

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
Gefäßchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle

**Expression und Regulation von Pyruvatkinase-M2 und
Laktatdehydrogenase-A in humanem Schilddrüsengewebe**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Paul Kachel
geboren am: 29.11.1982 in Frankfurt am Main
Betreuer: Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu

Gutachter: 1. Prof. H. Dralle
2. apl. Prof. S. Knipping
3. Prof. J. Köhrle

Eröffnung des Verfahrens: 11.2.2014

Datum der Verteidigung: 17.6.2015

Referat

In den 1920er Jahren zeigten Untersuchungen von Otto Warburg, dass Tumoren selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung Laktat bilden. Dieser Effekt wurde nach seinem Erstbeschreiber Warburg-Effekt genannt.

Untersuchungen konnten zeigen, dass Zellen durch die Nutzung dieses Effekts schneller proliferieren können, eine wichtige Eigenschaft für Tumorzellen.

Pyruvatkinase-M2 (PKM2) und Laktatdehydrogenase-A sind zwei Enzyme der Glykolyse. Sie sind maßgeblich am Warburg-Effekt beteiligt und daher von großem Interesse für die Krebsforschung.

Um enzymatisch aktiv zu sein, bedarf es bei beiden Enzymen der Homo-Tetramerisierung aus den Untereinheiten. PKM2 liegt in Karzinomen gehäuft in seiner Homo-Dimerform, also inaktiv vor. Diese Form wird daher auch *Tumor-PKM2* genannt. Die Regulation beider Enzyme erfolgt unter anderem durch Phosphorylierung durch den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor-1 (FGFR1). Dabei wird Laktatdehydrogenase-A aktiviert und PKM2 inaktiviert. Beide Effekte unterstützen den Warburg-Effekt und damit die Proliferation der Krebszellen.

Unsere Studie umfasste Gewebe von 77 Patienten mit folgender Histologie: follikuläres, papilläres und undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom, follikuläres Adenom und Struma nodosa. Diese Gewebe wurden mittels Western Blot und Real-Time PCR untersucht. Wir konnten nachweisen, dass PKM2 und in geringerem Umfang Laktatdehydrogenase-A, in Schilddrüsenkarzinomen, verglichen mit Strumen überexprimiert werden.

Wir konnten eine Korrelation zwischen Phosphorylierung von PKM2 bzw. Laktatdehydrogenase-A und der Expression des FGFR1 nachweisen.

Mittels Tumor-PKM2-Plasma-ELISA-Test werteten wir die Blutproben von 30 Patienten prä- und postoperativ aus. Bei ausreichender Tumormasse ließ sich PKM2 im Blut nachweisen.

Dies könnte einen Weg darstellen, über die Hemmung des FGFR1 den Warburg-Effekt in Schilddrüsenkarzinomen zu unterdrücken.

Kachel, Paul, „Expression und Regulation von Pyruvatkinase-M2 und Laktatdehydrogenase-A in humanem Schilddrüsengewebe“, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 52 Seiten, 2014

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Glykolyse und Krebs	1
1.2 Laktatdehydrogenase	2
1.2.1 Laktatdehydrogenase-A (LDHA).....	3
3 Pyruvatkinase	4
1.3.1 Pyruvatkinase-M2 (PKM2).....	5
1.4 Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren (FGFR).....	7
1.4.1 Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor-1 (FGFR1)	7
1.5 Schilddrüsenkarzinome.....	8
1.5.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC)	8
1.5.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC).....	9
1.5.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom (UTC)	9
1.5.4. Thyreoglobulin	9
1.5.5.„Targeted Therapy“ für Schilddrüsenkarzinome	10
1.6 Benigne Schilddrüsentumoren.....	11
1.6.1 Struma	11
1.6.2 Adenom	11
2 Zielstellung	12
3. Material und Methoden	13
3.1 Materialien und Geräte	13
3.2 Patientengewebe	15
3.3 Homogenisierung.....	16
3.4 Proteinnachweis / Western Blot	16
3.4.1 Proteinisolation und Vermessung	16
3.4.2 Gelelektrophorese	17
3.4.3 Semidry Blotting.....	17
3.4.4 Antikörpernachweisreaktion.....	18
3.5 RNA-Nachweis/ Real-Time PCR	19
3.5.1 RNA-Gewinnung.....	19
3.5.2 Reverse Transkription.....	19
3.5.3 Real-Time PCR.....	20
3.6. ELISA.....	22

3.6.1 Patienten.....	22
3.6.2 Plasmaproben.....	22
3.6.3 ELISA (Tumor-PKM2).....	22
3.7 Thyreoglobulin	23
3.8 Statistische Methoden.....	23
4 Ergebnisse.....	24
4.1 PKM2	24
4.1.1 PKM2 Western Blot	25
4.1.2 PKM1/2 Real-Time PCR.....	25
4.1.3 Phospho-PKM2 Western Blot.....	26
4.2 LDHA	27
4.2.1 LDHA Western Blot.....	28
4.2.2 LDHA Real-Time PCR.....	29
4.2.3 Phospho-LDHA Western Blot	30
4.3 FGFR1	31
4.3.1 FGFR1 Western Blot	31
4.3.2 FGFR1 Real-Time PCR.....	32
4.3.3 Korrelation FGFR1 mit Phospho-PKM2.....	32
4.3.4 Korrelation FGFR1 und Phospho-LDHA.....	33
4.5 Tumor-PKM2 Plasma ELISA	34
5 Diskussion	36
5.1 PKM2 und LDHA.....	36
5.2 Phospho-PKM2 und Phospho-LDHA.....	38
5.3 FGFR1	39
5.4 Tumor-PKM2 im Blut-Plasma	39
6 Zusammenfassung	40
7 Literaturverzeichnis	42
9 Thesen	49
10 Lebenslauf	50
11 Selbstständigkeitserklärung	51
12 Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis

APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adeninriphosphat
BRAF	BRAF (Proteinkinase)
BSA	Bovine serum albumine
c-Myc	Cellular-myelocytomatose
CHAPS	3-Cholamidopropyldimethylammonio-1-propanesulfonat
dNTP	Desoxy-nucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektorchemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Essay
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FBP	Fruktose 1,6 Bisphosphat
FC	Cristallisable fragment
FDG-PET	Fluordesoxyglukose Positronen Emissionstomographie
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FLAG	FLAG
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
HCl	Salzsäure
HIF-1-Alpha	Hypoxy inducible factor 1 alpha
HIF1	Hypoxie inducible factor
hnRNP	Heterogene nucleare Ribonucleoproteine
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRP	Horse Radishperoxidase
LDH	Laktatdehydrogenase
LDHA	Laktatdehydrogenase-A (M)
LDHB	Laktatdehydrogenase-B
LDHC	Laktatdehydrogenase-C
m-RNA	Messenger ribonucleic acid

MAP	Mitogen-activated protein
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase 1,2
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid
PCR	Polymerase chain reaction
PDTC	Poorly differentiated thyroid carcinoma
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHD3	Prolyl Hydroxylase 3
PKM	Pyruvatkinase-M
PKM1	Pyruvatkinase-M1
PKM1/2	Pyruvatkinase-M1+M2
PKM2	Pyruvatkinase-M2
PTB	Poly pyrimidine tract binding proteinn
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Rat fibrosarcoma (Proteinkinase)
Ras	Rat sarcoma (Proteinkinase)
RNA	Ribonukleinsäure / ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SPSS	Markenname der Statistik Software (IBM)
T3	Triiodthyronin
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEPP46	[6-(3-Aminobenzyl)-4-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-4H-thieno[2',3':4,5]pyrrolo[2,3-d]pyridazin-2-yl](methyl)sulfoniumolate
TNM	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amiomethan
UTC	Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom

1 Einleitung

1.1 Glykolyse und Krebs

Otto Warburg beschrieb in den 1920 Jahren erstmals, dass maligne Tumoren, verglichen mit Normalgewebe oder gutartigen Tumoren, ein Vielfaches an Glukose aufnehmen, diese allerdings nicht komplett verstoffwechseln, sondern selbst bei ausreichendem Sauerstoffangebot hohe Mengen an Milchsäure bilden. Diese Stoffwechsellage wird als Warburg-Effekt bezeichnet. Er schloss daraus, dass der malignen Entartung von Zellen eine Entgleisung der Zellatmung und des Glukosestoffwechsels zu Grunde liege [1,2]. Auch wenn bis heute nicht bewiesen ist, dass der gestörte Glukosestoffwechsel ursächlich für die Entstehung von Krebs sein kann. So gibt es doch viele Anhaltspunkte dafür, dass aerobe Glykolyse und Reduktion der Zellatmung ein Vorteil für die Krebszellen bedeutet und zu höheren Proliferationsraten und damit schnellerer Progression führen[3]. Bei Zervixkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass hohe Laktatwerte im Tumorgewebe mit schlechterer Prognose bzw. höherer Wahrscheinlichkeit der Metastasierung einhergehen [4]. Diese Erkenntnisse führten in den vergangenen Jahren zu einem steigenden Interesse am Glukosestoffwechsel der Krebszellen, mit dem Hintergrund, dessen Besonderheiten therapeutisch nutzbar zu machen.

Bereits heute nutzt man die übermäßige Glukoseaufnahme von Krebszellen in Form der FDG-PET. Hierbei ersetzt radioaktives Fluor eine Hydroxylgruppe der Glukose. Die Akkumulation dieser Glukosemoleküle kann mittels Bildgebung sichtbar gemacht werden und wird z.B. zur Suche von Metastasen eingesetzt. Lange galt die Annahme, dass der Warburg-Effekt auf einer Störung oder Fehlfunktion der am Metabolismus beteiligten Enzyme beruht. Er kann allerdings nicht nur in Krebszellen beobachtet werden, sondern kommt auch physiologisch in sich schnell teilenden Geweben vor [5].

Es existieren mehrere Erklärungsansätze, dieses Phänomen zu ergründen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Glykolyse in sich teilenden Zellen nicht nur zur Energiegewinnung dient, sondern, durch ihre Verflechtung mit anderen

Stoffwechselwegen, auch der Bereitstellung von Metaboliten für die Nukleinsäure- bzw. Fettsäuresynthese [6].

Die Verstoffwechslung zu Laktat liefert zwar weniger Energie pro Molekül Glukose, dies kann aber durch hohen Umsatz mehr als ausgeglichen werden. Um NADH zu regenerieren und somit einen hohen Umsatz durch die Glykolyse gewährleisten zu können, wird Pyruvat zu Laktat oxidiert und NADH zu NAD⁺ reduziert [7]. Eine weitere Quelle des Laktats ist die gesteigerte Glutaminolyse in vielen Krebszellen. Durch den Abbau im Citratzyklus kommt es zur erhöhten Konzentration von Pyruvat, welches zu Laktat abgebaut wird [8,9]. Um die Umstellung des Stoffwechsels zu verstehen, liegt es nahe, sich die Enzyme genauer anzuschauen, die an dem für den Warburg-Effekt entscheidenden Scheidewegen der Glykolyse stehen. Zwei dieser Enzyme sind Pyruvatkinase-M2 (PKM2) und Laktatdehydrogenase-A (LDHA). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Erforschung dieser beiden Enzyme und ihrer Regulation durch Phosphorylierung.

1.2 Laktatdehydrogenase

Laktatdehydrogenase (LDH) existiert in Form verschiedener Isoenzyme. Es kommen zwei Untereinheiten LDHA (M) und LDHB (H) vor, die organabhängig in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten existieren. Die beiden Untereinheiten bilden durch Kombination das enzymatisch aktive Homo- bzw. Heterotetramer. LDHA stellt die vorherrschende Isoform des Skelettmuskels und LDHB die überwiegende Isoform des Herzens. Die übrigen Organe zeigen physiologisch meist Mischformen aus beiden Untereinheiten. Als Ausnahme gelten Hoden und Spermien, die LDHC exprimieren, welches ebenfalls in Tumoren nachgewiesen werden konnte [10].

LDHA und LDHB unterscheiden sich in ihrer enzymatischen Aktivität. LDHA konvertiert vorwiegend Pyruvat zu Laktat. Dies macht es zum optimalen Isoenzym im Rahmen der anaeroben Glykolyse, beispielweise bei starker Muskelbeanspruchung, aber auch bei der aeroben Laktatbildung im Rahmen des Warburg-Effekts. LDHB begünstigt besonders die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, um es anschließend in den Mitochondrien weiter zu

verstoffwechseln und zur Energiegewinnung zu nutzen. Dieser Effekt wird besonders vom Herzmuskel genutzt [11].

1.2.1 Laktatdehydrogenase-A (LDHA)

Wie bereits erwähnt, produzieren Karzinome große Mengen an Laktat, selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung. Ein überwiegender Anteil der LDHA ist daher anzunehmen und konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [11,12]. Die Expression der LDHA wird durch Onkogene wie c-Myc und HIF1-Alpha reguliert [13,14]. Die Hemmung der LDHA durch den Small Molecule Inhibitor FX11 führt zu erhöhtem oxidativem Stress und gesteigertem Zelltod. In Xenotransplantations-Maus-Modellen konnte unter FX11 eine Verminderung der Tumorprogression von Lymphomen und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden [15]. Die Laktatdehydrogenase ist, wie die Pyruvatkinase, nur als Tetramer enzymatisch aktiv. Die Phosphorylierung an Tyrosin 10 führt zur Tetramerisierung und damit zur Zunahme der Aktivität. Brochialkarzinomzellen, bei denen durch Punktmutation Tyrosin 10 ausgeschaltet wurde, steigern reaktiv die oxidative Phosphorylierung und leiden bei Sauerstoffmangel unter Hypoxie [16].

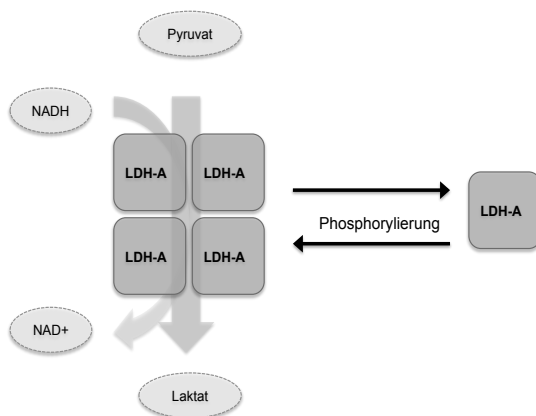


Abb. 1: Enzymatische Aktivität und Regulation der Laktatdehydrogenase-A

3 Pyruvatkinase

Beim Menschen sind 4 Isoenzyme der Pyruvatkinase bekannt: L, R, M1 und M2. L und R sind Produkte eines Gens unter der Kontrolle unterschiedlicher Promoter. L wird in Leber und Niere, R in Erythrozyten exprimiert. M1 und M2 entstehen durch alternatives Splicing eines Gens und unterscheiden sich in 22 Aminosäuren bzw. einem Exon [17]. Die Regulation des alternativen Splicings erfolgt über hnRNP A1/A2 und PTB, die wiederum c-Myc abhängig exprimiert werden. Das Anlagern dieser Ribonukleoproteine an die mRNA führt zur Unterdrückung von Exon 9 (PKM1) und dadurch zum Einbau von Exon 10 (PKM2) [18,19].

