SD              | RANGE         |
|-------------------------------------|----|----------------------|---------------|
| Messwert Hexokinase-1 [counts/area] | 29 | 109537,24 ± 70387,09 | 3195 – 345574 |
| uPA                                 | 18 | 2,8461 ± 2,5482      | 0,18 – 6,74   |
| PAI-1                               | 18 | 11,9172 ± 9,8790     | 1,52 – 36,85  |

Tabelle 55: Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte von uPA und PAI-1 mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich

|       |                          | Messwert HK-1 [counts/area] | uPA     |
|-------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| uPA   | Korrelation nach Pearson | 0,235                       |         |
|       | Signifikanz (2-seitig)   | 1,041                       |         |
|       | N                        | 18                          |         |
| PAI-1 | Korrelation nach Pearson | 0,244                       | 0,687** |
|       | Signifikanz (2-seitig)   | 0,987                       | 0,006   |
|       | N                        | 18                          | 18      |

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Der Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte mit den uPA- und PAI-1-Werten zeigt einen Pearson'schen Korrelationskoeffizient von  $r=0,235$  bzw.  $r=0,244$  und  $p=1,041$  bzw.  $p=0,987$ . Es besteht daher kein statistischer Zusammenhang zwischen den Messwerten von Hexokinase-1 und dem Prognosefaktor uPA und seinem Inhibitor (Tabelle 54 und 55).

Diese statistischen Zusammenhänge werden in den folgenden Abbildungen 42 und 43 dargestellt.

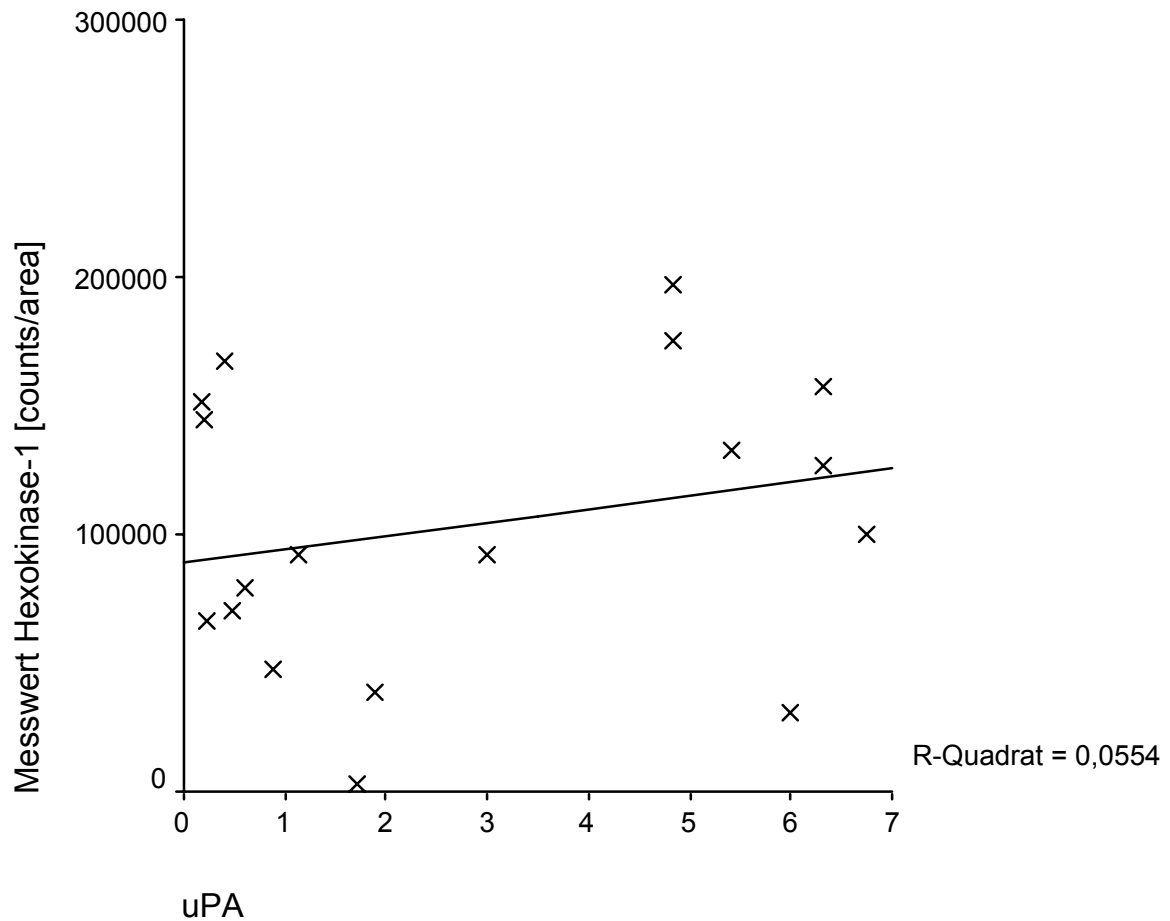


Abbildung 42: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Werten des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)

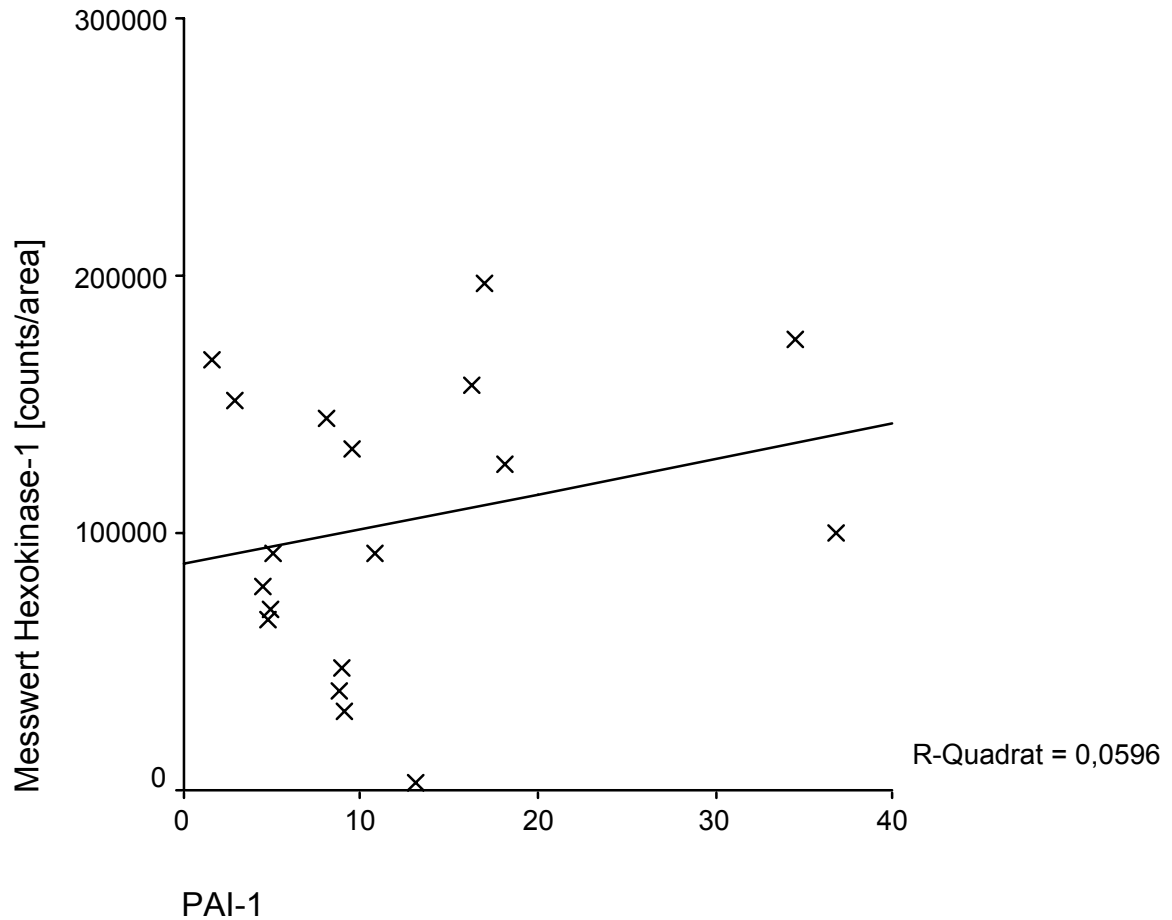


Abbildung 43: Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Werten des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

In den Abbildungen 42 und 43 wird die fehlende Korrelation zwischen den Hexokinase-1-Messwerten und den Werten für uPA und PAI-1 verdeutlicht.

## 3.3.3.2.6 Vergleich der Hexokinase-1-Messdaten mit den PET-FDG-Messdaten

Tabelle 56: Hexokinase-1-Messwerte und FDG-standard uptake values (n.v. = nicht vorhanden)

| Probennummer | Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | FDG-standard uptake values<br>(SUV) |
|--------------|--|-------------------------------------|
| 1            | 144213                                 | 2,3                                 |
| 2            | 116483                                 | 1,5                                 |
| 3            | 30696                                  | 5,9                                 |
| 4            | 30444                                  | n.v.                                |
| 5            | 127328                                 | 2,7                                 |
| 6            | 99963                                  | 5,4                                 |
| 7            | 345574                                 | 1,3                                 |
| 8            | 213320                                 | n.v.                                |
| 9            | 66292                                  | 3,0                                 |
| 10           | 151901                                 | 1,0                                 |
| 11           | 47486                                  | 3,6                                 |
| 12           | 66179                                  | 4,5                                 |
| 13           | 127621                                 | 1,5                                 |
| 14           | 79692                                  | 3,9                                 |
| 15           | 70712                                  | 1,9                                 |
| 16           | 3195                                   | 4,0                                 |
| 17           | 196940                                 | 2,2                                 |
| 18           | 167431                                 | 0,3                                 |
| 19           | 156934                                 | 6,6                                 |
| 20           | 34864                                  | n.v.                                |
| 21           | 78937                                  | 1,8                                 |
| 22           | 92265                                  | 2,1                                 |
| 23           | 91924                                  | n.v.                                |
| 24           | 174954                                 | 10,2                                |
| 25           | 38418                                  | 1,8                                 |
| 26           | 117951                                 | 1,7                                 |
| 27           | 132316                                 | 3,7                                 |
| 28           | 45591                                  | 0,6                                 |
| 29           | 126956                                 | 4,4                                 |

In Tabelle 56 werden die gemessenen Hexokinase-1-Werte mit den korrespondierenden SUV-Werten für jede Gewebeprobe aufgelistet.