Christofk et al konnte zeigen, dass die stabile Ausschaltung der PKM2-Isoform mittels sh-RNA in Lungenkrebszelllinien zu erniedrigten Proliferationsraten und erniedrigtem Glukosestoffwechsel führt. Weiterhin konnte an den PKM2-Knockdown-Zellen durch die Überexpression FLAG markierter M1- oder M2-Form die Bedeutung der beiden Isoenzyme für den Glukosestoffwechsel der Zelle belegt werden. Beide Klone zeigten ähnliches Wachstumsverhalten bei hoher Sauerstoff- und Glukosekonzentration. Unter hypoxischen Bedingungen oder bei Ausschaltung der mitochondrialen ATP-Synthase mittels Oligomycin sank allerdings die Proliferationsrate des PKM1-Klons deutlich stärker als die des PKM2-Klons. Die Messung der Laktatkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs ergab, dass die PKM1-Zellen mehr Sauerstoff aufnahmen und gleichzeitig weniger Laktat produzierten als die PKM2-Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass die PKM1-Klone Glukose hauptsächlich über Citratzyklus und Atmungskette verstoffwechseln, während die M2-Zellen überwiegend den Weg der anaerobe Glykolyse nutzen. Im Mausmodell konnte schließlich nachgewiesen werden, dass die PKM2-Klone schneller und häufiger zu Karzinomen führten und eine höhere Tumormasse aufwiesen als die PKM1-Klone [20].

Trotz dieser Erkenntnisse konnte die über Jahre postulierte Theorie nicht aufrecht erhalten werden, dass PKM1 überwiegend in ausdifferenziertem Gewebe und PKM2 überwiegend in stark proliferierendem bzw. niedrig differenziertem Gewebe wie Krebs- oder Stammzellen exprimiert würden [21,22]. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass PKM2 in allen

untersuchten Geweben (Lunge, Blase, Niere Leber, Schilddrüse und Kolon), sowohl in normalem als auch in Karzinomgewebe die überwiegende Isoform darstellt [23]. Allerdings konnte in allen Karzinomen eine deutlich höhere Expression von PKM2 im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden. In den untersuchten Geweben kommt es also während der Karzinogenese nicht zur Verschiebung der Expression von PKM1 zu PKM2 sondern lediglich zur erhöhten Expression der PKM2-Isoform.

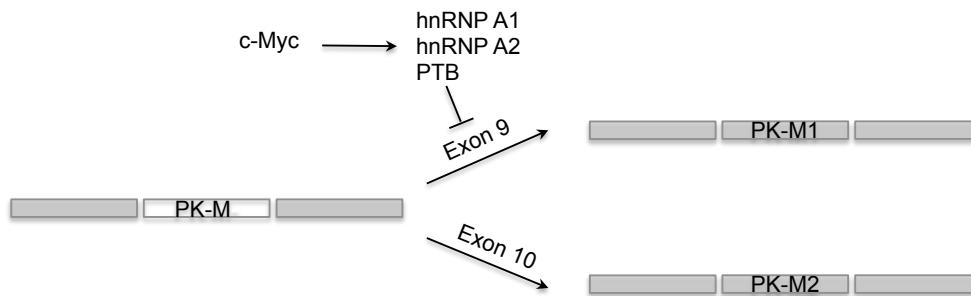


Abb. 2: Alternatives Splicing der Pyruvatkinase-Isoformen M1 und M2

1.3.1 Pyruvatkinase-M2 (PKM2)

Der Unterschied zwischen der M1- und M2-Form der Pyruvatkinase beschränkt sich auf wenige Aminosäuren, führt aber zu weitreichenden Veränderungen des Zellstoffwechsels. Die Ursache dafür liegt in der durch Exon 10 exprimierten Bindungstasche von PKM2 und damit möglichen Regulierbarkeit. Katalytische Aktivität, im Sinne der Umwandlung von PEP zu Pyruvat, entfaltet die Pyruvatkinase-M2 nur als Tetramer. Liegt sie als Dimer oder Monomer vor, ist sie als glykolytisches Enzym inaktiv. Im Rahmen der Glykolyse erfolgt die Regulation über Fruktose-1,6-Bisphosphat als allosterische Feedforward-Regulation. Fruktose-1,6-Bisphosphat wird entsprechend dem Glukoseangebot durch die Phosphofruktokinase gebildet und führt zur Tetramerisierung und damit Aktivierung der Pyruvatkinase [24,25].

In Tumorzellen liegt die Pyruvatkinase-M2 allerdings überwiegend in der Dimerform vor.[26] Verschiedene Substanzen und Mechanismen führen durch Bindung an die Pyruvatkinase-M2 zum Verlust der FBP Bindung und zur Dimerisierung. Dazu zählen die Bindung von Phospho-Proteinen, von T3, von PHD3 bei Hypoxie, des Onkoproteins E7 von HPV 16 oder die

Phosphorylierung von Tyrosin 105 [24,27-29]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung zu erhöhten Proliferationsraten unter hypoxischen Bedingungen führt [27,29]. Der Nutzen für schnell proliferierende Zellen durch die Inaktivierung der Pyruvatkinase könnte in der Akkumulation von Metaboliten der Glykolyse liegen, die dann beispielweise für die Synthese von Nucleinsäuren zur Verfügung stehen [30]. Diese Theorie lässt jedoch die Frage unbeantwortet, warum es zur erhöhten Expression in Tumoren kommt und anschließend zur weitgehenden Inaktivierung. Neuere Forschung konnte Funktionen der PKM2-Dimerform als Proteinkinase und Kofaktor für verschiedene Zielproteine nachweisen (Abb. 3) [31-34].

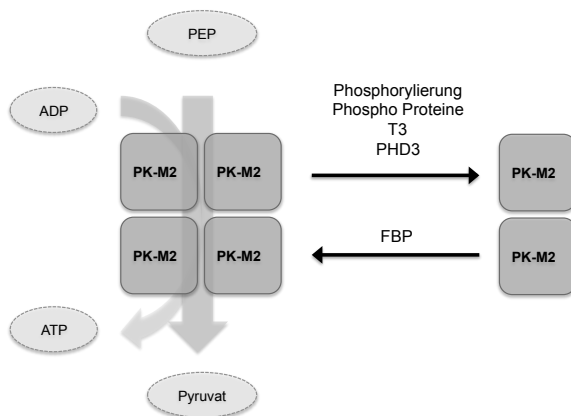


Abb. 3: Enzymatische Aktivität und Regulation der Pyruvatkinase-M2

Im Gegensatz zur Tetramerform scheint die Dimerform besonders im Zellkern ihre Wirkung zu entfalten. In Kolonkarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass im Zellkern ausschließlich die Dimerform vorliegt [34], was den Schluss nahelegt, dass ein Zusammenhang mit der Transkription bestimmter Gene besteht.

Yang et al. zeigten, dass die PKM2-Dimerform eine Rolle in der EGF-Rezeptor abhängigen Expression von c-Myc und Cyclin D1 spielt [31,32].

Ebenfalls eine Funktion im Rahmen der Genexpression nimmt die Dimerform der Pyruvatkinase als Kofaktor von HIF1-alpha ein [33].

Chen et. al. konnten zeigen, dass Shikonin, als Inhibitor der enzymatischen Aktivität der PKM2, zum Absterben von Krebszellen führt [35]. Die Hemmung der Translation durch siRNA führte zur Verminderung des Zellwachstums bzw.

erhöhter Apoptose *in vivo* und zu Tumorregression in Xenotransplantations-Maus-Modellen [36].

Interessanterweise führte auch die Aktivierung der PKM2 durch beispielweise TEPP 46 zu einer Hemmung des Tumorwachstums *in vitro* und im Xenotransplantations-Maus-Modell [37].

1.4 Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren (FGFR)

Die Familie der Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren umfasst 4 Rezeptoren (FGFR 1-4). Sie gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. So beeinflussen sie Zelldifferenzierung, -migration und -überleben [38]; Funktionen, die auch in der Krebsentstehung von Bedeutung sind. In einer Reihe von Karzinomen konnte eine erhöhte Expression, Mutationen oder Amplifikation von FGF Rezeptoren nachgewiesen werden [39-41]. Aktuell sind diverse Ansätze in Entwicklung, diese Erkenntnis mittels „Small Molecule“ Tyrosinkinaseinhibitoren oder mittels Antikörpern gegen FGF bzw. FGF-Rezeptoren therapeutisch nutzbar zu machen [42,43].

1.4.1 Fibroblastenwachstumsfaktorrezptor-1 (FGFR1)

Wie beschrieben, können sowohl PKM2 (Tyrosin 105) als auch LDHA (Tyrosin 10) durch Phosphorylierung reguliert werden. Beide Mechanismen unterstützen die Proliferation bei Hypoxie und spielen eine wichtige Rolle in der Umstellung des Stoffwechsels im Sinne des Warburg-Effekts. Verantwortlich für die Phosphorylierung ist der Fibroblastenwachstumsfaktorrezptor-1 (FGFR1) [16,29]. St. Bernard et al. konnten zeigen, dass FGFR1 in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen stark exprimiert wird [44].

1.5 Schilddrüsenkarzinome

Schilddrüsenkarzinome machen circa 1% aller malignen Neoplasien aus und sind gleichzeitig die häufigsten endokrinen Karzinome.

Die Unterscheidung der Schilddrüsenkarzinome folgt ätiologischen und histologischen Kriterien. Das follikuläre (FTC) und das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC) sind die beiden Vertreter der epithelialen Schilddrüsenkarzinome. Weiterhin kommt in der Schilddrüse das medulläre Karzinom (MTC), das aus C-Zellen entsteht, und das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom (UTC) vor. Daten aus den USA für das Jahr 2002 zeigen folgende Häufigkeitsverteilung: Frauen waren 2,7 mal häufiger betroffen als Männer, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 46 Jahren lag. Am häufigsten wurde mit 88% ein PTC diagnostiziert, gefolgt von 9% FTC und 3% UTC plus MTC. Insgesamt stieg die Inzidenz des Schilddrüsenkarzinoms von 3,6/100.000 1973 auf 8,8/100.000 im Jahr 2002 stark an. Dies lässt sich auf die höhere Zahl diagnostizierter PTCs zurückführen [45].

Für die Stadieneinteilung der differenzierten epithelialen Schilddrüsenkarzinome gilt, neben der TNM-Klassifikation, das Patientenalter als entscheidender Faktor, wobei das 45. Lebensjahr als Grenze für eine schlechtere Prognose gilt. Zur Entstehung von epithelialen Schilddrüsentumoren werden zwei Theorien diskutiert. Während lange Zeit die Mehr-Stufen-Theorie der Krebsentstehung aus differenzierten Thyreozyten als anerkannt galt [46], mehren sich inzwischen die Hinweise auf eine Entstehung aus fetalen Schilddrüsenzellen, bzw. Stammzellen [47].

1.5.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC)

Kennzeichnend für das PTC ist die papilläre Struktur im histologischen Schnitt. Es zeigt ein langsames Wachstum und metastasiert überwiegend lymphogen und in regionale Lymphknoten. Die relative 5-Jahres-Überlebenschance ist mit 99,5% sehr hoch [48]. Von bisher unklarer Relevanz sind die häufig in Obduktionen gefundenen Mikrokarzinome. Typische Mutationen des PTC sind RET/PTC Rearrangement und aktivierende BRAF Mutationen [49].

1.5.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC)

Histologisch zeigt das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC) seinem Namen entsprechend eine follikuläre Struktur mit unterschiedlicher Größe der Follikel. Es ist unter Umständen schwer vom follikulären Adenom zu unterscheiden. Das Vorliegen eines der folgenden Merkmale gilt als beweisend für ein follikuläres Karzinom [50]:

1. Der Einbruch von Tumorzellen in ein Gefäß.
2. Der Durchbruch der Tumorkapsel.

Erhöhte Aggressivität und höhere Sterblichkeit zeigen die oxyphile und die insuläre Variante des FTC [51]. Die Inzidenz des FTC ist in Jodmangelgebieten erhöht [51]. Die Metastasierung erfolgt bevorzugt hämatogen in Lunge, Knochen und Gehirn.

1.5.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom (UTC)

Das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom (UTC) ist sehr selten und mit einer ausgesprochen schlechten Prognose verbunden. Das relative 1-Jahres-Überleben liegt bei 19,2% [48]. Histologisch lassen sich drei Typen unterscheiden, der spindelzellige, großzellige und squamöse Typ. Der histologische Typ beeinflusst allerdings nicht die Prognose [52]. Das undifferenzierte oder anaplastische Schilddrüsenkarzinom kann primär oder bei vorbestehendem inkomplett entfernten PTC oder FTC auftreten [52].

1.5.4. Thyreoglobulin

Thyreoglobulin ist ein schilddrüsenspezifisches Protein, das sich gut als Tumormarker für differenzierte Schilddrüsenkarzinome eignet. Besonders nach der Entfernung der Schilddrüse können erhöhte Werte auf Metastasen hindeuten [53]. Werte unter 2 ng/ml unter TSH unterdrückender Schilddrüsenhormontherapie oder unter 3 ng/ml ohne Hormontherapie sprechen, bei vorausgegangener Schilddrüsenentfernung und Radioablation, mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen das Wiederauftreten von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (FTC und PTC) [54]. Thyreoglobulin und

Thyreoglobulin-Antikörper sollten in der Nachsorge von initial thyreoglobulinnegativen Patienten bestimmt werden und zeigen bei Auftreten mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv an [55].

1.5.5, „Targeted Therapy“ für Schilddrüsenkarzinome

In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt, um gezielte Therapien für Patienten mit metastasierten Schilddrüsenkarzinomen zu etablieren. Der Ras-Raf-MEK-MAP-ERK-Signalweg spielt eine Rolle in der Entstehung von follikulärem und papillärem Schilddrüsenkarzinom, weshalb in mehreren Phase II Studien die Wirksamkeit von Sorafenib, einem Multityrosinkinaseinhibitor, getestet wurde. Dabei konnte die Überlegenheit gegenüber Chemotherapie und ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 79 Wochen belegt werden [56,57]. Dies führte schließlich zu der aktuell noch nicht abgeschlossenen Phase 3 DECISION Studie ("stuDy of sorafEnib in loCally advanced or metastatic patientS with radioactive Iodine refractory thyrOid caNcer") [58], an deren Ende die Zulassung für Sorafenib bei metastasiertem oder lokal fortgeschrittenem Radioiod refraktärem Schilddrüsenkarzinom stehen soll. Weitere Kinase Inhibitoren wie Sunitinib, Vandetanib, Axitinib, Motesanib und Imatinib befinden sich in der klinischen Erprobung [59-61]. Eine Sonderstellung der zielgerichteten Therapien nimmt Vemurafenib ein. Als einzige Substanz in der klinischen Erprobung ist es auf die, häufig in papillären Schilddrüsenkarzinomen vorkommende, V600E Mutation von BRAF gerichtet. Nur bei Vorliegen der Mutation führt das Medikament zur Hemmung der Serin-/Threonin-Kinase BRAF [62]. Bereits zugelassen ist Vemurafenib zur Behandlung des malignen Melanoms.

1.6 Benigne Schilddrüsentumoren

1.6.1 Struma

Eine Struma ist per Definition eine Vergrößerung der Schilddrüse auf über 25 ml bei Männern und über 18 ml bei Frauen. Es handelt sich also um ein Symptom mit vielfältigen Ursachen wie bsp. Thyreoiditis oder Jodmangel. Die klinische Einteilung nach der Größe umfasst drei Schweregrade. Grad 1: nur sonografisch nachweisbare Vergrößerung, Grad 2: tastbare Vergrößerung, Grad 3: sichtbare Vergrößerung [63]. Ebenfalls angewendet wird die Einteilung nach dem Funktionszustand der Schilddrüse also eu-, hyper, und hypothyreot. Histologisch gilt Struma als Diagnose für eine benigne Vergrößerung der Schilddrüse. Aus der näheren Beschreibung lässt sich die Struktur des Gewebes herauslesen: (Struma diffusa, Struma nodosa, Struma multinodosa).

1.6.2 Adenom

Das follikuläre Adenom beschreibt einen gutartigen Tumor innerhalb der Schilddrüse, der aus monoklonalen Zellen besteht und durch eine Kapsel vom umliegenden Gewebe getrennt ist [64]. Der Unterschied zum FTC besteht im nicht invasiven Wachstum, also kein Durchbruch der Tumorkapsel oder Einbruch in Gefäße. Das bereitet gerade bei der Feinnadelbiopsie Schwierigkeiten in der Unterscheidung [65]. Das Gewebe ist nicht hormonaktiv und zeigt sich dementsprechend in der Schilddrüsenszintigraphie als kalter Knoten.

2 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war der Nachweis der Expression von LDHA, PKM2, Phospho-PKM2, Phospho-LDHA und FGFR1 mittels Western Blot, ELISA und Real-Time PCR.

Folgende Punkte waren dabei von besonderem Interesse:

Wie hoch ist die LDHA, PKM2 und FGFR1 Expression bei den untersuchten Schilddrüsenerkrankungen?

Korrelieren die Phosphorylierung von LDHA und PKM2 mit der Expression von FGFR1 in Schilddrüsengeweben?

Lässt sich Tumor PKM2 aus Schilddrüsenkarzinomen im Blutplasma nachweisen?

Ergeben sich aus den gewonnenen Daten Hinweise auf eine diagnostische oder therapeutische Nutzung?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Chemikalien

30% Acrylamid mix	Carl Roth GmbH+Co KG Karlsruhe, Deutschland
APS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5x RT-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
peqGOLD Universal Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
Bio Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
dNTP-Mix	Invitrogen, Berlin, Deutschland
DTT (Proteinlysepuffer)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT (Reverse Transkription)	Invitrogen, Carlsbad, USA
ECL Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Full range rainbow Marker	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Glycine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HCl 25%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH+Co KG Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Primer	Metabion international AG, Martinsried, Deutschland
PVDF Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Random Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA

RNasin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rotor Gene SYBR Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
SDS	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Superscript II	Invitrogen, Carlsbad, USA
TBE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Bio-Rad, München, Deutschland
Thiourea	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Tris	Carl Roth GmbH+Co KG Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL® Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Urea	AmershamBiosciences,Uppsala,Schweden

Tabelle 2: Geräte

T3-Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
UV-Visible Spectrophotometer UV-1602	Shimadzu, Kyoto, Japan
Schüttler	Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
ELISA-Reader Rainbow	SLT, Crailsheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Gera, Deutschland
Minigelkammer Protean II	Bio-Rad, München, Deutschland
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transferkammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Waage	Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland
Rotor Gene Q® Qiagen 2 plax Plattform	Qiagen, Hilden, Deutschland
Micro-Dismembrator S	B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland

Tabelle 3: Antikörper

PKM2 Antibody	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
Phospho-PKM2 (Tyr105) Antibody	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
LDHA (C4B5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
Phospho-LDHA (Tyr10) Antibody #8176	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
FGF Receptor 1 (D8E4)	Cell Signaling Technology, Cambridge, England
Monoclonal Anti- β -Aktin Clone AC15	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Goat anti Rabbit IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Goat anti Mouse IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz USA

Tabelle 4: ELISA

Tumor M2-PK Plasma Elisa Test	Schebo Biotech, Giessen, Deutschland
-------------------------------	--------------------------------------

3.2 Patientengewebe

Die Patienten wurden im Zeitraum März 1994 – Juli 2009 in der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie bei medizinischer Indikation thyreoidektomiert. Die Bereitstellung des Gewebes für Forschungszwecke erfolgte mit Einverständnis der Patienten und Genehmigung der Ethikkommission. Das operativ entnommene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert.

Insgesamt wurden mittels Western Blot und Real-Time PCR 77 Gewebe untersucht (Tab. 5).

Tabelle 5: Untersuchte Gewebe

Struma	Adenom	FTC	PTC	UTC
19	11	16	15	16

3.3 Homogenisierung

Zur weiteren Verarbeitung bzw. RNA- oder Proteingewinnung erfolgte die Homogenisierung des Gewebes. Dabei wurde es zunächst mit einem Hammer grob zerkleinert und anschließend zweimal 45 Sec. bei 2500 RPM in einem Teflon beschichteten Gefäß mit Teflon beschichteter Kugel zu feinem Pulver zermahlen. Alle benutzten Materialien und Gewebe wurden wiederholt mit flüssigem Stickstoff gekühlt.

3.4 Proteinnachweis / Western Blot

3.4.1 Proteinisolation und Vermessung

Circa 100 mg des gefrorenen Gewebepulvers wurden in 1ml des Proteinlysepuffer (s.u.) gelöst, nach gründlichem Vortexen bei 4°C 45 Minuten zentrifugiert, anschließend der proteinhaltige Überstand abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Die Vermessung der Proteinkonzentration erfolgte per Doppelbestimmung nach der Bradford Methode bei 480 nm. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20 Grad.

Tabelle 6: Proteinlysepuffer:

7 M Urea
2 M Thiourea
4% CHAPS
40 mM DTT

3.4.2 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins erfolgt in einem SDS-Polyacrylamidgel, welches wiederum aus einem Sammel- und Trenngel besteht. Beide Gele werden übereinander gegossen. Bevor die Proben mit Ladepuffer versetzt in Geltaschen des Sammelgels pipettiert werden konnten, mussten sie für fünf Minuten auf 95°C erhitzt werden. Durch die niedrigere Acrylamidkonzentration im Sammelgel sind die Poren groß und es findet hier noch keine Auftrennung statt, die Proteine werden gesammelt und ein gleichmäßiger Übergang in das Trenngel gewährleistet. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung nach Molekulargewicht. SDS verhindert durch den Ausgleich der Ladungen der Aminosäuren, dass diese Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit nehmen können. APS und TEMED starten durch Radikalbildung die Quervernetzung des Acrylamids.

Bei jedem Ansatz liefen jeweils ein Rainbow Kilodalton Marker und eine Positivkontrolle mit. Dies ermöglicht die Größenbestimmung der Zielproteine und eine semiquantitative Auswertung. Als Positivkontrolle wurde die Schilddrüsenkarzinom Zelllinie FTC 133 verwendet.

Tabelle 7: Pipettierschema für ein Gel:

Trenngel 12%	10 ml	Sammelgel 4%	2 ml
H ₂ O	3,3 ml	H ₂ O	1,4 ml
30% Acrylamid mix	4,0 ml	30% Acrylamid mix	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,02 ml
10% APS	01 ml	10% APS	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,002 ml

3.4.3 Semidry Blotting

Der Transfer vom Gel auf eine PVDF-Membran macht die Proteine zugänglich für die Antikörperbindung [66]. Dazu werden Gel und Membran luftblasenfrei übereinander gelegt und beidseitig von zwei Filterpapieren eingefasst. In einer Blotkammer, die mit Transferpuffer gefüllt ist, wandern die Proteine durch die

angelegte Spannung vom Minuspol zum Pluspol und damit vom Gel in die Membran. Der Blot erfolgte bei einem Amper für 120 Minuten und 6°C.

Tabelle 8: Transferpuffer:

42 g Glycin
9 g Tris
600 ml Methanol
in 2 Liter Aqua bidest

3.4.4 Antikörpernachweisreaktion

Die mit aufgetrennten Proteinen beladenen Membranen wurden zunächst eine Stunde in TBS-T und 5% BSA geblockt, um unspezifische Bindungen des ersten und zweiten Antikörpers zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 über Nacht bei 4°C. Ein zweiter Antikörper ist gegen den FC-Teil des ersten gerichtet und gleichzeitig mit dem Enzym HRP (Meerrettich Peroxidase) gekoppelt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde und im Anschluss wurden die Membranen für eine Minute in ECL, dem Substrat für HRP, geschwenkt. Das vom Enzym umgesetzte Substrat führt zu Chemielumineszenz, die anschließend mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer sichtbar gemacht werden konnte. Zwischen allen Inkubationen erfolgte jeweils dreimaliges Waschen mit TBS-T. Als Normalisierung für Abweichungen beim Pipettieren, Blotten oder Vermessen setzten wir β -Aktin ein. Nach der Behandlung mit dem ersten Antikörper wurde durch Stripping-Puffer die Bindung der Antikörper gelöst und durch Waschen entfernt. β -Aktin wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 9: Strippingpuffer

15 g Glycin
1 g SDS
10 ml Tween20
mit HCl auf pH 2,2 einstellen
mit Aqua bidest auf 1 Liter auffüllen

3.5 RNA-Nachweis/ Real-Time PCR

3.5.1 RNA-Gewinnung

Die Gesamt-RNA-Gewinnung erfolgte aus Gewebehomogenisat. Circa 100mg tiefgefrorenes Homogenisat wurden zunächst in 1 ml TRIZOL® Reagent gelöst und 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Nach Zentrifugation bei 4°C und 1400 U erfolgte das Überführen der oberen Phase und die Fällung in Isopropylalkohol, wodurch nach erneuter Zentrifugation das RNA-Pellet sichtbar wurde.

Anschließend erfolgte zweifaches Waschen in 75% Ethanol. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in RNase freiem Wasser bei 60°C für 10 Minuten gelöst und die RNA-Konzentration mittels Photometer bei 260nm Wellenlänge bestimmt.

3.5.2 Reverse Transkription

Um geeignetes Ausgangsmaterial für die Real-Time PCR zu bekommen, muss mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür benutzt man Reverse Transkriptase, die, entgegen dem physiologischen Ablauf in eukaryoten Zellen, RNA in DNA umschreiben kann.

1 µg RNA wurde auf 10 µl DEPC verdünnt und bei 70°C für 3 Minuten im Thermocycler inkubiert. Nach Zugabe des Reaktionsmixes erfolgte eine weitere Inkubation bei 42°C für 45 Minuten und anschließend 3 Minuten bei 95°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 10: Reaktionsmix für einen Reaktionsansatz:

5,0 µl	5x RT-Puffer
1,0 µl	12,5 mM dNTP-Mix
3,0 µl	100 ng/µl random Primer
2,5 µl	0,01 M DTT
0,5 µl	RNasin (40 U/µl)
0,3 µl	Superscript II (200 U/µl)
2,7 µl	DEPC-H ₂ O

3.5.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR erfolgte mittels einem 15 µl Ansatz mit 1,5 µl cDNA je 1,5 µl des Primerspaars, 7,5 µl Rotor Gene SYBR Green PCR Kit und 3 µl Aqua bidest. Bei sämtlichen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Durch die Verwendung spezifischer Primer und einer DNA Polymerase kommt es zur Vervielfältigung der Ziel-mRNA-, bzw. -cDNA Sequenz, in die sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green einlagert. Zwar bindet SYBR Green auch an Einzelstrang-DNA bzw. -RNA, in deutlich stärkerem Maße erhöht sich allerdings die Fluoreszenz bei Einlagerung in Doppelstrang-DNA [67,68]. Mit steigender DNA-Menge nimmt also die Fluoreszenz zu. Die Veränderung der Fluoreszenz wird in Echtzeit während der standardmäßig 40 Zyklen der PCR verfolgt, und von einem Computerprogramm in Form einer Kurve dargestellt. Im Verhältnis zu einer Positivkontrolle kann so die vorhandene Menge cDNA bestimmt werden.

Zur Überprüfung der Spezifität des Amplifikats führten wir zwei zusätzliche Untersuchungen durch.

1. Die Schmelzkurvenanalyse: Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 60°C bis auf 95°C erhöht. Bei einer für das Zielprodukt spezifischen Temperatur kommt es zur Trennung der Doppelstränge und somit zur Abnahme der Fluoreszenz. Bei nur einem Zielprodukt existiert also auch nur eine Schmelzkurve.

2. Gelelektrophorese: Durch die Auftragung im Agarosegel lässt sich die DNA der Größe (Basenpaare) des Strangs entsprechend auftrennen. Tritt mehr als eine Bande auf, so wurde nicht nur die Ziel mRNA bzw. cDNA vervielfältigt, was die Daten verfälschen würde, bzw. auf einen nicht spezifischen Primer hindeuten kann.

Zum Abgleich des Umschreibens zu cDNA wurden sämtliche Proben jeweils mit zwei Housekeepinggenen normalisiert. Als Negativkontrolle diente Wasser, als Positivkontrolle FTC 133.