Tabelle 57: Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der SUV

|  | <b>N</b> | <b>MW ± SD</b>       | <b>RANGE</b>  |
|--|----------|----------------------|---------------|
| Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | 29       | 109537,24 ± 70387,09 | 3195 – 345574 |
| Messwert SUV <sub>korrigiert</sub>     | 25       | 3,116 ± 2,215        | 0,3 – 10,2    |

Tabelle 58: Test auf Normalverteilung der Hexokinase-1-Messwerte und der FDG-SUV-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

|  |                    | Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] | SUV korrigiert |
|--|--------------------|--|----------------|
| N  |                    | 29                                     | 25             |
| Parameter der<br>Normalverteilung <sup>a,b</sup> | Mittelwert         | 109537,24                              | 3,116          |
|  | Standardabweichung | 70387,09                               | 2,215          |
| Kolmogorov-Smirnov-Z                             |                    | ,524                                   | ,819           |
| Exakte Signifikanz (2-seitig)                    |                    | ,922                                   | ,466           |

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

Bei diesem Test liegt eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  vor. Die p-Werte ergeben für die Messwerte von Hexokinase-1 und SUV daher eine Normalverteilung (Tabelle 57 und 58).

Tabelle 59: Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für Hexokinase-1 und die SUV-Messwerte

|                |                             | Messwert Hexokinase-1<br>[counts/area] |
|----------------|-----------------------------|--|
| SUV korrigiert | Korrelation nach<br>Pearson | -,073                                  |
|                | Signifikanz (2-seitig)      | ,729                                   |
|                | N                           | 25                                     |

Beim Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte mit den SUV-Messwerten ergibt sich ein Pearson'scher Korrelationskoeffizient von  $r = -0,073$  und zweiseitiges Signifikanzniveau von  $p = 0,729$ . Dies bedeutet, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Messwert für Hexokinase-1 und dem für den jeweiligen Tumor gemessenen FDG-standard-uptake-value besteht. Graphisch ist dies in Abbildung 44 dargestellt.

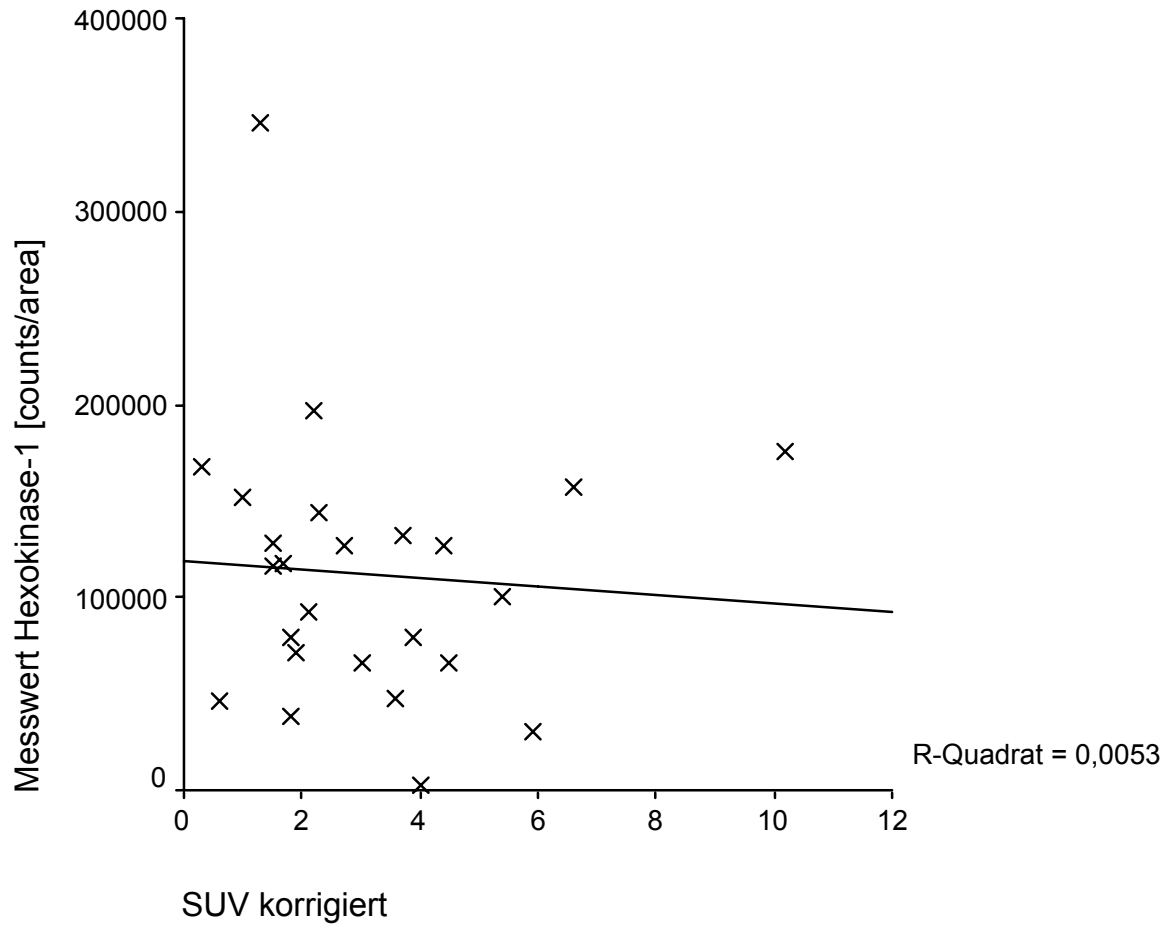


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Messwerten der FDG-SUV



## 4 Diskussion

Die Suche nach einer diagnostischen Methode, mit deren Hilfe ausreichend sicher zwischen benignen und malignen Tumoren differenziert und somit auch frühzeitig eine entsprechende Therapie eingeleitet werden kann, lenkte das Interesse auf den erhöhten Glukosemetabolismus von Tumorzellen. Eine der charakteristischen biochemischen Veränderungen ist die erhöhte Glukoseaufnahme und Metabolisierung von Glukose in maligne transformierten Zellen (Warburg, 1931). Mit der Positronenemissionstomographie (PET) ist es möglich, anhand unterschiedlicher Glukoseaufnahmen von malignen und benignen Geweben, maligne transformierte Gewebe zu erkennen (Fischman, 1993, S. 7; Wahl, 1991, S. 1544).

Die ersten PET-Studien beschäftigten sich mit der FDG-Aufnahme von Kopf-Hals-Tumoren bei gleichzeitiger Bestimmung der Proliferationsaktivität. Dabei zeigte sich unter anderem, dass in Gruppen jeweils gleicher histologischer Tumortypen und vergleichbarer Proliferationsaktivität, deutlich verschiedene Werte für die FDG-Aufnahme vorlagen. Es wurde daher gefolgert, dass diese unterschiedlichen Anreicherungen von FDG in histologisch gleichen Tumortypen aufgrund von Unterschieden auf molekularer Ebene bestehen. Der unterschiedliche Gehalt an Glukosetransportern, verursacht durch die onkogene Zelltransformation, könnte eine Erklärung hierfür sein (Haberkorn, 1991, S. 1548; Fischman, 1993, S. 6; Brown, 1993, S. 2980). In Tumorzellen ist die maximale Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) des Glukosetransports in die Zelle deutlich gesteigert. Dies wurde mit der Erhöhung membranständiger Glukosetransportproteine erklärt (Weber, 1983, S. 3466; Yamamoto, 1990, S. 2223), wobei der Plasmaglukoselevel auf die Glukoseaufnahme und damit auch die FDG-Aufnahme von Tumorzellen anscheinend keinen Einfluss ausübt (Yamada, 1985, S. 341).