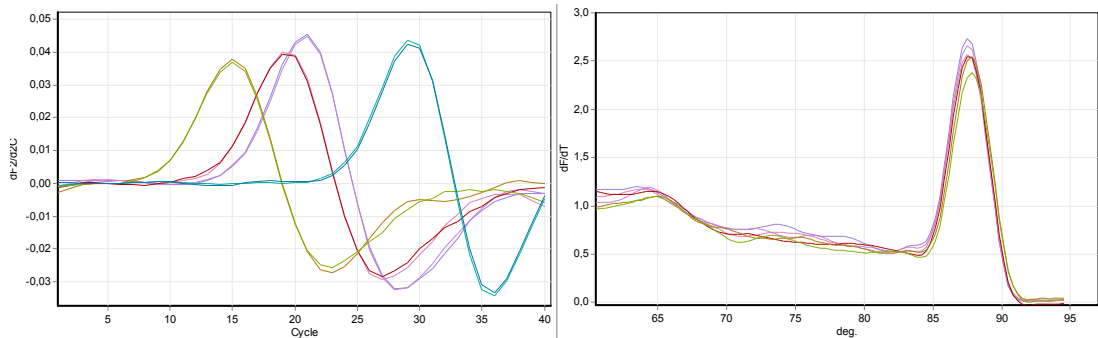


Abb. 4: SYBR Green Real-Time PCR

Grafik a) zeigt die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit (Comparative Quantitation Analysis).

Grafik b) zeigt die Änderung der Fluoreszenz bei zunehmender Temperatur (Melt Curve Analysis).

Tabelle 11: Primertabelle

Zielgen	Primersequenz
PKM1/2	5' CTG GGA AGC CTG TCA TCT GT-3'
	5' - AGT CCC CTT TGG CTG TTT CT-3'
LDHA	5'-GGC CTC TGC CAT CAG TAT CT-3'
	5'-GCC GTG ATA ATG ACC AGC TT-3'
FGFR1	5'-ACA CTG CGC TGG TTG AAA A- 3'
	5'-TGG TAT GTG TGG TTG ATG CTC- 3'
yWHAZ (Housekeeping)	5'-AGC AGG CTC AGC GAT ATG AT-3'
	5'-TCT CAG CAC CTT CCG TCT TT-3'
GAPDH (Housekeeping)	5'-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3'
	5'-TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT-3'

Die Länge der Primer bei der Verwendung von SYBR Green ist auf circa 200 Basenpaare begrenzt. Mit dieser Vorgabe war es nicht möglich einen Primer zu designen, der ausschließlich PKM2 nachweist und gleichzeitig alle Transkriptvarianten mit einschließt. Wir entschieden uns daher, einen Primer einzusetzen, der PKM2 und PKM1 mRNA nachweist.

3.6. ELISA

3.6.1 Patienten

Die Blutproben wurden im Rahmen der Routinediagnostik bei 30 Patienten vor und 3-4 Tage nach Thyreoidektomie entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Einwilligung der Patienten und mit Genehmigung der Ethikkommission.

3.6.2 Plasmaproben

Die Blutentnahme erfolgte in 10ml EDTA Plasmaröhrchen, anschließend wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank für höchstens 24 Stunden gelagert. Durch Zentrifugieren für 10 Min bei 4°C konnte das Plasma isoliert, in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert werden.

3.6.3 ELISA (Tumor-PKM2)

Das Prinzip des Sandwich-Elisa besteht in der doppelten Bindung des Antigens durch Antikörper. Hierbei ist der erste Antikörper auf dem Boden der Mikrotiterplatte fixiert und hält damit das Antigen fest, während sich Nicht-Ziel-Proteine durch Waschen wieder entfernen lassen. Ein zweiter Antikörper bindet im nächsten Schritt an ein anderes Epitop des Antigens. Der zweite Antikörper kann entweder direkt enzymgekoppelt sein, oder ein weiterer Antikörper, der gegen den zweiten Antikörper gerichtet ist, trägt das Enzym. Es handelt sich um HRP, die bei Zugabe von Substrat zu einem Farbumschlag in der Reaktionslösung führt. Diese Farbänderung ist proportional zum vorhandenen Enzym und damit zum gebundenen Antigen. Ein Photometer ermöglicht die Quantifizierung der Reaktion. Bei jedem Versuch werden eine Positiv- bzw. Negativkontrolle und vier ansteigende Konzentrationen eines bekannten Standards des Antigens mitgeführt. Die Standardwerte wurden anschließend zur Berechnung einer Standardkurve verwendet, wodurch sich die Konzentration jeder einzelnen Probe berechnen lässt. Bei sämtlichen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der eingesetzte ELISA Kit erkennt laut Hersteller spezifisch die Dimerform der Pyruvatkinase-M2 und ist von daher besonders für die Detektion von Tumoren geeignet. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 U/ml.

3.7 Thyreoglobulin

Die Thyreoglobulinwerte wurden bei klinischer Indikation im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt. Die Zeit zwischen Thyreoglobulin und Tumor-PKM2 Bestimmung betrug maximal drei Tage, erfolgte aber in der Mehrzahl der Fälle am gleichen Tag.

3.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Zur Gegenüberstellung mehrerer Gruppen mit verschiedenen Merkmalen kam der Kruskal Wallis Test zum Einsatz. Hierbei erfolgte zunächst ein a priori Test. Erst wenn dieser signifikante Unterschiede anzeigte, wurden die verschiedenen Gruppen gegeneinander getestet.

Die Korrelationsanalyse erfolgte mit der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

4 Ergebnisse

Für die folgenden Diagramme wurden die Daten aus Real-Time PCR und Western Blot von 77 Gewebeproben ausgewertet (Tab. 5, Abb. 6-17). Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen sind durch Klammern markiert. Bei der Auswertung wurde jeweils nur nach Hauptdiagnose getrennt, d.h. in PTC, FTC, UTC, Struma und Adenom. Auf eine weitere Aufschlüsselung mittels TNM-Klassifikation wurde auf Grund der dafür zu geringen Probenanzahl verzichtet. Im folgenden sind repräsentative Westernblots von jeweils dem gleichen Patientenkollektiv dargestellt. Diese Westernblots wurden zur besseren Darstellung ausgewählt, daher wurden Blots von verschiedenen Ansätzen kombiniert. Insbesondere ist hier β -Aktin aus nur einem Ansatz gezeigt. Eine Auswertung der Daten aus diesen Blots fand nicht statt.

4.1 PKM2

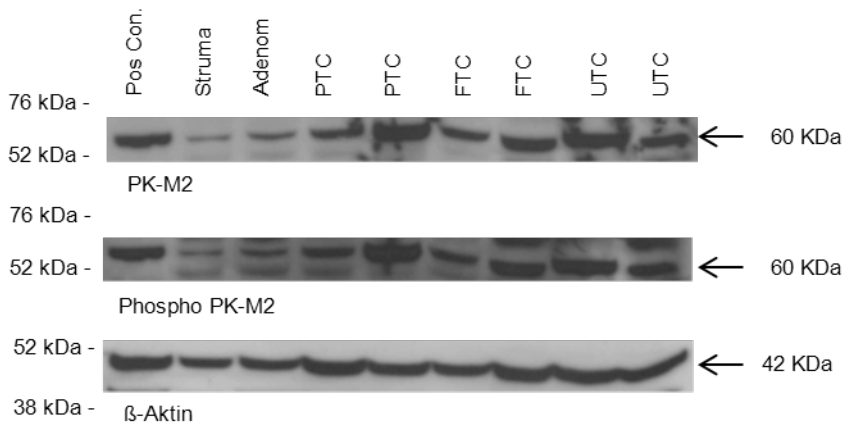


Abb. 5: Western Blot PKM2, Phospho-PKM2 und β -Aktin als Ladungskontrolle. Die Karzinome zeigen eine deutlich erhöhte Expression von PKM2 und Phospho-PKM2. Gleichzeitig wird die unterschiedlich starke Expression und Phosphorylierung innerhalb der einzelnen Entitäten deutlich.

4.1.1 PKM2 Western Blot

Die Expression der PKM2 auf Proteinebene zeigt eine deutlich Erhöhung, im Median um das Doppelte bis Dreifache in allen Karzinomen verglichen mit Strumen. Die Adenome nehmen hier eine Zwischenrolle ein. Die PKM2-Expression zeigte keinen Unterschied zwischen den Tumorentitäten. Signifikant niedriger jedoch ist sie in benignen Geweben insbesondere verglichen mit UTCs (Abb. 5 und Abb. 6).

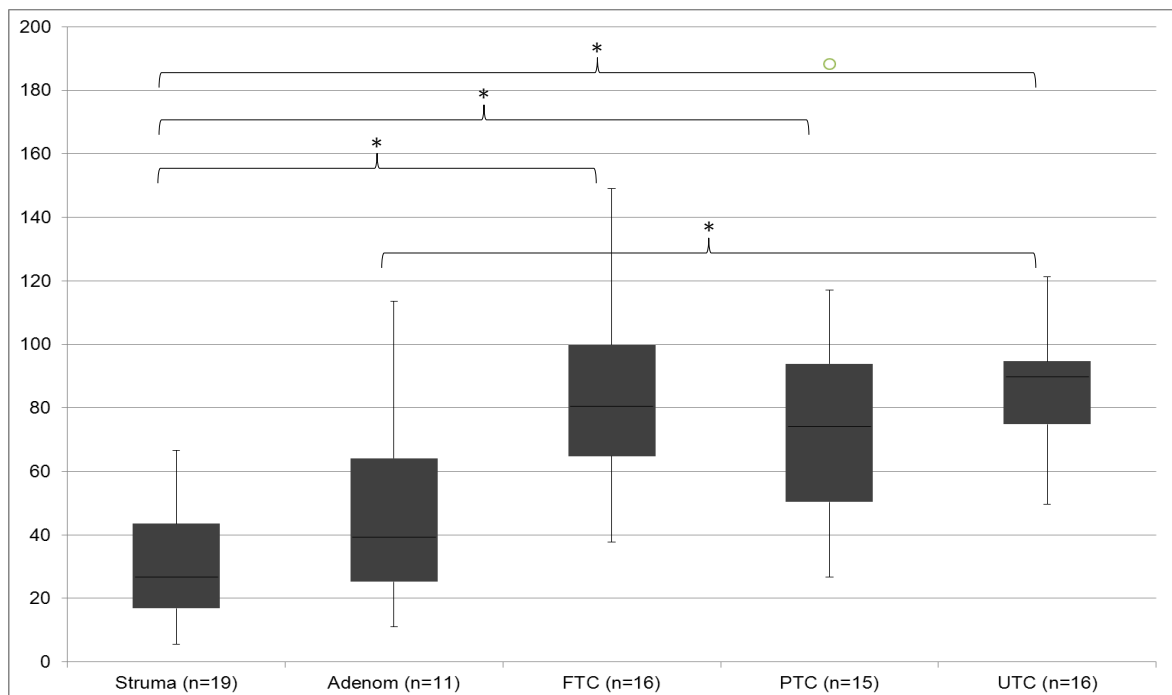


Abb. 6: Diagramm PKM2 Western Blot

* = $p < 0,05$; y Achse = Protein Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.1.2 PKM1/2 Real-Time PCR

Ein leicht verändertes Bild als auf Proteinebene zeigt die Analyse der mRNA-Expression von PKM1/2 (Abb. 7). Die UTC Gewebe zeigen eine erhöhte Expression im Vergleich zu den benignen Geweben. Allerdings ist bei den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen kein signifikanter Unterschied zu den benignen Geweben (Struma und Adenom) nachweisbar. Die FTC-Gewebe liegen sogar in ihrer mRNA Expression etwa auf dem Level von Strumen und

Adenomen und zeigen im Median eine signifikant niedrigere Expression als die UTCs.

Die Daten aus Western Blot und Real-Time PCR sind allerdings nur näherungsweise vergleichbar, da aus technischen Gründen (siehe Material und Methoden) ein gemeinsamer Primer für PKM1 und PKM2 gewählt wurde, während der Antikörper für den Western Blot nur PKM2 nachweist. Anhand einer Korrelationsanalyse ließ sich ein linearer Zusammenhang mit einer Korrelation von 0,501 nach Pearson ($p < 0,05$) zwischen mRNA- und Proteinexpression nachweisen.

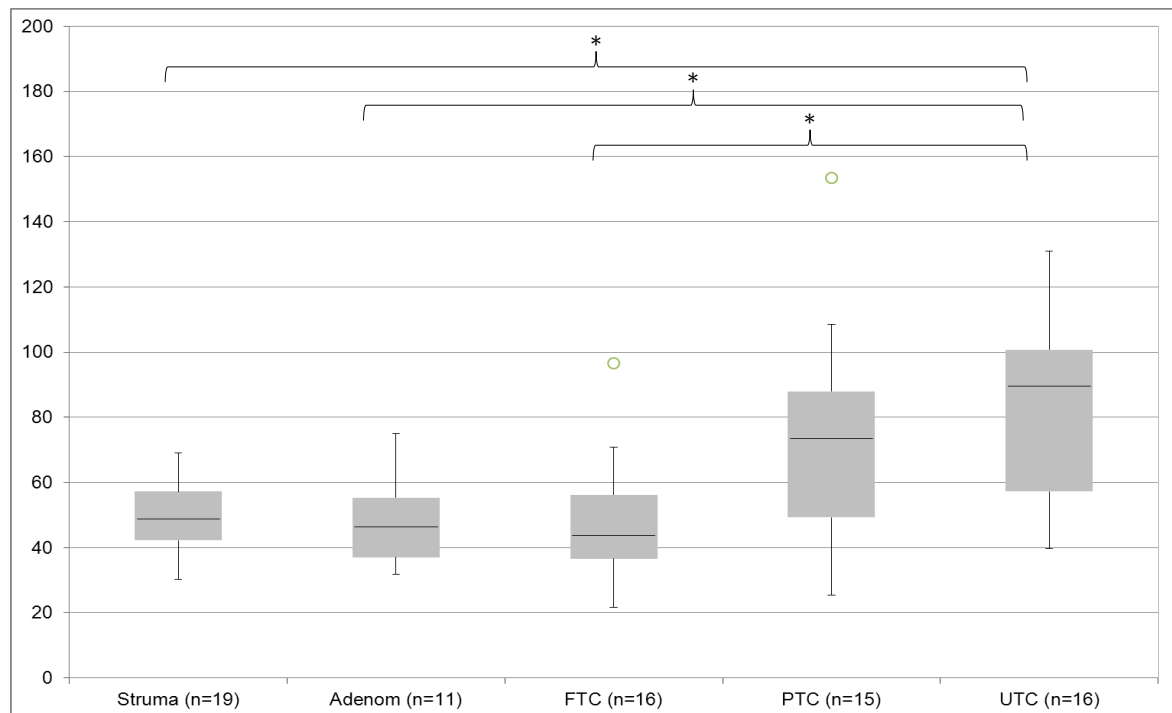


Abb. 7: Diagramm PKM1/2 Real-Time PCR

* = $p < 0,05$; y Achse = mRNA Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.1.3 Phospho-PKM2 Western Blot

Die an Tyrosin 105 phosphorylierte PKM2 zeigt im Boxplot-Diagramm eine ähnliche Verteilung wie PKM2 (Abb. 8). Auch die statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen einzelnen Gewebegruppen sind identisch. Allerdings fällt auf, dass der Gehalt von Phospho-PKM2 in Struma, Adenom, FTC und PTC im Median zwischen 15% und 24% unter dem Gehalt der PKM2 in der

jeweiligen histologischen Gruppe liegt. UTCs zeigen mit einem Median von 85% (Phospho-PKM2) zu 89% (PKM2) nur 4% Abweichung und damit fast identische Werte von Phospho-PKM2 und PKM2.