Die Glukoseaufnahme in Zellen erfolgt prinzipiell über zwei Hauptwege: Zum einen über die Natrium/Glukose Ko-Transporter (SGLT1 und SGLT2), die Glukose gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren, zum anderen über die Glukosetransporter der erleichterten Diffusion („facilitative glucose transporters“), Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-11, die einen passiven Transfer entlang eines Konzentrationsgefälles ermöglichen (Doege, 2001, S. 443; McVie-Wylie, 2001, S. 113; Ibberson, 2000, S. 4608; Wahl, 1996, S. 1039; Mueckler, 1993, S. 717; Gould, 1993, S. 335). Die Transporter SGLT1 und SGLT2 spielen aber im Gegensatz zu den Transportern der erleichterten Diffusion keine Rolle für den Glukosetransport in Tumorzellen (Wahl, 1996, S. 1038). An humanem Brustkrebsgewebe und Lymphknotengewebe wurde erstmals von Brown et al. (1993, S. 2979) die Expression von Glukosetransportproteinen durch immunhistochemischen Nachweis untersucht. Alle untersuchten Karzinom- und Lymphknotenproben wiesen eine starke Anreicherung von Glukosetransporter-1 auf. Im gesunden Gewebe war die Intensität von markiertem Glukosetransporter-1 (Glukosetransporter vor allem im Bereich der Blut-Hirnschranke und in Endothelien) deutlich geringer. Die Expression von Glukosetransporter-2 (Glukosetransporter vor allem im Lebergewebe) war nicht wesentlich verschieden zum Normalgewebe. Die Proteine Glukosetransporter-3 (Gehirngewebe) und Glukosetransporter-4 (Muskel- und Fettgewebe) waren nicht in allen untersuchten Tumoren

nachweisbar. Der Transporter Glukosetransporter-5 (Jejunum) konnte nicht in den untersuchten Gewebeproben gefunden werden. Aus diesen Ergebnissen folgerten Brown et al., dass die hohe Expression von Glukosetransporter-1 in Mammatumoren für die erhöhte FDG-Aufnahme dieser Tumore, die mittels PET detektiert wird, verantwortlich ist (Brown, 1993, S. 2982). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen die Forschergruppen um Wahl (1991, S. 765; 1996, S. 1040), die Methoden und Vorgehensweisen entwickelten, um verschiedene Tumore des menschlichen Körpers mit der PET sichtbar zu machen und damit frühzeitig einer gezielteren Therapie zuzuführen. In allen Tumorgruppen konnte eine deutliche Erhöhung des FDG-Uptakes im Vergleich zum entsprechenden normalen Referenzgewebe gemessen werden (Wahl, 1991, S. 765).

In einer weiteren Untersuchung von Wahl (1991, S. 1544) wurde die Expressierung von fünf Glukosetransportern (Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-5) in Paraffinschnitten von primären humanen Mammakarzinomen und Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass in allen Tumorproben (primäre Mammakarzinome und Lymphknotenmetastasen) der membranständige und intrazellulär vorliegende Glukosetransporter-1 im Vergleich zum umgebenden physiologischen Gewebe deutlich erhöht war. Auch Glukosetransporter-2 wurde in allen Tumorproben exprimiert, doch die Intensität der immunhistochemischen Markierung war nicht durchgehend stärker als im Normalgewebe. Nur in wenigen Proben konnte Glukosetransporter-4 nachgewiesen werden, wobei auch hier keine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Normalgewebe gefunden wurde. Glukosetransporter-3 und Glukosetransporter-5 wurden in den untersuchten Gewebeproben nicht gefunden. Als Ergebnis aus dieser Untersuchung wurde angenommen, dass die erhöhte Expressierung von Glukosetransporter-1 im Mammakarzinomgewebe für die erhöhte FDG-Aufnahme verantwortlich ist (Brown, 1993, S. 2979).

Auch in Folgeuntersuchungen von Brown (1996, S. 1042) an tierischen Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Glukosetransporter-1-Expression und dem Glukoseuptake von Mammakarzinomzellen besteht.

In der mehrfach zitierten Studie von Avril (1996, S. 1848) wurde eine Unterscheidung von Brusttumoren anhand ihres Glukosemetabolismus mithilfe der PET durchgeführt. In dieser Studie wurden die PET-Messergebnisse von 51 Patientinnen mit suspekten Brusttumoren, die entweder durch klinische Untersuchung oder Mammographie entdeckt wurden, analysiert. Dabei konnte für die Erkennung eines primären Mammakarzinoms nach durchgeführten Korrekturen eine Sensitivität von 68% - 92% mit korrespondierender Spezifität von 84% - 97% angegeben werden (Avril, 1996, S. 1854). Als Ergebnis dieser Studie wurde gefolgert, dass die PET-Untersuchung eine Differenzierung in benigne und maligne Brusttumore anhand unterschiedlich hohem Glukosemetabolismus mit hoher Spezifität ermöglicht (Avril, 1996, S. 1848). Andererseits ist die PET weniger als Routineuntersuchung für das Mammakarzinomscreening geeignet. Dies liegt zum einen an den hohen Kosten und zum anderen an der sehr beschränkten Sensitivität bei der Erkennung von sehr kleinen Tumoren (kleiner als 1 cm im Durchmesser) und der damit verbundenen falsch negativen Befundung (Avril, 1996, S. 1855; Adler, 1995, S. 19). Auch wurden negative PET-Ergebnisse bei tastbaren Befunden und anormaler Mammographie erhoben, was keinesfalls ein Mammakarzinom ausschliessen lässt (Avril, 1999, S. 268). Jedoch zur Abgrenzung

fibrozystischer Veränderungen, Fibrosen nach Radiatio oder Narbengewebe nach Mammaoperationen von Tumorgewebe ist die PET derzeit Mittel der Wahl. Auch zur Ortung von Rezidiven und Fernmetastasen übertrifft die PET die bisher zur Verfügung stehenden Methoden. Schneller als bisher können durch die PET Responder und Nonresponder bei unterschiedlichen Therapieformen identifiziert werden. Dies führt neben einer Einsparung von Kosten zu einer deutlichen Senkung von unerwünschten Nebenwirkungen beim Patienten (Avril, 1999, S. 268).

Als weitere Ursache für die Erhöhung des Glukosemetabolismus in malignen Geweben wurde eine vermehrte Expression von Hexokinase als Schlüsselenzym der Glykolyse diskutiert. Die Umwandlung von Glukose in Glukose-6-Phosphat stellt den ersten Schritt der Glykolyse dar, wobei dieser Vorgang ATP-abhängig ist und durch vier Isoenzyme von Hexokinase katalysiert wird. Die phosphorylierte Glukose kann die Zelle nicht mehr verlassen und wird weiter abgebaut. Die Isoformen Hexokinase 1-3 besitzen eine hohe Affinität zu Glukose, die Isoform Hexokinase 4 hingegen eine niedrige Affinität. Diese vier Isoenzyme treten in Abhängigkeit von Gewebeart, Ernährungszustand, Alter und hormonellem Status in unterschiedlicher Expression auf. Ein Isoenzym-Shift tritt in neoplastischen Geweben, während der normalen Entwicklung, während verschiedener hormoneller Zustände und mehreren anderen physiologischen und pathologischen Zuständen auf (Magnani, 1990, S. 186).

Von den Isoenzymen Hexokinase 1 und 2 ist bekannt, dass sie mit der äusseren Mitochondrienmembran assoziiert sind (Gelb, 1992, S. 202). Der Typ 3 der Hexokinase ist in der Nähe des Zellkerns lokalisiert (Preller, 1992, S. 482). Hexokinase 1 ist nahezu in allen Geweben vertreten und spielt vor allem eine Rolle bei katabolen Stoffwechselfvorgängen (Preller, 1992, S. 485). Hexokinase 2 findet sich ausschliesslich in insulinsensitiven Geweben wie der Skelettmuskulatur, was unter anderem auf die Bedeutung im anabolen Stoffwechsel bezüglich der Glykogenbildung schliessen lässt. Die Isoform 3 lässt sich in zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen zellkerngebunden nachweisen. Vor allem in Endothelien und Epithelien ist diese Isoform nachweisbar. Hexokinase 4 ist ausschliesslich in Leber und Pankreas nachweisbar, weshalb eine Rolle als Glukosesensor diskutiert wird (Preller, 1992, S. 486). Eine Erhöhung von Hexokinase 1 ist in zahlreichen neoplastischen Geweben bekannt und somit wurde bei dieser Isoform eine Regulation des Glukosemetabolismus in Tumorzellen vermutet (Gelb, 1992, S. 204).

Am Ratten-Mammakarzinom-Modell wurde schliesslich 1995 der positive statistische Zusammenhang zwischen intrazellulärer FDG-Aufnahme und Expression von Glukosetransporter-1 bewiesen. Die Arbeitsgruppe um Brown erhob in dieser Studie den Gehalt der Tumore an Glukosetransporter-1 immunhistochemisch und den FDG-Uptake der Tumore durch Mikro- und Makroautoradiographie. Als statistisches Endergebnis erhielt die Gruppe für die Korrelation von Glukosetransporter-1-Gehalt und FDG-Uptake Pearson'sche Korrelationskoeffizienten zwischen  $r=0,3$  bis  $r=0,6$  bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,0001$  (Brown, 1995, S. 1854).

In weiteren in vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass erhöhte Aktivitäten und die erhöhte Expression von Glukosetransporter-1 auch mit einer erhöhten Invasivität der Tumorzelllinien und deren Metastasierungspotenzial einhergehen. Zumindest beim immunhistochemischen Glukosetransporter-1-Nachweis am humanen invasiv duktal wachsenden Mammakarzinom konnte eine starke Anfärbung mit Glukosetransporter-1-Antikörpern

nachgewiesen werden (Grover-McKay, 1998, S. 115; Younes, 1996, S. 1165; Wahl, 1996, S. 1039).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 in Gewebeproben von denjenigen Patientinnen untersucht, die bereits in die Studie von Avril (1996) eingebunden waren. Die Patientinnen waren in diesem Rahmen einer PET-Untersuchung zugeführt worden. Die histologische Pathomorphologie, das Ausmass der Zellproliferation (Expression von Ki-67) und die Markerwerte der Karzinominvasivität (uPA und PAI-1) waren bekannt. Die Ergebnisse der eigenen Messungen konnten so diesen bereits erhobenen Daten gegenüber gestellt werden.

Dabei ergab der Vergleich der Glukosetransporter-1-Messdaten [counts/area] mit den „standardized uptake values“ der PET-Messungen eine signifikante Korrelation dieser Werte ( $r=0,558$  und  $p=0,005$ ). Dieses Ergebnis findet Bestätigung in den Studien von Brown et al. (1993, S. 2983; 1996, S. 1045), die zeigten, dass einmal die mRNA von Glukosetransporter-1 und daneben auch geringer die mRNA von Glukosetransporter-2 und Glukosetransporter-3 in Mammatumoren im Vergleich zu Normalgewebe erhöht waren, wenn auch nicht signifikant. Dies lässt vermuten, dass neben Glukosetransporter-1 auch noch ein oder mehrere andere Glukosetransporter für den erhöhten Glukoseuptake in humane Mammakarzinomzellen verantwortlich sind (Younes, 1995, S. 2896). Die Untersuchungen von Binder (1997, S. 4302) zeigten beim immunhistochemischen Nachweis von Glukosetransporter-1 bis Glukosetransporter-4 im Mammakarzinomgewebe, dass nicht nur Glukosetransporter-1-mRNA im Vergleich zu den Normalgeweben erhöht exprimiert wurde, sondern auch Glukosetransporter-4. Glukosetransporter-2 und Glukosetransporter-3 konnten nicht detektiert werden. Weitere quantitative Untersuchungen der Glukosetransporterproteine werden daher nötig sein, um die teils widersprüchlichen Ergebnisse aufzuklären.

Der Vergleich zwischen den hier gemessenen Glukosetransporter-1-Werten [counts/area] und den Werten des Glukosetransporter-1-Score ergibt einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern ( $r=0,802$  und  $p=0,00006$ ). In der Arbeit von Menzel (2000) wurde Glukosetransporter-1 immunhistochemisch in Paraffinschnitten der Mammakarzinomproben bestimmt und quantifiziert. Hierzu wurde ebenfalls der „Rabbit anti-rat/mouse/bovine brain glucose transporter“ der Firma Diagnostic International verwendet. Die Ergebnisse wurden als GluT-1-Score zusammengefasst. Die Messwerte des GluT-1-Score wurden mit den korrespondierenden „standardized uptake values“ der PET-Messungen verglichen, wobei sich keine signifikanten Zusammenhänge ergaben (Menzel, 2000).

Als Ergebnis der Korrelation zwischen Glukosetransporter-1-Messwerten [counts/area] und Ki-67 als Marker der Zellproliferation (Scholzen, 2000, S. 311; Crosier, 1999, S. 2683; Funke, 1998, S. 32) ergibt sich im Rahmen dieser Studie kein signifikanter Zusammenhang (vgl. Punkt 3.3.3.1.5, Tabellen 31 und 32). Auch der Vergleich der vorliegenden Ki-67 Werte und der Werte des Glukosetransporter-1-Score zeigt keinen signifikanten Zusammenhang. Damit können Ergebnisse, die in Untersuchungen von Younes (1995, S. 2897) beim Vergleich der immunhistochemischen Glukosetransporter-1 Bestimmung am humanen Mammakarzinom mit der immunhistochemischen

Ki-67 Bestimmung erhoben wurden, nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen Glukosetransporter-1 und Ki-67 (Younes, 1995, S. 2897) nachgewiesen. In einer Untersuchung von Furudoj (2001, S. 162) wurde die Glukosetransporter-1-Expression an der tiefsten invasiven Stelle von kolorektalen Karzinomen immunhistochemisch gemessen und mit den ebenfalls bestimmten Werten von Ki-67 in Zusammenhang gebracht. Dabei ergab sich ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen der Glukosetransporter-1-Expression und dem Messwert für Ki-67. Bei der Untersuchung von Tumorzelllinien in der Arbeit von Binder (1997, S. 4303) konnte auch ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen der Proliferationsrate und der Glukosetransportaktivität festgestellt werden. Aber nur die hierbei erhobenen erhöhten Expressionswerte für Glukosetransporter-4 (siehe oben) zeigten eine positive Korrelation mit den Werten für Ki-67 sowohl im Tumorgewebe als auch in den Tumorzelllinien. Für Glukosetransporter-1 konnte eine positive Korrelation lediglich bei den untersuchten Tumorzelllinien festgestellt werden (Binder, 1997, S. 4303).

Ursächlich für den fehlenden statistischen Zusammenhang zwischen der Expression von Glukosetransporter-1 und dem Marker der Zellproliferation Ki-67 in dieser Arbeit könnte die geringe Anzahl an vorliegenden Daten für Ki-67 sein. Zum Vergleich wurden 19 Datenpaare herangezogen. Andererseits könnte auch ein anderer Glukosetransporter als Glukosetransporter-1, wie in der Arbeit von Binder (1997, S. 4299) gezeigt, für den erhöhten Glukoseuptake in die Zellen und eine erhöhte Proliferationsaktivität verantwortlich sein. Als wahrscheinlichste Ursache muss man aber das völlige Fehlen von Ki-67-Werten bei den benignen Läsionen ansehen. Die Anzahl benigner Läsionen umfasst insgesamt acht untersuchte Gewebeprobe. Würde man für alle benignen Gewebeprobe einen theoretischen Wert für Ki-67 gleich „0“ annehmen, was für benigne Gewebe einem wahrscheinlichen Wert entspräche, würde man vermutlich eine hoch signifikante mittlere positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,640$  erreichen. Oben genannte Studien und Arbeiten (Furudoj, 2001, S. 162; Scholzen, 2000, S. 311; Crosier, 1999, S. 2682; Funke, 1998, S. 31; Binder, 1997, S. 4299; Younes, 1995, S. 2895) bezogen alle Normalgewebe in die Auswertung ein.

Die Prognosefaktoren der Zellinvasivität uPA und dessen Inhibitor PAI-1 sind in invasiven Karzinomen stets erhöht (De Witte, 1999, S. 1190; Funke, 1998, S. 32; Duffy, 1988, S. 531). Sie zerstören Basalmembranen und Endothelien durch proteolytische Aktivität und bahnen dadurch den Weg für Zellinvasivität und Metastasierung (Precht, 2000, S. 74; Rha, 2000, S. 138; Grebenschikov, 1999, S. 600; Jänicke, 1993, S. 195 & 1994, S. 2527). Im normalen Zellverhalten sind sie Grundlage für die Angiogenese (Fox, 2001, S. 237). Die Interaktion von uPA mit seinem Zelloberflächenrezeptor uPAR führt zu einer Stimulation des Glukoseuptakes durch die Glukosetransporter der erleichterten Diffusion (vor allem GluT-1) in zahlreichen Zelllinien (Sweep, 1998, S. 1437; Grondahl-Hansen, 1997, S. 158). Der uPA-Inhibitor PAI-1 scheint ein Schlüsselenzym zur Regulation der Gefäßneubildung in Tumorzellen zu sein (Fox, 2001, S. 239). Diese Erkenntnisse bezüglich des Systems uPA/PAI-1 legen nahe, einen statistischen Zusammenhang zwischen den Glukosetransporter-1-Werten und den Werten für uPA und PAI-1 zu suchen. Beim Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte mit den uPA-Werten ergibt sich ein positiver signifikanter Zusammenhang mit einem Pearson'scher Korrelationskoeffizienten von

$r=0,626$  bei  $p=0,021$  und bestätigt damit Angaben von Anichini (1997, S. 3080) bezüglich des Zusammenhangs zwischen uPA-Expression und Stimulation des Glukoseuptakes. Der Vergleich zwischen den Glukosetransporter-1-Messwerten und den PAI-1-Messwerten ergibt einen Pearson'schen Korrelationskoeffizient von  $r=0,346$ , was einer positiven jedoch statistisch nicht signifikanten Korrelation ( $p=0,522$ ) entspricht. Der Vergleich der Werte für uPA und den Werten seines Inhibitors PAI-1 zeigt eine signifikante Korrelation ( $r=0,687$  und  $p=0,006$ ). Ein hoher Wert von uPA bedingt also statistisch gesehen auch einen hohen Wert seines Inhibitors. Obwohl die Werte von Glukosetransporter-1 und uPA positiv korrelieren, ist dies bei den Werten von Glukosetransporter-1 und PAI-1 nicht der Fall. Dieser hier fehlende statistische Zusammenhang lässt sich am wahrscheinlichsten durch die hohe Anzahl fehlender PAI-1-Werte bei den benignen Gewebeproben erklären. Bei der Korrelation mit angenommenen niedrigen PAI-1-Werten ergäbe sich vermutlich beim Vergleich zwischen Glukosetransporter-1 und PAI-1 auch ein signifikanter Zusammenhang.

Die von Gelb (1992, S. 204) geäußerte Vermutung, dass die Isoform Hexokinase-1 in neoplastischen Geweben erhöht sei, und somit für einen gesteigerten Glukosemetabolismus von Tumorzellen verantwortlich ist, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. In Lebertumoren wurden ebenfalls erhöhte Werte für Hexokinase nachgewiesen bzw. eine positive Korrelation zwischen Hexokinaseaktivität und der Proliferationsaktivität festgestellt (Okazumi, 1992, S. 337). Sowohl der Vergleich von Glukosetransporter-1 mit Hexokinase-1 als auch von Glukosetransporter-1-Score und Hexokinase-1 ergibt jeweils keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (vgl. Punkt 3.3.3.1.9 und Punkt 3.3.3.2.3). Ebenso beim Vergleich zwischen den gemessenen Hexokinase-1-Werten und den korrespondierenden „standardized uptake values“ (SUV) ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang (vgl. Punkt 3.3.3.2.6). Eine gesteigerte Phosphorylierung durch erhöhte Expression von Hexokinase-1 als Ursache für den erhöhten Glukoseuptake kann im Rahmen dieser Arbeit nicht begründet werden. Auch die statistischen Vergleiche zwischen Hexokinase-1-Werten und Ki-67, uPA und PAI-1 ergaben, anders als bei den Vergleichen mit den Glukosetransporter-1-Werten, keinerlei signifikante Korrelationen (vgl. Punkt 3.3.3.2.4 und 3.3.3.2.5). In der Literatur finden sich dazu bis dato keine Angaben.