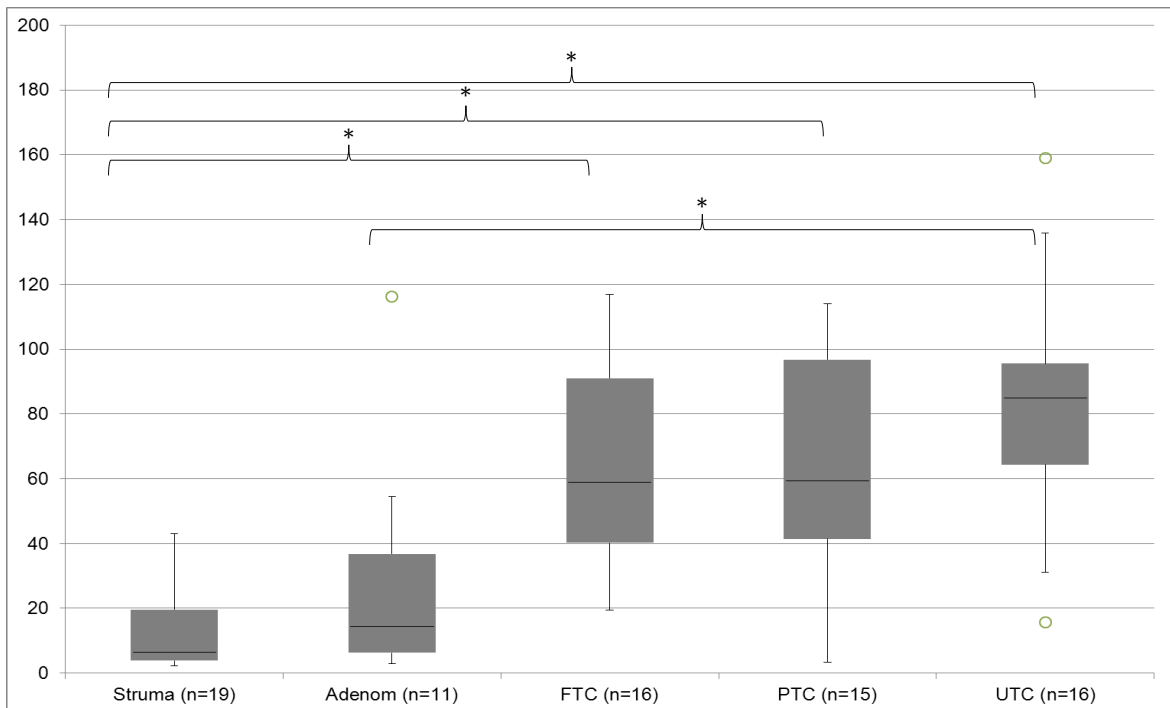


Abb. 8: Diagramm Phospho-PKM2 Western Blot

* = $p < 0,05$; y Achse = Proteinexpression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle.
Ein Extremwert (410% PTC) nicht angezeigt

4.2 LDHA

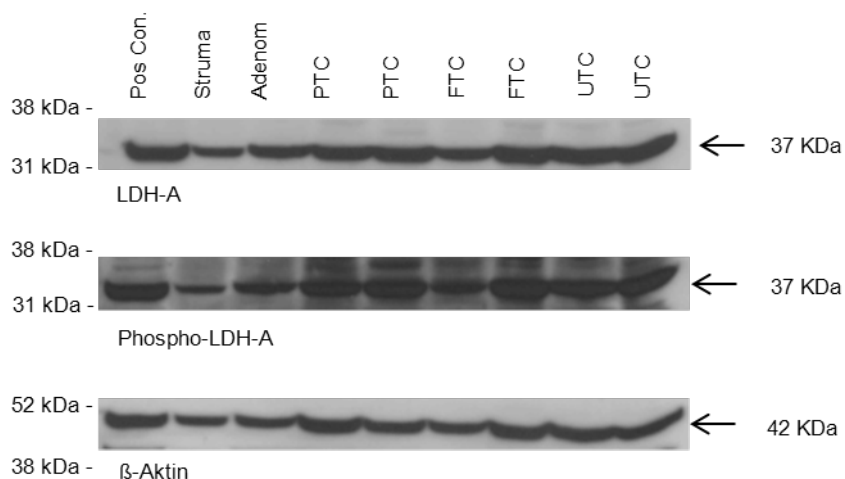


Abb. 9: Westernblot LDHA, Phospho-LDHA und β -Aktin als Ladungskontrolle. Auffällig ist die verhältnismäßig gleichmäßige Expression über alle Entitäten. Gleichzeitig fällt auf, dass die Karzinome einen höheren phosphorylierten LDHA-Anteil zeigen als Struma und Adenom.

4.2.1 LDHA Western Blot

Bei der Analyse der Gesamtproteinmenge der LDHA fällt zunächst auf (Abb. 9 und 10), dass, anders als bei PKM2, die im Median höchste Expression in PTCs vorkommt, während UTCs nahezu auf dem Niveau der Strumen liegen. Weiterhin ist die Expression verglichen mit PKM2 gleichmäßiger und unterliegt weniger ausgeprägten Veränderungen. Statistisch signifikant ist die im Median fast doppelt so hohe Expression von PTCs verglichen mit Strumen und die um ein Drittel erhöhten Werte der FTCs verglichen mit Strumen. Adenome zeigen weder im Vergleich mit Strumen noch mit einem der Karzinome einen statistisch signifikanten Unterschied.

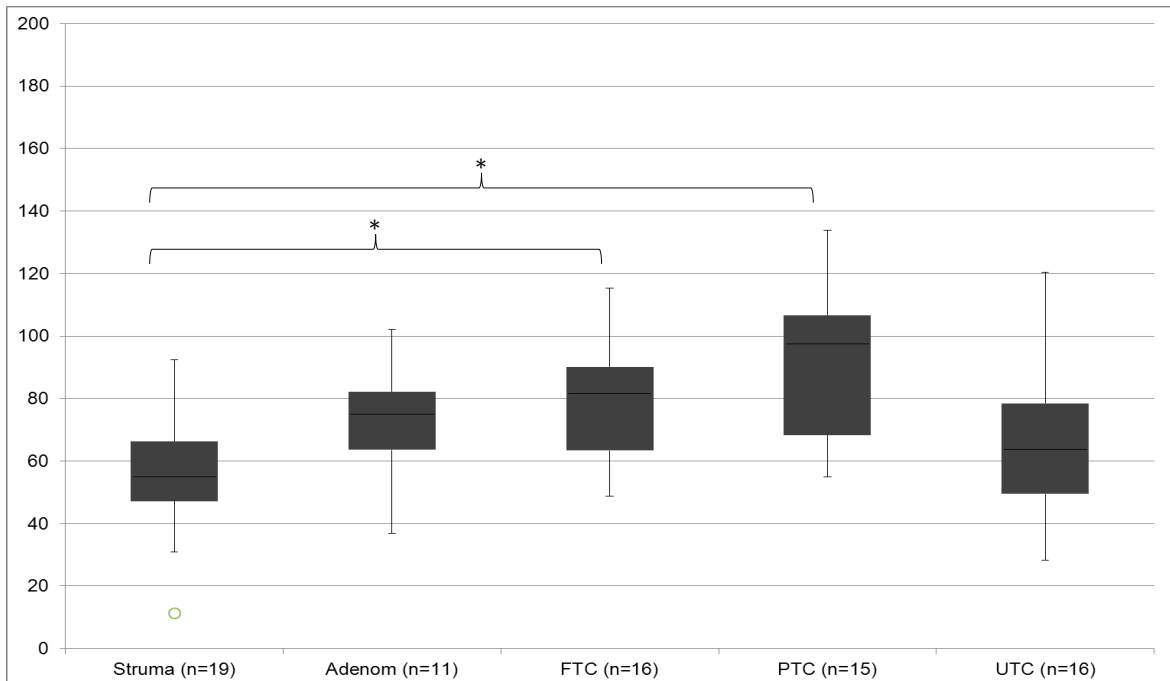


Abb.10: Diagramm LDHA Western Blot

* = $p > 0,05$; y Achse = Proteinexpression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.2.2 LDHA Real-Time PCR

Das Bild der mRNA-Expression entspricht im Falle der Laktatdehydrogenase nicht dem der Proteinexpression (Abb. 11). Insgesamt zeigt sich in den benignen Geweben (Struma, Adenom) und in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen eine sehr stabile Expression, die weder innerhalb einer Gewebegruppe noch zwischen diesen stark schwankt. Einzige Ausnahme sind die UTCs, die im Median eine erhöhte Expression zeigen und eine große Bandbreite von sehr hohen bis hin zu niedrigen Werten aufweisen. Statistisch macht sich dies in einem signifikanten Unterschied zwischen UTCs verglichen mit Strumen und FTCs bemerkbar. Die Korrelationsanalyse zwischen mRNA- und Proteinebene ergab keine statistisch signifikante Korrelation.

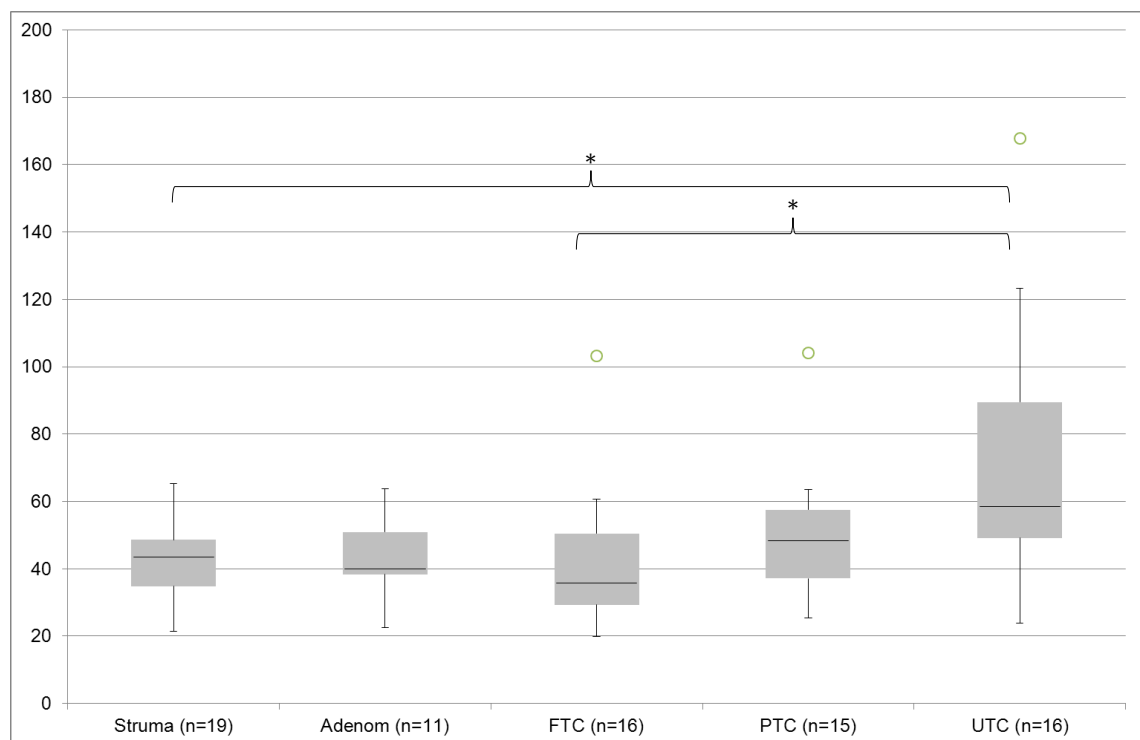


Abb. 11: Diagramm LDHA Real-Time PCR

* = $p > 0,05$; y Achse = mRNA-Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.2.3 Phospho-LDHA Western Blot

Phospho-LDHA (Abbildung 12) zeigt zwar tendenziell ein ähnliches Bild wie LDHA, allerdings sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebearten größer, sodass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen allen Karzinomentitäten verglichen mit Strumen zeigt. Die Menge an phosphorylierter LDHA der Karzinomgewebe ist im Median fast dreimal so hoch wie die der Strumen. Adenome zeigen zwar auch eine doppelt so hohe Menge an Phospho-LDHA verglichen mit Strumen, allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant, genauso wie die um ein Drittel geringere Menge verglichen mit PTCs.