#### Schlussfolgerung:

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis des Glukosetransporter-1 ist geeignet, den Gehalt von Mammakarzinomproben an Glukosetransporter-1 quantitativ zu ermitteln. Der bei der Positronenemissionstomographie ermittelte erhöhte FDG-Uptake in maligne transformierte Zellen wird durch den membrangebundenen Glukosetransporter GluT-1 ermöglicht, wie die positive signifikante Korrelation zeigte. Beim hier untersuchten Mammakarzinom scheint der Glukosetransporter-1 das Haupttransportprotein für die Glukose zu sein.

## 5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom als häufigste Krebserkrankung der Frau in der westlichen Welt ist in seiner Prognose von einer frühestmöglichen Erkennung und Therapie abhängig. Das bislang gepriesene Mammographiescreening ist zuletzt deutlich in Misskredit geraten, da derzeit Beweise für einen Nutzen fehlen (Koch, 2001, S. 2385; Horton, 2001, S. 1).

Auch die Erkennung von Rezidiven nach vorangegangener Tumoresektion ist aufgrund von Narbenbildungen nach brusterhaltender Operation oft schwierig. In diesem Zusammenhang erwies sich ein weiteres diagnostisches Verfahren, die Positronenemissionstomographie (PET), das auf der Darstellung des Tumormetabolismus - des Glukosestoffwechsels – basiert, als hilfreich.

Bisherige Studien und Untersuchungen ergaben, dass Mammakarzinomgewebe im Vergleich zum Normal- und Narbengewebe häufig eine deutlich erhöhte intrazelluläre Glukoseaufnahme zeigt. Die Aufnahme in die Zelle hängt im Wesentlichen von einem membrangebundenen Glukosetransportprotein, dem Glukosetransporter-1 ab. Wenige Untersuchungen wiesen bisher den Gehalt an Glukosetransporter-1 semiquantitativ durch immunhistochemische Methoden in Gewebeschnitten humanen Mammakarzinomgewebes nach.

In dieser Arbeit wurde nun eine alternative Methode angewandt, die in geringen Mengen von tiefgefrorenen Karzinomproben den Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 quantitativ zu bestimmen versuchte. Ziel war es, diese Ergebnisse mit den Ergebnissen vorausgegangener PET-Messungen zu vergleichen und den Wert des immunhistochemischen Glukosetransporter-1-Nachweises zu prüfen. Dazu wurde zunächst eine Methode zum Zellaufschluss und zur Proteinanreicherung etabliert. Die Proteinhomogenate wurden in definierten Mengen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western-Blotting wurden sie auf Nitrocellulose übertragen und mit den Primärantikörpern gegen Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1 inkubiert. Abschließend erfolgte die Markierung mit dem Sekundärantikörper. Die Detektion der radioaktiven Banden wurde mit einem PhosphorImager durchgeführt.

Mit der erstmaligen quantitativen Bestimmung des Glukosetransporter-1 am humanen Mammakarzinomgewebe konnte gezeigt werden, dass eine hohe intrazelluläre FDG-Aufnahme, die im Rahmen einer vorangegangenen Studie mittels PET als „standardized uptake values“ gemessen wurde, mit einer vermehrten Expression von Glukosetransporter-1 korreliert. Der Einsatz der in der vorliegenden Arbeit angewandten Bestimmungsmethode von Glukosetransporter-1 ermöglicht des Weiteren die Unterscheidung in maligne und benigne Gewebe mit einer Sensitivität von 85% und einer Spezifität von 75%.

Auch die Ergebnisse der semiquantitativen immunhistochemischen Bestimmung von Glukosetransporter-1 als Glukosetransporter-1-Score korrelieren positiv mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Glukosetransporter-1-Messwerten. Außerdem konnten statistische Zusammenhänge mit den Markern der Zellinvasivität, uPA und PAI-1 festgestellt werden, was im Weiteren Glukosetransporter-1 als Prognosefaktor interessant machen könnte. Dies muss jedoch in zukünftigen Studien anhand einer entsprechend größeren Fallzahl an geeignetem Gewebe noch detaillierter evaluiert werden.

---

Der statistische Vergleich der parallel zum Glukosetransporter-1-Nachweis bestimmten Hexokinase-1-Messwerte ergab keine statistisch signifikante Korrelation mit den „standardized uptake values“ die mittels PET gemessen worden waren. Auch die Vergleiche mit dem Marker der Zellproliferation, Ki-67, und den Markern der Zellinvasivität, uPA und PAI-1, führten zu keinen signifikanten Ergebnissen. Die Ergebnisse der unter Punkt 1.5.2 aufgeführten Studien zur erhöhten Hexokinase-1-Aktivität bei erhöhtem Glukosemetabolismus in maligne transformierten Zellen können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.



## 6 Abbildungsverzeichnis

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1:  | Prozentuale Verteilung des Mammakarzinoms auf die verschiedenen Sektoren der Brust (Pfleiderer, 1996, S. 538)  | 3  |
| Abbildung 2:  | Mammographisches Bild eines szirrhösen Mammakarzinoms mit strangartiger Verdickung der Mamille: „Warnungstreifen“ (Pfleiderer, 1996, S. 541)   | 4  |
| Abbildung 3:  | Die intraoperative Röntgenaufnahme eines Biopsiepräparates (5fach vergrößert) zeigt den Bezirk mit den Mikrokalzifikationen am Präparatrand miterfasst. Histologie: Vorwiegend intraduktal wachsendes Mammakarzinom mit beginnender Infiltration des Gewebes. An einzelnen Stellen lobuläres Carcinoma in situ, Mastopathie (Pfleiderer, 1996, S. 542) | 4  |
| Abbildung 4:  | Modifizierte Modelldarstellung des FDG-Metabolismus nach Phelps M.E. et al., 1979.<br>k1=Transfer vom Blut in das Gewebe, k2=Transfer vom Gewebe in das Blut,<br>k3=Phosphorylierung durch Hexokinase, k4=Dephosphorylierung durch<br>Glukose-6-Phosphatase (aus Okazumi., 1992, S. 333)   | 7  |
| Abbildung 5:  | Modell des Glukosetransporter-1 (Mueckler, 1994, S 716)  | 8  |
| Abbildung 6:  | Darstellung der Aminosäuresequenzen der Glukosetransporter 1-5 (Mueckler, 1994, S. 715)  | 9  |
| Abbildung 7:  | Darstellung der Ausgangsgewebemengen und der Mengen von Tumor- und Fettanteilen der Vorversuchsgewebeproben  | 14 |
| Abbildung 8:  | Reaktionsschema beim Proteinnachweis nach Pierce   | 24 |
| Abbildung 9:  | Beispiel einer Eichgeraden zur Proteinbestimmung nach Pierce   | 25 |
| Abbildung 10: | Graphische Darstellung der Proteingesamt mengen [g] und die jeweiligen Anteile von Fettfraktion [g] und Tumorfraktion [g] bei den Gewebeproben der Vorversuche   | 33 |
| Abbildung 11: | Graphische Darstellung der Proteinausbeute [mg] bei den 200000g-Tumorfraktionen  | 34 |
| Abbildung 12: | Beispiel eines gesamten Blotbildes nach dem Nachweis von Glukosetransporter-1. Die Doppelbanden mit einem Molekulargewicht um 46 kD stellen Glukosetransporter-1 dar. Die Nummern 1-13 kennzeichnen verschiedene Vorversuchsproteinproben. Rechts aussen befindet sich die Markierungen des Proteinmarkers.  | 37 |
| Abbildung 13: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 3 und 4. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen   | 38 |
| Abbildung 14: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5 und 6. Bei den Spuren (8) und (10-12) wurden 75 µg Protein aufgetragen, sonst jeweils 50 µg  | 39 |
| Abbildung 15: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5, 6 und 7   | 40 |
| Abbildung 16: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12  | 41 |
| Abbildung 17: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5 und 6  | 42 |
| Abbildung 18: | Ausschnitt des Blots mit den Tumorproben Nummer 5,6 und 7  | 43 |
| Abbildung 19: | Graphische Darstellung der Gewebeprobenausgangsmengen der Hauptversuche [mg]   | 49 |
| Abbildung 20: | Darstellung der Proteinausbeuten der Rohhomogenate, und der 600g- und 200000g-Anreicherungsfraktionen.   | 49 |
| Abbildung 21: | Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 26.05.97 auf Höhe um 46 kD (Proben 1 bis 8 und 17, 27, 29)   | 52 |
| Abbildung 22: | Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 27.05.97 auf Höhe um 46 kD (Proben 11 bis 27 ohne 16, 20, 25, 26)  | 52 |
| Abbildung 23: | Ausschnitt des mit Glukosetransporter-1-Antikörper inkubierten Blot vom 21.05.97 auf Höhe um 46 kD (aufgetragen sind die Proben 6 bis 19 und 27 ohne 10, 15, 16)   | 52 |
| Abbildung 24: | Graphische Darstellung des Glukosetransporter-1-Messwertes der einzelnen Proben [counts/area] in Prozent des maximalen Glukosetransporter-1-Messwertes   | 54 |
| Abbildung 25: | Graphische Darstellung der Glukosetransporter-1-Messwerte (GluT-1) aller Gewebeproben die mehrfach geblottet worden sind (mindestens 2 und maximal 6 unterschiedliche Werte sind bei diesen Proben vorhanden). Aufgrund der vorhandenen Probenmengen konnten nur bei diesen Tumorproben Mehrfachmessungen durchgeführt werden.                         | 54 |
| Abbildung 26: | Ausschnitt des mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Blot vom 13.05.97 in Höhe von 100 kD (Proben 10 bis 19; RM=Regenbogenmarker).   | 55 |
| Abbildung 27: | Ausschnitt des mit Hexokinase-1-Antikörper inkubierten Blot vom 21.04.97 in Höhe von ca. 100 kD (Proben 19 bis 29; RM=Regenbogenmarker).   | 55 |
| Abbildung 28: | Graphische Darstellung des Hexokinase-1-Messwertes der einzelnen Proben [counts/area] in Prozent des maximalen Hexokinase-1-Messwertes   | 57 |

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 29: | <i>Graphische Darstellung der Hexokinase-1-Messwerte aller Gewebeproben die mehrfach geblottet worden sind (mindestens 2 und maximal 3 unterschiedliche Werte sind bei diesen Proben vorhanden, die Tumorproben 1-9 wurden aufgrund der vorliegenden Probenmengen jeweils nur einmal geblottet)</i> | 57 |
| Abbildung 30: | <i>Boxplot mit Vergleich der SUV von benignen und malignen Tumoren</i>  | 60 |
| Abbildung 31: | <i>Boxplot mit Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte von benignen und malignen Tumoren</i>   | 61 |
| Abbildung 32: | <i>Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte der 3 histopathologischen Gruppen der untersuchten invasiv wachsenden Karzinome (das in nur einer Gewebeprobe vorliegende invasiv muzinöse Karzinom wurde in der Abbildung vollständigshalber auch dargestellt)</i>                                 | 62 |
| Abbildung 33: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Glukosetransporter-1-Score-Werten</i>   | 65 |
| Abbildung 34: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Werten des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)</i>  | 69 |
| Abbildung 35: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Werten des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)</i>   | 70 |
| Abbildung 36: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Werten von uPA und dessen Inhibitor PAI-1</i>   | 71 |
| Abbildung 37: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und den Messwerten der FDG-SUV</i>  | 74 |
| Abbildung 38: | <i>ROC-Kurve zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität des hier angewendeten Messverfahrens von Glukosetransporter-1</i>  | 76 |
| Abbildung 39: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1</i>  | 79 |
| Abbildung 40: | <i>Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte von benignen und malignen Tumoren</i>   | 82 |
| Abbildung 41: | <i>Zusammenhang zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Glukosetransporter-1-Score-Werten</i>  | 84 |
| Abbildung 42: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Werten des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)</i>  | 86 |
| Abbildung 43: | <i>Darstellung des statistischen Zusammenhangs zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Werten des Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)</i>   | 87 |
| Abbildung 44: | <i>Zusammenhang zwischen den Messwerten für Hexokinase-1 und den Messwerten der FDG-SUV</i>   | 90 |

## 7 Tabellenverzeichnis

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1:  | <i>Etablierte Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms (De Waal, 2001, S. 10)</i>   | 1  |
| Tabelle 2:  | <i>Ausgangsmengen der Vorversuchsgewebeproben und prozentuale Anteile von Tumor- und Fettgewebe</i>   | 13 |
| Tabelle 3:  | <i>Charakterisierung der Ausgangsmengen und deren prozentuale Tumor- und Fettanteile der Vorversuchsgewebeproben</i>  | 14 |
| Tabelle 4:  | <i>Charakterisierung der verwendeten Gesamtmenge der einzelnen Proben und deren histologische Klassifizierung</i>   | 15 |
| Tabelle 5:  | <i>Patientencharakteristik</i>  | 16 |
| Tabelle 6:  | <i>Charakterisierung der Dignität der Gewebeproben (die Gesamtzahl von 29 Proben ergibt sich durch das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Gewebeproben bei einer Patientin)</i>  | 16 |
| Tabelle 7:  | <i>Charakterisierung der benignen Gewebeproben</i>  | 16 |
| Tabelle 8:  | <i>Charakterisierung der malignen Gewebeproben</i>  | 16 |
| Tabelle 9:  | <i>Proteinstandards zur Proteinbestimmung nach Pierce</i>   | 25 |
| Tabelle 10: | <i>Gesamtgewebemenge, Menge des Tumoranteils, Resuspendierungsvolumina der 200000g-Tumorpellets, Proteinbestimmungsergebnisse der nach Anreicherung erhaltenen Proteinsuspensionen der Gewebeproben und Gesamtausbeute an Protein in der 200000g-Tumorfraktion (die gemessene Proteinkonzentration der 200000g-Tumorfraktion bezieht sich auf die nach der Anreicherung vorliegenden Proteinsuspensionen)</i> | 32 |
| Tabelle 11: | <i>Gesamtgewebemenge, Menge des Fettanteils, Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fettpellets, Proteinbestimmungsergebnisse der nach Anreicherung erhaltenen Proteinsuspensionen der Gewebeproben und Gesamtausbeute an Protein in der 200000g-Fettfraktion (die gemessene Proteinkonzentration der 200000g-Fettfraktion bezieht sich auf die nach der Anreicherung vorliegenden Proteinsuspensionen)</i>     | 33 |
| Tabelle 12: | <i>Charakterisierung des Untersuchungsmaterials und der Proteinausbeuten der 200000g-Fractionen</i>   | 34 |
| Tabelle 13: | <i>Korrelation der Proteinausbeuten der 200000g-Fractionen mit den Mengen an verarbeitetem Ausgangsgewebe mit durchgeführter Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>  | 35 |
| Tabelle 14: | <i>Ausgangsgewebemengen der Tumorproben [g], gemessene Proteinkonzentrationen der Rohhomogenate [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der Rohhomogenate [ml], Gesamtproteinmengen der Rohhomogenate [mg]</i>  | 46 |
| Tabelle 15: | <i>Proteinkonzentrationen der 600g-Proteinsuspensionen [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der 600g-Fraktion [ml], Proteinausbeuten der 600g-Fraktion [mg], prozentualer Anteil der 600g-Proteinfraktion an der Rohhomogenat-Proteinausgangsmenge [%]</i>   | 47 |
| Tabelle 16: | <i>Proteinkonzentrationen der 200000g-Proteinsuspensionen [mg/ml], Resuspendierungsvolumina der 200000g-Fraktion [ml], Proteinausbeuten der 200000g-Fraktion [mg], prozentualer Anteil der 200000g-Proteinfraktion an der Rohhomogenat-Proteinausgangsmenge [%]</i>   | 48 |
| Tabelle 17: | <i>Charakterisierung des Untersuchungsmaterials und der Proteinbestimmungsergebnisse</i>  | 50 |
| Tabelle 18: | <i>Korrelation der Proteinausbeuten mit der Menge an verarbeitetem Ausgangsgewebe mit durchgeführter Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>  | 50 |
| Tabelle 19: | <i>Messwerte von Glukosetransporter-1 und Charakterisierung der Messwerte (n.v. = nicht vorhanden)</i>  | 53 |
| Tabelle 20: | <i>Hexokinase-1-Messwerte und Charakterisierung der Messwerte</i>   | 56 |
| Tabelle 21: | <i>Charakterisierung der verschiedenen Daten und Messwerte der hier untersuchten Tumorproben</i>  | 58 |
| Tabelle 22: | <i>Statistischer Vergleich der Proteinausgangsgewebemenge und dem Glukosetransporter-1-Messwert mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>   | 59 |
| Tabelle 23: | <i>Mittelwertvergleich der SUV-Messwerte gruppiert nach der Dignität</i>  | 60 |
| Tabelle 24: | <i>Mittelwertvergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität</i>   | 61 |
| Tabelle 25: | <i>U-Test nach Mann und Whitney zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität</i>  | 62 |
| Tabelle 26: | <i>H-Test nach Kruskal und Wallis zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte innerhalb der 3 histologischen Gruppen der invasiv wachsenden Karzinome - Rangplätze in den einzelnen Gruppen</i>  | 63 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 27: | <i>H-Test nach Kruskal und Wallis zum Vergleich der Glukosetransporter-1-Messwerte innerhalb der 3 histologischen Gruppen der invasiv wachsenden Karzinome - Teststatistik</i>          | 63 |
| Tabelle 28: | <i>Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Glukosetransporter-1-Score-Werte</i>  | 64 |
| Tabelle 29: | <i>Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Score-Werte und der Glukosetransporter-1-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest</i>                                  | 64 |
| Tabelle 30: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 [counts/area] und die Werte des Glukosetransporter-1-Score</i>                                      | 64 |
| Tabelle 31: | <i>Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Ki-67-Werte</i>   | 66 |
| Tabelle 32: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und die Werte von Ki-67</i>   | 66 |
| Tabelle 33: | <i>Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Werte der Prognosefaktoren uPA und PAI-1</i>  | 67 |
| Tabelle 34: | <i>Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Werte von uPA und PAI-1 mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest</i>   | 67 |
| Tabelle 35: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und die Werte von uPA und PAI-1 mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>     | 68 |
| Tabelle 36: | <i>Glukosetransporter-1-Messwerte und FDG-standard uptake values (n.v. = nicht vorhanden)</i>   | 72 |
| Tabelle 37: | <i>Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und der SUV</i>   | 73 |
| Tabelle 38: | <i>Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und der FDG-SUV-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest</i>                                   | 73 |
| Tabelle 39: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für Glukosetransporter-1-Messwerte [counts/area] und die SUV-Messwerte</i>   | 73 |
| Tabelle 40: | <i>Kreuztabelle zur Darstellung der, mit Messung des Glukostransporter-1 richtig erkannten malignen und benignen Tumore und der falsch positiv bzw. falsch negativ erkannten Tumore</i> | 75 |
| Tabelle 41: | <i>Fläche unter der ROC-Kurve aus Abbildung 38 zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität</i>   | 76 |
| Tabelle 42: | <i>Koordinaten der ROC-Kurve aus Abbildung 38</i>   | 77 |
| Tabelle 43: | <i>Charakterisierung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Hexokinase-1-Messwerte</i>  | 78 |
| Tabelle 44: | <i>Test auf Normalverteilung der Glukosetransporter-1-Messwerte und der Hexokinase-1-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest</i>  | 78 |
| Tabelle 45: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Glukosetransporter-1 und Hexokinase-1</i>  | 79 |
| Tabelle 46: | <i>Charakterisierung der verschiedenen Daten und Messwerte der Tumore</i>   | 80 |
| Tabelle 47: | <i>Vergleich der Proteinausgangsgewebemenge und dem Hexokinase-1-Messwert mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>   | 81 |
| Tabelle 48: | <i>Mittelwertvergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität</i>   | 82 |
| Tabelle 49: | <i>U-Test nach Mann und Whitney zum Vergleich der Hexokinase-1-Messwerte gruppiert nach der Dignität</i>  | 82 |
| Tabelle 50: | <i>Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Glukosetransporter-1-Score-Werte</i>  | 83 |
| Tabelle 51: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte des Glukosetransporter-1-Score</i>  | 83 |
| Tabelle 52: | <i>Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Ki-67-Werte</i>   | 84 |
| Tabelle 53: | <i>Berechnung der Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte von Ki-67</i>  | 85 |
| Tabelle 54: | <i>Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der Werte der Prognosefaktoren uPA und PAI-1</i>  | 85 |
| Tabelle 55: | <i>Pearson'scher Korrelationskoeffizient für die Messwerte von Hexokinase-1 und die Werte von uPA und PAI-1 mit Bonferroni-Korrektur bei vorliegendem Mehrfachvergleich</i>             | 85 |
| Tabelle 56: | <i>Hexokinase-1-Messwerte und FDG-standard uptake values (n.v. = nicht vorhanden)</i>   | 88 |
| Tabelle 57: | <i>Charakterisierung der Hexokinase-1-Messwerte und der SUV</i>   | 89 |
| Tabelle 58: | <i>Test auf Normalverteilung der Hexokinase-1-Messwerte und der FDG-SUV-Messwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest</i>   | 89 |
| Tabelle 59: | <i>Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten für Hexokinase-1 und die SUV-Messwerte</i>  | 89 |