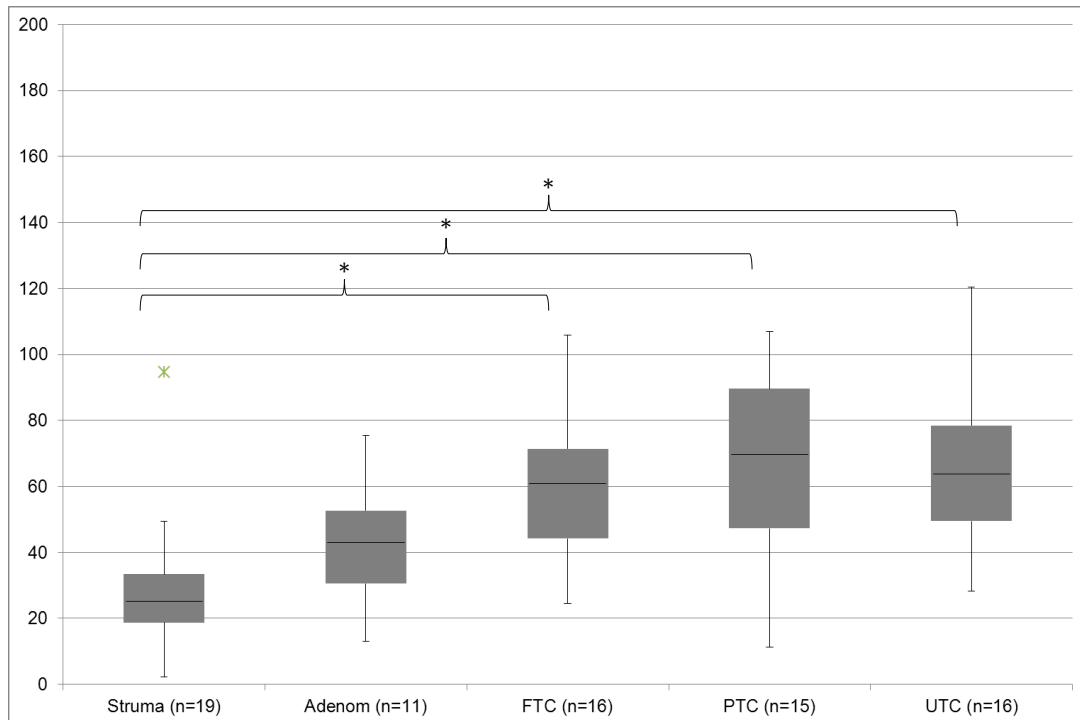


Abb. 12: Diagramm Phospho-LDHA Western Blot

* = $p > 0,05$; y Achse = Protein-Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.3 FGFR1

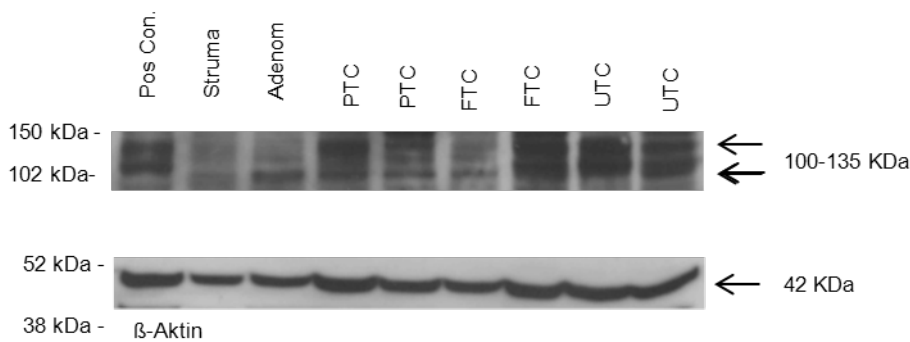


Abb. 13: Western Blot FGFR1 und β -Aktin als Ladungskontrolle

4.3.1 FGFR1 Western Blot

Die Expression von FGFR1 auf Proteinebene (Abb. 13 und 14) zeigt große Differenzen und besonders in den malignen Geweben eine große Bandbreite. PTCs und UTCs zeigen eine im Median circa doppelt so hohe Expression wie die benignen Gewebe (Struma und Adenom), welche auch in allen Fällen statistisch signifikant ist. FTCs liegen im Median mit 45% nur geringfügig über den benignen Geweben, weshalb auch statistisch kein Unterschied zu ihnen nachweisbar ist. Ebenso ist kein signifikanter Unterschied zu PTCs und UTCs nachweisbar.

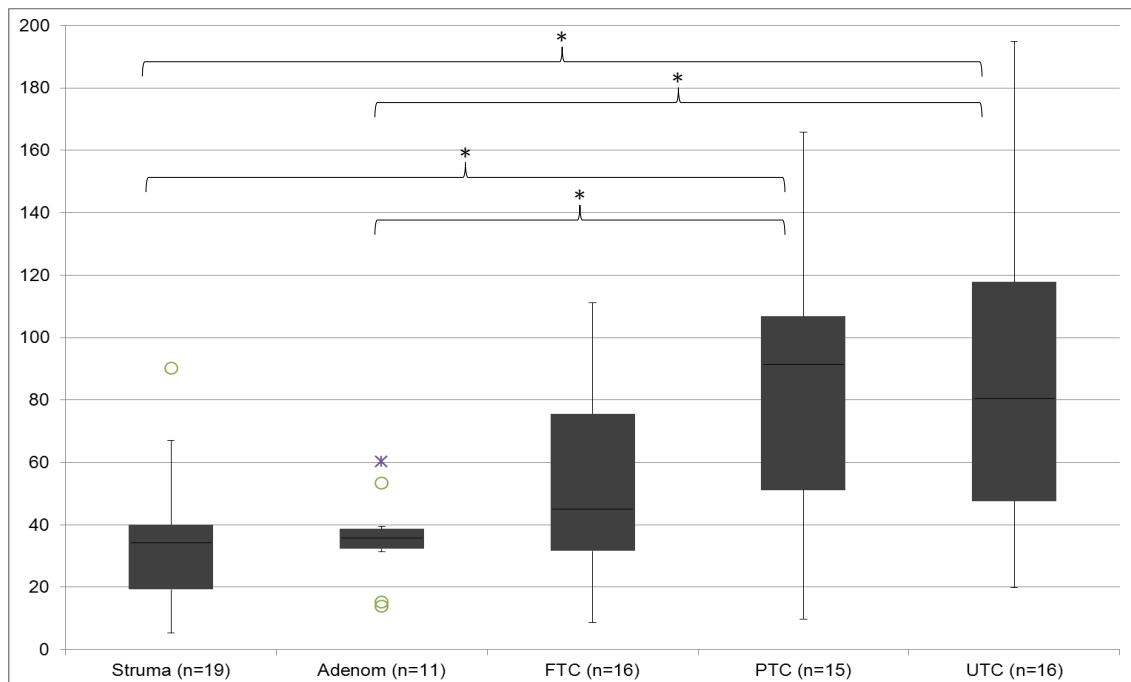


Abb. 14: Diagramm FGFR1 Western Blot

* = $p < 0,05$; y Achse=Protein Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.3.2 FGFR1 Real-Time PCR

Wie bereits in der Proteinanalyse festgestellt, zeigt sich auch auf mRNA Ebene eine große Varianz der Werte (beachte unterschiedliche Skalierung bei Western Blot und Real-Time PCR) (Abb. 15). Ein statistisch signifikanter Unterschied ist jedoch nur zwischen UTCs und Strumen nachweisbar, wobei erstere eine 68% höhere Expression zeigten. Die Korrelationsanalyse zwischen mRNA und Protein Expression ergab eine Korrelation von 0,529 nach Pearson ($p < 0,05$)

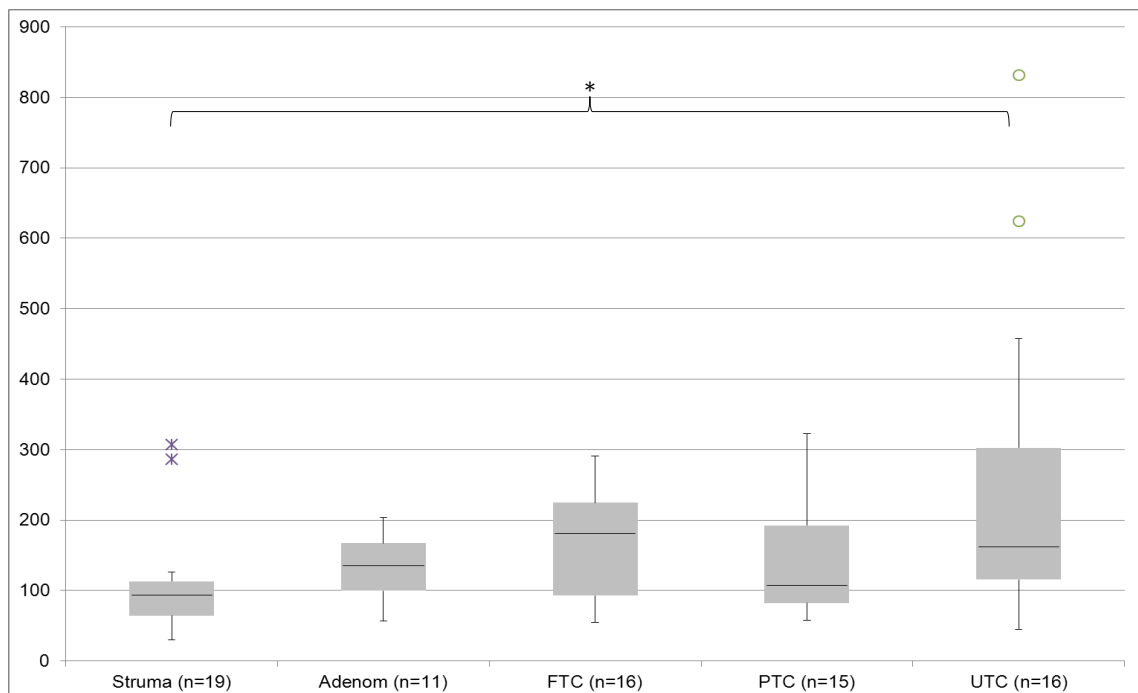


Abb. 15: Diagramm FGFR1 Real-Time PCR

* = $p > 0,05$; y Achse = mRNA-Expression in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle

4.3.3 Korrelation FGFR1 mit Phospho-PKM2

Um einen Zusammenhang zwischen FGFR1 und Phospho-PKM2 darzustellen führten wir eine Korrelationsanalyse durch. Da allerdings die Phospho-PKM2 Menge auch abhängig vom Gesamtproteingehalt an PKM2 ist, bildeten wir zunächst einen Quotienten aus Phospho-PKM2 und PKM2.

Während die Korrelation von FGFR1 mit Phospho-PKM2 bei 0,390 ($p < 0,05$) lag, zeigte sich nach Bildung des Quotienten aus Phospho-PKM2 / PKM2 eine

Korrelation von 0,439 ($p < 0,05$) (Abb. 16). Keine statistisch signifikante Korrelation zeigte sich bei der Analyse einzelner histologischer Gruppen zwischen FGFR1 und Phospho-PKM2. Bei Verwendung des Phospho-PKM2 / PKM2 Quotienten zeigte sich eine Korrelation mit FGFR1 in der Gruppe der UTCs mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,529 ($p = 0,035$). Die Gruppe der Strumen zeigte eine Korrelation von 0,405, lag allerdings mit einem p von 0,085 etwas zu hoch, um als statistisch signifikant zu gelten. Die 30 benignen Gewebe zeigten in der Analyse keine Abhängigkeit zwischen FGFR1 und Phospho-PKM2 bzw. Phospho-PKM2 / PKM2. Die 47 Karzinome lagen mit einem p von 0,057 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,279 außerhalb der statistischen Signifikanz.

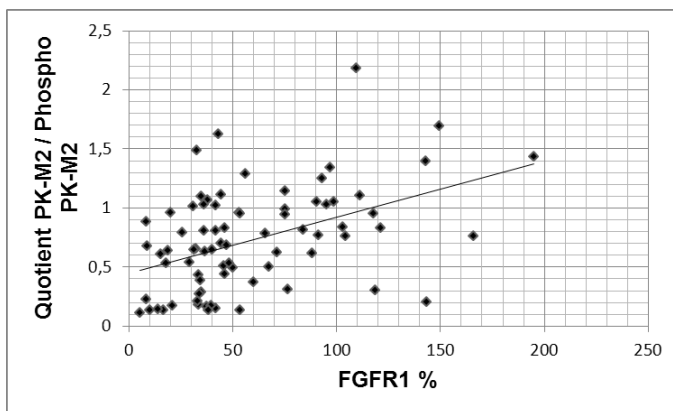


Abb. 16: Diagramm Western Blot FGFR1 in Korrelation zum Quotienten aus Phospho-PKM2 und PKM2

Korrelation nach Pearson: 0,439

4.3.4 Korrelation FGFR1 und Phospho-LDHA

Wie bereits für Phospho-PKM2 beschrieben, führten wir auch für Phospho-LDHA die Korrelationsanalyse mit FGFR1 sowohl nur mit Phospho-LDHA als auch in Abhängigkeit zur Gesamtproteinmenge von LDHA (Phospho-LDHA / LDHA Quotient) durch. Bei der Analyse aller 77 Gewebe zeigte sich eine Korrelation von 0,311 ($p = 0,006$) zwischen FGFR1 und Phospho-LDHA. Die Korrelation zwischen FGFR1 und dem Phospho-LDHA / LDHA Quotienten betrug 0,226 ($p = 0,048$) (Abb. 17). Die Analyse der 47 malignen Gewebe

erbrachte keine positive Korrelation von FGFR1 zum Phospho-LDHA / LDHA Quotienten; allerdings zeigte die Untergruppe der FTCs eine Korrelation von 0,647 ($p=0,007$). Bei der alleinigen Analyse der benignen Gewebe ergab sich eine Korrelation zwischen FGFR1 und Phospho-LDHA / LDHA Quotient von 0,364 ($p=0,048$).

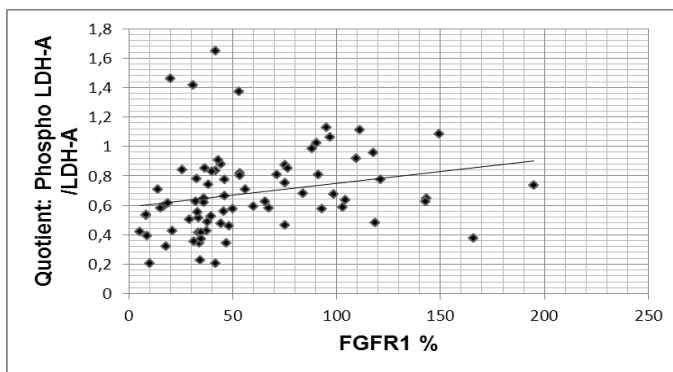


Abb. 17: Western Blot: FGFR1 in Korrelation zum Quotienten aus Phospho-LDHA und LDHA Korrelation nach Pearson: 0,226

4.5 Tumor-PKM2 Plasma ELISA

Tabelle 12: Prä- und postoperative Werte Tumor-PKM2 und Thyreoglobulin

Pat N.	Prä OP Tumor-PKM2 Wert U/ml	Post OP Tumor-PKM2 Wert U/ml	Prä OP Tg Wert	Post OP Tg Wert	Diagnose
1	24,48	50,50			Hashimoto Thyreoiditis
2	6,53	49,65			Mikrokarzinom (PTC)
3	18,32	45,77	22,5	17,1	PTC Metastasen
4	8,17	42,96			Struma nodosa
5	73,21	118,24			Morbus Basedow
6	38,20	67,56	<0,3	0,8	PTC
7	10,42	21,19			Struma nodosa
8	31,19	105,98			Struma nodosa
9	23,95	68,73			Struma nodosa / Aden.

10	25,09	35,08			Struma nodosa
11	39,92	65,99			Hashimoto Thyreoiditis
12	18,08	55,89			Struma nodosa
13	6,44	118,57		43	PTC
14	109,77	43,39	46,8	15,6	PTC
15	18,77	63,05	9,1	15,6	PTC
16	72,12	111,03			Nebenschilddrüsenadenom / Struma nodosa
17	11,73	105,15	34,8		Plattenepithelkarzinom
18	22,31	38,64			Struma nodosa
19	17,95	36,46			PTC
20	3,06	7,21	2,0	3,5	PTC
21	37,31	79,25			Struma
22	41,07	87,01			Struma
23	13,55	33,07	<0,3	<0,3	PTC
24	28,20	83,31			Struma nodosa
25	19,40	53,32			Follikuläres Adenom
26	54,47	117,52		2423	PDTC
27	359,01	192,78	35,6	8,6	PDTC
28	99,64	161,85			Struma nodosa
29	17,45	17,57			Hashimoto Thyreoiditis
30	48,05	78,56			Nebenschilddrüsenadenom / Struma nodosa

Die Gegenüberstellung benignen Gewebe (follikuläres Adenom, Struma, Hashimoto-Thyreoiditis und Nebenschilddrüsenadenom) mit malignen Geweben (PTC, PDTC, Plattenepithelkarzinom) ergab, sowohl prä- als auch postoperativ keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18). Innerhalb beider Gruppen kam es jedoch zu einem Anstieg der Tumor-PKM2-Werte bei der Messung 3-4 Tage postoperativ. Zwei Patienten (Nr. 14 und 27), beides Karzinompatienten, zeigten nach der Operation einen Rückgang der Tumor-PKM2-Werte. Alle anderen Patienten wiesen ein gleichbleibendes Level oder einen Anstieg der

Tumor-PKM2 auf. PDTC Patienten zeigten überdurchschnittlich hohe PKM2-Werte. Während ein PDTC Patient (Nr. 26, Tab. 12) gleichzeitig einen mit 2423 U/ml extrem hohen Thyreoglobulinwert zeigte, hatte der zweite Patient (Nr. 27 Tab.12) bei hohem PKM2-Wert einen nur unwesentlich erhöhten Thyreoglobulinwert.

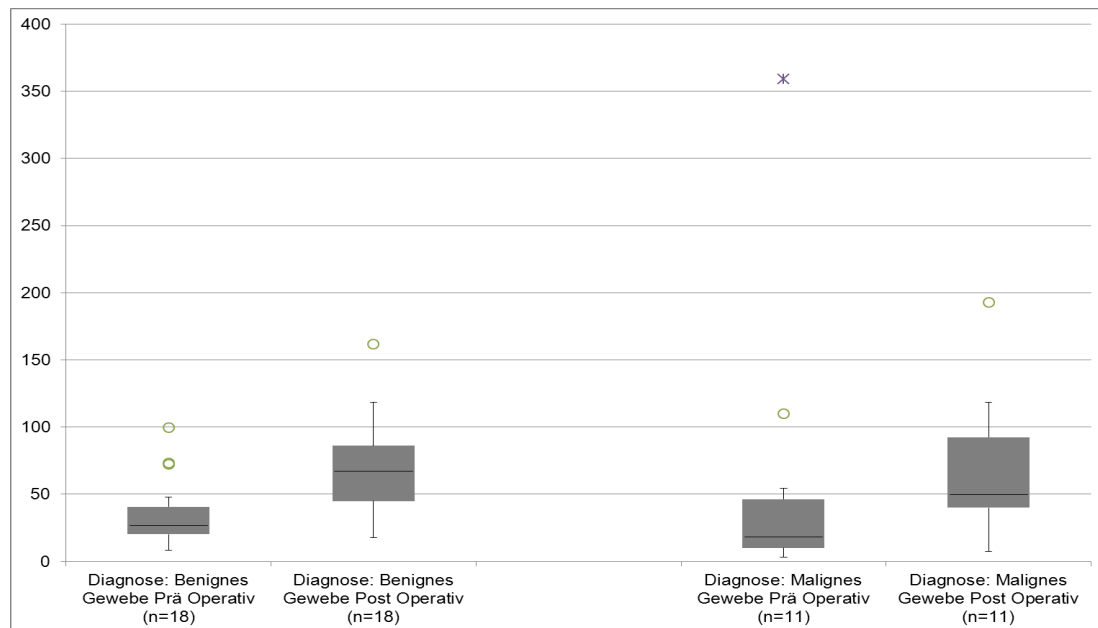


Abb. 18: Diagramm: Plasmawerte von Patienten ermittelt mittels Tumor-PKM2 Plasma Elisa Test

5 Diskussion

5.1 PKM2 und LDHA

Die PKM2-Expression zeigt sich auf Proteinebene in allen Tumorentitäten verglichen mit Strumen deutlich erhöht. Adenome zeigen eine höhere Expression als Strumen, allerdings eine niedrigere als die Karzinome. Insgesamt zeigen sie eine sehr große Bandbreite, von niedriger bis zu hoher Expression. Geht man von follikulären Adenomen als Vorstufe für FTCs aus, dann deckt sich dies mit Beobachtungen an Ösophagusgewebe, dass mit

zunehmender Malignität vermehrt PKM2 exprimiert wird [69]. Eine weitere Studie zeigt auch für die Schilddrüsenkarzinome die Überexpression von PKM2 im Vergleich zum umliegenden gesunden Schilddrüsengewebe [23].

Auch LDHA zeigt eine erhöhte Expression in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen verglichen mit Strumen, allerdings sind die Unterschiede bedeutend geringer ausgeprägt. Auch hier nehmen die follikulären Adenome die beschriebene Zwischenstellung ein.

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass während der Schilddrüsenkarzinomentstehung eine Umstellung des Stoffwechsels stattfindet, wodurch die Voraussetzungen für erhöhten Glukoseumsatz und den Warburg-Effekt gegeben sind. Dies ist vereinbar mit Daten, die eine Überexpression von c-Myc und HIF1-alpha in malignen Schilddrüsenerkrankungen zeigen, die zu einer Expression von PKM2 und LDHA führen [70-72].

Wie bereits mehrere Studien zeigten, könnte die Hemmung von LDHA und PKM2 eine therapeutische Option bedeuten [36,73]. Bisher eingesetzte Substanzen im Rahmen der „Targeted Therapie“ versprechen besonders dann Wirkung, wenn das Zielprotein deutlich überexprimiert wird. Diesen Anspruch erfüllt nach unserer Studie besonders PKM2. Während LDHA eine nur mäßig erhöhte Expression in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gegenüber Strumen zeigt. Anders als lange vermutet [18] wird von vielen Geweben überwiegend die M2 Isoform der Pyruvatkinase exprimiert [23]. Eine Hemmung oder Aktivierung hätte also auch Auswirkungen auf viele andere Organe, was PKM2 als selektives Ziel für die Krebstherapie in Frage stellt.

Vergleicht man mRNA und Proteinebene, fallen besonders bei LDHA Unterschiede auf. Während die Protein- und RNA-Daten von FGFR und PKM2 jeweils eine Korrelation zeigen, ist diese bei LDHA nicht nachweisbar. Hierfür können mehrere Gründe diskutiert werden. Zunächst muss festgehalten werden, dass die Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene keinen großen Schwankungen unterlag. Kommt nun eine gewisse Abweichung hinzu, die jedes Verfahren mit sich bringt, lässt sich der Zusammenhang zwischen RNA- und Proteinexpression evtl. nicht mehr nachweisen. Ein weiterer Grund für diese Abweichung könnten die verwendeten Housekeepinggene sein. Während wir im Rahmen des Western Blots β -Aktin

verwendeten, wurden die PCR-Daten mit GAPDH und β -ACTIN normalisiert. Da auch diese Gene, in geringem Maße reguliert werden, können sie das Ergebnis beeinflussen. Letztendlich könnte die Ursache auch in der Regulation der Degradation von LDHA liegen, wodurch die LDHA Proteinlevel unabhängig von der mRNA Expression reguliert werden können. Für Pankreaskarzinome konnte eine verminderte Acetylierung der LDHA an Lysin 5 und daraus folgend ein verminderter Abbau nachgewiesen werden [74].

5.2 Phospho-PKM2 und Phospho-LDHA

In erster Linie ist die Phospho-PKM2 oder Phospho-LDHA Menge abhängig von der Menge an PKM2 oder LDHA. Trotzdem lässt sich der klare Trend nachweisen, dass mit zunehmender Malignität ein größerer Anteil der PKM2 bzw. LDHA phosphoryliert ist. Dabei ist zu beachten, dass die Phosphorylierung der PKM2 zur Inaktivierung führt, die durch einen bisher unbekanntem Effekt auch bei nicht phosphorylierten PKM2-Molekülen zum Verlust der Bindungsfähigkeit für FBP führt [29]. Eine geringe Änderung des Phosphorylierungsstatus hat also unter Umständen große Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität. Zusätzlich zu der bereits beschriebenen Hochregulation der Expression findet durch die vermehrte Phosphorylierung eine weitere Verschiebung des Stoffwechsels zu Gunsten des Warburg-Effekts statt.

Wie unsere Daten zeigen konnten, korrelieren Phosphorylierungsstatus von LDHA und PKM2 mit der FGFR1-Expression. Die Korrelation von FGFR mit dem Phospho-LDHA / LDHA- bzw. mit dem Phospho-PKM2 / PKM2 Quotienten liegt allerdings mit 0,226 bzw. 0,439 nicht sehr hoch. Das legt nahe, dass weitere Faktoren den Phosphorylierungsstatus von LDHA und PKM2 beeinflussen. Grundsätzlich kann man davon ausgehen, dass eine hohe Expression des Rezeptors auch zu einer verstärkten Aktivität führt. Um einen Effekt auf die Zielproteine auszuüben, bedarf es aber der Aktivierung des Rezeptors, was durch Phosphorylierung geschieht. Wir beschränkten uns auf die absolute Expression und konnten so keine Unterschiede erkennen, die aus einer möglicherweise unterschiedlichen Aktivität des Rezeptors resultieren.

Auch aktivierende Mutationen oder Fusionsproteine mit aktivem FGFR1 Tyrosinkinaseanteil sind denkbar und in anderen malignen Erkrankungen nachgewiesen. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt auch in der Zugehörigkeit des FGFR1 zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Eine Phosphorylierung von LDHA und PKM2 durch andere Rezeptortyrosinkinasen wäre daher denkbar und in weiteren Studien zu überprüfen [75,76].

5.3 FGFR1

Der Beschriebene Zusammenhang von FGFR1 mit dem Warburg-Effekt [16,29] könnte eine therapeutische Möglichkeit bieten. Wie wir zeigen konnten, wird FGFR1 in allen Schilddrüsenkarzinomen stark überexprimiert. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass die Bandbreite der Expression innerhalb der histologischen Gruppen groß ist. Vor einer evtl. Therapie böte sich also die Bestimmung der Expression im Karzinomgewebe an, um die Therapie auf die Gruppe mit deutlicher Überexpression zu begrenzen.

Ein direkter Eingriff in die Glykolyse könnte in Geweben, die auf die Glykolyse angewiesen sind, zu starken Nebenwirkungen führen. Die Hemmung des FGFR1 hätte hingegen nur dann einen Effekt auf die Glykolyse, wenn der Rezeptor überexprimiert wird.

5.4 Tumor-PKM2 im Blut-Plasma

Die sehr regelmäßig auftretende hohe Expression der PKM2 in Tumoren, einhergehend mit der Dimerisierung (Tumor-PKM2), führte zu Versuchen, Tumor-PKM2 als Tumormarker einzusetzen. In dem Vorteil der hohen Expression in vielen Tumoren liegt allerdings auch der Nachteil. Im Gegensatz zu Thyreoglobulin ist Tumor-PKM2 nicht organspezifisch. Wie unsere Daten der benignen Gewebe zeigen, sind auch hier die Tumor-PKM2 Level teils deutlich erhöht. Also auch ohne eine Krebserkrankung können hohe Tumor-PKM2 Level auftreten. Drei Tage nach der Thyreoidektomie steigen sie sogar noch an. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Bei jeder Operation, unabhängig von der Indikation, kommt es zu mehr oder weniger umfangreichen Zerstörung von

Gewebe, aus dem PKM2 freigesetzt wird und anschließend für einige Tage im Blut zirkuliert, bevor es abgebaut wird. Denkbar ist auch eine Hochregulation der PKM2 im Rahmen des Heilungsprozesses, da sie besonders in schnell proliferierende Zellen exprimiert wird.

Zwei Patienten (Nr. 14 PTC und Nr. 27 PDTC) zeigten präoperativ stark überdurchschnittliche Tumor-PKM2 Levels, die postoperativ von 109 U/ml auf 43 U/ml bzw. von 359 U/ml auf 192 U/ml abfielen. Parallel dazu vielen die Thyreoglobulinwerte bei diesen beiden Geweben ab. Die benignen Gewebe zeigten durchgehend keinen Abfall nach Operation. Zwei Karzinom-Patienten (Nr. 15 und Nr. 20) zeigten jeweils nach Operation einen Anstieg von Thyreoglobulin und Tumor-PKM2. Dies lässt vermuten, dass es sich um Tumor-PKM2 aus den entfernten Tumoren handelt. Es lässt sich also schlussfolgern, dass Tumor-PKM2 aus Schilddrüsenkarzinomen im Blutplasma nachweisbar ist. Die Mehrzahl der PTC Patienten zeigte in unserer Studie keine erhöhten Tumor-PKM2 Werte verglichen mit Patienten, die auf Grund benigner Diagnosen operiert wurden. Der Einsatz als Tumormarker ist damit fraglich. Sollte es allerdings zur Behandlung von Patienten mit Inhibitoren der Glykolyse bzw. der PKM2 kommen, wäre die Bestimmung vor der Behandlung und das Monitoring mit einem Tumor-PKM2-Plasma-Elisa-Test denkbar.

6 Zusammenfassung

Pyruvatkinase-M2 wird in allen untersuchten Schilddrüsenkarzinomentitäten höher exprimiert als in den benignen Strumen. Dies deutet auf eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Krebszelle hin. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass mit zunehmender Malignität ein größerer PKM2 Anteil phosphoryliert ist. LDHA zeigt eine weniger deutlicher Überexpression verglichen mit Strumen und diese auch nur bei FTC und PTC, nicht aber bei UTC-Gewebe. Die Überexpression der PKM2 könnte eine therapeutische Option darstellen. Die Tatsache, dass einzelne Strumen und Adenome PKM2 und LDHA ebenfalls sehr hoch exprimieren, könnte für einen frühen Schritt in der Tumorentstehung sprechen. FGFR1 wird verglichen mit Strumen in allen Schilddrüsenkarzinomenentitäten überexprimiert. Dabei korreliert es mit dem Phosphorylierungsstatus von LDHA

und PKM2. FGFR1 erscheint als geeignetes Ziel für die Hemmung des Warburg-Effekts in Schilddrüsenkarzinomen. Wir konnten Hinweise liefern, dass sich PKM2 bei ausreichender Tumormasse im Blut nachweisen lässt, allerdings als Tumormarker für Schilddrüsenkarzinome nicht in Frage kommt.