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Adler D.D., Wahl R.L.:** New methods for imaging the breast: Techniques, findings, and potential. *AJR* 164 (1995) 19-30
2. **Adler L.P., Crowe J.P., Al-Kaisi N.K., Sunshine J.L.:** Evaluation of breast masses and axillary lymph nodes with [F-18] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose PET. *Radiology* 187 (1993) 743-750
3. **Ahn Y.S., Rempel A., Zerban H., Bannasch P.:** Over-expression of glucose transporter isoform GLUT1 and hexokinase I in rat renal oncocyctic tubules and oncocytomas. *Virchows Arch* 425 (1994) 63-68
4. **Ahn Y.S., Zerban H., Bannasch P.:** Expression of glucose transporter isoforms (GLUT1, GLUT2) and activities of hexokinase, pyruvate kinase, and malic enzyme in preneoplastic and neoplastic rat renal basophilic cell lesions. *Virchows Arch B Cell Pathol* 63 (1993) 351-357
5. **Anichini E., Zamperini A., Chevanne M., Caldini R., Pucci M., Fibbi G., Del Rosso M.:** Interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor rapidly induces activation of glucose transporters. *Biochem* 36 (1997) 3076-3083
6. **Arora K.K., Pedersen P.L.:** Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. *J Biol Chem* 263 (1988) 17422-17428
7. **Avril N., Menzel M., Dose J., Schelling M., Weber W., Jänicke F., Nathrath W., Schwaiger M.:** Glucose metabolism of breast cancer assessed by <sup>18</sup>F-FDG PET: Histologic and immunohistochemical tissue analysis. *J Nucl Med* 42 (2001) 9-16
8. **Avril N., Schelling M., Dose J., Weber W.A., Schwaiger M.:** Utility of PET in breast cancer. *Clin Pos Imag* 2 (1999) 261-271
9. **Avril N., Dose J., Jänicke F., Bense S., Ziegler S., Laubenbacher C., Römer W., Pache H., Herz M., Allgayer B., Nathrath W., Graeff H., Schwaiger M.:** Metabolic characterization of breast tumors with positron emission tomography using F-18 fluorodeoxyglucose. *J Clin Oncol* 14 (1996) 1848-1857
10. **Avril N., Dose J., Jänicke F., Ziegler S., Römer W., Weber W., Herz M., Nathrath W., Graeff H., Schwaiger M.:** Assessment of axillary lymph node involvement in breast cancer patients with positron emission tomography using radiolabeled 2-(fluorine-18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *J Natl Cancer Inst* 88 (1996) 1204-1209
11. **Bachor R., Kocher F., Gropengiesser F., Reske S.N., Hautmann R.E.:** Positronenemissionstomographie. *Urologe A* 34 (1995) 138-142
12. **Baldwin S.A., Kan O., Whetton A.D., Martin S., Fawcett H.A.C., Flint D.J., Wilde C.J.:** Regulation of the glucose transporter GLUT1 in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 22 (1994) 814-817

13. **Binder C., Binder L., Marx D., Schauer A., Hiddemann W.:** Deregulated simultaneous expression of multiple glucose transporter isoforms in malignant cells and tissues. *Anticancer Res* 17 (1997) 4299-4304
14. **Bramwell M.E., Davies A., Baldwin S.A.:** Heterogeneity of the glucose transporter in malignant and suppressed hybrid cells. *Exp Cell Res* 188 (1990) 97-104
15. **Brown R.S., Leung J.Y., Fisher S.J., Frey K.A., Ethier S.P., Wahl R.L.:** Intratumoral distribution of tritiated-FDG in breast carcinoma: Correlation between Glut-1 expression and FDG uptake. *J Nucl Med* 37 (1996) 1042-1047
16. **Brown R.S., Leung J.Y., Fisher S.J., Frey K.A., Ethier S.P., Wahl R.L.:** Intratumoral distribution of tritiated-FDG in breast carcinoma: I. Are inflammatory cells important? *J Nucl Med* 36 (1995) 1854-1861
17. **Brown R.S., Wahl R.L.:** Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. *Cancer* 72 (1993) 2979-2985
18. **Burnette W.N.:** „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112 (1981) 195-203
19. **Burnol A.-F., Leturque A., Loizeau M., Postic C., Girard J.:** Glucose transporter expression in rat mammary gland. *Biochem J* 270 (1990) 277-279
20. **Bustamante E., Morris H.P., Pedersen P.L.:** Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem* 256 (1981) 8699-8704
21. **Camps M., Vilaro S., Testar X., Palacín M., Zorzano A.:** High and polarized expression of GLUT1 glucose transporters in epithelial cells from mammary gland: acute down-regulation of GLUT1 carriers by weaning. *Endocrinology* 134 (1994) 924-934
22. **Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., Maity A.:** Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276 (2001) 9519-9525
23. **Clavo A.C., Brown R.S., Wahl R.L.:** Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *J Nucl Med* 36 (1995) 1625-1632
24. **Crosier M., Scott D., Wilson R.G., Griffiths C.D., May F.E., Westley B.R.:** Differences in Ki67 and c-erbB2 expression between screen-detected and true interval breast cancers. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 2682-2688
25. **De Waal J.C., Eiermann W., Engel J., Gauwerky J., Hölzel D., Kessler M., Mahl G., Sitttek H., Sommer H., Strigl R., Untch M.:** Diagnostik des Mammakarzinoms. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. (2001) 9-17

26. **De Witte J.H., Sweep C.G., Klijn J.G., Grebenschikov N., Peters H.A., Look M.P., van Tienoven T.H., Heuvel J.J. van Putten W.L., Benraad T.J., Foekens J.A.:** Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1) in cytosols and pellet extracts derived from 892 breast cancer patients. *Br J Cancer* 79 (1999) 1190-1198
27. **Doege H., Bocianski A., Scheepers A., Axer H., Eckel J., Joost H.-G., Schürmann A.:** Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* 359 (2001) 443-449
28. **Duffy M.J., O'Grady P., Devaney D., O'Siorain L., Fennelly J.J., Lijnen H.J.:** Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62 (1988) 531-533
29. **Engel J., Schubert-Fritschle G., Hölzel D.:** Epidemiologie. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. (2001) 1-8
30. **Fischman A.J., Alpert N.M.:** FDG-PET in oncology: There's more to it than looking at pictures. *J Nucl Med* 34 (1993) 6-11
31. **Fox S.B., Taylor M., Grondahl-Hansen J., Kakolyris S., Gatter K.C., Harris A.L.:** Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J. Pathol* 195 (2001) 236-243
32. **Furudoi A., Tanaka S., Haruma K., Yoshihara M., Sumii K., Kajiyama G., Shimamoto F.:** Clinical significance of human erythrocyte glucose transporter 1 expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 60 (2001) 162-169
33. **Gardner S.F., Green J.A., Bednarczyk E.M., Farnett L., Miraldi F.:** Principles and clinical applications of positron emission tomography. *Am J Hosp Pharm* 49 (1992) 499-506
34. **Gelb B.D., Adams V., Jones S.N., Griffin L.D., MacGregor G.R., McCabe E.R.B.:** Targeting of hexokinase 1 to liver and hepatoma mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 202-206
35. **Gould G.W., Holman G.D.:** The glucose transporter family: Structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 295 (1993) 329-341
36. **Grebenschikov N., Sweep F., Geurts A., Andreasen P., De Witte H., Schousboe S., Heuvel J., Benraad T.:** ELISA for complexes of urokinase-type and tissue-type plasminogen activators with their type-1 inhibitor (uPA-PAI-1 and tPA-PAI-1). *Int J Cancer* 17 (1999) 598-606
37. **Grondahl-Hansen J., Hilsenbeck S.G., Christensen I.J., Clark G.M., Osborne C.K., Brunner N.:** Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 43 (1997) 153-163
38. **Grover-McKay M., Walsh S.A., Seftor E.A., Thomas P.A., Hendrix M.J.:** Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol Oncol Res* 4 (1998) 115-120

39. **Haberkorn U., Strauss L.G., Reisser Ch., Haag D., Dimitrakopoulou A., Ziegler S., Oberdorfer F., Rudat V., van Kaick G.:** Glucose uptake, perfusion and cell proliferation in head and neck tumors: Relation of positron emission tomography to flow cytometry. *J Nucl Med* 32 (1991) 1548-1554
40. **Harbeck N., Eiermann W., Engel J., Funke I., Lebeau A., Permanetter W., Untch M.:** Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. (2001) 39-43
41. **Hawkins R.A., Choi Y., Huang S.-C., Messa C., Hoh C.K., Phelps M.E.:** Quantitating tumor glucose metabolism with FDG and PET. *J Nucl Med* 33 (1992) 339-344
42. **Hawkins R.A., Hoh C., Dahlbom M., Choi Y., Glaspy J., Tse N., Slamon D., Chen B., Messa C., Maddahi J., Phelps M.E.:** PET cancer evaluations with FDG. *J Nucl Med* 32 (1991) 1555-1558
43. **Horton R.:** Screening mammography - an overview revisited. *Lancet* 358 (2001) 1-2
44. **Ibberson M., Uldry M., Thorens B.:** GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 275 (2000) 4607-4612
45. **Ichiya Y., Kuwabara Y., Otsuka M., Tahara T., Yoshikai T., Fukumura T., Jingu K., Masuda K.:** Assessment of response to cancer therapy using fluorine-18-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *J Nucl Med* 32 (1991) 1655-1660
46. **Jänicke F., Pache L., Schmitt M., Ulm K., Thomssen C., Prechtel A., Graeff H.:** Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res* 54 (1994) 2527-2530
47. **Jänicke F., Schmitt M., Pache L., Ulm K., Harbeck N., Höfler H., Graeff H.:** Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24 (1993) 195-208
48. **Koch K.:** Für ein Screening fehlt die wissenschaftliche Grundlage. *Deutsches Ärzteblatt* 98 (2001) 2385-2386
49. **Lebeau A., Nathrath W., Permanetter W.:** Pathomorphologie des Mammakarzinoms. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. (2001) 18-33
50. **Magnani M., Serafini G., Chiarantini L., Corsi D., Stocchi V.:** Immunological quantification of human hexokinase type I. *Clinica Chimica Acta* 194 (1990) 185-192



51. **Menzel M.:** Pathohistologische und immunhistochemische (Glut-1) Charakterisierung von Mammakarzinomen im Vergleich zu in vivo Stoffwechseluntersuchungen mit der Positronen-Emissions-Tomographie und Fluor-18-Deoxyglukose. Dissertationsarbeit, medizinische Fakultät der Technischen Universität München (2000) 1-95
52. **McNamee M.G.:** Isolation and characterization of cell membranes. *BioTechniques* 7 (1989) 466-475
53. **McVie-Wylie A.J., Lamson D.R., Chen Y.T.:** Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: A candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72 (2001) 113-117
54. **Mueckler M.:** Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219 (1994) 713-725
55. **Nakashima R.A., Paggi M.G., Scott L.J., Pedersen P.L.:** Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res.* 48 (1988) 913-919
56. **Nitzsche E.U., Hoh C.K., Dalbohm N.M., Glaspy J.A., Phelps M.E., Moser E.A., Hawkins R.A.:** Ganzkörper-Positronen-Emissions-Tomographie beim Mammakarzinom. *Fortschr. Röntgenstr.* 158 (1993) 293-298
57. **Okazumi S., Isono K., Enomoto K., Kikuchi T., Ozaki M., Yamamoto H., Hayashi H., Asano T., Ryu M.:** Evaluation of liver tumors using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET: Characterization of tumor and assessment of effect of treatment. *J. Nucl. Med.* 33 (1992) 333-339
58. **Olsen O., Gøtzsche P.C.:** Is screening for breast cancer with mammography justifiable? *Lancet* 355 (2000) 129-134
59. **Pfleiderer A.:** Maligne Tumoren der Brustdrüse: Mammakarzinom. In: „Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe“, Martius G., Breckwoldt M., Pfleiderer A., Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1996, 3. Auflage, 534 - 550
60. **Postic C., Leturque A., Printz R.L., Maulard P., Loizeau M., Granner D.K., Girard J.:** Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *Am. J. Physiol.* 266 (1994) 548-559
61. **Prechtel A., Harbeck N., Thomssen C., Meisner C., Braun M., Untch M., Wieland M., Lisboa B., Cufer T., Graeff H., Selbmann K., Schmitt M., Jänicke F.:** Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* 15 (2000) 73-78
62. **Preller A., Wilson J.E.:** Localization of the type III isoform of hexokinase at the nuclear periphery. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 482-492
63. **Rha S.Y., Yang W.I., Gong S.J., Kim J.J., Yoo N.C., Roh J.K., Min J.S., Lee K.S., Kim B.S., Chung H.C.:** Correlation of tissue and blood plasminogen activation system in breast cancer. *Cancer Lett.* 31 (2000) 137-145
64. **Rhoads D.B.:** Liver glut-1 expression: An enigma deepens. *Hepatology* 19 (1994) 540-545

65. **Richter E.A.:** Mammographie-Screening: Keine Zeit für Zweifel. Deutsches Ärzteblatt 43 (2001) 2369
66. **Scholzen T., Gerdes J.:** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell Physiol. 182 (2000) 311-322
67. **Smith A.D., Wilson J.E.:** Disposition of mitochondrially bound hexokinase at the membrane surface, deduced from reactivity with monoclonal antibodies recognizing epitopes of defined location. Arch. Biochem. Biophys. 287 (1991) 359-366
68. **Smith A.D., Wilson J.E.:** Epitopic regions recognized by monoclonal antibodies against rat brain hexokinase: association with catalytic and regulatory function. Arch. Biochem. Biophys. 292 (1992) 165-178
69. **Sweep C.G., Geurts-Moespot J., Grebenschikov N., De Witte J.H., Heuvel J.J., Schmitt M., Duffy M.J., Jänicke F., Kramer M.D., Foekens J.A., Brunner N., Brugal G., Pedersen A.N., Benraad T.J.:** External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. Br. J. Cancer 78 (1998) 1434-1441
70. **Thorens B., Cheng Z.-Q., Brown D., Lodish H.F.:** Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. Am. J. Physiol. 259 (1990) 279-285
71. **Thorens B., Lodish H.F., Brown D.:** Differential localization of two glucose transporter isoforms in rat kidney. Am. J. Physiol. 259 (1990) 286-294
72. **Towbin H., Staehelin T., Gordon J.:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354
73. **Tse N.Y., Hoh C.K., Hawkins R.A., Zinner M.J., Dahlbom M., Choi Y., Maddahi J., Brunicardi C., Phelps M.E., Glaspy J.A.:** The application of positron emission tomographic imaging with fluorodeoxyglucose to the evaluation of breast disease. Ann. Surg. 216 (1992) 27-34
74. **Wahl R.L.:** Targeting glucose transporters for tumor imaging: „sweet“ idea, „sour“ result. J. Nucl. Med. 37 (1996) 1038-1041
75. **Wahl R.L., Cody R.L., Hutchins G.D., Mudgett E.E.:** Primary and metastatic breast carcinoma: Initial clinical evaluation with PET with the radiolabeled glucose analogue 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose. Radiology 179 (1991) 765-770
76. **Wahl R.L., Henry Ch.A., Ethier S.P.:** Serum glucose: Effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. Radiology 183 (1992) 643-647
77. **Wahl R.L., Hutchins G.D., Buchsbaum D.J., Liebert M., Grossman H.B., Fisher S.:** 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose uptake into human tumor xenografts. Feasibility studies for cancer imaging with positron-emission tomography. Cancer 67 (1991) 1544-1550

- 
78. **Weber G.:** Enzymology of cancer cells. *N. Engl. J. Med.* 296 (1977) 541-551
  79. **Weber G.:** Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 433 (1983) 3466-3492
  80. **Yamada K., Endo S., Fukuda H., Abe Y., Yoshioka S., Itoh M., Kubota K., Hatazawa J., Satoh T., Matsuzawa T.:** Experimental studies on myocardial glucose metabolism of rats with <sup>18</sup>F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Eur. J. Nucl. Med.* 10 (1985) 341-345
  81. **Yamamoto T., Seino Y., Fukumoto H., Koh G., Yano H., Inagaki N., Yamada Y., Inoue K., Manabe T., Imura H.:** Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 170 (1990) 223-230
  82. **Yang J., Clark A.E., Harrison R., Kozka I.J., Holman G.D.:** Trafficking of glucose transporters in 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* 281 (1992) 809-817
  83. **Younes M., Lechago L.V., Somoano J.R., Mosharaf M., Lechago J.:** Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter glut1 in human cancers. *Cancer Res.* 56 (1996) 1164-1167
  84. **Younes M., Brown R.W., Mody D.R., Fernandez L., Laucirica R.:** GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res.* 15 (1995) 2895-2898

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Schwaiger, Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Arbeit in den Laborräumen seiner Klinik.

Zu Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. W. Nathrath, ehemals Institut für Pathologie und pathologische Anatomie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, derzeit Städtisches Krankenhaus München-Harlaching, für die freundliche Überlassung von Tumormaterial verpflichtet.

Vielmals möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Silvia Egert, Nuklearmedizinische Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die kompetente Beratung bei der experimentellen Ausführung, für die wissenschaftliche Betreuung und für ihre Geduld bedanken.

Die Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Nuklearmedizin war stets von Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit geprägt, vielen Dank, dass ich daran teilnehmen durfte.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Ehefrau danken, die mich während des Studiums und der Ausführung dieser Arbeit auf vielfältige Weise unterstützten und mich immer wieder zum Vollenden dieser Arbeit angespornt haben.