7 Literaturverzeichnis

1. Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314.
2. Warburg O (1924) über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12: 1131–1137. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3900.
3. Lunt SY, Vander Heiden MG (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 441–464. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
4. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, et al. (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Research* 60: 916–921.
5. Curi R, Newsholme P, Newsholme EA (1988) Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem J* 250: 383–388.
6. Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R (1992) Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev Oncog* 3: 91–115.
7. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* 7: 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
8. Dang CV (2009) PKM2 tyrosine phosphorylation and glutamine metabolism signal a different view of the Warburg effect. *Science Signaling* 2: pe75. doi:10.1126/scisignal.297pe75.
9. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, et al. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19345–19350. doi:10.1073/pnas.0709747104.
10. Gupta GS (2012) LDH-C4: a target with therapeutic potential for cancer and contraception. *Mol Cell Biochem* 371: 115–127. doi:10.1007/s11010-012-1428-2.
11. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E (2003) Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol* 24: 199–202.
12. Hilf R, Rector WD, Orlando RA (1976) Multiple molecular forms of lactate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in normal and abnormal human breast tissues. *Cancer* 37: 1825–1830.

13. Dang CV (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 19: 1–11.
14. Baker LCJ, Boulton JKR, Walker-Samuel S, Chung Y-L, Jamin Y, et al. (2012) bjc2012131a. *British Journal of Cancer* 106: 1638–1647. doi:10.1038/bjc.2012.131.
15. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, et al. (2010) Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 2037–2042. doi:10.1073/pnas.0914433107.
16. Fan J, Hitosugi T, Chung TW, Xie J, Ge Q, et al. (2011) Tyrosine Phosphorylation of Lactate Dehydrogenase A Is Important for NADH/NAD⁺ Redox Homeostasis in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 31: 4938–4950. doi:10.1128/MCB.06120-11.
17. Noguchi T, Inoue H, Tanaka T (1986) The M1-and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 261: 13807–13812.
18. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL (2010) HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463: 364–368. doi:10.1038/nature08697.
19. Clower CV, Chatterjee D, Wang Z, Cantley LC, Vander Heiden MG, et al. (2010) The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 1894–1899. doi:10.1073/pnas.0914845107.
20. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, et al. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230–233. doi:10.1038/nature06734.
21. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E (2005) Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology* 15: 300–308. doi:10.1016/j.semcancer.2005.04.009.
22. Vander Heiden MG, Christofk HR, Schuman E, Subtelny AO, Sharfi H, et al. (2010) Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem Pharmacol* 79: 1118–1124. doi:10.1016/j.bcp.2009.12.003.
23. Bluemlein KK, Grüning N-MN, Feichtinger RGR, Lehrach HH, Kofler BB, et al. (2011) No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2: 393–400.
24. Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, Cheng SY (1991) An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6-bisphosphate. *Biochemistry* 30: 7105–7111.
25. Ashizawa K, Willingham MC, Liang CM, Cheng SY (1991) In vivo

- regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate. *J Biol Chem* 266: 16842–16846.
26. Mazurek S (2007) Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found Symp Proc*: 99–124.
 27. Christofk HRH, Vander Heiden MGM, Wu NN, Asara JM, Cantley LC (2008) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452: 181–186. doi:10.1038/nature06667.
 28. Chen N, Rinner O, Czernik D, Nytko KJ, Zheng D, et al. (2011) The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase. *Nature Publishing Group* 21: 983–986. doi:10.1038/cr.2011.66.
 29. Hito T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, et al. (2009) Tyrosine Phosphorylation Inhibits PKM2 to Promote the Warburg Effect and Tumor Growth. *Science Signaling* 2: ra73–ra73. doi:10.1126/scisignal.2000431.
 30. Gupta V, Bamezai RNK (2010) Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein. *Protein Science* 19: 2031–2044. doi:10.1002/pro.505.
 31. Yang W, Xia Y, Hawke D, Li X, Liang J, et al. (2012) PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* 150: 685–696. doi:10.1016/j.cell.2012.07.018.
 32. Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, et al. (2011) Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 480: 118–122. doi:10.1038/nature10598.
 33. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, et al. (2011) Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* 145: 732–744. doi:10.1016/j.cell.2011.03.054.
 34. Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu Z-R (2012) Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell* 45: 598–609. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.001.
 35. Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, et al. (2011) Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene* 30: 4297–4306. doi:10.1038/onc.2011.137.
 36. Goldberg MS, Sharp PA (2012) Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *Journal of Experimental Medicine* 209: 217–224. doi:10.1126/science.123.3191.309.
 37. Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ, Jiang J-K, Boxer MB, et al. (2012) Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress

- tumorigenesis. *Nat Chem Biol* 8: 839–847. doi:10.1038/nchembio.1060.
38. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 139–149. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
 39. di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA (2012) A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. *Advances in Urology 2012*: 1–10. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0394.
 40. Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, et al. (2011) Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS ONE* 6: e20351.
 41. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, et al. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61–70. doi:10.1038/nature11412.
 42. Katoh M, Nakagama H (2013) FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med Res Rev*: n/a–n/a. doi:10.1002/med.21288.
 43. Issa A, Gill JW, Heideman MR, Sahin O, Wiemann S, et al. (2013) bcr3379. *Breast Cancer Research* 15: R8. doi:10.1186/bcr3379.
 44. St Bernard R (2004) Fibroblast Growth Factor Receptors as Molecular Targets in Thyroid Carcinoma. *Endocrinology* 146: 1145–1153. doi:10.1210/en.2004-1134.
 45. Davies L, Welch HG (2006) Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 295: 2164–2167.
 46. Gimm O (2001) Thyroid cancer. *Cancer Lett* 163: 143–156.
 47. Takano T (2007) Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: Theory and practice. *Seminars in Cancer Biology* 17: 233–240. doi:10.1016/j.semcancer.2006.02.001.
 48. Tumorregister M (2013) Tumorregister München. Überleben C73: Schilddrüsenkarzinom [Internet]. 2013 [aktualisiert 01.04.2013]. Abrufbar von: http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C73__G.pdf: 1–12.
 49. Biersack HJ, Grünwald F (2005) Thyroid Cancer. Springer Verlag. 1 pp.
 50. Schlumberger MJ (1998) Papillary and follicular thyroid carcinoma. *New England Journal of Medicine* 338: 297–306.
 51. Grebe SK, Hay ID (1995) Follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 24: 761–801.

52. Are C, Shaha AR (2006) Anaplastic Thyroid Carcinoma: Biology, Pathogenesis, Prognostic Factors, and Treatment Approaches. *Ann Surg Oncol* 13: 453–464. doi:10.1245/ASO.2006.05.042.
53. Herle AJ, Uller RP (1975) Elevated serum thyroglobulin. A marker of metastases in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 56: 272–277. doi:10.1172/JCI108090.
54. Ozata M, Suzuki S, Miyamoto T, Liu RT, Fierro-Renoy F, et al. (1994) Serum thyroglobulin in the follow-up of patients with treated differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 98–105.
55. Phan HTT, Jager PL, van der Wal JE, Sluiter WJ, Plukker JTM, et al. (2008) The follow-up of patients with differentiated thyroid cancer and undetectable thyroglobulin (Tg) and Tg antibodies during ablation. *European Journal of Endocrinology* 158: 77–83. doi:10.1530/EJE-07-0399.
56. Gupta-Abramson V, Troxel AB, Nellore A, Puttaswamy K, Redlinger M, et al. (2008) Phase II Trial of Sorafenib in Advanced Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26: 4714–4719. doi:10.1200/JCO.2008.16.3279.
57. Kloos RT, Ringel MD, Knopp MV, Hall NC, King M, et al. (2009) Phase II Trial of Sorafenib in Metastatic Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27: 1675–1684. doi:10.1200/JCO.2008.18.2717.
58. Brose MS, Nutting CM, Sherman SI, Shong YK, Smit JW, et al. (2011) 1471-2407-11-349. *BMC Cancer* 11: 349. doi:10.1186/1471-2407-11-349.
59. Carr LL, Mankoff DA, Goulart BH, Eaton KD, Capell PT, et al. (2010) Phase II Study of Daily Sunitinib in FDG-PET-Positive, Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer and Metastatic Medullary Carcinoma of the Thyroid with Functional Imaging Correlation. *Clinical Cancer Research* 16: 5260–5268. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0994.
60. Goulart B, Carr L, Martins RG, Eaton K, Kell E, et al. (2008) Phase II study of sunitinib in iodine refractory, well-differentiated thyroid cancer (WDTC) and metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC). *J Clin Oncol* 26: a6062.
61. Licitra L, Locati LD, Greco A, Granata R, Bossi P (2010) Multikinase inhibitors in thyroid cancer. *European Journal of Cancer* 46: 1012–1018. doi:10.1016/j.ejca.2010.01.010.
62. Kim KB, Cabanillas ME, Lazar AJ, Williams MD, Sanders DL, et al. (2013) Clinical Responses to Vemurafenib in Patients with Metastatic Papillary Thyroid Cancer Harboring BRAF Mutation. *Thyroid*. doi:10.1089/thy.2013.0057.
63. Musholt TJ (2010) Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie - Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Endokrinologie.

Operative Therapie benigner Schilddrüsenerkrankungen: 1–16.

64. Thomas GA, Williams D, Williams ED (1989) The clonal origin of thyroid nodules and adenomas. *Am J Pathol* 134: 141–147.
65. Bryson PC, Shores CG, Hart C, Thorne L, Patel MR, et al. (2008) Immunohistochemical distinction of follicular thyroid adenomas and follicular carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134: 581–586. doi:10.1001/archotol.134.6.581.
66. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27: 495–501.
67. Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R (2003) Duplex Real-Time SYBR Green PCR Assays for Detection of 17 Species of Food- or Waterborne Pathogens in Stools. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5134–5146. doi:10.1128/JCM.41.11.5134-5146.2003.
68. Giglio S (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 31: 136e–136. doi:10.1093/nar/gng135.
69. Koss K, Harrison RF, Gregory J, Darnton SJ, Anderson MR, et al. (2004) The metabolic marker tumour pyruvate kinase type M2 (tumour M2-PK) shows increased expression along the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 57: 1156–1159. doi:10.1136/jcp.2004.018150.
70. Terrier P, Sheng ZM, Schlumberger M, Tubiana M, Caillou B, et al. (1988) Structure and expression of c-myc and c-fos proto-oncogenes in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer* 57: 43.
71. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR (1993) Demonstration of a TGF- α -EGF-receptor autocrine loop and c-myc protein over-expression in papillary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 55: 37–43.
72. Burrows N, Resch J, Cowen RL, Wasielewski von R, Hoang-Vu C, et al. (2010) Expression of hypoxia-inducible factor 1 in thyroid carcinomas. *Endocrine Related Cancer* 17: 61–72. doi:10.1677/ERC-08-0251.
73. Xie H, Valera VA, Merino MJ, Amato AM, Signoretti S, et al. (2009) LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 8: 626–635. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-1049.
74. Zhao D, Zou S-W, Liu Y, Zhou X, Mo Y, et al. (2013) Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 23: 464–476. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.005.
75. Guasch G (2004) FOP-FGFR1 tyrosine kinase, the product of a t(6;8) translocation, induces a fatal myeloproliferative disease in mice. *Blood*

103: 309–312. doi:10.1182/blood-2003-05-1690.

76. Wu Y-M, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, et al. (2013) Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer discovery* 3: 636–647.

9 Thesen

1. Pyruvatkinase-M2 wird in Schilddrüsenkarzinomen überexprimiert.
2. Laktatdehydrogenase-A wird in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen leicht erhöht exprimiert.
3. Die Phosphorylierung von LDHA und PKM2 steigt mit zunehmender Malignität des Gewebes.
4. Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor-1 wird in Schilddrüsenkarzinomen überexprimiert, zeigt aber besonders in malignen Geweben eine stark schwankende Konzentration.
5. Die Phosphorylierung von LDHA und PKM2 korrelieren mit der Expression des FGFR1.
6. Die Beteiligung weiterer Tyrosinkinase an der Phosphorylierung von PKM2 und LDHA sind wahrscheinlich.
7. Die direkte Beeinflussung der Pyruvatkinase-M2, über Hemmung oder über Aktivierung, könnte in Schilddrüsenkarzinomen eine therapeutische Option darstellen.
8. Tyrosinkinaseinhibitoren mit FGFR1 als Ziel könnten den Warburg-Effekt in Schilddrüsenkarzinomzellen beeinflussen und so deren Wachstum verlangsamen.

10 Lebenslauf

Nachname, Vorname Kachel, Paul
Adresse Dryander Straße 13
D-06110 Halle
Telefon +49 152 34208405
E-Mail baussa@gmx.de
Staatsangehörigkeit Deutsch
Geburtsdatum 29.11.1982
Geburtsort Frankfurt am Main

2009 → Promotion bei Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu
Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-,
Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum
Halle (Saale), ECHO Labor

9.2013 → Assistenzarzt Pathologie Uniklinik RWTH-Aachen

10.2006 – 11.2012 Medizinstudium: Staatsexamen Humanmedizin
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

4.2005 – 9.2006 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger
Lahn Dill Kliniken GmbH Standort Wetzlar

1.2004 - 9.2004 Work and Travel in Australien

10.2002 – 12.2003 Zivildienst, Rettungssanitäter, DRK Fulda

1989 – 2002 Schulbildung: Allgemeine Hochschulreife
Rudolf Steiner Schule Loheland, Fulda

Halle, den

Paul Kachel

11 Selbstständigkeitserklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Universität Halle erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Frühere Promotionsversuche bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den

Paul Kachel

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe „Experimentelle und Chirurgische Onkologie“.

Ich danke Prof. Dr. Dr. h.c. Henning Dralle für die freundliche Überlassung des Themas.

Meinem Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu möchte ich danken, dass er mir die nötige Freiheit ließ zu lernen, ohne mich alleine zu lassen.

Frau OÄ PD Dr. Kerstin Lorenz danke ich für die Hilfe bei sämtlichen klinischen Fragestellungen und Aufgaben.

Frau Kathrin Hammje danke ich für ihre hervorragende Anleitung und ihre große Geduld.

Herrn Dr. Carsten Sekulla danke ich für seine stets ausführliche Computer- und Statistikhilfe.

Herrn Dr. Bogusz Trojanowicz danke ich für kurze und präzise Antworten auf sämtliche Fragen.

Dem Team des ECHO-Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit.