

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-W. Müller

**Analyse des Glucose-Stoffwechsels solider Tumoren des
Kindes- und Jugendalters mit Hilfe der Immunhistochemie
und Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Daniel Finkenstädt

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: PD Dr. Hautzel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Borkhardt

Der Weg ist das Ziel.

Teile dieser Arbeit wurden bis dato nicht veröffentlicht. Nach Abschluss des Promotionsverfahrens wird eine wissenschaftliche Publikation der Ergebnisse angestrebt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 ENTDECKUNGSGESCHICHTE DES GLYKOLYSE-STOFFWECHSELS	1
1.2 GRUNDLAGEN DES GLUCOSE-STOFFWECHSELS	1
1.2.1 <i>Glucose-Stoffwechsel</i>	1
1.2.2 <i>Glucose-Stoffwechsel in Tumoren</i>	4
1.3 BESONDERE PROTEINE DES GLUCOSESTOFFWECHSELS	5
1.3.1 <i>Glucosetransporter</i>	5
1.3.2 <i>Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)</i>	6
1.3.3 <i>Pyruvatkinase M2 (PKM2)</i>	8
1.3.4 <i>Transketolase-like-1 (TKTL1)</i>	8
1.4 DIE ¹⁸ FDG-POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE	9
1.4.1 <i>Prinzip der ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie</i>	9
1.4.2 <i>Grundlagen für die Interpretation der ¹⁸FDG-PET-Daten</i>	11
1.4.3 <i>Standardized uptake value</i>	12
1.4.4 <i>Bedeutung der ¹⁸FDG-PET für die Tumordiagnostik</i>	13
1.4.5 <i>Strahlenexposition</i>	14
1.5 SOLIDE TUMOREN DES KINDES- UND JUGENDALTERS	14
1.5.1 <i>Osteosarkom</i>	14
1.5.2 <i>Ewing-Sarkom</i>	16
1.5.3 <i>Neuroblastom</i>	17
1.6 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION	18
2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1 PATIENTEN	20
2.1.1 <i>Patientenkohorte, Ethikvotum und Einschlusskriterien</i>	20
2.1.2 <i>Klinische Charakteristika der Patientenkohorte</i>	21
2.2 MATERIALIEN	22
2.2.1 <i>Materialien, Antikörper und Chemikalien</i>	22
2.2.2 <i>Geräte</i>	24
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE	25
2.3.1 <i>Durchführung der immunhistochemischen Färbungen</i>	25
2.3.2 <i>Auswertung der immunhistochemischen Färbungen</i>	27
2.3.3 <i>Positiv- und Negativkontrollen</i>	29

2.4	¹⁸ FDG-POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE	29
2.4.1	Durchführung der ¹⁸ FDG-Positronen-Emissions-Tomographie	29
2.4.2	Auswertung der ¹⁸ FDG-Positronen-Emissions-Tomographie	30
2.5	STATISTISCHE METHODEN	31
3.	ERGEBNISSE	32
3.1	ÜBERSICHT DER PRÄTHERAPEUTISCH ERHOBENEN DATEN	32
3.2	AUSWERTUNG DER PRÄTHERAPEUTISCHEN POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIEN	33
3.3	AUSWERTUNG DER PRÄTHERAPEUTISCHEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE	34
3.3.1	GLUT1	34
3.3.2	GLUT3	36
3.3.3	Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)	37
3.3.4	Pyruvatkinase M2 (PKM2)	39
3.3.5	TKTL1	40
3.4	VERGLEICH DER PRÄTHERAPEUTISCHEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE UNTEREINANDER	41
3.5	VERGLEICH DER PRÄTHERAPEUTISCHEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE MIT DENEN DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIEN	43
3.6	ÜBERSICHT DER POSTTHERAPEUTISCH ERHOBENEN DATEN	43
3.7	AUSWERTUNG DER POSTTHERAPEUTISCHEN POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIEN	45
3.8	AUSWERTUNG DER POSTTHERAPEUTISCHEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE	46
3.9	VERGLEICH DER POSTTHERAPEUTISCHEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE MIT DENEN DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIEN	48
3.10	VERGLEICH DER PRÄ- MIT DEN POSTTHERAPEUTISCH ERHOBENEN DATEN	50
3.10.1	Glucoseaufnahmeverhalten der Tumoren vor und nach Chemotherapie	50
3.10.2	Änderung der Proteinexpression der Tumore vor und nach Chemotherapie	51
3.11	IMMUNHISTOCHEMISCH ERMITTELTE BASISWERTE DER PROTEIN-EXPRESSION IM VORLÄUFERGEWEBE	54
4.	DISKUSSION	54
4.1	PRÄTHERAPEUTISCHE ERGEBNISSE	56
4.2	POSTTHERAPEUTISCHE ERGEBNISSE UND VERLAUF	63
4.3	AUSBLICK	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
6.	LITERATURVERZEICHNIS	67
7.	ANHANG	75
	Danksagung	75
	Eidesstaatliche Erklärung	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenfassung der Glykolyse	2
Abbildung 2: Die Regulationsmechanismen der HIF-1-Kaskade	7
Abbildung 3: Schematische Illustration der Funktionsweise der PET	10
Abbildung 4: Tumorentitäten-Verteilung in der Patientenkohorte.....	21
Abbildung 5: Übersicht zur Errechnung des immunreaktiven Scores (IRS).....	28
Abbildung 6: SUVmax ₁ -Daten in den Tumor-Untergruppen	33
Abbildung 7: MRT- und PET-Aufnahmen des Patienten Nr. 12	34
Abbildung 8: GLUT1-Expression bei Patient Nr. 5 mit Ewing-Sarkom.....	35
Abbildung 9: GLUT3-Expression bei Patient Nr. 7 mit Ewing-Sarkom.....	37
Abbildung 10: HIF-1 α -Expression bei Patient Nr. 14 mit Osteosarkom	38
Abbildung 11: PKM2-Expression bei Patient Nr. 19 mit Osteosarkom.....	39
Abbildung 12: TKTL1-Expression bei Patient Nr.21 mit Neuroblastom.....	41
Abbildung 13: Die prätherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse.....	42
Abbildung 14: SUVmax ₂ -Daten in den Tumoruntergruppen	46
Abbildung 15: Posttherapeutisch ermittelte IRS-Scores der Proteine.....	47
Abbildung 16: PET- und immunhistochemische Bilder des Patienten Nr. 21.....	49
Abbildung 17: Gegenüberstellung der SUVmax ₁ - und SUVmax ₂ -Werte.....	50
Abbildung 18: PET-Aufnahmen von Patient Nr. 10 mit Ewing-Sarkom.....	51
Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von GLUT 1 bei Patient Nr. 13	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Salzer-Kuntschik: Klassifikation des Therapieansprechens	16
Tabelle 2: Alter- und Geschlechterverteilung in den Tumoruntergruppen	22
Tabelle 3: Ergebnisse der prätherapeutischen PET / Immunhistochemie.....	32
Tabelle 4: IRS-Score von GLUT1 in den Tumor-Untergruppen	36
Tabelle 5: IRS-Score von GLUT3 in den Tumor-Untergruppen	37
Tabelle 6: IRS-Score von HIF-1 α in den Tumor-Untergruppen	39
Tabelle 7: IRS-Score von PKM2 in den Tumor-Untergruppen	40
Tabelle 8: IRS-Score von TKTL1 in den Tumor-Untergruppen	41
Tabelle 9: Ergebnisse der posttherapeutischen PET / Immunhistochemie	44
Tabelle 10: Gegenüberstellung der prä- / posttherapeutischen Untersuchungen	52
Tabelle 11: IRS-Score der fünf Proteine in den Vorläufergeweben.....	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
CT	Computertomographie
CUP	Cancer of unknown primary
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EPO	Erythropoetin
ETS-Gen	Erythroblastosis virus transferring sequence gen
EWS	Ewing-Sarkom
EWS-FLI1	Ewing-Sarkom friend leukemia integration 1 transcription factor
GLUT	Glucosetransporter
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HRE	Hypoxia response element
IRS	Immunreaktiver Score
KM	Michaelis-Menten-Konstante
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin
MRT	Magnetresonanztomographie
mt-DNA	Mitochondriale DNA
NB	Neuroblastom
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
OAc	Acetylierung
OH	Hydroxylierung
OS	Osteosarkom
P300/CBP	Coaktivator/CREB-binding protein
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
PP	Prozentsatz positiver Zellen

pVHL	Von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein
PK	Pyruvatkinase
RB	Retinoblastom
r²	Pearson-Korrelationskoeffizient
r_s	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCLC	Small cell lung carcinoma
SI	Staining intensity
SLC	Solute carrier family
SUV	Standardized uptake value
TKTL	Transketolase
Ub	Ubiquitin
UKD	Universitätsklinik Düsseldorf
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem
2-OG	2-Oxoglutarat
σ (SD)	Standardabweichung

1. Einleitung

1.1 Entdeckungsgeschichte des Glykolyse-Stoffwechsels

Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts gab es Untersuchungen zur alkoholischen Gärung und damit zum Abbau von Zucker im weitesten Sinne. Bis zur vollständigen Aufklärung aller Ablaufschritte der Glykolyse (gr. glykys ‚süß‘ und lysis ‚Auflösung‘) um 1940 gab es einige besonders hervorzuhebende Entdeckungen.

So konnte der französische Chemiker Joseph Louis Gay-Lussac bereits 1815 die Brutto-Reaktionsgleichung für den Abbau von Glucose zu Ethanol aufstellen, ohne jedoch die Zwischenschritte genau identifizieren zu können (1). In den folgenden Jahrzehnten entbrannte eine wissenschaftliche Kontroverse darüber, ob diese alkoholische Gärung an den Einfluss von lebendigen Zellen gebunden sei. So stellte Louis Pasteur im Jahre 1857 die Behauptung auf, dass die alkoholische Gärung nur unter Mitwirkung von lebendigen Hefezellen funktionieren könne. Dieses wurde 1897 durch Eduard Buchner widerlegt, der aufzeigen konnte, dass auch zellfreie Hefezellextrakte ausreichen, um die Fermentation zu ermöglichen (2). Mit diesen bahnbrechenden Entdeckungen wurden Stoffwechselvorgänge innerhalb von Lebewesen als eine Folge von chemischen Reaktionen erklärbar. Nicht zuletzt durch Otto Warburg, Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin von 1931, konnten bis 1940 alle Zwischenschritte und beteiligten Enzyme der Glykolyse aufgedeckt werden. Dabei konzentrierte sich Otto Warburgs Forschung auf die oxygene Photosynthese, sowie die genauere Charakterisierung der an den energieliefernden Reaktionen der Atmung und Gärung beteiligten wasserstoffübertragenden Enzyme (3, 4).

1.2 Grundlagen des Glucose-Stoffwechsels

1.2.1 Glucose-Stoffwechsel

Glucose ist der wesentliche Energieträger fast aller zellulären Lebewesen. Als Monosaccharid mit der Strukturformel $C_6H_{12}O_6$ wird die Glucose den Kohlenhydraten zugeordnet. Da freie Glucose auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften nur schwer die Lipiddoppelschicht der Zellmembran passieren kann, erfolgt die Aufnahme der Glucose in die Zellen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion, die mit Hilfe von

transmembranären Carrierproteinen, den sog. Glucosetransportern, funktioniert. Bislang sind 14 verschiedene Arten von Glucosetransportern bekannt (siehe auch 1.3.1) (5). Die Klasse I der Glucosetransporter, zu der auch die insulinunabhängigen **Glucosetransporter 1 (GLUT1)** und 3 (GLUT3) gehören, spielt eine zentrale Rolle in der Glucoseversorgung der meisten Säugerzellen. Nach Aufnahme der Glucose in die Zelle, wird die Glucose durch das Enzym Hexokinase, welches in verschiedenen Isoformen vorkommt, in Glucose-6-Phosphat umgewandelt (6). Einen schematischen Überblick der Glykolyse gibt Abb. 1:

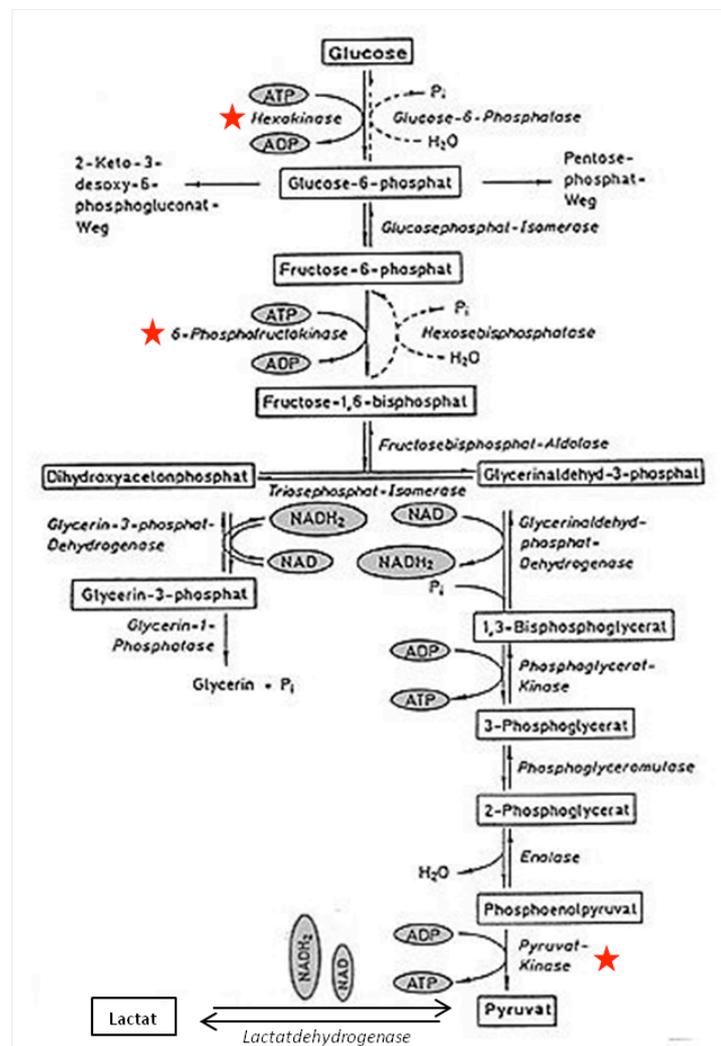


Abb. 1: Zusammenfassung der Glykolyse

Schematische Darstellung der Glykolyse sowie der sich anschließenden Milchsäuregärung. Die drei irreversiblen Schritte der Glykolyse (Asterisk) werden von den Schlüsselenzymen Hexokinase, 6-Phosphofruktokinase sowie Pyruvatkinase katalysiert (Verwendung und Modifizierung mit freundlicher Genehmigung des Urhebers Herrn Dr. med. Felix Gmünder, 2001, Zürich).

Durch diese Phosphorylierung kann das Molekül auf Grund seiner neu gewonnenen Polarität die Zelle nicht mehr verlassen. Die intrazelluläre Konzentration des Glucose-6-Phosphats signalisiert der Zelle die aufgenommene Menge an Glucose und bestimmt darüber, welcher der verschiedenen Stoffwechselwege der Glucoseverwertung sich anschließt. Der klassische Abbau des Glucose-6-Phosphats zu Pyruvat (Glykolyse) wird durch verschiedene Enzyme gesteuert, wobei die Enzyme Hexokinase im ersten und Pyruvatkinase im letzten Schritt eine limitierende Rolle einnehmen. Die **Pyruvatkinase (PK)** (siehe auch 1.3.3) katalysiert dabei die Dephosphorylierung des 2-Phosphoenolpyruvats zu (Enol-)Pyruvat, wobei ATP entsteht. Neben der Metabolisierung des Glucose-6-Phosphats über den klassischen Weg der Glykolyse, können weitere Glucose-Abbauwege eingeschlagen werden. Hier ist besonders die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Ribulose-5-Phosphat im oxidativen Teil und die sich anschließende Umwandlung von Xylulose-5-Phosphat in Glycerinaldehyd-3-Phosphat im nicht-oxidativen, zweiten Teil des Pentosephosphatwegs zu erwähnen, die durch das Enzym **Transketolase (TKTL)** (siehe auch 1.3.4) katalysiert wird. Dabei entstehen NADPH-Reduktionsäquivalente und Ribosen, die für die Nukleinsäuresynthese unabdingbar sind (6). Insgesamt wird durch die Glykolyse ein Molekül Glucose unter Gewinnung von zwei Molekülen ATP zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut. Unter aeroben Bedingungen wird das Pyruvat in den Mitochondrien mit Hilfe des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch Decarboxylierung in Acetyl-CoA umgewandelt und findet so den Anschluss an den Citratzyklus, dessen energiereiche Produkte NADH und FADH₂ durch sauerstoffabhängige, oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette verstoffwechselt werden. Insgesamt beträgt die Energieausbeute 32 mol ATP pro mol Glucose, die über die Mechanismen der Glykolyse, der Pyruvatoxidation, des Citratzyklus und der Atmungskette gewonnen werden. Neben ATP entstehen im Laufe der Zellatmung aus sechs Molekülen Sauerstoff und einem Molekül Glucose sechs Moleküle CO₂ und H₂O.

Unter anaeroben Bedingungen muss Pyruvat allerdings durch die Lactatdehydrogenase in Lactat umgewandelt werden, um die für den Ablauf der Glykolyse notwendigen Oxidationsäquivalente NAD⁺ zu generieren. Die Energieausbeute der anaeroben Glykolyse beträgt nur etwa 5% der aeroben Oxidation, nämlich 2 mol ATP pro mol Glucose (6). Daher wird unter aeroben Bedingungen in den meisten

Säugerzellen die anaerobe Glykolyse unterdrückt und die oxidative Phosphorylierung aus energetischer Sicht favorisiert.

1.2.2 Glucose-Stoffwechsel in Tumoren

Otto Heinrich Warburg hat bereits vor über 80 Jahren das zunächst widersinnig anmutende Phänomen beschrieben, dass die meisten Tumorzellen auch unter Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff ihre Energie über eine hohe glykolytische Stoffwechselaktivität mit der Produktion von Lactat generieren, anstatt die energetisch wesentlich ergiebigere aerobe Oxidation zu nutzen (7, 8). Dieser besondere Metabolismus von Tumoren wurde von Otto Warburg als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet. Da maligne Tumore aufgrund ihres schnellen Wachstums einen hohen Energiebedarf decken müssen, jedoch die Energieausbeute der aeroben Glykolyse nur 5% der aeroben Oxidation beträgt, haben solche Tumorzellen Glykolyse-Umsatzraten, die bis zu 200-mal höher als bei normalen Zellen gleichen Ursprungs sind. Genau dieser Wechsel in der Energiegewinnung von Tumorzellen wurde damals von Otto Warburg als die fundamentale Ursache von Krebserkrankungen postuliert und ist heute unter dem Begriff der „Warburg Hypothese“ oder des „Warburg Effekts“ bekannt (9). Allerdings besteht heute die Erkenntnis, dass dieser Wechsel in der Energiegewinnung nicht nur bei Tumorzellen vorkommt, sondern auch bei nicht-malignen proliferierenden Zellen beschreibbar ist (9). Die genauen Mechanismen und Ursachen des Warburg-Effekts sind bis dato nur ansatzweise verstanden und Gegenstand intensiver Forschung. So wird vermutet, dass diesem Phänomen u.a. folgende drei Mechanismen zu Grunde liegen (10):

1. Inaktivierung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung durch Mutation der mitochondrialen DNA (mt-DNA)
2. Adaptation der Tumorzellen an eine hypoxische Umgebung
3. Onkogenetische Signale.

1.3 Besondere Proteine des Glucosestoffwechsels

1.3.1 Glucosetransporter

Der Eintritt von Zuckern wie Glucose und Fructose in Säugetierzellen wird von einer Gruppe von transmembranären Transportproteinen (sog. GLUTs = Glucosetransporter) katalysiert, die zur Familie der sog. major facilitator superfamily gehören (11). Bei den Glucosetransportern handelt es sich um trägerproteinvermittelte Uniports, wobei der Konzentrationsgradient von Glucose über die Plasmamembran die für den Transport benötigte Energie bereitstellt (erleichterte Diffusion). Bislang sind 14 verschiedene Transporter vom GLUT-Typ bekannt, die in drei Klassen unterteilt werden. Klasse I stellt die wichtigste Gruppe dar und beinhaltet GLUT1-4 und 14. Klasse II wird durch GLUT5, 7, 9 und 11 gebildet. Klasse III fasst schließlich GLUT6, 8, 10, 12 und 13 zusammen (11).

GLUT1 ist der am weitesten verbreitete Glucosetransporter. Dieser kommt besonders in fetalen, aber auch in adulten Säugetierzellen wie Endothelzellen und Erythrozyten vor. Darüber hinaus hat dieser Transporter eine besondere Bedeutung für die Glucoseversorgung des Zentralnervensystems, da er vermehrt in den Kapillaren des Zentralnervensystems, die die Blut-Hirn-Schranke bilden, exprimiert wird. GLUT1 funktioniert insulinunabhängig und weist bei einem K_M -Wert von $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ eine hohe Substrataffinität auf. Unter physiologischen Bedingungen ist er nahezu gesättigt (12). So ist selbst bei geringen Blutzuckerspiegeln die ständige Aufnahme von Glucose in die Zellen sichergestellt. GLUT3 galt lange Zeit als spezifischer neuronaler Glucosetransporter. Heute ist aber bekannt, dass dieser auch in Spermien und weißen Blutkörperchen exprimiert wird (6, 13). Im ZNS transportiert GLUT3 die Glucose von der interstitiellen Flüssigkeit in die neuronalen Zellen.

In unterschiedlichsten Tumorarten ist eine Überexpression von GLUT1 und GLUT3 zu verzeichnen (14, 16), welches als Grundlage für die Darstellung dieser Tumoren im Rahmen der Positronen-Emissions-Tomographie (siehe auch 1.4.1) anzusehen ist (17, 18). Gemeinsam haben die beiden Moleküle GLUT1 und GLUT3, dass diese als einzige aus der Glucosetransporter-Gruppe durch HIF-1 (siehe 1.3.2) reguliert werden und damit deren Expression dem lokalen Einfluss von Gewebshypoxie unterworfen ist (18, 19).

1.3.2 Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)

Sauerstoffmangel führt zu einer Erhöhung der Erythropoetin (EPO)-Konzentration im Blut von Säugetieren, die letztendlich eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits zur Folge hat. Im Jahre 1992 gelang es Semenza et al. diesen Regulationsmechanismus detaillierter zu beschreiben. Sie fanden in der 3'-Enhancerregion des EPO-Gens eine Bindungsstelle, die unter hypoxischen Bedingungen von einem Transkriptionsfaktor besetzt ist und die Transkription des EPO-Gens einleitet (21). Bei dieser Bindungsstelle handelt es sich um einen Promotorbereich namens HRE (hypoxia response element), der von dem Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) besetzt werden kann. HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, welches aus einer größeren α - und einer kleineren β -Untereinheit besteht (22). Nur die regulative α -Untereinheit von HIF-1 ist sauerstoffabhängig reguliert (23), während es sich bei HIF-1 β um ein konstitutives, sauerstoffunabhängiges Protein handelt, das auch als aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) bekannt ist (24). Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 α instabil und wird mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten degradiert, nachdem die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert wurde. Diese Hydroxylierung führt dazu, dass HIF-1 α über das Von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Gen Produkt (pVHL) proteosomal destruiert wird (25). Erst unter Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert, da in diesem Falle die den Abbau von HIF-1 α einleitende Hydroxylierung unterbleibt (26). Nach Stabilisierung der α -Untereinheiten kommt es zur sukzessiven Dimerisierung mit der β -Untereinheit. Diese im Zytosol entstandenen Dimere stellen die aktive Form des Transkriptionsfaktors HIF-1 dar und führen nach Migration in den Nukleus durch Bindung an die o.g. HRE-Enhancerbereiche zur Transkription unterschiedlicher Zielgene, die am Glucosestoffwechsel, der Angiogenese sowie dem Zellzyklus beteiligt sind (27) (siehe Abb. 2).

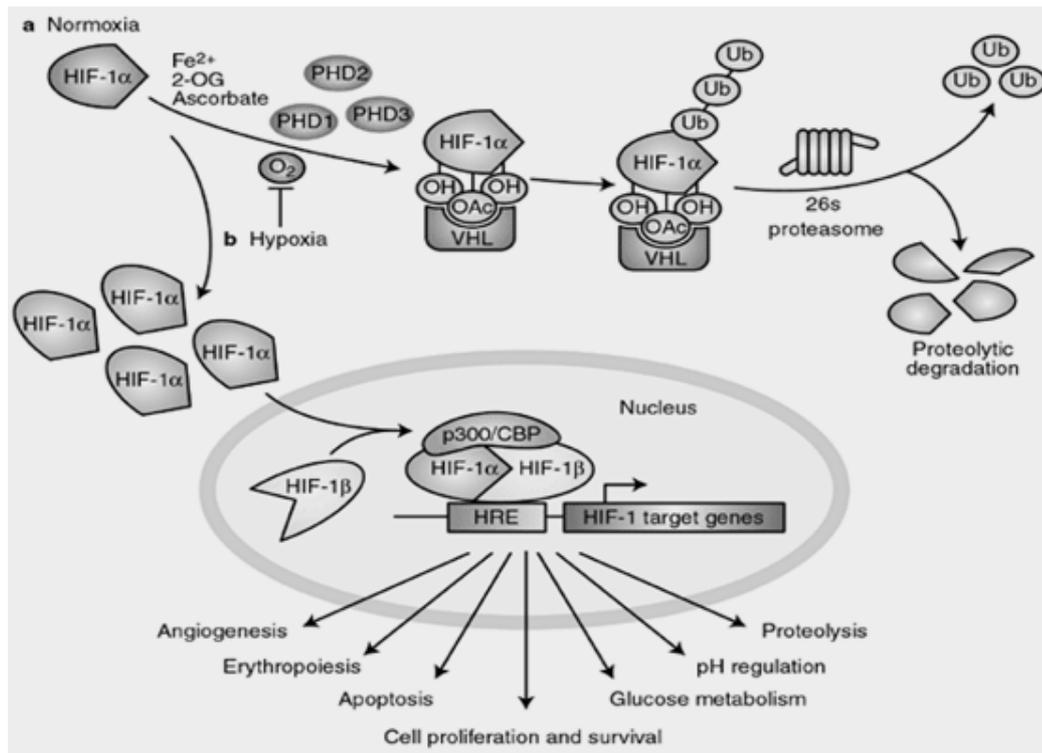


Abb. 2: Zusammenfassung der Regulationsmechanismen der HIF-1-Kaskade

Unter (a) wird die HIF-1-Kaskade bis zum finalen proteasomalen Abbau bei normoxischen Bedingungen skizziert. Demgegenüber illustriert (b) die HIF-1-Kaskade unter hypoxischen Bedingungen, die zur Aktivierung von zahlreichen Zielgenen führt. 2-OG = 2-Oxoglutarat, PHD = Prolyl-4-Hydroxylase, OH = Hydroxylierung, OAc = Acetylierung, Ub = Ubiquitin, P300/CBP = Coaktivator/CREB-binding protein (Verwendung mit freundlicher Genehmigung der Urheberin Frau Dr. med. Margaret Ashcroft, 2005, Sutton).

Demnach kann dem Protein HIF-1 die Rolle des entscheidenden Sauerstoffmessfühlers in Säugetieren zugeschrieben werden. Durch diese komplexe Vernetzung von HIF-1 mit verschiedenen Zellregulationsmechanismen spielt dieses Protein eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und -progression. Beispielsweise ist in den meisten schnell wachsenden Tumorarten ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf zu verzeichnen, da die der Blutversorgung dienende Kapillarisation nicht mit der Wachstumsgeschwindigkeit des neu entstehenden Tumorgewebes Schritt halten kann. Es entstehen Bereiche innerhalb des Tumors, die eine signifikant geringere O₂-Konzentration aufweisen als im gesunden Gewebe. Hier stellt die Expression von HIF-1 α somit die essentielle Anpassung des Tumors an lokale Hypoxiezustände dar, die die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3 sowie die der Glykolyse katalysierenden Enzyme induziert, zudem die Angiogenese über Transkription des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) begünstigt und die Lipid- und Nucleotidsynthese fördert (28). So konnte in murinen HIF-1-Knockout-Xenografts

gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen eine Wachstumsinhibition erfahren, die durch eine Reduktion der Überexpression von GLUT1 und der glykolytischen Enzyme bedingt ist (29).

1.3.3 Pyruvatkinase M2 (PKM2)

Die Pyruvatkinase ist ein Enzym, das einen der drei irreversiblen Schritte der Glykolyse katalysiert (siehe auch 1.1). Bei diesem Schritt wird eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen, so dass letztendlich ein Molekül Pyruvat und ein Molekül Adenosintriphosphat (ATP) entstehen (6). Die Enzymaktivität der Pyruvatkinase wird von ihrem eigenen Substrat, Phosphoenolpyruvat, und von einem Zwischenprodukt der Glykolyse, nämlich Fructose-1,6-Bisphosphat, im Sinne eines positiven allosterischen Effekts bestimmt. So erhöht sich die Glykolyseumsatzrate, wenn mehr Substrate zur Verfügung stehen. ATP sowie Alanin hemmen das Enzym, wenn genügend Bausteine vorhanden sind.

Beim Menschen gibt es vier Isoformen der Pyruvatkinase, die in verschiedenen Gewebetypen lokalisiert sind (30). PK-L wird als führendes Isoenzym vorrangig in Geweben mit Gluconeogenese-Aktivität wie Leber und Niere exprimiert. Die Isoform PK-R findet sich in Erythrozyten. Beide Isoformen (PK-L und PK-R) werden von demselben Gen codiert, aber von verschiedenen Promotoren reguliert (31). PKM1 wird vor allem in Geweben hergestellt, die schnell große Mengen von Energie bereitstellen müssen, wie es im Muskel, Herz und ZNS der Fall ist. Die Isoform PKM2 ist charakteristisch für Zellen, die eine hohe Rate an Nucleinsäuresynthese aufweisen. Dazu gehören proliferierende Zellen wie fetale und adulte Stammzellen, aber auch im besonderen Maße Tumorzellen (32), die sich mit Hilfe von PKM2 wechselnden Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen anpassen können (32-34).

1.3.4 Transketolase-like-1 (TKTL1)

Transketolasen sind Enzyme, die in Pflanzen, Bakterien und Tieren vorkommen und Ketolgruppen übertragen. Zusammen mit der Enzymaktivität der Transaldolasen, die Aldol-Gruppen übertragen, stellen diese Enzyme das Verbindungsstück zwischen der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg dar (siehe auch 1.1).

Im Rahmen des Pentosephosphatwegs entstehen NADPH-Reduktionsäquivalente, die in anderen Stoffwechselwegen wie der Fettsäure- und

Steroidbiosynthese benötigt werden. Zu Geweben mit aktiven Fettsäurebiosynthesen gehören die Leber, das Fettgewebe und die laktierende Brustdrüse. Eine verstärkte Cholesterin- und Steroidhormonbiosynthese erfolgt in Organen wie der Nebennierenrinde, dem Ovar und dem Hoden. Da für den Ablauf des Pentosephosphatwegs die Reoxidation des gebildeten NADPH zu NADP⁻ unverzichtbar ist, kommt der Pentosephosphatweg zum Erliegen, wenn die obligat aerob arbeitende Fettsäure- und Steroidbiosynthese unter anaeroben Bedingungen inaktiv werden muss und folglich kein NADP⁻ mehr generiert wird (6). Darüber hinaus entsteht im Rahmen des Pentosephosphatwegs Ribose-5-Phosphat, welches für die Nukleotid- und Nukleinsäure-Biosynthese verwendet wird, die gerade bei schnell proliferierenden Geweben von elementarer Bedeutung ist. Bis dato sind drei verschiedene Isoformen der Transketolase bekannt, die von den Genen TKT, TKTL1 und TKTL2 codiert werden (35). In Tumorzellen ist überwiegend die Isoform TKTL1 hochreguliert (36).

1.4 Die ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie

1.4.1 Prinzip der ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin, das Schnittbilder vom lebenden Organismus erzeugt, indem es die Verteilung einer radioaktiv markierten Substanz (=Tracer) im lebenden Organismus darstellt und so eine Aussage über biophysikalische Vorgänge im Sinne einer funktionellen Bildgebung ermöglicht.

Bei der PET-Untersuchung werden sog. Positronenstrahler als Tracer verwendet. Dabei handelt es sich um Atomkerne, die ein positiv geladenes Elektron (Positron, β^+) emittieren. In unmittelbarer Nähe zum Entstehungsort vereinigt sich das Positron mit einem Elektron (β^-), wodurch die Masse beider Teilchen in Strahlungsenergie, sog. Vernichtungsenergie, umgewandelt wird. Diese entstandene Vernichtungsenergie entfernt sich in Form von zwei diametral gerichteten Gammaquanten (Photonen) mit exakt je 511 keV vom Entstehungsort (37). In einem dedizierten PET-Gerät sind eine Vielzahl wie bei Gammakameras aufgebaute Kristall-/Photomultiplier-Einheiten zu einem zirkulären Detektorring zusammengefügt. Die beiden beim Positronenzerfall entstehenden Vernichtungsstrahlen werden von direkt gegenüberliegenden Detektoren als Koinzidenzereignis aufgenommen. Durch dieses Koinzidenzereignis ergibt sich

physikalisch eine sogenannte „line of response“, auf der an irgendeiner Stelle der Zerfall stattgefunden haben muss. Die Überlagerung einer großen Summe dieser lines of response führt dann zur Erzeugung eines zweidimensionalen Schnittbildes (siehe Abb. 3).

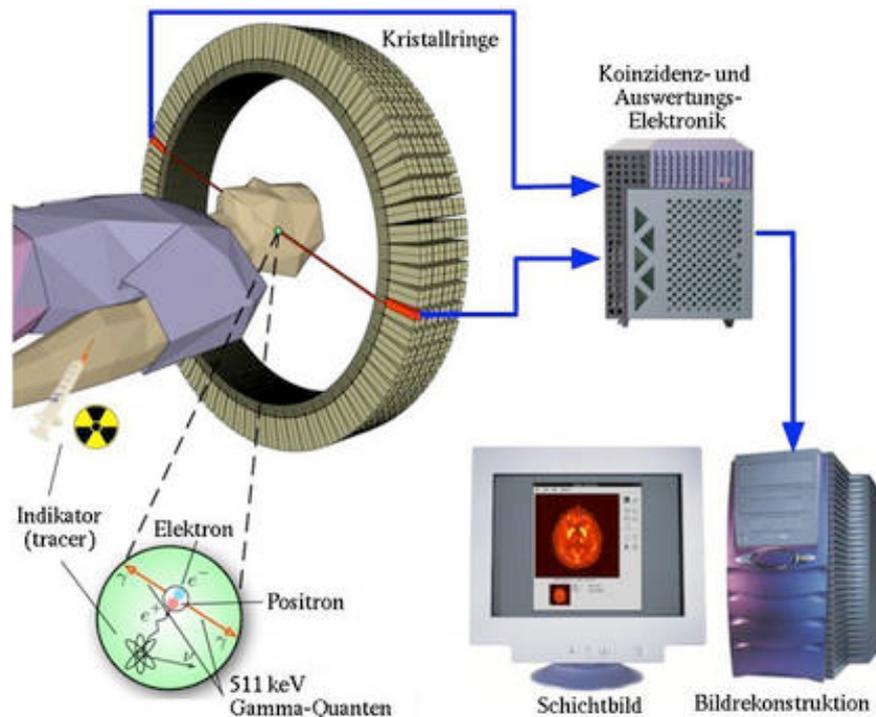


Abb.3: Schematische Illustration der Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie

Die durch den intravenös injizierten Tracer bedingte Emission von sich diametral ausbreitender Vernichtungsstrahlung wird im Detektorring, der aus vielen Gammakamera-ähnlichen Einheiten besteht, als Koinzidenzereignis registriert und anschließend durch aufwändige Berechnungsschritte zu einem zweidimensionalen Schnittbild zusammengesetzt (Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Urhebers Herrn Dr. Jens Langner, 2003, Dresden).

Entscheidend ist, dass die Menge der entstandenen Gammastrahlung proportional zur Menge des sich an einem Ort befindlichen Radionuklids ist und somit die von den PET-Detektoren gemessene Signalstärke vom Tracer-Aufnahmeverhalten des jeweiligen Körperareals abhängig ist. Dieses biophysikalische Prinzip ermöglicht einen funktionellen Einblick in den Organismus.

Bei der ^{18}F FDG-PET-Untersuchung wird das Glucose-Analogon 2-Fluor-2-Deoxy-D-Glucose (^{18}F FDG) verwendet. Bei diesem ist an der zweiten Stelle des Glucose-Moleküls eine Hydroxylgruppe durch das radioaktive Isotop ^{18}F ersetzt. Die Halbwertszeit von ^{18}F beträgt ca. 110 Minuten und dessen Zerfallsenergie wird mit 1,656 MeV angegeben. Diese radioaktive Markierung des Glucose-Biomoleküls ändert dessen

chemische Eigenschaften nicht grundlegend, so dass die Markersubstanz ähnlich wie das unveränderte Molekül über Glucosetransporter (siehe auch 1.3.1) in die Zellen aufgenommen wird (17). Anschließend kann aber nur die durch Hexokinase katalysierte Phosphorylierung des verwendeten Tracers ^{18}FDG zu ^{18}FDG -6-Phosphat stattfinden, nicht aber dessen weitere Metabolisierung, so dass ^{18}FDG -6-Phosphat in der Zelle akkumuliert. Dieser Prozess wird als „metabolic trapping“ bezeichnet und ist entscheidend für die klinische Anwendung in der Positronen-Emissions-Tomographie (17). Dabei wird vorausgesetzt, dass dem radioaktiv markierten Tracer ausreichend Zeit eingeräumt wird, sich im Körper zu verteilen.

1.4.2 Grundlagen für die Interpretation der ^{18}FDG -PET-Daten

Die korrekte Interpretation der durch die ^{18}FDG -PET erhobenen Daten erfordert differenzierte stoffwechselphysiologische und differentialdiagnostische Kenntnisse einer Aktivitätsmehranreicherung. Zu den Geweben, die physiologisch ein erhöhtes Glucose-Aufnahmeverhalten zeigen, gehören stark stoffwechselaktive Gewebe wie zum Beispiel Herz, ZNS, Knochenmark, lymphatisches Gewebe, z.B. der Waldeyersche Rachenring und die Wand des Gastrointestinaltrakts. Aber auch Körperregionen, die einen entzündlichen Prozess oder einen Heilungsprozess mit konsekutiv erhöhter Durchblutung und erhöhtem Metabolismus aufweisen, zeigen eine Akkumulation des radioaktiven Tracers. Außerdem erzeugen Zustände wie Frieren oder aktive Muskularbeit eine erhöhte Traceraufnahme.

Da der Anteil des injizierten ^{18}FDG , der nicht über die Glucosetransporter in die Zellen aufgenommen wurde, fast ausschließlich renal ausgeschieden wird, gehört auch das Urogenitalsystem zu den Orten erhöhter Positronenemission. Diese möglichen Ursachen eines vermehrten Emissionssignals werden u.a. zu den sog. „pitfalls“ der ^{18}FDG -Positronen-Emissions-Tomographie gezählt (38). Davon abzugrenzen sind neoplastische Gewebe, die in der Mehrzahl der Fälle, durch eine hohe Proliferationsaktivität und einen erhöhten Glucosemetabolismus gekennzeichnet sind und daher ebenfalls in der ^{18}FDG -PET-Untersuchung durch eine erhöhte Traceranreicherung auffallen.

1.4.3 Standardized uptake value

Aus den bei der ^{18}F FDG-PET-Untersuchung erhobenen Rohdaten entsteht ein dreidimensionales Abbild der Aktivitätsverteilung im beobachteten Körperareal des Patienten, wobei die örtliche Zerfallsaktivität abhängig von der Konzentration des dort befindlichen ^{18}F FDG-Radiopharmakons ist. Die Notwendigkeit eines Vergleichsparameters für unterschiedliche ^{18}F FDG-PET-Untersuchungen wird sowohl bei intrapersoneller (z.B. während eines Therapie-Monitorings bei einem Patienten), als auch interpersoneller (z.B. Bestimmung des Schweregrads einer Erkrankung im kollektiven Vergleich) Betrachtung deutlich (39). Bis dato ist der dimensionslose „Standardized uptake value“ (SUV) der Vergleichsparameter mit der größten internationalen Verbreitung. Dieser Wert quantifiziert die Anreicherung des radioaktiven Tracers an einer bestimmten Stelle des Körpers („region of interest“ (ROI)), indem die Anzahl der „counts“ (Messsignale) pro PET-Volumendatensatz (cm^3) in Verhältnis zur injizierten Aktivitätsmenge (MBq) pro Körpergewicht (kg) gesetzt werden.

$$\text{SUV} = \frac{\text{Aktivitätskonzentration (Bq) / g Gewebe}}{\text{apptizierte Aktivität (Bq) / g Körpergewicht}}$$

Bei homogener Verteilung des injizierten radioaktiven Tracers im ganzen Körper des Patienten wäre der SUV-Wert definitionsgemäß 1. Werte über 1 beschreiben eine Anreicherung, während Werte unter 1 im Vergleich eine Abnahme repräsentieren. Allerdings findet im Körper keine Gleichverteilung statt. Im gesunden Gewebe liegen durchschnittlich SUV-Werte von 1-2 vor, während im stoffwechselarmen Fettgewebe, das nahezu gar kein ^{18}F FDG aufnimmt, ein SUV-Wert kleiner 1 erreicht werden kann (40). Auf der Suche nach einem Cut-Off-Wert, der die Grenze zur pathologischen ^{18}F FDG-Aufnahme am besten beschreibt, wurden verschiedene Parameter untersucht. Der sog. SUVmean konnte sich in der Praxis nicht durchsetzen, da die Messung des mittleren SUV innerhalb eines Untersuchungsgebiets („region of interest“ (ROI)) maßgeblich von der genauen Definition und Abgrenzbarkeit ebendieses Untersuchungsgebiets (z.B. irregulär konfigurierte Tumorkläsion) abhängig ist und dies durch Faktoren wie Bildrauschen, Partialvolumeneffekt und eine eingeschränkte Auflösung nicht mit ausreichender Genauigkeit durchführbar ist (41). Demgegenüber haben sich je nach Tumorart in der Literatur SUVmax-Werte zwischen 2,5 und 4,5 etabliert (42-44). Der SUVmax-Wert beschreibt den maximalen ^{18}F FDG-Aufnahmewert in einem einzelnen Pixel innerhalb einer definierten Fläche (ROI). Die im Folgenden verwendete Abkürzung „SUVmax₁“

steht für den initialen, also vor der Chemotherapie gemessenen Standardized uptake value, während „SUVmax₂“ den nach der Chemotherapie gemessenen Wert repräsentiert.

1.4.4 Bedeutung der ¹⁸FDG-PET für die Tumordiagnostik

Seit Einführung der ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie im Jahre 1972 hat sich deren Anwendungsbereich stetig erweitert. Neben kardiologischen und neurologischen Indikationsstellungen wie der Herzinfarkt-, Epilepsie- und Demenzdiagnostik, hat die ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie mittlerweile einen festen Platz in der Onkologie, wobei bevorzugt folgende Anwendungsgebiete bestehen (37, 38):

- Diagnose maligner Erkrankungen
- Grading maligner Erkrankungen
- Staging/Restaging
- Bestimmung des aggressivsten Anteiles eines Tumors im Rahmen der Biopsieplanung
- Therapiekontrolle während und nach Abschluss der Tumorbehandlung
- Beurteilung eines initialen Therapieansprechens zur Prognoseableitung
- Planung einer kurativen oder palliativen Radiotherapie
- Untersuchung von Patienten mit Metastasen eines unbekanntem Primärtumors („Cancer of unknown Primary“-Syndrom)
- Unterscheidung zwischen Tumorrezidiven und Residuen (Narben) einer Tumorbehandlung.

Insbesondere bei nicht-kleinzelligen (NSCLC) und kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) sowie bei malignen Lymphomen kommt die ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie heute regelmäßig und sehr kosteneffektiv zum Einsatz (45). Sie gilt als ein hochsensitives Untersuchungsverfahren. Eingeschränkt wird ihr klinischer Nutzen allerdings dadurch, dass im klinischen Einsatz die Ortsauflösung auf 4-6 mm begrenzt ist und sich Aktivitätsanreicherungen wegen der unzulänglichen Kontrastierung anatomisch nicht immer einwandfrei zuordnen lassen. Daher werden heutzutage die bei einer computertomographischen Untersuchung erhobenen Daten über die genaue Morphologie mit den Daten einer gleichzeitig oder separat abgelaufenen ¹⁸FDG-PET kombiniert (PET/CT) (46, 47), um Aktivitätsanreicherungen radiomorphologisch sicher

einordnen zu können. Kombinierte PET/MRT-Geräte finden gegenwärtig Einzug in den klinischen Alltag.

1.4.5 Strahlenexposition

Im Rahmen der Positronen-Emissions-Tomographie kommen radioaktive Substanzen zum Einsatz, die die Patienten ionisierender Strahlung aussetzen, wie es auch bei anderen Bildgebungsverfahren (z.B. Computertomographie und Angiographie) der Fall ist. Die Strahlenexposition für den Patienten wird in Form der Äquivalenzdosis mit der Einheit „Sievert“ angegeben. Die Äquivalenzdosis ist definiert als die durch die ionisierende Strahlung vom Körpergewebe aufgenommene Energiedosis multipliziert mit einem Strahlungswichtungsfaktor, welcher die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit der verschiedenen Strahlungsarten berücksichtigt (48).

Bei der ^{18}F FDG-Positronen-Emissions-Tomographie eines Erwachsenen, dem 350 MBq verabreicht werden, lässt sich die Strahlenexposition mit ca. 7 mSv bemessen. Zum Vergleich liegt die durchschnittliche natürliche Strahlenexposition in Deutschland bei 2,4 mSv pro Jahr, die durchschnittliche Strahlenexposition einer Röntgen-Thorax-Untersuchung im p.a. Strahlengang bei ca. 0,1 mSv und die einer Computertomographie-Untersuchung des Thorax bei ca. 7-11 mSv (49). Da sich die Äquivalenzdosen der in der Mehrzahl der Fälle gemeinsam durchgeführten PET- und CT-Untersuchung addieren, sollte insgesamt die Indikationsstellung (siehe auch 1.4.3) zurückhaltend gestellt werden.

1.5 Solide Tumoren des Kindes- und Jugendalters

1.5.1 Osteosarkom

Knochtumoren machen ca. 10% der soliden malignen Tumoren und ca. 1% der malignen Tumoren insgesamt im Kindes- und Jugendalter aus. Ihre Einteilung wird anhand ihrer Histogenese vollzogen. Das Osteosarkom (OS), auch osteogenes Sarkom genannt, ist der häufigste maligne Knochtumor mit einem Altersgipfel bei ca. 15 Jahren (50). Bevorzugt wächst der osteoidbildende Tumor metaphysär in den langen Röhrenknochen und in Nachbarschaft zum Kniegelenk. Das klinische Erscheinungsbild kann von Schmerzen, Schwellung und Bewegungseinschränkung geprägt oder völlig asymptomatisch sein. Radiologisch kann das Osteosarkom sowohl osteolytisch, als auch

osteosklerotisch erscheinen. Typisch sind Periostabhebungen und sog. Spiculae, deren morphologisches Korrelat das senkrecht zum Knochen in die Umgebung wachsende Tumorosteoid ist. Eine wichtige radiologische Differentialdiagnose stellt die chronische Osteomyelitis dar (51). Der Tumor metastasiert vorrangig hämatogen in die Lunge.

Ursächlich konnte ein Zusammenhang mit der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *RB* auf Chromosom 13 nachgewiesen werden, das ebenfalls beim Retinoblastom, einem bösartigen Netzhauttumor, betroffen ist (52). Allerdings deuten weitere Studien auch auf Zusammenhänge mit Chemikalien, Viren und Bestrahlungsexposition hin, so dass die Ätiologie des Osteosarkoms bis dato als nicht vollständig geklärt gilt (53). In ca. 1% der Fälle entwickelt sich aus der Erkrankung der Osteodystrophia deformans (Syn. Morbus Paget) ein sekundäres Osteosarkom (54). Laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) werden die Osteosarkome in zwei Hauptgruppen, in das zentrale (medulläre) und das oberflächliche (periphere) Osteosarkom eingeteilt (55). Die zentralen Osteosarkome gliedern sich wiederum in die klassischen, die teleangiektatischen, die klein- und rundzelligen und die zentral gut differenzierten (low-grade) Osteosarkome auf. Bis auf Letztere verhalten sich alle Unterformen ausgeprägt bösartig. Bei den klassischen Osteosarkomen können histologisch drei Subtypen unterschieden werden: osteoblastisch, chondroblastisch und fibroblastisch. Die oberflächlichen Osteosarkome unterteilen sich in die parostalen (juxtakortikalen), die periostalen und die oberflächlichen high-grade Osteosarkome (55). Je nach Unterform und Grading des Tumors kann sich die Therapie und Prognose erheblich unterscheiden, so dass die Therapie von einer rein chirurgischen Intervention bis zur einer aggressiven Therapie, bestehend aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie, sowie radikaler Operation reichen kann (56). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist stadienabhängig und konnte bei Betrachtung aller Osteosarkome durch die neuen interdisziplinären Therapieansätze von 22% im Jahre 1965 auf 67% im Jahre 2002 gesteigert werden (57).

Um das Tumoransprechen auf eine chemotherapeutische Intervention durch eine histologische Beurteilung bewerten zu können, hat sich seit 1983 die Salzer-Kuntschik Klassifikation (58) im deutschen Sprachraum durchgesetzt (siehe Tabelle 1).

Regressionsgrad 1:	Keine vitalen Tumorzellen
Regressionsgrad 2:	Einzelne vitale Tumorzellen / Zell-Cluster von 0,5 cm
Regressionsgrad 3:	Vitaler Tumor <10% der Gesamttumormasse
Regressionsgrad 4:	Vitaler Tumor 10-50% der Gesamttumormasse
Regressionsgrad 5:	Vitaler Tumor > 50% der Gesamttumormasse
Regressionsgrad 6:	Kein Effekt der Chemotherapie

Tabelle 1: Salzer-Kuntschik Klassifikation

Grundlage dieser sechsstufigen Klassifikation ist das Maß der im Verlauf einer Chemotherapie verbliebenen, vitalen Tumorareale an der Gesamttumormasse in mittels Immunhistochemie untersuchten Gewebeprobe.

Die Grade 1-3 (<10% vitaler Resttumor) stehen in der Regel für ein Ansprechen (Responder), die Grade 4-6 (≥10% vitaler Resttumor) für ein unvollständiges oder gänzlich fehlendes Ansprechen (Non-Responder) auf die neoadjuvant durchgeführte Chemotherapie. Ursprünglich wurde diese Klassifikation von Salzer-Kuntschik et al. im Rahmen der Therapie von Osteosarkomen entwickelt. Heutzutage beschränkt sich ihr Einsatzgebiet nicht mehr nur auf Osteosarkome, sondern findet auch Verwendung in der Behandlung von anderen soliden Tumoren (z.B. Ewing-Sarkomen) im Kindesalter. Für die Neuroblastome wird diese Klassifikation jedoch nicht angewendet.

1.5.2 Ewing-Sarkom

Das Ewing-Sarkom (EWS) ist nach dem Osteosarkom der zweithäufigste maligne Knochentumor des Kindesalters mit einem Altersgipfel bei 15 Jahren (59). Die Markhöhle des Beckens, die diaphysären Bereiche der langen Röhrenknochen und die platten Knochen wie z.B. die Scapula, sind die häufigsten Primärlokalisationen des Tumors. Seine Entstehung in den Rippen ist zwar nicht häufig, aber bei Vorhandensein charakteristisch für das Ewing-Sarkom. Klinisch kann es durch Schmerzen, Schwellung und Bewegungseinschränkung in Erscheinung treten. Konventionell-radiologisch ist eine „zwiebelschalenartige“ periostale Reaktion im betroffenen Bereich typisch. Da das Ewing-Sarkom konventionell-radiologisch als chronische Osteomyelitis oder Osteosarkom fehlgedeutet werden kann, ist zur Differenzierung eine kernspintomographische Untersuchung angezeigt.

Durch neuere wissenschaftliche Erkenntnisse werden die Ewing-Sarkome mittlerweile der übergeordneten Familie der Ewing-Tumoren zugewiesen. Zu dieser

Gruppe zählen außerdem der seltene extraossäre Ewing-Tumor, das periphere Neuroepitheliom, der Askin-Tumor der Thoraxwand und der primitive neuroektodermale Tumor (PNET) (60). Histologisch präsentiert sich das Ewing-Sarkom als klein-, rund- und blazelliger Tumor. Histogenetisch zeigen Studien, dass sein Ursprung in entarteten Neuralleisten-Vorläuferzellen liegt (61). Molekulargenetisch lässt sich bei 85-95% aller Gruppenmitglieder der Ewing-Tumoren die Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ nachweisen (62). Diese pathognomonische Translokation beinhaltet das auf Chromosom 22 lokalisierte *EWS*-Gen (Ewing sarcoma gen) und das auf Chromosom 11 befindliche *ETS*-Gen (erythroblastosis virus transferring sequence gen), wodurch Transkriptionsfaktoren entstehen, die essentiell für die Pathogenese sind (63). Bei Diagnosestellung haben bereits durchschnittlich 25% der Fälle hämatogen, vor allem in Lunge und Knochen, metastasiert. Die Therapie ist aggressiv: zusätzlich zur neoadjuvanten Chemotherapie und radikalen Operation hat die postoperative Radiochemotherapie einen festen Stellenwert in der Behandlung. Die Prognose ist maßgeblich von der Tumorausbreitung abhängig. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate der Ewing-Sarkome über alle Stadien hinweg lag im Jahre 2002 bei 63% (64).

1.5.3 Neuroblastom

Mit 9% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter liegt das Neuroblastom (NB) nach der akuten lymphatischen Leukämie, den ZNS-Tumoren und den malignen Lymphomen an vierter Stelle der Häufigkeitsverteilung. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt zwei Jahre, wobei 90% aller Neuroblastome vor dem fünften Lebensjahr auftreten. Zu den häufigsten Manifestationsorten gehören das Nebennierenmark, der sympathische Grenzstrang und die Paraganglien. Diese Lokalisationen sind dadurch erklärbar, dass die neuroendokrin-aktiven Neuroblastome als Abkömmlinge der Neuralleistenzellen angesehen werden (65). Da 70% aller Neuroblastome im Retroperitoneum lokalisiert sind, äußert sich dieser Tumor klinisch häufig erst durch seinen raumfordernden Effekt in Form von neurologischen Ausfallserscheinungen oder Harnwegs- und Darmproblemen. Je nach Lokalisation kann sich das Neuroblastom aber auch durch ein Horner-Syndrom, ein Brillenhämatom oder ein Opsomyoklonus-Ataxie-Syndrom manifestieren (66). Die Metastasierung erfolgt frühzeitig, so dass bei Diagnosestellung bereits 50% aller Neuroblastome in Lymphknoten, Leber und

Knochenmark gestreut haben. Durch die neuroendokrine Aktivität der Neuroblastome kommt neben den bildgebenden Verfahren wie der Sonographie und der Kernspintomographie auch die Meta-Jod-Benzylguanidin-Szintigraphie (MIBG-Szintigraphie) zum Einsatz. Hier wird der radioaktive Tracer (^{123}I od oder ^{131}I od) von 90-95% aller Neuroblastome gespeichert, so dass sich diese darstellen lassen (67). Außerdem sind aufgrund der neuroendokrinen Aktivität Katecholamin-Abbauprodukte im Urin nachweisbar. So finden sich dort bei 90% aller Neuroblastom-Fälle Metabolite wie Dopamin, Homovanillinsäure oder Vanillinmandelsäure (68). Molekularbiologisch kann in 20% der Fälle eine Amplifikation des *n-myc*-Onkogens nachgewiesen werden, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (69). Bemerkenswert ist, dass ein erheblicher Teil der Neuroblastome im Säuglingsalter die Tendenz zur vollständigen, spontanen Remission zeigt (65). Die Therapie des Neuroblastoms ist komplex und hängt vom Lebensalter, dem Ausbreitungsstadium und der molekulargenetischen Klassifizierung ab. Die durchschnittliche 5-Jahre-Überlebensrate für alle Stadien zusammen beträgt ca. 74% im Jahre 2002 (70).

1.6 Zielsetzung der Dissertation

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, in soliden Tumoren des Kindes- und Jugendalters die Expression von Glucosetransportern und anderen wichtigen Proteinen des Glucosestoffwechsels vor und nach chemotherapeutischer Intervention mit Hilfe der Immunhistochemie zu erheben und diese Ergebnisse mit den vor und nach Chemotherapie ermittelten PET-Daten zu vergleichen. So soll die klinische Wertigkeit der ^{18}F FDG-PET in der Behandlung von Osteosarkom, Ewing-Sarkom und Neuroblastom untersucht und dabei insbesondere folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

1. Gibt es Unterschiede in dem prätherapeutischen ^{18}F FDG-Aufnahmeverhalten der einzelnen Tumorentitäten?
2. Lassen sich bei den verschiedenen Tumorentitäten Unterschiede bei der prätherapeutisch gemessenen Expressionsstärke von Schlüsselproteinen des Glucosestoffwechsels (GLUT1, GLUT3, HIF-1 α , TKTL1 und PKM2) feststellen?
3. Wie verhalten sich die prätherapeutisch erhobenen Protein-Expressionsmuster in den einzelnen Tumorentitäten untereinander?

4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der prätherapeutisch gemessenen Proteinexpression, insbesondere der Glucosetransporterexpression und den SUV_{max1}-Werten?
5. Gibt es Unterschiede in dem posttherapeutischen ¹⁸F₁₈FDG-Aufnahmeverhalten der einzelnen Tumorentitäten?
6. Wie verhalten sich die im Verlauf erhobenen Expressionsmuster in den einzelnen Tumorentitäten untereinander?
7. Welche Veränderungen zeigen die prä- und posttherapeutischen Daten zum ¹⁸F₁₈FDG-Aufnahmeverhalten und zur Proteinexpression?
8. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der nach Chemotherapie gemessenen Proteinexpression, insbesondere der Glucosetransporterexpression und den SUV_{max2}-Werten?
9. Lassen der Vergleich der Proteinexpression und der SUV_{max}-Werte vor und nach Chemotherapie Rückschlüsse auf die Veränderung des Glucose-Abbaus unter chemotherapeutischer Behandlung zu?

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkohorte, Ethikvotum und Einschlusskriterien

Dieser Doktorarbeit ging eine prospektive, multizentrische Studie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie voraus, in dessen Rahmen zwischen 2003 und 2007 über 100 Kinder mit soliden Tumoren mit ^{18}F FDG-PET untersucht und die PET-Ergebnisse mit deren klinischen Verlauf korreliert wurde. Hierzu liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission des Campus Virchow-Klinikum unter dem Vorsitz von Herrn Prof. H. Eichstädt vor (Zeichen: 205/2001), das nach Rücksprache mit Herrn Prof. K. Kröncke, dem Geschäftsführer der Ethikkommission der Med. Fak. der HHU Düsseldorf, auch für diese Dissertation Gültigkeit besitzt. Diese Studie wurde von der Charité Universitätsmedizin Berlin organisiert und mit Studienpatienten der Unikliniken Düsseldorf, Leipzig, Cottbus und Greifswald unterstützt. Ergebnisse dazu sind bereits publiziert worden (71-78). Von diesen 100 Studienpatienten entsprachen 23 Patienten den folgenden Einschlusskriterien dieser Doktorarbeit:

- Histologisch gesicherter Tumor der Entität OS, EWS oder NB
- Patientenalter < 25 Jahre
- Verfügbarkeit des prä- und posttherapeutisch gewonnenen Tumormaterials in Form von Paraffinblöcken
- Identifizierbarkeit und Übereinstimmung des Entnahmeorts des initialen Biopsiematerials mit dem Entnahmeort des im Verlauf gewonnenen Tumorgewebes anhand von Operations- und Pathologieberichten
- Zeitpunkt des prätherapeutisch Ganzkörper-PETs max. 14 Tage nach erfolgter initialer Tumorbiopsie
- Zeitpunkt des prätherapeutischen Ganzkörper-PETs vor Beginn der Chemotherapie
- Zeitspanne zwischen Beginn der Chemotherapie und dem Verlaufs-PET < 4 Monate
- Zeitspanne zwischen Verlaufs-PET und Verlaufs-OP < 4 Monate

Acht dieser Patienten stammen aus der Universitätsklinik Düsseldorf und 15 Patienten aus der Charité Universitätsmedizin Berlin. Diese Universitätskliniken haben Gewebeproben in Form von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe bereitgestellt, die in den Jahren 2003 bis 2007 bei Operationen den Studienpatienten entnommen wurden. Für jeden Patienten wurde anhand der Operations- und Histologieberichte ein repräsentativer Paraffinblock mit Tumorgewebe ausgewählt. Das Wissen um die genaue Lokalisation der jeweiligen entnommenen Gewebeprobe war von essentieller Bedeutung, da diese der PET-Untersuchung räumlich zugeordnet und für den betreffenden Bereich der SUVmax-Wert berechnet wurde (siehe 2.4.2). Dafür existierte von allen 23 untersuchten Studienteilnehmern ein vollständiger PET-Datensatz. Die Expressionsstärke der am Gewebe untersuchten Zielstrukturen wurde dann mit den SUVmax-Werten der PET-Ergebnisse korreliert. Auf Grund des guten Therapieansprechens einiger Patienten auf die neoadjuvant durchgeführte Chemotherapie konnten im Verlauf nur in elf von anfänglich 23 Tumorproben vitales Tumorgewebe identifiziert werden, so dass für die posttherapeutische immunhistochemische Auswertung letztlich elf Patienten zur Verfügung standen.

2.1.2 Klinische Charakteristika der Patientenkohorte

Von den 23 Studienpatienten verteilen sich elf Patienten auf die Tumorentität der Ewing-Sarkome (EWS), acht Patienten auf die Osteosarkome (OS) und vier Patienten auf die Neuroblastome (NB), siehe Abb. 4. Der Mittelwert des Alters aller 23 Patienten zum Zeitpunkt der initialen PET-Untersuchung betrug 10,6 Jahre mit einem Minimum von 0,7 und einem Maximum von 18,3 Jahren.

Verteilung der Tumorentitäten

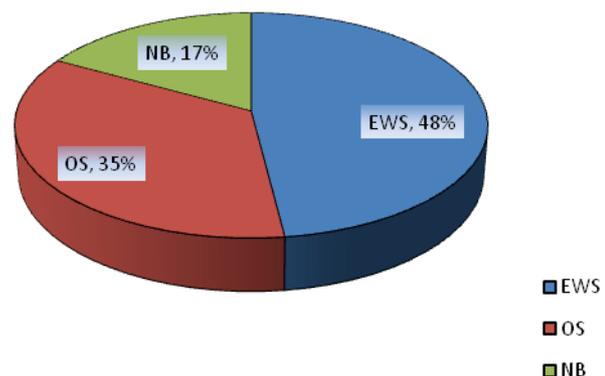


Abb. 4: Tumorentitäten-Verteilung in der Patientenkohorte

Nahezu die Hälfte der Studienpatienten entfallen auf die Gruppe der Ewing-Sarkome (n=23). EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Von den 23 Studienpatienten waren neun Patienten weiblich (39%) und 14 Patienten männlich (61%). Die Tabelle 2 ergibt Aufschluss über die Alters- und Geschlechterverteilung in den einzelnen Tumoruntergruppen.

Tumoruntergruppe	Mittelwert	Min.	Max.	Geschlechterverteilung
EWS (n=11)	14,6	6,9	18,3	4 weiblich (36,3%) 7 männlich (63,7%)
OS (n=8)	13,0	9,6	15,1	3 weiblich (37,5%) 5 männlich (62,5%)
NB (n=4)	4,2	0,7	10,3	2 weiblich (50,0%) 2 männlich (50,0%)

Tabelle 2: Alter- und Geschlechterverteilung in den Tumoruntergruppen

Der Mittelwert des Alters liegt bei den Neuroblastomen mit 4,2 deutlich unter denen der Ewing-Sarkome (14,6) und der Osteosarkome (13,0). Während die Geschlechter bei den Neuroblastomen paritätisch verteilt sind, dominiert bei den Ewings-Sarkomen mit ca. 64% und bei den Osteosarkomen mit ca. 63% das männliche Geschlecht. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Neun der untersuchten Sarkome waren im Femur und vier im Unterschenkel lokalisiert. Die verbleibenden sechs Osteo- bzw. Ewing-Sarkome verteilten sich auf die Körperregionen Thorax, Becken, Kalotte und Scapula. Von den vier Neuroblastomen befanden sich zwei im Bereich der rechten und zwei im Bereich der linken Nebenniere. Bei einem Neuroblastom war zusätzlich zum Primarius in der linken Nebenniere auch die hepatisch lokalisierte metastatische Absiedelung Gegenstand der Untersuchung.

2.2 Materialien

2.2.1 Materialien, Antikörper und Chemikalien

PET-Tracer

¹⁸F-2-Fluor-2-deoxy-D-glucose (¹⁸FDG) 300-3100 MBq/ml; Firma Eckert & Ziegler Strahlen- und Medizintechnik AG, Berlin, Deutschland (79).

Objektträger

Es wurden silanisierte Objektträger namens „SuperFrost®/Plus 75x25 mm“ der Firma „Menzel-Gläser“, Braunschweig, Deutschland verwendet.

GLUT1-Antikörper

Der gegen das C-terminale Ende des humanen GLUT-1 Proteins gerichtete polyklonale Kaninchen-Antikörper (Firma Millipore/Chemicon, USA, Katalognummer: AB1340, LOT

Nummer: LV1436416) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:2000 verwendet.

GLUT3-Antikörper

Der gegen das C-terminale Ende des humanen GLUT-3 Proteins gerichtete polyklonale Kaninchen-Antikörper (Firma Millipore/Chemicon, USA, Katalognummer: AB1345, LOT Nummer: 0611045217) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:1000 verwendet.

HIF-1 α -Antikörper

Der gegen das C-terminale Ende des humanen HIF-1 α -Proteins gerichtete polyklonale Kaninchen-Antikörper (Firma Millipore/Chemicon, USA, Katalognummer: 07-628, LOT Nummer: DAM1461576) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:250 verwendet.

PKM2-Antikörper

Der gegen das C-terminale Ende des humanen PKM2-Proteins (Isoform M1/M2) gerichtete polyklonale Kaninchen-Antikörper (Firma Abcam, Cambridge, England, Katalognummer: AB38237) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:50 verwendet.

TKTL1-Antikörper

Der gegen das humane TKTL1-Protein gerichtete monoklonale Maus-Antikörper („RIDA® PentoCheck® IHC“, Firma r-biopharm, Darmstadt, Deutschland, Art. No.: T001) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:50 verwendet.

MIB-1-Antikörper

Der gegen das humane Ki-67-Protein gerichtete monoklonale Maus-Antikörper (Firma Dako, Dänemark, Katalognummer: M7240) wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:500 verwendet.

Nachweissystem

Als Nachweissystem im Rahmen der LSAB-Methode wurde das IHC-Kit “UltraTek Reagent (Ready-to-Use)” der Firma “ScyTek”, Logan, UT, USA verwendet:

- biotinylierter Sekundär-Antikörper: Anti-Polyvalent “ABN999” (mouse, rabbit, rat, guinea pig)

- Horseradish Peroxidase "ABL999" (Tertiärreagent, labeled streptavidin)
- Bulk DAB-Reagent "ACK999" (30 % H₂O₂, DAB, PBS, ddH₂O)
- Normal Antibody Diluent "ADT999" (1000 ml)

Chemikalien

- 0 mM Natriumcitratpuffer, pH 6,0: 21g Citronensäure, 25ml NaOH ad 10 Liter dH₂O
- Avidin (hergestellt aus Hühnereiweiß und Trockenmilch)
- 0,02 % Biotin (in TBS-Puffer)
- 0,03 % Triton X-100 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol
- Ethanol (je 100 %, 96 % und 70%)
- Doppelt destilliertes H₂O
- H₂O₂ (Fa. Merck)
- Häkalaun
- 10xPBS, pH 7,4; 0,58 M Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,17 M Natriumhydrogenphosphat
- 0,68 M NaCl
- Tris-Puffer: pH 7,6; 6,1g Tris (Fa. Merck, Darmstadt) ad 50 ml dH₂O
- 41 ml HCL 1N ad 1000ml dH₂O
- TBS-Puffer: 18 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- 200 ml Tris-Puffer ad 2000 ml dH₂O
- Kunstharz-Eindeckmedium "Entellan" (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.2.2 Geräte

- Zum Anfertigen der Schnitte aus den Paraffinblöcken wurde das Schlittenmikrotom „pfm Slide 2003“ der Firma „pfm medical ag“, Köln, Deutschland verwendet.
- Zum Eindecken der Objektträger wurde der Automat „Coveraid“ der Firma „Vogel GmbH“, Gießen, Deutschland verwendet.
- Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen wurde das Gerät „BioGenex i6000 Automated Staining System“ der Firma „BioGenex“ Fremont, CA, USA verwendet.
- Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte mithilfe des Mikroskops „Axioskop 2 plus“ der Firma Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland.

- Zur Datengewinnung wurden die Ganzkörper-Vollring-PET-Scanner „ECAT EXACT HR+“, „ECAT EXACT 921“ sowie „Biograph16“ (Firma Siemens, München, Deutschland) verwendet.
- Die Bildauswertung und die SUV-Bestimmung, sowie die Überlagerung der PET- mit den CT- oder MRT-Datensätzen erfolgte mit dem „Multi Purpose Imaging Tool, Version 4/5“ (Firma ADVANCED TOMO VISION GmbH, Kerpen, Deutschland).
- Als Software zur Errechnung deskriptiver Statistiken und graphischer Darstellungen wurden die Programme IBM SPSS Statistics (Version 20.0, IBM SPSS, Chicago, IL, USA), Microsoft Excel (Version 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA) sowie GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software, LaJolla, CA, USA) verwendet.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemisch gefärbt wurden die in Kapitel 1.3 genannten Proteine in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert). Als immunhistochemisches Verfahren wurde die sog. „LSAB“-Methode (Labelled Streptavidin-Biotin) gewählt, die zu den sensitivsten, indirekten Nachweismethoden der Immunhistochemie gezählt wird (80). Bei der LSAB-Methode bindet im ersten Schritt der Primärantikörper spezifisch an die zu untersuchende Zielstruktur. Im zweiten Schritt konjugiert ein biotinylierter Sekundärantikörper (syn. Brückenantikörper) an den Primärantikörper. Dieser Sekundärantikörper wiederum verbindet sich auf Grund der Affinität seines Biotins zu Avidin und Streptavidin im dritten Schritt mit einem Peroxidase-Streptavidin-Komplex. Dessen Enzymkomponente ist nach Zugabe des DAB-Chromogens für die indirekte Sichtbarmachung der markierten Zielstruktur verantwortlich.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Ausgangspunkt für die immunhistochemischen Verfahren war das Anfertigen von ca. 5 µm dicken Schnitten mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe. Diese Schnitte wurden anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank getrocknet. Vor der Entparaffinierung wurden die Schnitte zwei Stunden im Brutschrank auf 60°C erhitzt, damit das Gewebe fest auf der Objektträgeroberfläche zum Haften kam und nicht durch die weitere Prozedur

abgelöst werden konnte. Zur Entparaffinierung wurden die Präparate für 15 Minuten in Xylol inkubiert, wobei das Lösungsmittel Xylol auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften die Alkane des Paraffins aus dem Schnitt herauslösen konnte. Anschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe in fünf Schritten (70% Ethanol → 96% Ethanol → 96% Ethanol → 100% Ethanol → 100% Ethanol) entwässert. Die Fixierung und Haltbarkeitsmachung des bei den Operationen gewonnenen Patientengewebes geschah durch Formalin. Das Wirkprinzip beruht darauf, dass Formalin Proteine miteinander vernetzt und lösliche Antigene z.T. immobilisiert. Um die Immunreaktivität der vernetzten Antigene wiederherzustellen und damit die Antigene dem Primärantikörper besser zugänglich zu machen, wurden die Präparate im Rahmen der Epitopdemaskierung für 15 Minuten im Druckkochtopf unter Zugabe von Natriumcitratpuffer inkubiert (80). Anschließend wurden die Präparate 10 Minuten mit 3%iger wässriger H₂O₂-Lösung versetzt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren und somit unspezifische Reaktionen zu unterbinden. Der nächste Verfahrensschritt beinhaltete die Inkubation der Präparate für 15 Minuten mit aus Hühnereiern hergestellter, avidinreicher Eiweißlösung um das zelleigene Biotin zu blockieren. Schließlich wurden die Präparate bei Raumtemperatur für die Dauer von einer Stunde mit dem Primärantikörper benetzt. Ein zweiter Antikörper, der mit Biotinmolekülen an der konstanten Region markiert war, wurde daraufhin für 15 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur mit den Präparaten inkubiert. Der dritte Schritt bestand in der Inkubation der Präparate mit dem Peroxidase-Streptavidin-Komplex für 15 Minuten. Um die Markierung der untersuchten Proteine indirekt sichtbar zu machen, wurden die Präparate dann 10 Minuten mit dem Chromogen Diaminobenzidin inkubiert, das als Substrat der Enzymkomponente des Peroxidase-Streptavidin-Komplexes fungierte und ein braunes, unlösliches Endprodukt bildete (80). Zwecks Kernfärbung und daraus resultierender besserer histopathologischer Beurteilbarkeit wurden die Präparate anschließend für sieben Minuten mit Hämalaun inkubiert. Daraufhin wurden die Präparate zwei Minuten lang mit ca. 90°C heißem Wasser abgespült, um nicht gebundenes Hämalaun zu entfernen. Daran schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe zwecks Entwässerung an (96% Ethanol → 96% Ethanol → 100% Ethanol → 100% Ethanol). Nach kurzer Spülung mit Xylol wurden die Präparate mittels Kunstharz-Eindeckmedium eingedeckt.

2.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Mikroskopisch ausgewertet wurden die immunhistochemisch gefärbten Präparate in 40 bis 400-facher Vergrößerung. Dabei wurde der sog. „IRS-Score“ (immunreaktiver Score) zur semiquantitativen Messung der Expression der untersuchten Proteine angewendet. Der IRS-Score wurde 1986 von Remmele und Stegner entwickelt und diente ursprünglich als Bewertungsskala zur Quantifizierung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Brustkrebstumorzellen (81). Seit dem hat sich der IRS-Score als eine anerkannte Bewertungsgrundlage für viele weitere Anwendungsbereiche in der Immunhistochemie etabliert und wurde deshalb auch im Rahmen dieser Dissertation angewandt. Der Score besteht aus dem Produkt zweier semiquantitativ erhobener Komponenten, nämlich der mittleren Färbeintensität (engl. „staining intensity“, SI) und dem Prozentsatz immunreaktiver Zellen (engl. „percentage of positivity“, PP). Im Rahmen der Auswertung dieser Arbeit wurden entsprechend der üblichen Anwendungen des IRS-Scores folgende Unterteilungen für das jeweilige Kriterium gewählt (siehe Abb. 5):

vierstufige Unterteilung der Färbeintensität von Tumorzellen (SI)

SI = 0: keine Färbereaktion

SI = 1: schwache Färbereaktion

SI = 2: mäßige Färbereaktion

SI = 3: starke Färbereaktion

vierstufige Unterteilung des Prozentsatzes positiver Tumorzellen (PP)

PP = 1: < 10% positive Zellen

PP = 2: zwischen 10-50% positive Zellen

PP = 3: zwischen 51-80% positive Zellen

PP = 4: > 80% positive Zellen

Immunreaktiver Score (IRS)

0 – <2 = negativ

2 – <6 = schwach positiv

6 – <9 = mäßig positiv

9 – 12 = stark positiv

Färbeintensität Prozentsatz positiver Zellkerne	Keine Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	Starke Farbreaktion = 3 Punkte
keine positiven Zellkerne = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10% positive Zellkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10–50% positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51–80% positive Zellkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 80% positive Zellkerne = 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Abb. 5: Übersicht zur Errechnung des immunreaktiven Scores (IRS)

Der immunreaktive Score wird aus dem Produkt der beiden bei der Auswertung erhobenen Werte für die Färbeintensität (SI) und den Prozentsatz positiver Zellen (PP) für jedes Präparat erhoben. Mögliche Ergebnisse bei dieser Unterteilung sind folglich 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12 (Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Urhebers Herrn Dr. med. Michael Respondek, 2008, Vechta).

Vor der eigentlichen Auswertung wurde die jeweilige Negativkontrolle der Schnittserie analysiert, um sicherzustellen, dass der Färbevorgang spezifisch stattgefunden hat (siehe auch 2.3.3). Um das Auffinden der relevanten Tumorareale bei der mikroskopischen Auswertung zu erleichtern, wurde bei jeder Schnittserie auch ein Präparat mit dem Antikörper MIB-1 als verlässlichen Proliferationsmarker, sowie ein Präparat mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Im Sinne der interpersonellen Reproduzierbarkeit der Untersuchung fand eine unabhängige Bewertung aller Präparate durch zwei, gegenüber dem Untersuchungsergebnis verblindeten, geschulten Untersucher, statt. Dabei wurden bei jedem Präparat zehn Sichtfelder im Bereich des Tumors analysiert und anschließend für jedes Sichtfeld der IRS-Score erhoben. Diese zwei Beurteilungen pro Sichtfeld wurden anschließend gemittelt. Aus den zehn gemittelten Messungen wurde wiederum der Mittelwert gebildet, um einen für das ganze Präparat repräsentativen IRS-Score zu erhalten. In gleicher Art und Weise wurde tumorfreies Vorläufergewebe derselben Studienpatienten (Lammellenknochen als Vorläufergewebe der Ewing- und Osteosarkome sowie Nebennierenparenchym als Vorläufergewebe der Neuroblastome) bezüglich der Expression von GLUT1, GLUT3, HIF-1, PKM2 und TKTL1 untersucht. Dadurch konnten anhand von gesunden, den Tumorentitäten korrespondierenden Vorläufergeweben Basiswerte für die Proteinexpression ermittelt werden, die als Referenz gegenüber der Proteinexpression bei den drei untersuchten Tumorarten verwendet werden konnten. Hierzu wurde

tumorfreier Lamellenknochen von zehn Patienten mit Ewing- und Osteosarkomen sowie tumorfreies Nebennierenparenchym von vier Neuroblastom-Patienten analysiert.

2.3.3 Positiv- und Negativkontrollen

Den Herstellerempfehlungen folgend wurden als Positivkontrollen für die Färbung von GLUT1 humanes Herzmuskelgewebe, für GLUT3 humanes Hodengewebe, für HIF-1 α humanes Tumorgewebe eines duktales Carcinoma in situ der Brustdrüse, für TKTL1 und PKM2 humanes Mammakarzinomgewebe in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (siehe auch 2.2.1) verwendet und so alle Antikörper auf ihr Bindungsverhalten hin getestet. Zum Ausschluss einer unspezifischen Farbreaktion wurden bei jeder immunhistochemischen Färbung Negativkontrollen, unter Auslassen der Applikation des Primärantikörpers bei sonst identischer Färbeprozedur, verarbeitet. Nur bei Negativkontrollen ohne Braunfärbung erfolgte die weiterführende Auswertung der anderen Präparate dieser Schnittserie.

2.4 ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie

2.4.1 Durchführung der ¹⁸FDG-Positronen-Emissions-Tomographie

Für die ¹⁸FDG-PET-Untersuchung der 8 aus der Universitätsklinik Düsseldorf stammenden Patienten wurde der Ganzkörper-Vollring-PET-Scanner „ECAT EXACT HR+“ der Firma Siemens der Klinik für Nuklearmedizin des UKD mit Standort im Forschungszentrum Jülich bereitgestellt. Für die ¹⁸FDG-PET-Untersuchung der 15 aus der Charité Universitätsmedizin Berlin stammenden Patienten wurden zwei Geräte, der Ganzkörper-Vollring-PET-Scanner „ECAT EXACT 921“ der Firma Siemens sowie der Ganzkörper-Vollring-PET-Scanner „Biograph16“ derselben Firma verwendet.

Die Patienten wurden im Rahmen des ärztlichen Aufklärungsgespräches mittels der in den Nuklearmedizinischen Kliniken verwendeten standardisierten Aufklärungsbögen ausführlich über den Nutzen und die Risiken der PET-Untersuchung informiert und erklärten in Schriftform ihr Einverständnis zu der Untersuchung. Bei Minderjährigen erteilten die Erziehungsberechtigten ihr Einverständnis nach vorheriger Aufklärung.

Die PET-Untersuchung wurde in den Morgenstunden (8-12 Uhr) durchgeführt, um intra- und interindividuell möglichst gleichmäßige Stoffwechsel-Bedingungen zu

gewährleisten. Zudem mussten die Patienten mindestens acht Stunden vor der Untersuchung nüchtern sein und sich in einem euglykämischen Zustand (Blutzuckerspiegel: 80-120 mg/dl) befinden, ohne vorher blutzuckersenkende Präparate verabreicht bekommen zu haben. Anschließend wurden gewichtsadaptiert 352 ± 52 MBq ^{18}F FDG als Tracer und abhängig vom Gewicht bis zu 10 mg Furosemid zur Forcierung der Diurese und damit der Ausscheidung des Tracers intravenös injiziert. Außerdem wurde der Patient gebeten, ca. 500 ml Wasser zu trinken. Der Patient sollte anschließend entspannt in einem Raum bei Indifferenztemperatur liegen und muskuläre Aktivität, wie fortwährende Bewegungen oder stetiges Sprechen, vermeiden. Nach Ablauf von insgesamt 60 Minuten Anreicherungszeit des Tracers und nach anschließender Miktion wurde der Patient auf dem Tisch des PET-Geräts positioniert. Die Untersuchung startete mit der Datenakquisition auf der Höhe der Oberschenkel-Mitte und setzte sich dann in Form von einzelnen 15,5 cm messenden Bettpositionen in Richtung Kopf bis auf Höhe der Schädelbasis fort. In jeder Bettposition verweilte der Patient während der Datengewinnung 10 Minuten. Je nach Körpergröße des Patienten und damit Anzahl der Bettpositionen dauerte die Messung im Rahmen der PET-Untersuchung ca. 60-70 Minuten. Bei OS und EWS Patienten wurden anschließend je nach Lokalisation des Primärbefunds Daten der unteren Extremitäten akquiriert, so dass sich für diese Patienten die Gesamtuntersuchungszeit um weitere 60-70 Minuten verlängerte. Um Auflösungsverluste zu minimieren, wurden die gemessenen Daten mit Hilfe des „Fourier rebinning“-Verfahrens konvertiert, welches bei der Koinzidenzmessung registrierte Streukoinzidenzen und zufällige Koinzidenzen aus dem Datensatz entfernt, ein Dämpfungskorrekturverfahren anwendet und die so normalisierten Daten iterativ rekonstruiert.

2.4.2 Auswertung der ^{18}F FDG-Positronen-Emissions-Tomographie

Die mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie gewonnenen Daten wurden mit den Daten der separat durchgeführten Computertomographie bzw. Magnetresonanztomographie fusioniert. Für diese Überlagerung der Bilddatensätze, sowie die Bildauswertung und die Bestimmung der SUV-Werte wurde das „Multi Purpose Imaging Tool, Version 5“ (Firma ADVANCED TOMO VISION GmbH, Kerpen, Deutschland) verwendet. Die Lokalisation der ROI wurde anhand der durch Operations- und Pathologieberichte bekannten Entnahmestellen der untersuchten

Tumorgewebeproben definiert und stellte die Grundlage für die Erhebung der lokalen SUVmax-Werte aus dem Gesamtdatensatz dar.

2.5 Statistische Methoden

Um die Verlässlichkeit der Analyse zu erhöhen, wurden alle Daten vor der Auswertung auf das Vorliegen einer Normalverteilung, sowie auf Varianzhomogenität getestet. Die Verteilungscharakteristik wurde mittels des D'Agostino-Pearson omnibus-Tests und die Varianzhomogenität mittels des Levene-Tests (beim Vorliegen von zwei Gruppen) bzw. mittels des Bartlett-Tests (beim Vorliegen von mehr als zwei Gruppen) überprüft. Zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde in den Kapiteln 3.2 sowie 3.3 im Falle von normalverteilten Stichproben eine Ein-Weg-Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit nachfolgender Tukey-Kramer post-hoc Analyse durchgeführt und im Falle von nicht normalverteilten Daten ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunns post-hoc Analyse. Für die Korrelationsanalyse in den Kapiteln 3.4, 3.5, 3.8 sowie 3.9 wurden bei nicht-normalverteilten Daten der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r^s) und bei normalverteilten Daten der Pearson-Korrelationskoeffizient (r^2) benutzt. Für die in Kapitel 3.10 durchgeführten Analysen an abhängigen Stichproben auf ihre zentrale Tendenz über eine therapeutische Intervention wurde bei normalverteilten Stichproben ein gepaarter t-Test und bei nicht-normalverteilten Stichproben ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Als Software zur Errechnung deskriptiver Statistiken und graphischer Darstellungen wurden die Programme IBM SPSS Statistics (Version 20.0, IBM SPSS, Chicago, IL, USA), Microsoft Excel (Version 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA) sowie GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software, LaJolla, CA, USA) verwendet. Ein p-Wert von <0.05 (zweiseitig bei t-Tests) wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht der prätherapeutisch erhobenen Daten

Einen Überblick über die Ergebnisse der PET-Untersuchungen, die jeweils vor Beginn der Chemotherapie durchgeführt wurden, und die Resultate, die anhand von prätherapeutisch gewonnenen Tumorbiopsien mit Hilfe der Immunhistochemie erhoben wurden, zeigt Tabelle 3.

Patient	Diagnose	Alter	SUVmax ₁	GLUT1	GLUT3	HIF-1 α	PKM2	TKTL1
1	EWS	15	10,1	3,5	4,5	12,0	12,0	0,0
2	EWS	7	6,3	8,0	8,0	12,0	4,0	0,0
3	EWS	17	7,8	1,2	5,0	12,0	9,0	2,6
4	EWS	13	7,2	1,0	4,7	12,0	6,9	2,7
5	EWS	17	7,9	4,0	7,3	4,2	7,2	5,2
6	EWS	15	13,5	4,0	4,0	6,0	3,0	2,5
7	EWS	15	13,5	8,0	9,6	8,1	6,4	0,3
8	EWS	18	11,2	7,8	8,0	12,0	11,0	0,0
9	EWS	12	8,5	6,4	6,0	11,7	11,2	7,4
10	EWS	9	9,9	4,8	5,4	12,0	10,5	3,1
11	EWS	9	2,6	5,8	4,6	12,0	10,3	2,3
12	OS	12	25,9	9,0	10,9	9,8	6,2	4,2
13	OS	15	7,8	5,7	7,0	11,4	6,4	4,9
14	OS	12	12,2	2,7	8,2	11,3	8,0	6,7
15	OS	10	20,9	3,6	4,0	7,6	3,8	1,3
16	OS	14	10,5	5,1	9,4	12,0	7,1	3,7
17	OS	14	12,8	4,1	6,6	12,0	6,6	0,9
18	OS	15	9,0	6,0	12,0	12,0	6,8	0,0
19	OS	10	9,7	5,0	8,0	12,0	7,6	6,4
20	NB	4	5,2	6,3	5,2	10,8	7,4	3,4
21	NB	2	10,5	9,1	6,7	12,0	9,3	6,4
22	NB	1	1,3	4,8	7,3	9,7	6,3	2,7

23	NB	10	6,0	9,2	8,0	9,0	5,9	7,9
MEDIAN			9,7	5,1	7,0	12,0	7,1	3,2

Tabelle 3: Ergebnisse der prätherapeutischen PET- Untersuchungen und Immunhistochemie

Die Tabelle zeigt die Übersicht aller vor chemotherapeutischer Intervention ermittelten immunhistochemischen Ergebnisse (GLUT1, GLUT3, HIF-1 α , PKM2 und TKTL1) und die mittels PET gemessene ^{18}F FDG-Traceraufnahme (SUVmax₁). EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

3.2 Auswertung der prätherapeutischen Positronen-Emissions-Tomographien

Die vor der Chemotherapie durchgeführten PET-Messungen aller 23 Studienpatienten ergaben einen SUVmax-Mittelwert von $10,0 \pm 5,3$ (=SUVmax₁). Der Median des SUVmax₁ betrug 9,7 mit einem Minimum bei 1,3 und einem Maximum bei 25,9. Die Differenzierung dieser Werte in den einzelnen Untergruppen ist der Abb. 6 zu entnehmen.

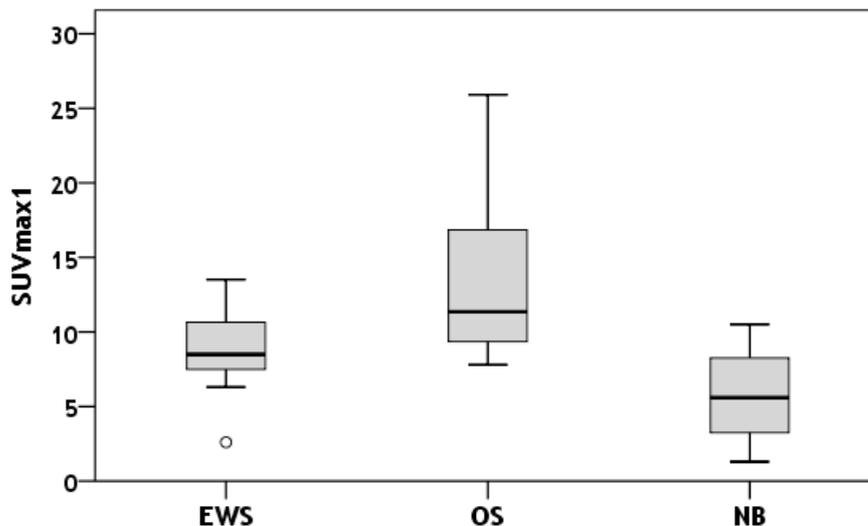


Abb. 6: SUVmax₁-Daten in den Tumor-Untergruppen (n=23)

Die mittels PET gemessene ^{18}F FDG-Traceraufnahme vor Chemotherapie (SUVmax₁) liegt bei der Osteosarkom- und Ewing-Sarkom-Untergruppe signifikant höher als bei den Neuroblastomen. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Den höchsten SUVmax₁-Median zeigen dabei die Osteosarkome mit 11,4 (7,8,-25,9), gefolgt von den Ewing-Sarkomen mit 8,5 (2,6-13,5) und den Neuroblastomen mit 5,6 (1,3-10,5). Hervorzuheben sind dabei zwei Patienten aus der Gruppe der Osteosarkome, die mit 25,9 (Patient Nr. 12, siehe Abb. 7) und 20,9 (Patient Nr. 15) einen extrem hohen SUVmax₁-Wert aufweisen. Dagegen ist in der Gruppe der Neuroblastome

bemerkenswert, dass Patient Nr. 22 mit 1,3 einen weit unterdurchschnittlichen SUV_{max_1} zeigt. Um zu untersuchen, wie sich die ^{18}F FDG-Aufnahme der verschiedenen Tumorentitäten untereinander verhält, wurden deren SUV_{max_1} -Werte in Beziehung zueinander gesetzt. Dabei ergeben sich signifikante Unterschiede bei der Gegenüberstellung der SUV_{max_1} -Werte in der Gruppe der Osteosarkome mit den SUV_{max_1} -Werten der Neuroblastome ($p < 0,001$), sowie zwischen den Patienten mit Ewing-Sarkomen und den Patienten mit Neuroblastomen ($p < 0,05$). Folglich kann der Osteosarkom-Untergruppe und der Ewing-Sarkom-Untergruppe eine höhere ^{18}F FDG-Aufnahme gegenüber der Neuroblastom-Untergruppe vor Chemotherapie zugeschrieben werden.

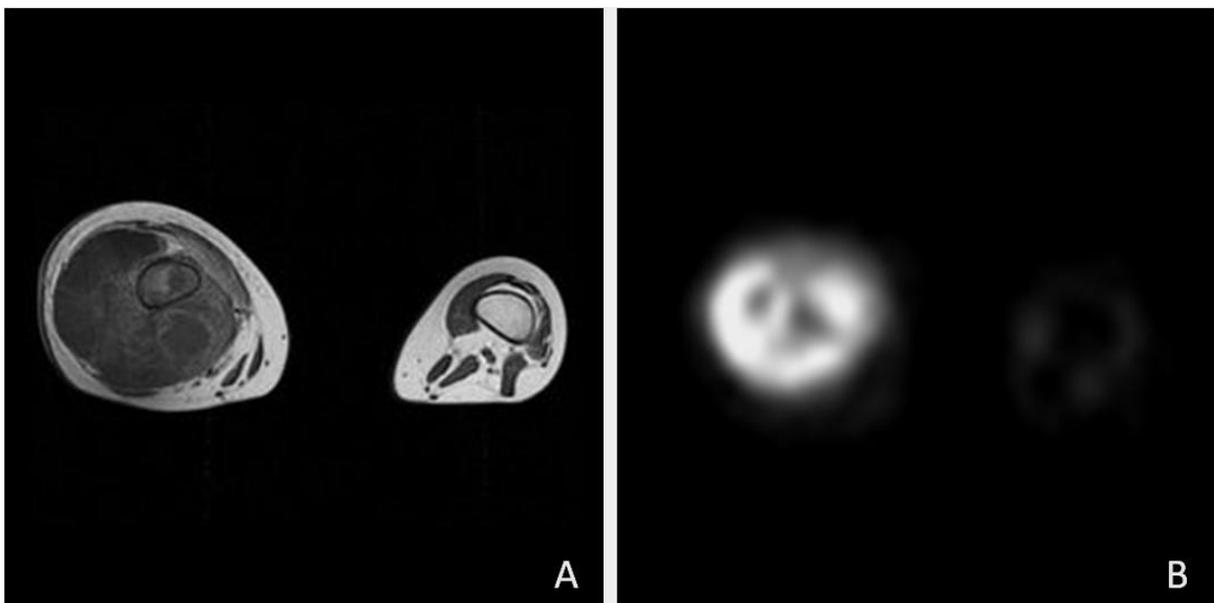


Abb. 7: MRT- und PET-Aufnahmen des Patienten Nr. 12 aus der Osteosarkom-Gruppe

Bild (A) stellt den ausgeprägten Tumorbefund in der distalen rechten Tibia vor Chemotherapie dar; axiales T1-gewichtetes, kontrastmittelgestütztes MRT. An korrespondierender Stelle des Körpers zeigt (B) ein axiales PET-Schnittbild, das zusätzlich zu morphologischen auch funktionelle Informationen über die ^{18}F FDG-Aufnahme des Tumors liefert. Der Patient Nr. 12 zeigt mit einem SUV_{max_1} von 25,9 den initial höchsten SUV_{max_1} -Wert des Patientenkollektivs.

3.3 Auswertung der prätherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse

3.3.1 GLUT1

Bei der immunhistologischen Untersuchung zeigte sich unter Verwendung des GLUT1-Primärantikörpers ein weitestgehend membranös-zytoplasmatisches Färbemuster (siehe Abb. 8). Bei acht der 23 Patienten konnte auch eine nukleäre Expression in der

mikroskopischen Auswertung festgestellt werden. Diese nukleäre GLUT1-Expression trat bei vier Patienten aus der EWS-Untergruppe (Patient Nr. 2, 8, 9 und 10), bei zwei Patienten aus der OS-Untergruppe (Patient Nr. 13 und 19), sowie bei zwei Patienten aus der NB-Untergruppe (Patient Nr. 21 und 23) auf. Dabei ist zu beachten, dass der Patient der NB-Gruppe mit niedriger ^{18}F FDG-Aufnahme keine nukleäre Expression aufweist (Patient Nr. 22).

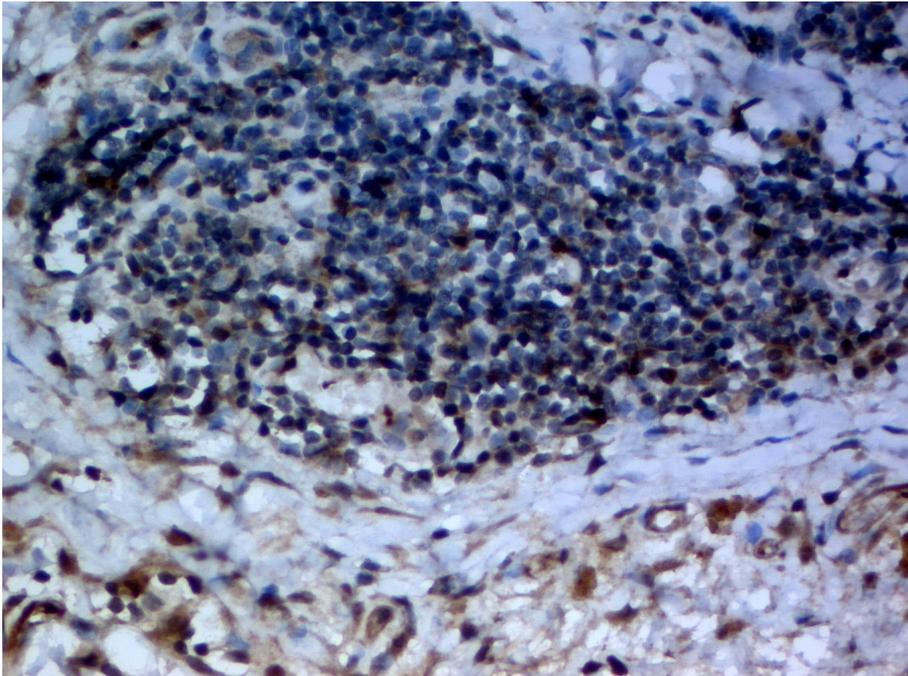


Abb. 8: GLUT1-Expression

GLUT1-Expression exemplarisch gezeigt bei dem Patienten Nr. 5 mit Ewing-Sarkom und einem mäßig positiven IRS-Score von insgesamt 4 (Originalvergrößerung 200-fach).

Die anhand der initialen Biopsien immunhistochemisch gefärbten Tumorproben aller 23 Studienpatienten führten bei der mikroskopischen Auswertung der GLUT1-Expressionsstärke zu einem Mittelwert des dafür verwendeten IRS-Scores von $5,4 \pm 2,3$. Der Median des IRS-Scores betrug 5,1 (1,0-9,2). Insgesamt fällt auf, dass nur drei von 23 Patienten ($\cong 13\%$, Patient Nr. 12, 21 und 23) eine als stark zu bezeichnende GLUT1-Expression mit einem IRS-Score ≥ 9 aufwiesen. Darunter sind auch die beiden Patienten mit Neuroblastom, die eine nukleäre GLUT1-Expression zeigen (Nr. 21 und 23). Wie sich die GLUT1-Proteinexpression in den einzelnen Tumoruntergruppen verhält, veranschaulicht die Tabelle 4.

<u>GLUT1</u>	Anzahl	Mittelwert \pm SD	Median	Min	Max
EWS	11	5,0 \pm 2,5	4,8	1,0	8,0
OS	8	5,2 \pm 1,9	5,1	2,7	9,0
NB	4	7,4 \pm 2,2	7,7	4,8	9,2

Tabelle 4: IRS-Score von GLUT1 in den Tumor-Untergruppen

Vor der Chemotherapie zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der immunhistochemisch ermittelten Expression von GLUT1 zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

In der Gruppe der Ewing-Sarkome fällt auf, dass die Patienten Nr. 3 und 4 trotz deutlicher ^{18}F FDG-Speicherung mit einem $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ von 7,8 und 7,2, einen weit unterdurchschnittlichen IRS-Score für GLUT1 (1,2 bzw. 1,0) aufwiesen. Darüber hinaus wurden die Messungen über die zelluläre Glucosetransporter-Expression, als morphologisches Korrelat der erhöhten ^{18}F FDG-Aufnahme der PET-Untersuchung, innerhalb der Tumor-Untergruppen verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen bezüglich der GLUT1-Expressionsstärke festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.3.2 GLUT3

Bei der immunhistologischen Untersuchung des GLUT3-Antikörpers war das Färbemuster ähnlich wie bei der GLUT1-Färbung vorrangig zytoplasmatisch, teils auch membranös (siehe Abb. 9).

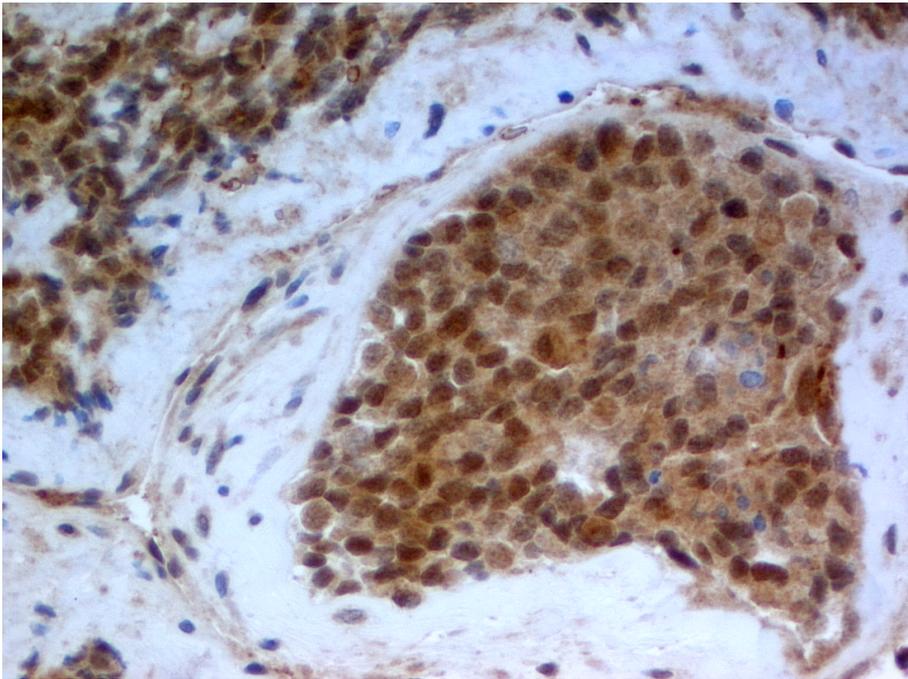


Abb. 9: GLUT3-Expression

GLUT3-Expression exemplarisch gezeigt bei dem Patienten Nr. 7 mit Ewing-Sarkom und einem stark positiven IRS-Score von insgesamt 9,6 (Originalvergrößerung 200-fach).

Bei der Betrachtung des mit GLUT1 funktionell eng verwandten Proteins GLUT3 ergab sich ein Mittelwert des zugrundeliegenden IRS-Scores von $7,0 \pm 2,2$. Der Median des IRS-Scores maß 7,0 (4,0-12,0). Insgesamt fällt auch bei diesem Glucosetransporter auf, dass nur 4/23 Patienten ($\cong 17\%$, Patient Nr. 7, 12, 16 und 18) eine starke GLUT3-Expression (IRS-Score ≥ 9) aufwiesen. Wie sich diese Werte in den verschiedenen Tumor-Untergruppen zusammensetzen, spiegelt Tabelle 5 wider.

GLUT3	Anzahl	Mittelwert \pm SD	Median	Min	Max
EWS	11	$6,10 \pm 1,84$	5,40	4,00	9,60
OS	8	$8,26 \pm 2,53$	8,10	4,00	12,00
NB	5	$6,82 \pm 1,03$	6,90	5,20	8,00

Tabelle 5: IRS-Score von GLUT3 in den Tumor-Untergruppen

Vor Chemotherapie zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der immunohistochemisch ermittelten Expression von GLUT3 zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Mit der gleichen Zielsetzung wie bei GLUT1 wurde untersucht, wie sich die Expression von dem Protein GLUT3 zwischen den einzelnen Tumorentitäten verhält. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden ($p > 0,05$), wenn auch tendenziell die

Gruppe der Osteosarkome eine höhere GLUT3-Expression als die anderen Tumorentitäten aufwies.

3.3.3 Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)

Der Antikörper HIF-1 α zeigte sowohl ein zytoplasmatisches, als auch ein nukleäres Färbemuster (siehe Abb. 10).

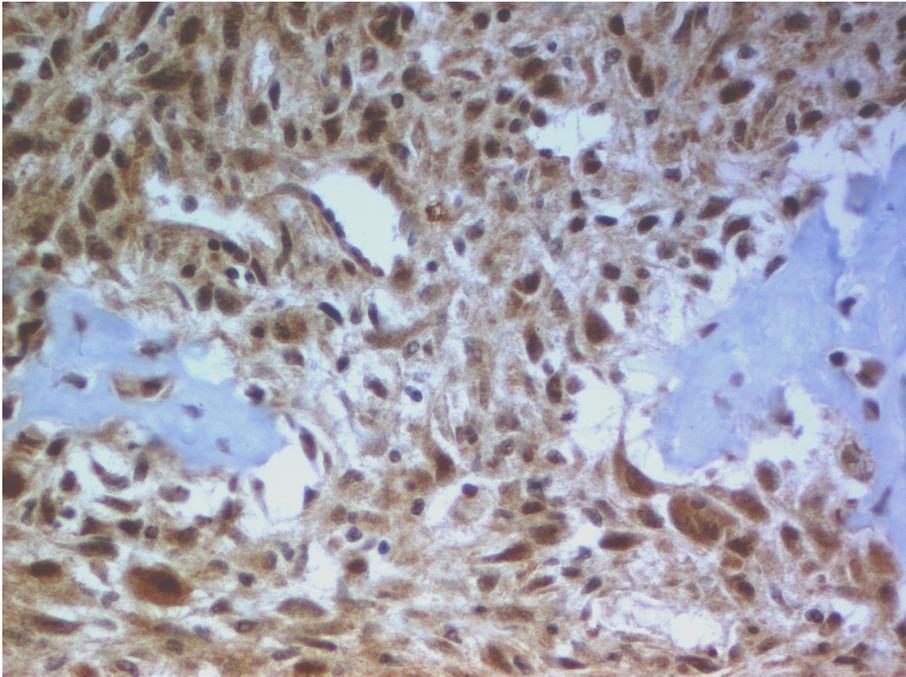


Abb. 10: HIF-1 α -Expression

HIF-1 α -Expression exemplarisch gezeigt bei dem Patienten Nr. 14 mit Osteosarkom und einem stark positiven IRS-Score von insgesamt 11,3 (Originalvergrößerung 200-fach).

Die mikroskopische Auswertung der Expressionsstärke des Proteins HIF-1 α aller 23 Patienten der Kohorte ergab einen Mittelwert des IRS-Scores von $10,6 \pm 2,2$. Der Median des IRS-Scores lag bei 12,0 (4,2-12,0). Besonders zu beachten ist, dass 12/23 Patienten ($\cong 52\%$) einen IRS-Score von 12 und 19/23 Patienten ($\cong 83\%$) einen IRS-Score von ≥ 9 (starke Expression) aufwiesen. Damit ist die Expression von HIF-1 α in der untersuchten Patientenkohorte deutlich höher als die von GLUT1 und GLUT3. Wie sich die Werte der gesamten Patientenkohorte in den einzelnen Tumoruntergruppen verhalten, ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

<u>HIF-1α</u>	Anzahl	Mittelwert \pm SD	Median	Min	Max
EWS	11	10,36 \pm 2,88	12,00	4,20	12,00
OS	8	11,01 \pm 1,57	11,70	7,60	12,00
NB	4	10,38 \pm 1,31	10,25	9,00	12,00

Tabelle 6: IRS-Score von HIF-1 α in den Tumor-Untergruppen

Vor Chemotherapie zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der immunhistochemisch ermittelten Expression von HIF-1 α zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Auffällig ist, dass HIF-1 α über alle Tumoruntergruppen hinweg eine starke bis sehr starke Expression präsentiert. Wie die relativ gleichmäßig hohen Werte der HIF-1 α -Expression in der Patientenkohorte erwarten ließen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.3.4 Pyruvatkinase M2 (PKM2)

Die Expression des Proteins PKM2 stellt sich mit Hilfe des PKM2-Antikörpers sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär dar (siehe Abb. 11).

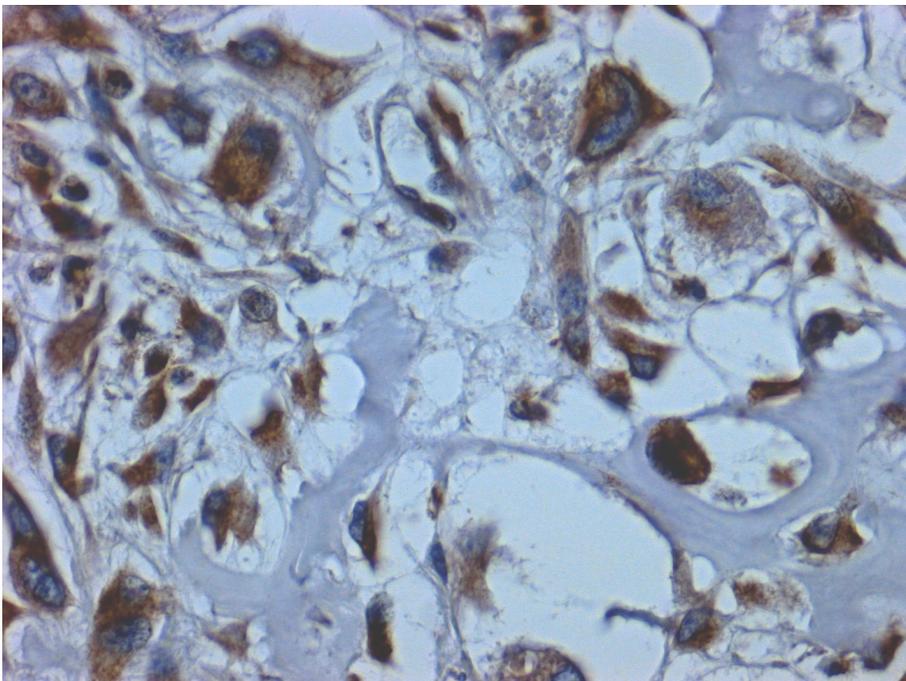


Abb. 11: PKM2-Expression

PKM2-Expression exemplarisch gezeigt bei dem Patienten Nr. 19 mit Osteosarkom und einem mäßig positiven IRS-Score von insgesamt 7,6 (Originalvergrößerung 200-fach).

Der Mittelwert des IRS-Scores der gesamten Patientenkohorte, der im Rahmen der mikroskopischen Auswertung für das Protein PKM2 erhoben wurde, lag bei $7,5 \pm 2,4$. Der Median des IRS-Scores war 7,1 (3,0-12,0). Die Verteilung dieser Werte in den einzelnen Tumoruntergruppen bringt Tabelle 7 zum Ausdruck.

PKM2	Anzahl	Mittelwert \pm SD	Median	Min	Max
EWS	11	$8,31 \pm 3,03$	9,00	3,00	12,00
OS	8	$6,56 \pm 1,27$	6,70	3,80	8,00
NB	4	$7,23 \pm 1,52$	6,85	5,90	9,30

Tabelle 7: IRS-Score von PKM2 in den Tumor-Untergruppen

Vor Chemotherapie zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der immunhistochemisch ermittelten Expression von PKM2 zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Als zentrales Enzym des Glucosestoffwechsels wurde die Expression von PKM2 in den einzelnen Tumoruntergruppen untersucht. Hinsichtlich der PKM2-Expression konnte zwischen den einzelnen Tumorgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$). Allerdings bleibt festzuhalten, dass die Gruppe der Ewing-Sarkome in dem Anteil der Patienten mit einer starken PKM2-Expression (IRS-Score ≥ 9) gegenüber den anderen Tumoruntergruppen mit sechs von insgesamt sieben Patienten stärker vertreten ist.

3.3.5 TKTL1

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Hilfe des TKTL1-Antikörpers zeigte sich ein nahezu ausschließlich zytoplasmatisches Färbemuster (siehe Abb. 12).

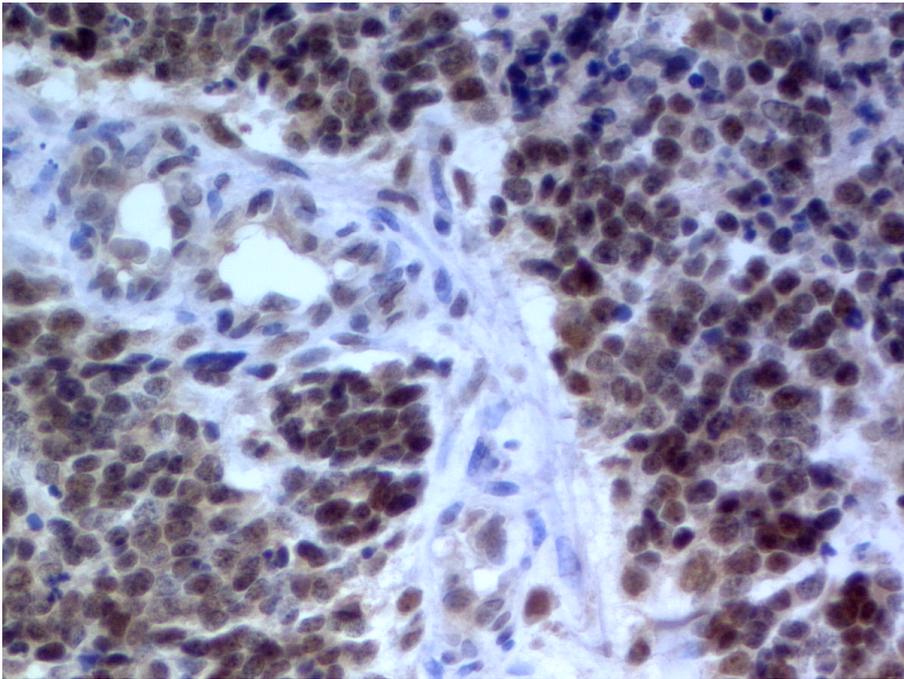


Abb. 12: TKTL1-Expression

TKTL1-Expression exemplarisch gezeigt bei dem Patienten Nr.21 mit Neuroblastom und einem mäßig positiven IRS-Score von insgesamt 6,4 (Originalvergrößerung 200-fach).

Der Expressionsstärke des Proteins TKTL1 ließ sich im Rahmen der mikroskopischen Auswertung ein Mittelwert des IRS-Scores von $3,2 \pm 2,5$ zuordnen. Der Median des IRS-Scores war 2,7 (0-7,9). Die Verteilung auf die Tumoruntergruppen gibt Tabelle 8 wieder. In der Gesamtschau fällt auf, dass der IRS-Score der TKTL1-Expression deutlich niedriger ist, als die Expression der anderen untersuchten Proteine. Insbesondere zeigt sich, dass bei vier Patienten aus der EWS-Untergruppe (Patient Nr. 1, 2, 7 und 8) und bei drei Patienten aus der OS-Untergruppe (Patient Nr. 15, 17 und 18) der IRS-Score < 2 liegt und damit von einer fehlenden Protein-Expression ausgegangen werden muss. Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Tumoruntergruppen konnte bezüglich der TKTL1-Expression kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p > 0,05$).

TKTL1	Anzahl	Mittelwert \pm SD	Median	Min	Max
EWS	11	$2,37 \pm 2,35$	2,50	0,00	7,40
OS	8	$3,51 \pm 2,54$	3,95	0,00	6,70
NB	4	$5,10 \pm 2,46$	4,90	2,70	7,90

Tabelle 8: IRS-Score von TKTL1 in den Tumor-Untergruppen

Vor Chemotherapie fällt eine insgesamt schwache immunhistochemisch ermittelte Expression von TKTL1 auf, ohne dass zwischen den einzelnen Tumoruntergruppen eine signifikant unterschiedliche TKTL1-Expression vorliegt. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

3.4 Vergleich der prätherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse untereinander

Die Expressionsverteilung der einzelnen am Glucose-Stoffwechsel beteiligten Proteine ist Abb. 13 zu entnehmen.

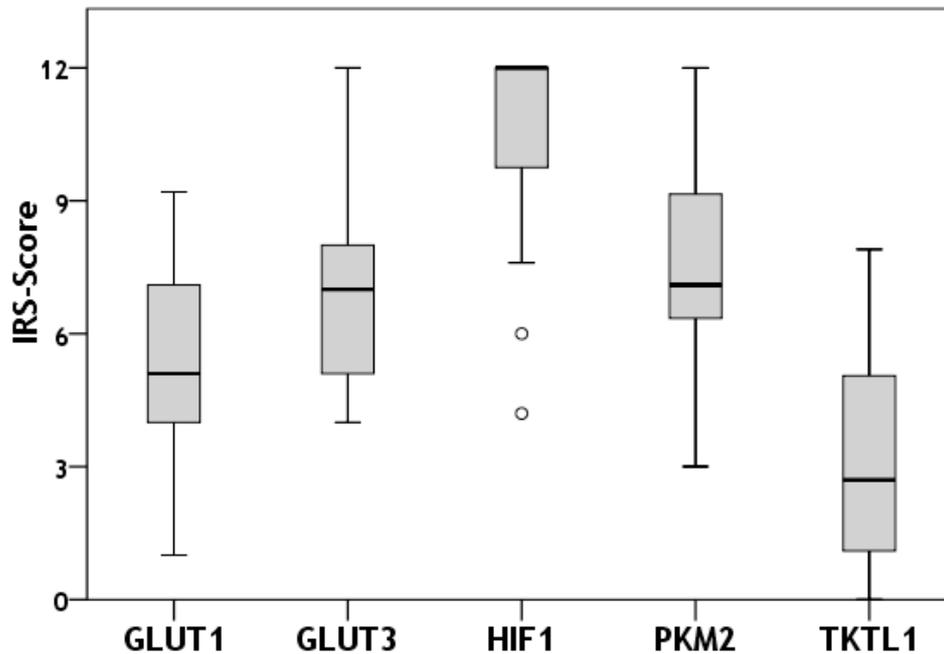


Abb. 13: Übersicht der prätherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse (n=23)

Beim Vergleich der initialen Proteinexpression der fünf untersuchten Proteine über das ganze Patientenkollektiv hinweg (n=23), korrelieren die Expressionsstärken der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 sowie die der Proteine HIF-1 α und PKM2 signifikant positiv miteinander. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Um die Expression von GLUT1, GLUT3, HIF-1 α , PKM2 und TKTL1 besser vergleichen zu können, wurden die anhand von prätherapeutisch entnommenen Tumorbiopsien von 23 Patienten gewonnenen IRS-Scores miteinander korreliert. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation der Expressionsstärken der in ihrer Funktion ähnlichen Proteine GLUT1 und GLUT3 ($r=0,26$, $p=0,01$). Außerdem konnte ein deutlicher Zusammenhang beim Vergleich der HIF-1 α -Expression mit der Expression von PKM2 ($r=0,55$, $p=0,006$) ermittelt werden. Dieser für die ganze Patientenkohorte gefundene Zusammenhang ist auf die starke Korrelation innerhalb der Neuroblastom-Untergruppe zurückzuführen ($r=1,00$, $p<0,0001$, bei $n=4$). Hingegen besteht keine Abhängigkeit der Expression von dem Protein HIF-1 α mit der Expression der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3. Ursächlich dafür verantwortlich sein könnte, dass es insbesondere in der EWS-Gruppe Patienten mit sehr hoher HIF-1 α -Expression gibt, die eine heterogene

GLUT1 oder GLUT3-Expressionsstärke aufweisen: nämlich sowohl Patienten mit vergleichsweise hoher (Patient Nr. 2 und 8) als auch niedriger (Patient Nr. 3 und 4) GLUT1-Expression. Eine Korrelation der prätherapeutisch ermittelten Werte mit dem histologischen Regressionsgrad nach Salzer-Kuntschik und damit der Prognose der untersuchten Patienten bestand für keines der fünf analysierten Proteine.

3.5 Vergleich der prätherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse mit denen der Positronen-Emissions-Tomographien

Bei der Gegenüberstellung der prätherapeutisch gewonnenen PET-Daten mit den Ergebnissen aus den prätherapeutischen immunhistochemischen Untersuchungen konnte weder für die gesamte Patientenkohorte, noch bei der separaten Betrachtung der einzelnen Tumoruntergruppen eine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden ($p > 0,05$). Auffallend ist allerdings Patient Nr. 12 aus der Gruppe der Osteosarkome, der mit einem SUV_{max_1} -Wert von 25,9 den höchsten prätherapeutischen Wert aus der ganzen Patientenkohorte zeigt und gleichzeitig mit einem IRS-Score von 9,0 für GLUT1 und 10,9 für GLUT3 auch zu der Gruppe mit der höchsten Glucosetransporterexpression zählt.

3.6 Übersicht der posttherapeutisch erhobenen Daten

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der PET-Untersuchungen, die nach der Chemotherapie durchgeführt wurden, und der Resultate, die anhand von posttherapeutischen Tumorproben mit Hilfe der Immunhistochemie erhoben wurden, gibt Tabelle 9 wieder. Während vor der Chemotherapie bei allen 23 Patienten tumorrepräsentatives Gewebe für die immunhistochemische Auswertung vorhanden war, konnte – hauptsächlich wegen des vollständigen Ansprechens auf die Chemotherapie – im Verlauf nur bei elf Patienten eine immunhistochemische Auswertung anhand von reseziertem Tumorgewebe mit noch vitalem Tumorzellanteil erfolgen.

Patient	Diagn.	SK	SUVmax ₁	SUVmax ₂	GLUT1	GLUT3	HIF-1 α	PKM2	TKTL1
1	EWS	1	10,1	2,5	-	-	-	-	-
2	EWS	1	6,3	3,6	-	-	-	-	-
3	EWS	2	7,8	2,8	-	-	-	-	-
4	EWS	1	7,2	3,6	-	-	-	-	-
5	EWS	4	7,9	4,4	4	4	4,2	1,9	0,1
6	EWS	1	13,5	3,4	-	-	-	-	-
7	EWS	2	13,5	0,4	-	-	-	-	-
8	EWS	3	11,2	2,7	-	-	-	-	-
9	EWS	1	8,5	1,3	-	-	-	-	-
10	EWS	4	9,9	1,4	4	6,7	12	12	2,4
11	EWS	1	2,6	0,8	-	-	-	-	-
12	OS	2	25,9	6,5	9,2	7,6	11,3	4,5	3,8
13	OS	5	7,8	2,9	1,2	4,6	6,8	3,6	0
14	OS	4	12,2	7,3	2,9	3,4	4,7	4,8	4,3
15	OS	4	20,9	12	5,8	6,8	7,8	7,6	1
16	OS	4	10,5	6,5	-	-	-	-	-
17	OS	3	12,8	2,3	-	-	-	-	-
18	OS	2	9	2,7	8	8,4	10	6,3	4
19	OS	4	9,7	3,9	7,9	5,6	7,2	8,2	4,8
20	NB	-	5,2	1,6	4	4	6,4	8,3	4
21	NB	-	10,5	0,9	3,4	10,1	12	12	4
22	NB	-	1,3	1,9	2,7	3,7	11	6,9	1,2
23	NB	-	6	1,1	-	-	-	-	-
MEDIAN			9,7	2,7	4,0	5,6	7,8	6,9	3,8

Tabelle 9: Ergebnisse der posttherapeutischen PET- Untersuchungen und Immunhistochemie

Die Tabelle zeigt die Übersicht aller nach chemotherapeutischer Intervention ermittelten immunhistochemischen Ergebnisse (GLUT1, GLUT3, HIF-1 α , PKM2 und TKTL1) der auch im Verlauf untersuchten Patienten (n=11) und die mittels PET gemessene ¹⁸F-DG-Traceraufnahme (SUVmax₂), die beim gesamten Patientenkollektiv (=23) durchgeführt wurde. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom., SK = Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad.

Von den 23 Studienteilnehmern wurde bei allen 19 OS- und EWS-Patienten der histologisch ermittelte Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad bestimmt, der das Therapieansprechen nach chemotherapeutischer Intervention klassifiziert, jedoch nicht für die Neuroblastome anwendbar ist (siehe auch 1.5.1). Demnach gelten 7/19 Patienten ($\cong 37\%$) mit einem Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad von ≥ 4 als Non-Responder in Bezug auf die zwischenzeitlich durchgeführte Polychemotherapie. Darunter befinden sich 2/11 Patienten mit Ewing-Sarkom ($\cong 18\%$) sowie 5/8 Patienten mit Osteosarkom ($\cong 63\%$).

3.7 Auswertung der posttherapeutischen Positronen-Emissions-Tomographien

Der nach der Chemotherapie bestimmte SUVmax-Wert der bei allen 23 Studienpatienten durchgeführten PET-Messungen (=SUVmax₂) ergab einen Mittelwert von $3,3 \pm 2,7$. Der Median des SUVmax₂ betrug 2,7 (0,4-12,0) und befand sich damit deutlich niedriger als der Median des initial gemessenen SUVmax₁ von 9,7 (siehe auch Tabelle 9).

Von den 23 Patienten überstieg/glich der SUVmax₂-Wert nur bei 14 Patienten ($\cong 61\%$) den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Cut-Off-Wert von 2,5, der als Grenze für eine pathologische ¹⁸FDG-Glucoseaufnahme diskutiert wird. Bei der Verlaufs-PET-Untersuchung erreichte lediglich der Patient Nr. 15 aus der Osteosarkom-Gruppe einen SUVmax₂-Wert >10 . Dieser Patient gilt mit einem Salzer-Kuntschik Regressionsgrad 4 auch als Non-Responder auf die neoadjuvant durchgeführte Chemotherapie. Die Differenzierung der posttherapeutisch erhobenen SUVmax-Werte in den einzelnen Tumoruntergruppen gibt die Abb. 14 wieder.

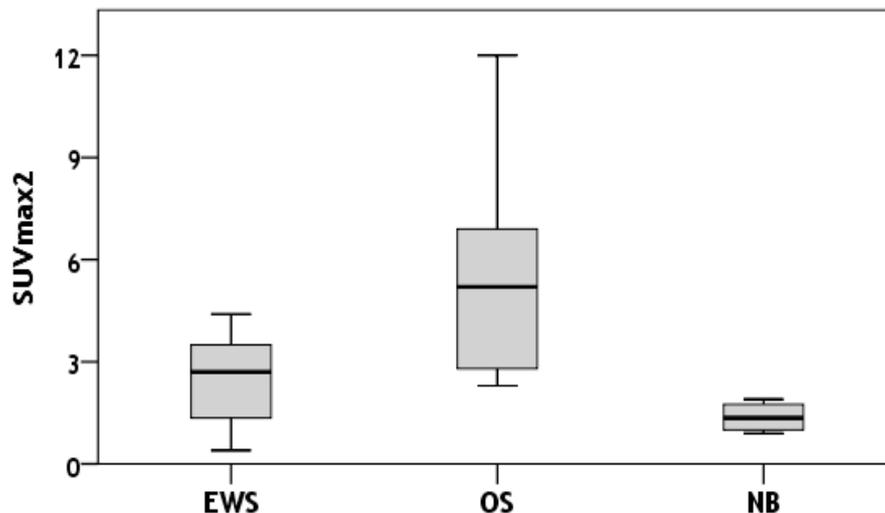


Abb. 14: SUVmax₂-Daten in den Tumor-Untergruppen (n=23)

Die mittels PET gemessene ¹⁸FDG-Traceraufnahme nach Chemotherapie (SUVmax₂) ist bei den Osteosarkomen signifikant höher als bei der Gruppe der Ewing-Sarkome und Neuroblastome. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Um zu untersuchen, wie sich die ¹⁸FDG-Aufnahme der verschiedenen Tumorentitäten nach der Chemotherapie untereinander verhält, wurden deren SUVmax₂-Werte in Beziehung zueinander gesetzt. Beim Vergleich der SUVmax₂-Werte innerhalb der einzelnen Tumorgruppen zeigte sich der höchste Median bei der Gruppe der Osteosarkome (Median 5,2; 2,3-12,0). Demgegenüber sind die SUVmax₂-Werte in der Gruppe der Ewing-Sarkome (Median 2,7; 0,4-4,4) und der Neuroblastome (Median 1,4; 0,9-1,9) signifikant geringer. Dazu passend stellt sich auch der Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad in der Gruppe der Osteosarkome gegenüber den Ewing-Sarkomen signifikant erhöht dar (p=0,011).

3.8 Auswertung der posttherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse

Die nach der Chemotherapie entnommenen Tumorgewebeproben wurden ebenfalls immunhistochemisch auf die Expression der in Kapitel 1.3 genannten Proteine untersucht. Die Abb. 15 veranschaulicht die dabei gewonnenen Ergebnisse.

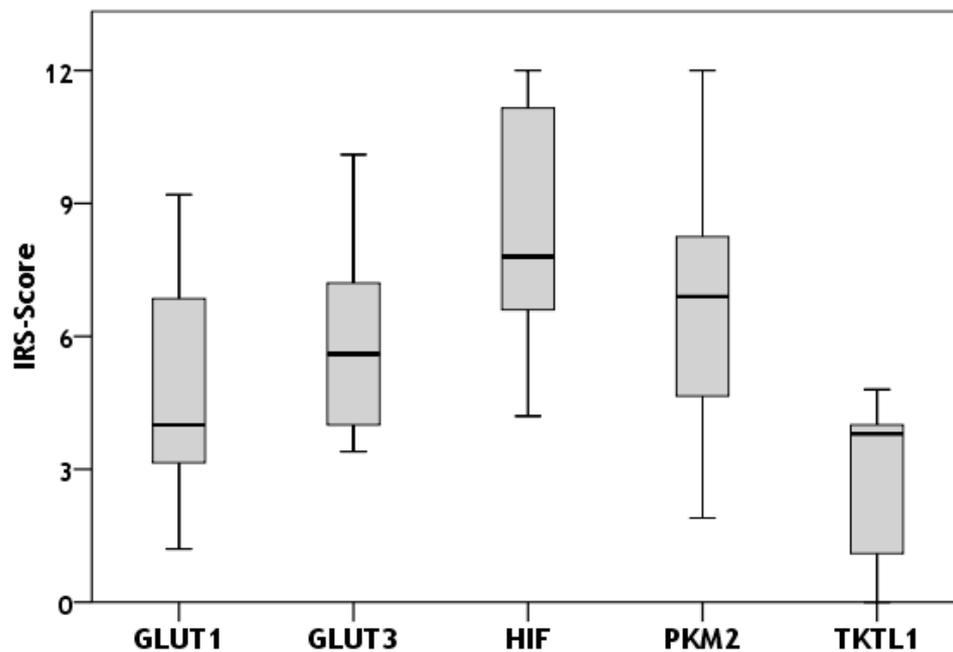


Abb. 15: Posttherapeutisch ermittelte IRS-Scores der untersuchten Proteine (n=11)

Beim Vergleich der posttherapeutischen Proteinexpression der fünf untersuchten Proteine bei den auch im Verlauf untersuchten Patienten (n=11) zeigt sich, dass TKTL1 signifikant am schwächsten und HIF-1 α am stärksten exprimiert wird. Außerdem korrelieren HIF-1 α und GLUT3 sowie HIF-1 α und PKM2 signifikant positiv miteinander. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Während die Verteilungen von GLUT1 und GLUT3 ähnlich stark ausgeprägt waren, aber nicht miteinander korrelierten ($p=0,15$), wird deutlich, dass bei allen 11 untersuchten Tumorgeweben nur eine schwache Expression des Enzyms TKTL1 vorlag (IRS-Score 2 bis <5) und dessen IRS-Score mit einem Median von 3,8 (0-4,8) den niedrigsten Wert der untersuchten Proteine bildet. Demgegenüber dominiert die Expression von HIF-1 α die Gruppe der untersuchten Proteine mit einem Median des IRS-Scores von 7,8 (4,2-12,0). Es lässt sich sogar bei den Patienten Nr. 10 und 21, passend zu ihrer hohen HIF-1 α -Expression, selbst nach der Chemotherapie eine stark ausgeprägte PKM2-Expression (IRS-Score=12) feststellen.

Beim Vergleich der dargestellten Proteinexpressionen untereinander bei allen 11 Patienten zeigt sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit von HIF-1 α und GLUT3 ($r^2=0,48$, $p=0,017$). Diese Abhängigkeit fußt vorrangig auf dem starken Zusammenhang dieser beiden Proteine innerhalb der Osteosarkom-Untergruppe ($r^2=0,85$, $p=0,009$). Zusätzlich korreliert bei der Osteosarkom-Untergruppe auch die HIF-1 α -Expression mit der von GLUT1 ($r^2=0,89$, $p=0,019$) und zwar dahingehend, dass mit dem Abfall der HIF-1 α -Expression die GLUT3- wie auch die GLUT1-Expression sinkt. Außerdem besteht ein signifikanter positiv-linearer Zusammenhang zwischen der HIF-1 α - und PKM2-

Expression ($r^2=0,39$, $p=0,039$) bei allen 11 Patienten. Hinsichtlich des histologischen Regressionsgrades nach Salzer-Kuntschik ist festzustellen, dass zwischen diesem und der GLUT1- und GLUT3-Expression ein negativ linearer Zusammenhang besteht, der für GLUT1 eine statistische Signifikanz annimmt (GLUT1: $p=0,005$; GLUT3: $p=0,053$).

3.9 Vergleich der posttherapeutischen immunhistochemischen Ergebnisse mit denen der Positronen-Emissions-Tomographien

Wie beim Vergleich der prätherapeutischen SUV_{max1}-Werte mit der Proteinexpression der Glucosetransporter lässt sich auch im Verlauf keine signifikante Korrelation zwischen der Glucosetransporterexpression und der nuklearmedizinisch ermittelten Glucoseaufnahme in den Tumoren darstellen. So präsentiert Patient Nr. 15 trotz eines deutlichen Abfalls des SUV_{max}-Wertes von anfänglich 20,9 auf 12,0 im Verlauf sogar einen Anstieg der GLUT1-Expression von ursprünglich 3,6 auf 5,8 sowie der GLUT3-Expression von 4,0 auf 6,8. Allerdings besteht eine negative Abhängigkeit der posttherapeutischen Enzymexpression von PKM2 mit den im Verlauf bestimmten SUV_{max2}-Werten ($r_s=-0,624$, $p=0,04$) über alle 11 Patienten hinweg, so dass zu beobachten ist, dass trotz eines eher niedrigen SUV_{max2}-Wertes noch eine erhöhte PKM2-Expression vorliegt (siehe Patient Nr. 10, 19, 20, 21). Exemplarisch zeigt Patient Nr. 21 trotz Abfall des SUV_{max}-Wertes von anfänglich 10,5 auf 0,9 nach der Chemotherapie eine persistierend starke Expression von PKM2 und auch HIF-1 α mit IRS-Scores von jeweils 12 (siehe Abb. 16). Gleiches trifft für den Patienten Nr. 10 der Ewing-Sarkom-Untergruppe zu.

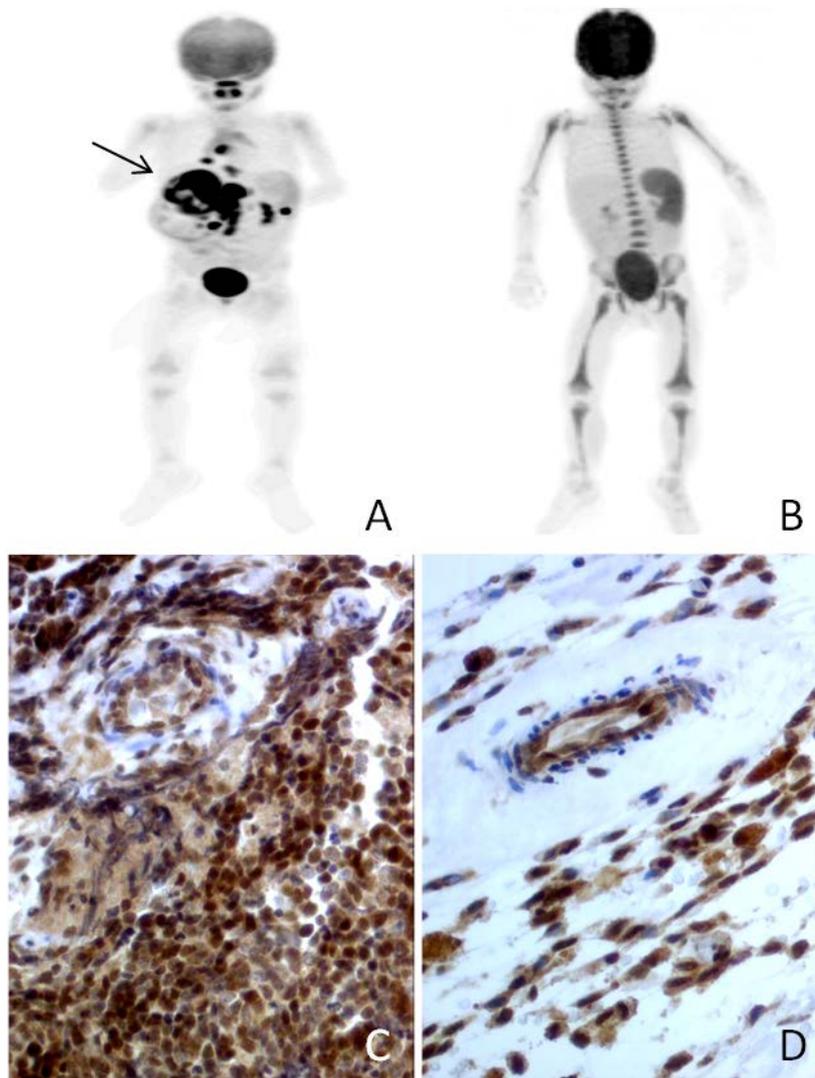


Abb. 16: PET- und immunhistochemische Bilder des Patienten Nr. 21 mit Neuroblastom

Deutliche Aktivitätsanreicherung in Projektion auf die rechte Nebenniere (Pfeil) mit einem SUV_{max_1} von 10,5 vor Durchführung der neoadjuvanten Chemotherapie (A), Maximum intensity projection. Postchemotherapeutisch findet sich mit einem SUV_{max_2} von 0,9 in demselben Areal keine pathologisch erhöhte ^{18}F FDG-Traceraufnahme mehr (B), Maximum intensity projection. Trotz deutlichem Abfall der ^{18}F FDG-Traceraufnahme ist nicht nur vor (C), sondern auch nach durchgeführter Chemotherapie (D) weiterhin eine starke PKM2-Expression in den verbliebenen Tumorzellen zu erkennen (Originalvergrößerung 200-fach).

3.10 Vergleich der prä- mit den posttherapeutisch erhobenen Daten

3.10.1 Glucoseaufnahmeverhalten der Tumoren vor und nach Chemotherapie

Das in Form des SUVmax-Wertes gemessene ^{18}F FDG-Glucoseaufnahmeverhalten vor (=SUVmax₁) und nach Chemotherapie (=SUVmax₂) ist der Tabelle 10 sowie der Abb. 17 zu entnehmen.

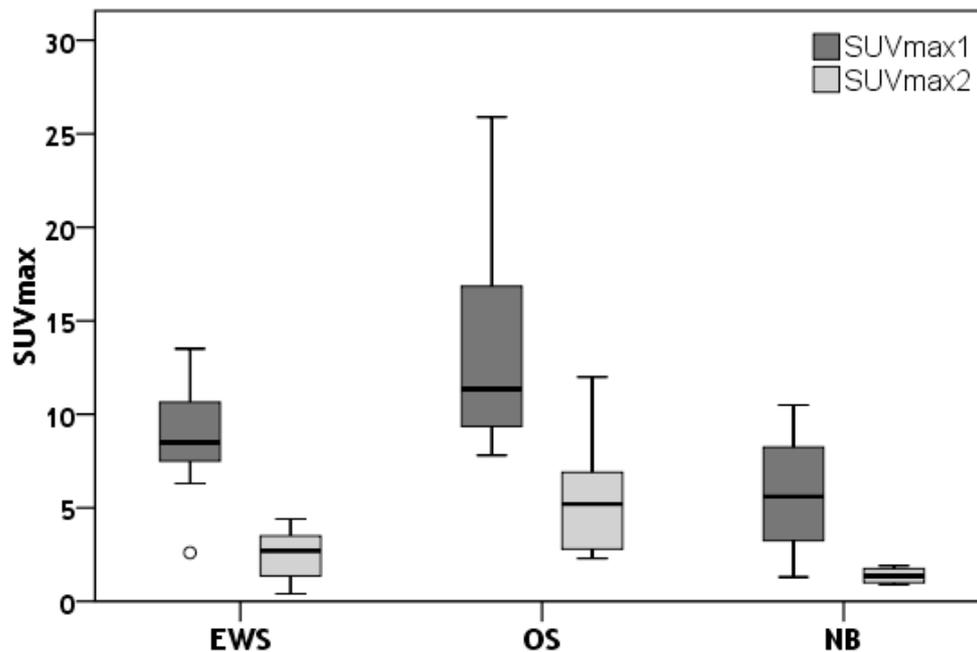


Abb. 17: Gegenüberstellung der SUVmax₁- und SUVmax₂-Werte in den Tumorgruppen (n=23)

Bei den Osteo- und Ewing-Sarkomen ist die Abnahme des ^{18}F FDG-Glucoseaufnahmeverhaltens über die Chemotherapie signifikant, während für die Neuroblastome keine signifikante Abnahme festgestellt werden kann. EWS = Ewing-Sarkom, OS = Osteosarkom, NB = Neuroblastom.

Beim Vergleich der beiden Untersuchungsergebnisse zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme des ^{18}F FDG-Glucoseaufnahmeverhaltens in der Patientenkohorte ($p < 0,001$). Der SUVmax-Median der prätherapeutisch durchgeführten PET-Untersuchung fällt um das 3,6-fache von 9,7 auf 2,7 nach der Chemotherapie ab.

Bei der differenzierten Betrachtung der Tumoruntergruppen wird deutlich, dass die Abnahme des ^{18}F FDG-Glucoseaufnahmeverhaltens in der Gruppe der Osteo- und Ewing-Sarkome im Gegensatz zu den Neuroblastomen statistisch signifikant ist. So fällt der Median des SUVmax bei den Ewing-Sarkomen von ursprünglich 9,0 auf 2,7 ab ($p = 0,0001$). Als exemplarisches Beispiel ist hier Patient Nr. 10 in der Abb. 18 dargestellt. Genauso ist in der Gruppe der Osteosarkome der Rückgang der ^{18}F FDG-Glucoseaufnahme durch die Chemotherapie signifikant ($p = 0,003$). Hier sinkt der Median von anfänglich 11,4 auf 5,2 nach Chemotherapie ab. In der Gruppe der Neuroblastome fällt der

SUVmax-Median zwar von 5,6 auf 1,4, erreicht aber aufgrund der kleinen Fallzahl (n=4) keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

Festzuhalten ist also, dass sich bei 22/23 Patienten ($\cong 96\%$) die mit Hilfe des ^{18}F FDG-Uptakes gemessene Glucoseaufnahme in Folge der neoadjuvant durchgeführten Chemotherapie reduziert. Nur bei Patient Nr. 22 aus der Gruppe der Neuroblastome trifft dieses nicht zu. Bei diesem Patient war bereits anfänglich nur ein SUVmax₁-Wert von 1,3 gemessen worden, der ebenso wie der SUVmax₂-Wert von 1,9 unter dem Cut-Off-Wert von 2,5 als Grenze für eine pathologische ^{18}F FDG-Glucoseaufnahme lag (siehe auch 2.4.2). Darüber hinaus wurden die SUVmax-Werte bei diesem Patienten nicht am Primärtumor, sondern im Bereich einer Lebermetastase erhoben.

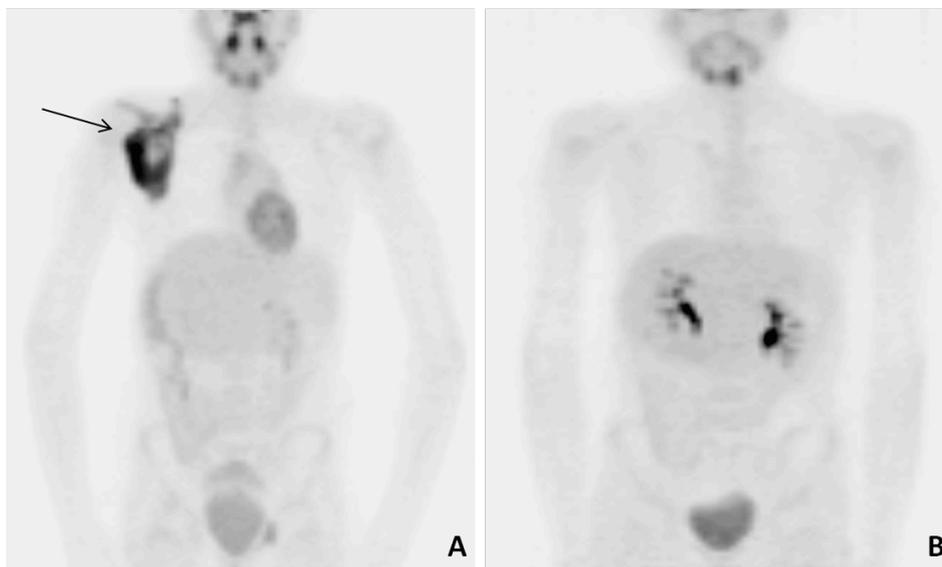


Abb. 18: PET-Aufnahmen des Körperstammes von Patient Nr. 10 mit Ewing-Sarkom

Der Primärtumor im Bereich der rechten Scapularegion (A) zeigt nach Chemotherapie (B) eine Reduktion der mittels PET gemessenen ^{18}F FDG-Glucoseaufnahme von SUVmax₁= 9,9 auf SUVmax₂= 1,4; PET maximum intensity projection (MIP).

3.10.2 Änderung der Proteinexpression der Tumore vor und nach Chemotherapie

Eine Gegenüberstellung der prä- und posttherapeutisch erhobenen PET- und immunhistochemischen Ergebnisse der elf für eine Verlaufsauswertung zur Verfügung stehenden Patienten gibt Tabelle 10 wieder.

Patient	Diagn.	SK	SUVmax ₁	SUVmax ₂	GLUT1	GLUT1 _v	GLUT3	GLUT3 _v	HIF-1 α	HIF-1 α _v	PKM2	PKM2 _v	TKTL1	TKTL1 _v
1	EWS	1	10,1	2,5	3,5	-	4,5	-	12,0	-	12,0	-	0,0	-
2	EWS	1	6,3	3,6	8,0	-	8,0	-	12,0	-	4,0	-	0,0	-
3	EWS	2	7,8	2,8	1,2	-	5,0	-	12,0	-	9,0	-	2,6	-
4	EWS	1	7,2	3,6	1,0	-	4,7	-	12,0	-	6,9	-	2,7	-
5	EWS	4	7,9	4,4	4,0	4	7,3	4	4,2	4,2	7,2	1,9	5,2	0,1
6	EWS	1	13,5	3,4	4,0	-	4,0	-	6,0	-	3,0	-	2,5	-
7	EWS	2	13,5	0,4	8,0	-	9,6	-	8,1	-	6,4	-	0,3	-
8	EWS	3	11,2	2,7	7,8	-	8,0	-	12,0	-	11,0	-	0,0	-
9	EWS	1	8,5	1,3	6,4	-	6,0	-	11,7	-	11,2	-	7,4	-
10	EWS	4	9,9	1,4	4,8	4	5,4	6,7	12,0	12	10,5	12	3,1	2,4
11	EWS	1	2,6	0,8	5,8	-	4,6	-	12,0	-	10,3	-	2,3	-
12	OS	2	25,9	6,5	9,0	9,2	10,9	7,6	9,8	11,3	6,2	4,5	4,2	3,8
13	OS	5	7,8	2,9	5,7	1,2	7,0	4,6	11,4	6,8	6,4	3,6	4,9	0
14	OS	4	12,2	7,3	2,7	2,9	8,2	3,4	11,3	4,7	8,0	4,8	6,7	4,3
15	OS	4	20,9	12	3,6	5,8	4,0	6,8	7,6	7,8	3,8	7,6	1,3	1
16	OS	4	10,5	6,5	5,1	-	9,4	-	12,0	-	7,1	-	3,7	-
17	OS	3	12,8	2,3	4,1	-	6,6	-	12,0	-	6,6	-	0,9	-
18	OS	2	9,0	2,7	6,0	8	12,0	8,4	12,0	10	6,8	6,3	0,0	4
19	OS	4	9,7	3,9	5,0	7,9	8,0	5,6	12,0	7,2	7,6	8,2	6,4	4,8
20	NB	-	5,2	1,6	6,3	4	5,2	4	10,8	6,4	7,4	8,3	3,4	4
21	NB	-	10,5	0,9	9,1	3,4	6,7	10,1	12,0	12	9,3	12	6,4	4
22	NB	-	1,3	1,9	4,8	2,7	7,3	3,7	9,7	11	6,3	6,9	2,7	1,2
23	NB	-	6,0	1,1	9,2	-	8,0	-	9,0	-	5,9	-	7,9	-
Median			9,7	2,7	5,1	4,0	7,0	5,6	12,0	7,8	7,1	6,9	3,2	3,8

Tabelle 10: Gegenüberstellung der prä- und posttherapeutischen Untersuchungen

Gegenüberstellung der prä- und posttherapeutisch ermittelten ¹⁸FDG-Glucoseaufnahme (SUVmax₁ bzw. SUVmax₂) sowie Proteinexpression (der Zusatz „v“ kennzeichnet die Verlaufsmessung nach Chemotherapie). Diagn.=Diagnose, SK=Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad, EWS=Ewing-Sarkom, OS=Osteosarkom, NB=Neuroblastom.

Beim Vergleich der gemessenen IRS-Scores von GLUT1 vor (Median=5,4) und nach der Chemotherapie (Median=4,0) zeigte sich keine signifikante Abnahme der GLUT1-Expression, trotz deutlichem Abfall der mit Hilfe der SUVmax gemessenen ^{18}F FDG-Glucoseaufnahme (siehe 3.10.1). Während beispielsweise die Patienten Nr. 13 (siehe Abb. 19) und 21 mit einer Veränderung des IRS-Scores von anfänglich 5,7 bzw. 9,1 auf 1,2 bzw. 3,4 im Verlauf eine deutliche Reduktion der GLUT1-Expression aufzeigten, war der Zusammenhang bei den Patienten Nr. 15, 18 und 19 gegenläufig. Hier nahm der IRS-Score der GLUT1-Expression nach der Chemotherapie zu. Bei allen drei Patienten handelt es sich um Patienten der Osteosarkom-Untergruppe, wobei zwei dieser drei Patienten mit einem Salzer-Kuntschik-Regressionsgrad von 4 auch als Non-Responder einzustufen sind. Zudem wies Patient Nr. 15 auch einen Anstieg der GLUT3- und PKM2-Expression auf.

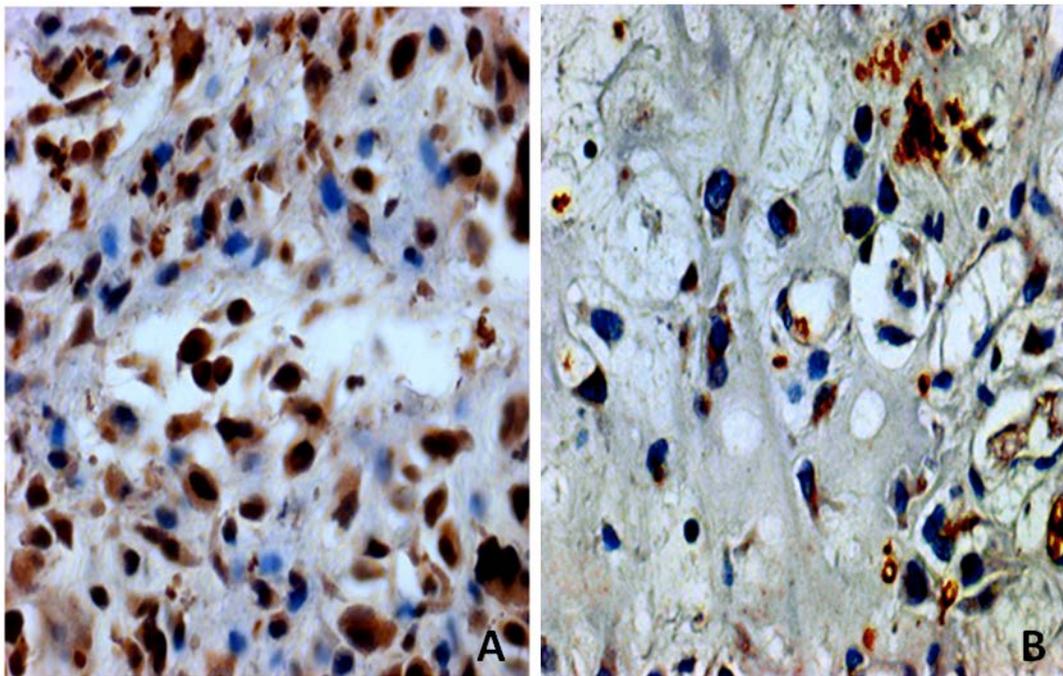


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung von GLUT 1 bei Patient Nr. 13 mit Osteosarkom
Reduktion der GLUT1-Expression von einem initialen IRS-Score von 5,7 (A) auf 1,2 (B) nach chemotherapeutischer Intervention (Originalvergrößerung 200-fach).

Insgesamt konnte bei allen 11 Patienten bezüglich der Expression von GLUT3, HIF-1 α und PKM2 keine signifikante Expressionsänderung nach chemotherapeutischer Intervention gemessen werden. Ferner gab es bei der Gegenüberstellung der TKTL1-Expression vor und nach der Chemotherapie keine signifikante Expressionsänderung. Bei der detaillierten Analyse findet sich bei allen 11 Patienten im Verlauf nur eine

schwache TKTL1-Expression (IRS-Score <6). Auffällig ist Patient Nr. 18 aus der Osteosarkom-Untergruppe, der zu Beginn keine TKTL1-Expression aufwies (IRS-Score=0), im Verlauf aber eine TKTL1-Expression von 4,0 zeigte.

3.11 Immunhistochemisch ermittelte Basiswerte der Protein-Expression im Vorläufergewebe

Um die immunhistochemisch ermittelten prä- und posttherapeutischen Proteinexpressionen des jeweiligen Tumorgewebes adäquat beurteilen zu können, wurde ebenfalls im nicht vom Tumorgewebe befallenen Vorläufergewebe derselben Studienpatienten (Lamellenknochen als Vorläufergewebe der Ewing- und Osteosarkome sowie Nebennierenparenchym als Vorläufergewebe der Neuroblastome) die Expression von GLUT1, GLUT3, HIF-1, PKM2 und TKTL1 untersucht (siehe Tabelle 11). Dabei wurde tumorfreier Lamellenknochen von zehn Patienten mit Ewing- und Osteosarkomen sowie tumorfreies Nebennierenparenchym von vier Neuroblastom-Patienten analysiert. Von diesen ermittelten Basiswerten ausgehend wurde der jeweilige IRS-Score mit $\pm 2\sigma$ des Basiswerts als Über- bzw. Unterexpression definiert.

Vorläufergewebe	GLUT1	GLUT3	HIF-1	PKM2	TKTL1
Lamellenknochen (n=10)	3,5 ± 0,7 ± 1σ 2,8-4,2 ± 2σ 2,1-4,9	4,4 ± 0,5 ± 1σ 3,9-4,9 ± 2σ 3,4-5,4	5 ± 0,9 ± 1σ 4,1-5,9 ± 2σ 3,2-6,8	3,4 ± 0,6 ± 1σ 2,8-4,0 ± 2σ 2,2-4,6	3,8 ± 0,6 ± 1σ 3,2-4,4 ± 2σ 2,6-5,0
Nebenniere (n=4)	2,2 ± 0,4 ± 1σ 1,8-2,6 ± 2σ 1,4-3,0	2,6 ± 0,6 ± 1σ 2,0-3,2 ± 2σ 1,4-3,8	4,3 ± 0,5 ± 1σ 3,8-4,8 ± 2σ 3,3-5,3	4,1 ± 0,6 ± 1σ 3,5-4,7 ± 2σ 2,9-5,3	2,7 ± 0,5 ± 1σ 2,2-3,2 ± 2σ 1,7-3,7

Tabelle 11: IRS-Score der fünf Proteine in den Vorläufergeweben

Die Tabelle fasst die in Form des IRS-Scores gemessene Expression der fünf untersuchten Proteine (GLUT1, GLUT3, HIF-1α, PKM2 und TKTL1) als „Mittelwert ± SD“ zusammen, die anhand von gesundem, den Tumorentitäten korrespondierenden Vorläufergewebe ermittelt wurde. Dabei beschreiben $\pm 1\sigma$ bzw.

$\pm 2\sigma$ den Abstand vom ermittelten Basiswert in Form einer bzw. zweier Standardabweichungen. Werte $< 2\sigma$ werden definitionsgemäß als Unter- und Werte $> 2\sigma$ als Überexpression bezeichnet.

Exemplarisch wurden für die Ewing- und Osteosarkome ein IRS-Score der GLUT1-Expression von $< 2,1$ als Unter- und eine Expression $> 4,9$ als Überexpression festgesetzt. Analog dazu wurden für die Neuroblastome ein IRS-Score der GLUT1-Expression von $< 1,4$ als Unter- und eine Expression $> 3,0$ als Überexpression definiert.

4. Diskussion

4.1 Prätherapeutische Ergebnisse

Nach Entdeckung und erfolgreicher Anwendung von Chemotherapeutika in den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts versucht die aktuelle Krebsforschung inzwischen anhand von komplexen Modellen zur Karzinogenese auf molekularer Ebene Ursachen der Tumorentstehung und -progression sowie therapeutische Interventionsmöglichkeiten im Sinne einer zielgerichteteren Therapie ausfindig zu machen. Dabei kam es zur Wiederentdeckung der Hypothese Warburgs (8) und der Konzentration auf Stoffwechselzusammenhänge, die sich aus einer erhöhten Glucoseaufnahme in malignen Tumoren ergeben und diese bedingen (19). Auch die Bedeutung von zentralen Stoffwechselregulationsproteinen für die Karzinogenese wie dem sauerstoffsensiblen HIF-1 α ist seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung (82). Während erste Studien zu Mamma- (83) und Lungenkarzinomen (84) sowie anderen Krebsformen (85-87) im Erwachsenenalter begonnen haben, Tumorzellen hinsichtlich ihrer metabolisch aktiven Proteine zu untersuchen, sind im Bereich der Tumoren von Kindern und Jugendlichen dahingehend nur spärlich Untersuchungen vorhanden.

Basierend auf einer umfangreichen prospektiven Multi-Center-Studie zur Wertigkeit der ^{18}F FDG-Positronen-Emissions-Tomographie im Kindes- und Jugendalter gewährt die hier vorliegende Arbeit Einblicke in Schlüsselproteine des Tumorstoffwechsels von Ewing- und Osteosarkomen wie auch Neuroblastomen.

So lässt sich zunächst feststellen, dass alle Tumorarten prätherapeutisch eine erhöhte ^{18}F FDG-Aufnahme gegenüber dem gesunden Gewebe als Anzeichen eines vermehrten Glucosestoffwechsels zeigen, eine Beobachtung, die von unterschiedlichen Studien an pädiatrischen Patienten unterstützt wird (76, 77, 88-90). Darüber hinaus zeigt die hier vorliegende Arbeit eine signifikant höhere prätherapeutische Traceraufnahme bei den Ewing- und Osteosarkomen gegenüber den Neuroblastomen, wobei die SUV_{max}-Werte der einzelnen Tumorgruppen mit denen anderer Studien vergleichbar sind (7, 77, 91-93). Aufgrund der vergleichsweise geringeren ^{18}F FDG-Traceraufnahme wird bei den Neuroblastomen die ^{18}F FDG-PET-Untersuchung nur ergänzend zur standardmäßig durchgeführten MIBG-Szintigraphie gesehen, insbesondere bei Patienten, die keine MIBG-Akkumulation aufweisen (94, 95).

Da die ^{18}F FDG-Aufnahme über die Glucosetransporter zu erfolgen scheint (17) (siehe auch 1.4.1), konnte angenommen werden, dass bei erhöhter prätherapeutischer ^{18}F FDG-Aufnahme auch eine starke Expression der Glucosetransporter vorliegt. Diese Hypothese konnte durch die hier vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. So weisen Neuroblastome im Vergleich zu den Sarkomen eine ähnlich hohe Expression von GLUT1 und GLUT3 auf, obwohl die $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ -Werte der Neuroblastome signifikant niedriger sind. Auch für die Tumorgruppen der Ewing- und Osteosarkome konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen den prätherapeutisch erhöhten $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ -Werten und der Glucosetransporterexpression festgestellt werden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Studien bei erwachsenen Patienten mit Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)(84), Nierenzell- (18) und Ösophaguskarzinomen (96). So konnten Marom et al. in ihrer Studie mit 66 NSCLC-Patienten zeigen, dass weder die anhand eines vergleichbaren IRS-Scores gemessene GLUT1- noch die GLUT3-Expression mit den $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ -Werten korrelieren. Auch für die Nierenzellkarzinome konnten Miyakita et al. in ihrer Studie mit 19 Patienten zeigen, dass die mittels $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ erhobene Glucoseaufnahme nicht mit der GLUT1-Expression korreliert, die mit Hilfe eines immunhistochemischen Scores ermittelt wurde, der zwischen negativer, schwacher und positiver Expression differenziert.

Demgegenüber finden sich in der wissenschaftlichen Literatur aber auch einige Gegenbeispiele, die eine deutliche Korrelation zwischen der ^{18}F FDG-Aufnahme und Glucosetransporter-Expression bei Tumorentitäten wie Cervix- (97) aber auch NSCLC nachweisen konnten (98, 99). Allerdings legten Baardwijk et al. bei den NSCLC für die Messung der GLUT1-Expression ebenfalls nicht den IRS-Score, sondern eine vereinfachte Kategorisierung mit einer Aufteilung, die lediglich zwischen negativer und positiver Expression unterscheidet, zugrunde. Auch die Arbeitsgruppe von Hamada et al. konnte in ihrer Studie mit 49 Patienten mit benignen sowie malignen Knochen- und Weichteiltumoren einen positiven Zusammenhang von $\text{SUV}_{\text{max}_1}$ und der GLUT1-Expression aufzeigen, wobei ebenfalls nur ein immunhistochemischer Score verwendet wurde, der zwischen den Kategorien der negativen und positiven Expression differenziert (100). Allerdings quantifiziert diese Studie auch die GLUT1-Expression durch eine RT-PCR, deren Ergebnisse positiv mit den immunhistochemisch erhobenen Werten der GLUT1-Expression korrelieren. Während in dieser Arbeit von Hamada et al.

neun Osteosarkome und ein Ewing-Sarkom untersucht wurden, sind weitere Ergebnisse zu SUVmax₁ und GLUT1-Expression, insbesondere bei Neuroblastomen, nicht publiziert. Folgende Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit aufgezeigten diskordanten Zusammenhänge zwischen SUVmax und Proteinexpression sind denkbar:

1. Die Probenentnahme des Tumors erfasst nur eine Momentaufnahme des Tumorstoffwechsels und ist daher nicht zwangsläufig repräsentativ für die zu einem anderen Zeitpunkt mittels ¹⁸FDG-PET gemessene durchschnittliche Tumorstoffwechselaktivität.
2. Das Wissen um die exakte Lokalisation der entnommenen Tumorprobe ist von besonderer Bedeutung. Die Berechnung der SUVmax-Werte (siehe Kapitel 1.4.3) muss im Bereich der Tumorproben-Entnahmestelle erfolgen, um die erhobenen PET-Daten mit der immunhistochemisch gemessenen Proteinexpressionsstärke an genau derselben Körperstelle korrelieren zu können. Es liegt in der Natur dieses Vorgehens, dass die Lokalisation der entnommenen Tumorproben nur auf Grund von Operations- und Pathologieberichten bestimmt werden konnte. Dies stellt daher, trotz sorgfältiger Recherche, eine systemimmanente Fehlerquelle dar.
3. Das an Tiermodellen erforschte Konzept zur ¹⁸FDG-Aufnahme (siehe Kapitel 1.4.1) in Tumorzellen besteht aus einer erleichterten Diffusion über Glucosetransporter im ersten Schritt (siehe Kapitel 1.3.1) sowie anschließender Phosphorylierung und damit einhergehender ¹⁸FDG-Akkumulation in den Zellen, ohne dass ¹⁸FDG daraufhin weiter metabolisiert werden kann. Die Menge des akkumulierten Radiotracers hängt allerdings nicht nur von der Anzahl der zur Verfügung stehenden Glucosetransporter ab, sondern auch maßgeblich von der sich daran anschließenden enzymatischen Phosphorylierungsgeschwindigkeit des ¹⁸FDG-Moleküls durch die Hexokinase und der Geschwindigkeit der Hydrolysierung durch die Glucose-6-Phosphatase (siehe Kapitel 1.1), die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, aber ebenfalls eine Rolle spielen (84, 100, 101).
4. Des Weiteren kann die ¹⁸FDG-Akkumulation durch den Tumor umgebende Entzündungszellen ausgelöst bzw. verstärkt werden. Damit wäre die ¹⁸FDG-Anreicherung nicht für die eigentliche Tumoraktivität repräsentativ (102). Diese

Hypothese erscheint aber im Kontext der hier untersuchten pädiatrischen Tumorentitäten nicht wahrscheinlich.

5. Die immunhistochemische Färbung zur Messung der Proteinexpressionsstärke ist eine semiquantitative Methode, die von dem Färbeverfahren, insbesondere den eingesetzten Antikörpern, und den individuellen Einschätzungen der Beurteiler abhängig ist.

Um die immunhistochemisch ermittelten prä- und posttherapeutischen Proteinexpressionen des jeweiligen Tumorgewebes sinnvoll interpretieren zu können, wird eine Referenz für die normale, nicht tumorinduzierte Proteinexpression des der jeweiligen Tumorentität zugrundeliegenden Vorläufergewebes benötigt. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es keine ausreichenden Daten, um aus diesen Referenz- und Basiswerte der Proteinexpression im gesunden Vorläufergewebe abzuleiten, die auf den in dieser Arbeit verwendeten IRS-Score (siehe Kapitel 2.3.2) übertragbar wären. Daher wurde im tumorfreien Vorläufergewebe derselben Studienpatienten (Lamellenknochen als Vorläufergewebe der Ewing- und Osteosarkome sowie Nebennierenparenchym als Vorläufergewebe der Neuroblastome) die Expression von GLUT1, GLUT3, HIF-1, PKM2 und TKTL1 untersucht und von diesen ermittelten Basiswerten ausgehend, Grenzwerte für die Über- bzw. Unterexpression des jeweiligen Proteins definiert (siehe Kapitel 3.11). Die gemessenen Basiswerte sind mit den Werten aus einer der größten humanen Proteinexpressionsdatenbank vergleichbar (103).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 konnte eine signifikant positiv korrelierende Expression festgestellt werden. So korreliert die prätherapeutische Expression von GLUT1 mit der des verwandten Proteins GLUT3, wobei GLUT3 hauptsächlich gleichwertig oder höher, aber nur bei 3/23 Patienten geringer exprimiert war (siehe Tabelle 3). Andere Studien konnten zeigen, dass die Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 in unterschiedlichen Tumorarten überexprimiert waren (104, 105). Dabei soll die Überexpression von GLUT1 mit einer erhöhten metabolischen Aktivität, einem erhöhten Energieverbrauch und einem aggressiveren Tumor-Verhalten mit erhöhter Metastasierungstendenz und invasivem Tumorwachstum assoziiert sein (106, 107). Dieses trifft auch für die in dieser Studie untersuchten Tumoruntergruppen zu, die sich ebenfalls durch frühzeitige Metastasierung und aggressives Wachstum auszeichnen. So konnte in dieser Arbeit eine erhöhte GLUT1-Expression beim hochmalignen Neuroblastom (IRS-Score $7,4 \pm 2,2$;

Basiswert des Vorläufergewebes $2,2 \pm 0,4$, siehe Kapitel 3.3.1 und 3.11) festgestellt werden, die in Untersuchungen anderer Autoren (108, 109) mit einer schlechteren Überlebensprognose korreliert werden konnte. Auch GLUT3 ist in einigen malignen Tumoren überexprimiert, wobei der GLUT3-Überexpression insgesamt eine geringere Bedeutung beigemessen wird (20). So konnte in der hier vorliegenden Arbeit erstmals die mäßige bis starke GLUT3-Expression bei Ewing- und Osteosarkomen sowie Neuroblastomen beschrieben werden.

Die Expression der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 wird durch HIF-1 α (siehe Kapitel 1.3.2) reguliert und ist damit vom Sauerstoffgehalt im Gewebe abhängig (19, 20). Von den hier prätherapeutisch untersuchten 23 Patienten zeigten 19 (\cong 83%) eine starke zytoplasmatische wie teilweise auch nukleäre HIF-1 α -Expression. Mit einem Median von 12,0 ist HIF-1 α das am stärksten exprimierte Protein aller untersuchten Proteine dieser Arbeit, während seine Detektion bei vergleichbaren Arbeiten zum Ewing-Sarkom nur bei 18/28 bzw. 17/56 Patienten gelang (110, 111). Demgegenüber konnte auch beim Osteosarkom eine starke Expression von HIF-1 α bestätigt werden, wobei sich das Protein dabei hauptsächlich nukleär anfärben lässt (112). Auch im Neuroblastom lässt sich gegenüber dem Nebennierenparenchym-Vorläufergewebe eine deutliche erhöhte Expression von HIF-1 α nachweisen. Diese wird allerdings in der Literatur unterschiedlich, nämlich mit einer schlechteren bzw. besseren Prognose, assoziiert (113, 114).

Neben der Expression der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 induziert HIF-1 α auch andere in die Glykolyse involvierte Enzyme, ferner die Angiogenese über Transkription des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (115, 116) sowie die Lipid- und Nucleotidsynthese (28). Durch die generell sauerstoffärmeren Bedingungen in Tumoren (117) wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 α gefördert und somit das Überleben unter hypoxischen Bedingungen ermöglicht (97, 118, 119). Diese Anpassung an lokale Hypoxiezustände wird bei Ewing- und Osteosarkomen als essentiell angesehen, um weitere Proliferation zu unterhalten und Apoptose zu verhindern (110, 111). Diese zentrale Rolle von HIF-1 α wird insbesondere dadurch deutlich, dass es die Expression des Ewing-spezifischen Fusionsgens EWS-FLI1 reguliert (110, 111). Ferner ist es beim Neuroblastom ein wichtiger Kooperationspartner des n-myc-Onkogens und führt auch hier wie bei Ewing- und Osteosarkomen zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und einer ausbleibenden Differenzierung des

Tumorgewebes (120, 121). Darüber hinaus sehen einige Autoren in HIF-1 α den entscheidenden Transkriptionsregulator, der durch Aktivierung der PKM2-Gentranskription für den Isoform-Wechsel der Pyruvatkinase (siehe Kapitel 1.3.3) in die Isoform PKM2 verantwortlich ist (122). Des Weiteren agiert PKM2 auch direkt mit HIF-1 α und führt über die Aktivierung von HIF-1 α -Zielgenen zu einer erhöhten Glucose-Aufnahme sowie Laktatproduktion (122), so dass der Tumor sich wechselnden Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen anpassen kann (34, 123). Im Gegensatz dazu führt der Ersatz von PKM2 durch PKM1 in Tumorzellen von Maus-Xenografts mit Hilfe von RNA-Interferenzen (small hairpin RNA) zur Umkehr des Warburg-Effektes und somit zu einer reduzierten Laktatproduktion sowie erhöhtem Sauerstoffverbrauch (32). In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Zusammenhang für das Neuroblastom hergestellt werden, indem eine starke positive Korrelation zwischen der HIF-1 α - und der PKM2-Expression in den prätherapeutischen Tumorproben festgestellt wurde ($p < 0,0001$). Diese Daten bilden damit die mögliche Basis für die Entwicklung von Therapieansätzen wie der Inhibition der tumorspezifischen PKM2-Isoform (124).

Neben einer PKM2-Überexpression wird auch die vermehrte Bildung von TKTL1 mit einem verstärkten Zellwachstum, einem erhöhten sauerstoffunabhängigen Glucoseverbrauch und einer konsekutiv erhöhten Laktatproduktion beschrieben (125, 126). Letztere hat dabei eine Umwandlung des den Tumor umgebenden Mikromilieus zur Folge, die das Wachstum und die Metastasierungstendenz des Tumors fördert (127). Zu diesem pathophysiologischen Ansatz passend ist in verschiedenen Tumorarten eine erhöhte TKTL1-Expression mit dem Nachweis einer Tumorzellausbreitung in die Lymphknoten vergesellschaftet (128-130). Demgegenüber konnten Diaz-Moralli et al. in ihrer Studie an kolorektalen Tumoren von 63 Patienten zeigen, dass eine immunhistochemisch ermittelte erniedrigte TKTL1-Expression hochsignifikant mit einer bereits stattgefundenen Fernmetastasierung assoziiert ist (128). Für diesen in der wissenschaftlichen Literatur für kolorektale Tumore erstmalig gezeigten Zusammenhang führen Diaz-Moralli et al. zwei Erklärungsansätze ins Feld. Zum einen sei die TKTL1-Überexpression, die die Metastasenbildung fördere, nach erfolgter Metastasierung nicht mehr notwendig, so dass die TKTL1-Expression verringert würde. Die Autoren bleiben allerdings die Erklärung schuldig wie der molekulare Rückkopplungsmechanismus aufgebaut sein soll, der dem Primarius signalisiert, dass im klassischen Sinne der Metastasierung an einer Stelle seines Tumorzellkonglomerats

Tumorzellen mit Hilfe der Lymph- oder Blutbahn abgewandert sind (131). Zum anderen sei TKTL1 notwendig für die Tumorprogression sowie sein lokales invasives Wachstum. Folglich seien Tumore, die keine Überexpression dieses Enzyms zeigen, unfähig fortdauernd in ihrem eigenen lokalen Mikromilieu zu wachsen und würden deshalb, der Logik des Darwin'schen Selektionsprozesses folgend, metastatische Eigenschaften im Sinne einer Tumorüberlebensstrategie ausprägen.

Da es sich bei den hier untersuchten Tumorentitäten wie Osteo- und Ewing-Sarkomen größtenteils um bereits bei Manifestation hämatogen metastasierte Erkrankungen handelt, kann die in dieser Arbeit ermittelte Unterexpression von TKTL1 bei den EWS und die indifferente Expression bei den OS in Analogie der von Diaz-Moralli et al. postulierten Hypothese als Indiz für eine bereits erfolgte Fernmetastasierung diskutiert werden. Die übergeordnete Bedeutung des TKTL1-Proteins für das Tumorwachstum ergibt sich auch aus einer aktuellen Studie (126), die unter Verwendung von RNA-Interferenzen in Kolonkarzinom-Zelllinien die Expression von TKTL1-Proteinen unterbindet. In diesen TKTL1-knockdown-Zellen waren die durch oxidativen Stress induzierten Apoptoseraten signifikant höher, obwohl die Menge der intrazellulären, reaktiven Sauerstoffverbindungen nicht erhöht war. In der Folge wuchsen Tumorzellen ohne TKTL1-Suppression doppelt so schnell wie Tumorzellen mit ausgeschalteter TKTL1-Expression (126). Außerdem erstarken durch den TKTL1-knockdown die mitochondrialen Prozesse der Zellen und führen so zu einer Steigerung der Laktatproduktion (132). Somit ist in vielen verschiedenen Tumorentitäten wie Lungen-, Urothel- und Kolonkarzinomen die Überexpression von TKTL1 mit einer schlechteren Patientenprognose vergesellschaftet (125, 133). Die hier vorliegende Studie beschreibt erstmals die Expression von TKTL1 in Ewing- und Osteosarkomen, ohne allerdings zu dessen prognostischer Bedeutung Stellung nehmen zu können. Hierzu ist die Durchführung von größeren, prospektiven Studien notwendig. Unter den embryonalen Tumoren ist bekannt, dass das anaplastische Nephroblastom (syn. Wilms-Tumor) eine TKTL1-Überexpression aufweist (134). Derartige Untersuchungen zu den Neuroblastomen liegen bis dato nicht vor. Die hier vorliegende Arbeit zeigt aber im Gegensatz zu den Ewing- und Osteosarkomen eine Überexpression von TKTL1 bei den Neuroblastomen.

4.2 Posttherapeutische Ergebnisse und Verlauf

Wie zahlreiche vergleichbare Studien belegt auch diese Arbeit eine statistisch signifikante Reduktion der mit Hilfe des ^{18}F FDG-Uptakes quantifizierten Tumorstoffwechselaktivität nach neoadjuvant durchgeführter Chemotherapie. So fällt der über alle 23 Patienten gemessene Median des SUVmax um das 3,6-fache von anfänglich 9,7 auf 2,7 ab. Dabei bleibt allerdings bei der Osteosarkom-Untergruppe eine gegenüber den anderen Tumorentitäten statistisch signifikant erhöhte ^{18}F FDG-Traceraufnahme (= SUVmax₂) bestehen (OS vs. EWS: p=0,028; OS vs. NB: p=0,006). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die beim Vergleich der SUVmax₁-Werte von Osteo- und Ewing-Sarkomen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, aber beim Vergleich der SUVmax₂-Werte signifikant höhere Resultate bei den Osteo- gegenüber den Ewing-Sarkomen feststellten (135, 136). Zudem konnte, basierend auf der in dieser Studie untersuchten Kohorte, eruiert werden, dass die Reduktion des SUVmax-Wertes sowie die Höhe des posttherapeutisch errechneten SUVmax-Wertes mit dem histologischen Ansprechen assoziiert sind (137). Bemerkenswert ist, dass bei einigen Studienteilnehmern in den Tumorverlaufspröben keine vitalen Tumorzellen detektiert werden konnten (= Salzer-Kuntschik Grad 1), diese Patienten (Nr. 2 und Nr. 4) aber trotzdem SUVmax₂-Werte von jeweils 3,6 aufweisen, die über dem Cut-Off-Wert von 2,5 zur pathologischen ^{18}F FDG-Aufnahme (siehe Kapitel 2.4.2) liegen. Diese erhöhte Tracerspeicherung ist somit eher auf reaktive Veränderungen in Folge der Chemotherapie, nicht aber zwangsläufig auf vitales Tumorgewebe, zurückzuführen (135).

Vergleichbar mit den Resultaten aus den prätherapeutischen immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit ist auch posttherapeutisch das Protein HIF-1 α am stärksten und das Protein TKTL1 am schwächsten unter den untersuchten Proteinen ausgeprägt. Einige Studien mit größeren Patientenkollektiven haben die nach neoadjuvanter Chemotherapie immunhistochemisch bestimmte HIF-1 α -Expression als potenziellen Prognosemarker ins Feld geführt. So konnte in Studien zum Mamma- (138) und Adenokarzinom (139) eine hohe postchemotherapeutisch gemessene HIF-1 α -Expression mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben in Verbindung gebracht werden. Dieser Zusammenhang besteht auch in der Gruppe der Osteosarkome, wie Yang et al. bei 39 Patienten zeigen konnten (112). Da das

krankheitsfreie Überleben in der hier vorliegenden Studie nicht untersucht wurde, ist es bei zudem geringen Fallzahlen nicht möglich, eine adäquate Aussage zur Wertigkeit von HIF-1 α als Prognosemarker für die untersuchten Tumorentitäten zu treffen. Jedoch bestand keine Korrelation der Expression von HIF-1 α mit dem histologischen Regressionsgrad nach Salzer-Kuntschik (siehe Kapitel 1.5.1).

Beim Vergleich der posttherapeutisch erhobenen Proteinexpressionsdaten lässt sich feststellen, dass HIF-1 α in der Gruppe der Osteosarkome, anders als in den prätherapeutisch untersuchten Tumorproben, mit der Expression der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT3 positiv korreliert. Vergleichbar mit der hier vorliegenden Arbeit untersuchten nur zwei weitere Studien sowohl prä- als auch posttherapeutische Tumorproben hinsichtlich der HIF-1 α - und GLUT1-Expression, wobei beide keinen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen in den posttherapeutischen Tumorproben feststellen konnten (140, 141). Dieser fehlende Zusammenhang basiert darauf, dass die posttherapeutische GLUT1-Expression bei der Studie von Koda et al. zum Mammakarzinom (140) deutlich stärker abfällt als die HIF-1 α -Expression, während sich bei der Studie von Havelund et al. zum Rektumkarzinom (141) die GLUT1-Expression nach Chemotherapie unverändert darstellt und demgegenüber die HIF-1 α -Expression stark abfällt.

Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten HIF-1 α - und PKM2-Expression besteht auch nach Durchführung der Chemotherapie fort. So zeigen hinsichtlich der PKM2-Expression die Mehrzahl der Patienten gleichbleibende oder sogar noch steigende IRS-Scores. Daraus resultiert eine negative Korrelation von PKM2 mit den SUV_{max2}-Werten ($r_s = -0,624$, $p = 0,04$). Dieses kann molekularbiologisch dadurch erklärt werden, dass zwar die Glucoseaufnahme in den Tumoren durch die Chemotherapie reduziert ist, jedoch nicht der Glucoseumsatz, der auch von anderen Stoffwechselwegen wie dem Pentosephosphatzyklus oder dem Fructose-Abbauweg beeinflusst wird. Bis dato existieren keine Daten zum Verhältnis von SUV_{max2} zur HIF-1 α - und PKM2-Expression nach Chemotherapie, die zum Vergleich herangezogen werden könnten.

4.3 Ausblick

Diese Arbeit zeigt anhand von Proteinexpressionsanalysen unterschiedlicher Schlüsselenzyme des Glucosestoffwechsels, dass Tumorzellen von Ewing- und Osteosarkomen sowie Neuroblastomen sowohl eine gesteigerte Glucoseaufnahme als auch einen gesteigerten Glucosestoffwechsel aufweisen. Dabei sind die hier untersuchten und frühzeitig zur Metastasierung neigenden drei Tumorentitäten durch eine prätherapeutisch erhöhte Expression von GLUT1 und GLUT3 sowie HIF-1 α und PKM2 charakterisiert. Analog zu Untersuchungen bei soliden Tumoren des Erwachsenenalters anderer Autoren sollte in zukünftigen größeren prospektiven Studien mit weiterführenden molekularbiologischen Methoden die Gen- und Proteinexpression von Glucosestoffwechsellzymen quantifiziert und diese gewonnenen Resultate mit den PET- und Überlebensdaten der Kinder und Jugendlichen korreliert werden. Aus diesen untersuchten Zusammenhängen können Möglichkeiten abgeleitet werden, die Therapie frühzeitig zu stratifizieren und zu adjustieren.

5. Zusammenfassung

Die hier vorliegende prospektive klinisch-experimentelle Arbeit analysiert den Glucose-Stoffwechsel bei soliden Tumoren des Kindes- und Jugendalters. Dazu wurden insgesamt 23 Kinder und Jugendliche mit den Diagnosen Ewing-Sarkom, Osteosarkom und Neuroblastom vor und nach durchgeführter Polychemotherapie untersucht. Dabei wurde die Glucoseaufnahme mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) gemessen und die Proteinexpression von verschiedenen Schlüsselenzymen des Glucosestoffwechsels sowie des sauerstoffabhängig regulierten Proteins HIF-1 α durch semiquantitative Auswertung mittels Immunhistochemie erhoben.

Die hier vorliegende Arbeit liefert erstmals einen mehrstufigen Einblick in die Glykolyse und den mit ihr verbundenen Pentosephosphatzyklus von soliden Tumoren des Kinder- und Jugendalters und kann prätherapeutisch sowohl eine gesteigerte Glucoseaufnahme als auch einen gesteigerten Glucosestoffwechsel für diese Tumore nachweisen. Dabei sind die untersuchten Tumorentitäten durch eine unterschiedlich erhöhte Proteinexpression von GLUT1 und GLUT3 sowie HIF-1 α und PKM2 charakterisiert, während TKTL1 als Enzym des Pentosephosphatzyklus bei den Ewing- und Osteosarkomen vergleichsweise gering exprimiert wird. Diese Enzymkonstellation kann als Anpassung an lokale Hypoxiezustände und zur Förderung der bei diesen Tumoren frühzeitig einsetzenden Metastasierung verstanden werden. Zudem weisen der nach Chemotherapie in einigen Tumoren dokumentierte ausbleibende Abfall der HIF-1 α -Expression und die weiterhin erhöhte Glucoseaufnahme in den Osteosarkomen auf eine erhöhte Resistenz gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung sowie eine reduzierte Apoptoserate hin.

Aus der hier vorliegenden Arbeit ergeben sich unterschiedliche Ansatzpunkte für weiterführende Studien. Folglich erscheint es von Interesse, die Gen- und Proteinexpression von HIF-1 α und PKM2 in großen prospektiven Studien zu quantifizieren und mit den PET- und Überlebensdaten der pädiatrischen Patienten zu korrelieren. Dadurch können prognostische Biomarker identifiziert werden, mit deren Hilfe die Therapie früh stratifiziert und adjustiert werden kann. Ferner bildet die hier vorliegende Arbeit die Basis für in-vitro und in-vivo-Studien zu möglichen Therapieansätzen. Insbesondere erscheint die Inhibierung des HIF-1 α -Signalweges sowie des Isoenzym PKM2 erfolgsversprechend in der Behandlung von Osteo- und Ewing-Sarkomen sowie Neuroblastomen des Kindes- und Jugendalters.

6. Literaturverzeichnis

1. Barnett, J.A., *A history of research on yeasts. 1: Work by chemists and biologists 1789-1850*. *Yeast*, 1998. **14**(16): p. 1439-51.
2. Barnett, J.A. and F.W. Lichtenthaler, *A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900*. *Yeast*, 2001. **18**(4): p. 363-88.
3. Warburg, O.H., *The classic: The chemical constitution of respiration ferment*. *Clin Orthop Relat Res*, 2010. **468**(11): p. 2833-9.
4. Brand, R.A., *Biographical sketch: Otto Heinrich Warburg, PhD, MD*. *Clin Orthop Relat Res*, 2010. **468**(11): p. 2831-2.
5. Scheepers, A., H.G. Joost, and A. Schurmann, *The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2004. **28**(5): p. 364-71.
6. Löffler, G., *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage ed2007, Heidelberg: Springer Verlag.
7. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect*. *Cancer Res*, 2006. **66**(18): p. 8927-30.
8. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
9. Fox, C.J., P.S. Hammerman, and C.B. Thompson, *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(11): p. 844-52.
10. Lopez-Lazaro, M., *The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?* *Anticancer Agents Med Chem*, 2008. **8**(3): p. 305-12.
11. Augustin, R., *The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(5): p. 315-33.
12. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(2): p. E141-5.
13. Simpson, I.A., et al., *The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(2): p. E242-53.
14. Younes, M., et al., *GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers*. *Anticancer Res*, 1995. **15**(6B): p. 2895-8.
15. Brown, R.S., et al., *Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer*. *J Nucl Med*, 1999. **40**(4): p. 556-65.
16. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(11): p. 891-9.
17. Ak, I., M.P. Stokkel, and E.K. Pauwels, *Positron emission tomography with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose in oncology. Part II. The clinical value in detecting and staging primary tumours*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000. **126**(10): p. 560-74.
18. Miyakita, H., et al., *Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for detection of renal cell carcinoma and immunohistochemical glucose transporter 1 (GLUT-1) expression in the cancer*. *Int J Urol*, 2002. **9**(1): p. 15-8.
19. Shaw, R.J., *Glucose metabolism and cancer*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(6): p. 598-608.
20. Airley, R.E. and A. Mobasheri, *Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics*. *Chemotherapy*, 2007. **53**(4): p. 233-56.

21. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
22. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
23. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
24. Hogenesch, J.B., et al., *Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8581-93.
25. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
26. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 176-82.
27. Brahimi-Horn, M.C. and J. Pouyssegur, *The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway*. Int Rev Cytol, 2005. **242**: p. 157-213.
28. Melillo, G., *Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(9): p. 601-5.
29. Chen, J., et al., *Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1283-91.
30. Tani, K., et al., *Human liver type pyruvate kinase: complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(6): p. 1792-5.
31. Lee, J., et al., *Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 1043-54.
32. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
33. Mazurek, S., *Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2010.
34. Mazurek, S., et al., *Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(4): p. 300-8.
35. Zhao, J. and C.J. Zhong, *A review on research progress of transketolase*. Neurosci Bull, 2009. **25**(2): p. 94-9.
36. Coy, J.F., et al., *Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer*. Clin Lab, 2005. **51**(5-6): p. 257-73.
37. Herzog, *Methods and applications of positron-based medical imaging*. Radiation Physics and Chemistry, 2007. **76**: p. 337-342.
38. Shreve, P.D., Y. Anzai, and R.L. Wahl, *Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants*. Radiographics, 1999. **19**(1): p. 61-77; quiz 150-1.
39. Thie, J.A., *Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage*. J Nucl Med, 2004. **45**(9): p. 1431-4.
40. Ramos, C.D., et al., *FDG-PET standardized uptake values in normal anatomical structures using iterative reconstruction segmented attenuation correction and filtered back-projection*. Eur J Nucl Med, 2001. **28**(2): p. 155-64.

41. Kinahan, P.E. and J.W. Fletcher, Positron emission tomography-computed tomography standardized uptake values in clinical practice and assessing response to therapy. *Semin Ultrasound CT MR*, 2010. **31**(6): p. 496-505.
42. de Langen, A.J., et al., Repeatability of 18F-FDG Uptake Measurements in Tumors: A Metaanalysis. *J Nucl Med*, 2012.
43. Khalaf, M., et al., Relation between nodule size and 18F-FDG-PET SUV for malignant and benign pulmonary nodules. *J Hematol Oncol*, 2008. 1: p. 13.
44. Ozcan Kara, P., et al., The role of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in differentiating between benign and malignant adrenal lesions. *Nucl Med Commun*, 2011. **32**(2): p. 106-12.
45. Langer, A., *A systematic review of PET and PET/CT in oncology: a way to personalize cancer treatment in a cost-effective manner?* *BMC Health Serv Res*, 2010. **10**: p. 283.
46. Franzius, C., *FDG-PET/CT in pediatric solid tumors*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **54**(4): p. 401-10.
47. Antoch, G., et al., *Comparison of PET, CT, and dual-modality PET/CT imaging for monitoring of imatinib (STI571) therapy in patients with gastrointestinal stromal tumors*. *J Nucl Med*, 2004. **45**(3): p. 357-65.
48. Krieger, H., *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Vol. 3. 2009, Wiesbaden: Vieweg+Teubner.
49. Mettler, F.A., Jr., et al., *Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine: a catalog*. *Radiology*, 2008. **248**(1): p. 254-63.
50. Bielack, S., D. Carrle, and P.G. Casali, *Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2009. **20 Suppl 4**: p. 137-9.
51. Dhanoa, A. and V.A. Singh, *Subacute osteomyelitis masquerading as primary bone sarcoma: report of six cases*. *Surg Infect (Larchmt)*, 2010. **11**(5): p. 475-8.
52. Osuna, D. and E. de Alava, *Molecular pathology of sarcomas*. *Rev Recent Clin Trials*, 2009. **4**(1): p. 12-26.
53. Fuchs, B. and D.J. Pritchard, *Etiology of osteosarcoma*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(397): p. 40-52.
54. Roodman, G.D. and J.J. Windle, *Paget disease of bone*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 200-8.
55. Schajowicz, F., H.A. Sissons, and L.H. Sobin, *The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition*. *Cancer*, 1995. **75**(5): p. 1208-14.
56. Bielack, S.S., et al., *Osteosarcoma: the same old drugs or more?* *J Clin Oncol*, 2008. **26**(18): p. 3102-3; author reply 3104-5.
57. Gadner, H., *Pædiatrische Hæmatologie und Onkologie* 2006, Heidelberg: Springer. XXV, 1228 S.
58. Salzer-Kuntschik, M., G. Brand, and G. Delling, *[Determination of the degree of morphological regression following chemotherapy in malignant bone tumors]*. *Pathologe*, 1983. **4**(3): p. 135-41.
59. Dirksen, U. and H. Jurgens, *Approaching Ewing sarcoma*. *Future Oncol*, 2010. **6**(7): p. 1155-62.
60. Iwamoto, Y., *Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma*. *Jpn J Clin Oncol*, 2007. **37**(2): p. 79-89.
61. Cavazzana, A.O., et al., *Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone*. *Am J Pathol*, 1987. **127**(3): p. 507-18.

62. Delattre, O., et al., *The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts*. N Engl J Med, 1994. **331**(5): p. 294-9.
63. Kovar, H., *Ewing tumor biology: perspectives for innovative treatment approaches*. Adv Exp Med Biol, 2003. **532**: p. 27-37.
64. Jurgens, H. and U. Dirksen, *Ewing sarcoma treatment*. Eur J Cancer, 2011. **47 Suppl 3**: p. S366-7.
65. Weinstein, J.L., H.M. Katzenstein, and S.L. Cohn, *Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma*. Oncologist, 2003. **8**(3): p. 278-92.
66. Rothenberg, A.B., et al., *The association between neuroblastoma and opsoclonus-myoclonus syndrome: a historical review*. Pediatr Radiol, 2009. **39**(7): p. 723-6.
67. Howman-Giles, R., et al., *Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors*. Semin Nucl Med, 2007. **37**(4): p. 286-302.
68. Strenger, V., et al., *Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **48**(5): p. 504-9.
69. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. Science, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
70. Maris, J.M., *Recent advances in neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **362**(23): p. 2202-11.
71. Furth, C., et al., *Interim PET response criteria in paediatric non-Hodgkin's lymphoma. Results from a retrospective multicenter reading*. Nuklearmedizin, 2013. **52**(4): p. 148-56.
72. Furth, C., et al., *Explorative analyses on the value of interim PET for prediction of response in pediatric and adolescent non-Hodgkin lymphoma patients*. EJNMMI Res, 2013. **3**(1): p. 71.
73. Furth, C., et al., *Evaluation of interim PET response criteria in paediatric Hodgkin's lymphoma--results for dedicated assessment criteria in a blinded dual-centre read*. Ann Oncol, 2011. **22**(5): p. 1198-203.
74. Denecke, T., et al., *Assessment of histological response of paediatric bone sarcomas using FDG PET in comparison to morphological volume measurement and standardized MRI parameters*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010. **37**(10): p. 1842-53.
75. Furth, C., et al., *Early and late therapy response assessment with [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in pediatric Hodgkin's lymphoma: analysis of a prospective multicenter trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4385-91.
76. Misch, D., et al., *Use of positron emission tomography for staging, preoperative response assessment and posttherapeutic evaluation in children with Wilms tumour*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(9): p. 1642-50.
77. Volker, T., et al., *Positron emission tomography for staging of pediatric sarcoma patients: results of a prospective multicenter trial*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5435-41.
78. Furth, C., et al., *SUV-measurements and patient-specific corrections in pediatric Hodgkin-lymphoma: is there a benefit for PPV in early response assessment by FDG-PET?* Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(3): p. 475-80.
79. FDG-Tracer Company - Firma Eckert & Ziegler Strahlen- und Medizintechnik AG
80. Boenisch, T., *Immunchemische Färbemethoden*. Vol. 3. 2006, Hamburg, Deutschland: DakoCytomation GmbH.

81. Remmele, W. and H.E. Stegner, [*Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*]. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
82. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. *Curr Opin Genet Dev*, 2010. **20**(1): p. 51-6.
83. Bos, R., et al., *Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(2): p. 379-87.
84. Marom, E.M., et al., *Correlation of FDG-PET imaging with Glut-1 and Glut-3 expression in early-stage non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2001. **33**(2-3): p. 99-107.
85. Yilmaz, M., et al., *FDG PET-CT in cervical cancer: relationship between primary tumor FDG uptake and metastatic potential*. *Nucl Med Commun*, 2010. **31**(6): p. 526-31.
86. Kostakoglu, L., H. Agress, Jr., and S.J. Goldsmith, *Clinical role of FDG PET in evaluation of cancer patients*. *Radiographics*, 2003. **23**(2): p. 315-40; quiz 533.
87. Hopkins, S. and G.Y. Yang, *FDG PET imaging in the staging and management of gastric cancer*. *J Gastrointest Oncol*, 2011. **2**(1): p. 39-44.
88. Krause, B.J., *Nuklearmedizinische Onkologie*. Vol. 1. 2007, Landsberg: ecomed Medizin.
89. Strauss, L.G. and P.S. Conti, *The applications of PET in clinical oncology*. *J Nucl Med*, 1991. **32**(4): p. 623-48; discussion 649-50.
90. Amthauer, H., et al., *FDG-PET in 10 children with non-Hodgkin's lymphoma: initial experience in staging and follow-up*. *Klin Padiatr*, 2005. **217**(6): p. 327-33.
91. Franzius, C., et al., *Prognostic significance of (18)F-FDG and (99m)Tc-methylene diphosphonate uptake in primary osteosarcoma*. *J Nucl Med*, 2002. **43**(8): p. 1012-7.
92. Kushner, B.H., et al., *Extending positron emission tomography scan utility to high-risk neuroblastoma: fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography as sole imaging modality in follow-up of patients*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(14): p. 3397-405.
93. Chawla, M., et al., *Role of positron emission tomography-computed tomography in staging and early chemotherapy response evaluation in children with neuroblastoma*. *Indian J Nucl Med*, 2010. **25**(4): p. 147-55.
94. Melzer, H.I., et al., *(1)(2)(3)I-MIBG scintigraphy/SPECT versus (1)(8)F-FDG PET in paediatric neuroblastoma*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011. **38**(9): p. 1648-58.
95. Taggart, D.R., et al., *Comparison of iodine-123 metaiodobenzylguanidine (MIBG) scan and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography to evaluate response after iodine-131 MIBG therapy for relapsed neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(32): p. 5343-9.
96. Tohma, T., et al., *Relationship between glucose transporter, hexokinase and FDG-PET in esophageal cancer*. *Hepatogastroenterology*, 2005. **52**(62): p. 486-90.
97. Yen, T.C., et al., *18F-FDG uptake in squamous cell carcinoma of the cervix is correlated with glucose transporter 1 expression*. *J Nucl Med*, 2004. **45**(1): p. 22-9.
98. van Baardwijk, A., et al., *The maximum uptake of (18)F-deoxyglucose on positron emission tomography scan correlates with survival, hypoxia inducible factor-1alpha and GLUT-1 in non-small cell lung cancer*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(9): p. 1392-8.

99. Mamede, M., et al., *[18F]FDG uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung*. *Neoplasia*, 2005. **7**(4): p. 369-79.
100. Hamada, K., et al., *18F-FDG-PET of musculoskeletal tumors: a correlation with the expression of glucose transporter 1 and hexokinase II*. *Ann Nucl Med*, 2008. **22**(8): p. 699-705.
101. Izuishi, K., et al., *Molecular mechanism underlying the detection of colorectal cancer by 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography*. *J Gastrointest Surg*, 2012. **16**(2): p. 394-400.
102. Kubota, R., et al., *Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography*. *J Nucl Med*, 1992. **33**(11): p. 1972-80.X.
103. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
104. Smith, T.A., *Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue*. *Br J Biomed Sci*, 1999. **56**(4): p. 285-92.
105. Ahrens, W.A., et al., *GLUT-1 expression in mesenchymal tumors: an immunohistochemical study of 247 soft tissue and bone neoplasms*. *Hum Pathol*, 2008. **39**(10): p. 1519-26.
106. Oliver, R.J., et al., *Prognostic value of facilitative glucose transporter Glut-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(4): p. 503-7.
107. Tateishi, U., et al., *Glut-1 expression and enhanced glucose metabolism are associated with tumour grade in bone and soft tissue sarcomas: a prospective evaluation by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006. **33**(6): p. 683-91.
108. Ramani, P., A. Headford, and M.T. May, *GLUT1 protein expression correlates with unfavourable histologic category and high risk in patients with neuroblastic tumours*. *Virchows Arch*, 2013. **462**(2): p. 203-9.
109. Matsushita, K., et al., *Glycolysis inhibitors as a potential therapeutic option to treat aggressive neuroblastoma expressing GLUT1*. *J Pediatr Surg*, 2012. **47**(7): p. 1323-30.
110. Aryee, D.N., et al., *Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells in vitro*. *Cancer Res*, 2010. **70**(10): p. 4015-23.
111. Knowles, H.J., et al., *Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 372.
112. Yang, Q.C., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome*. *Jpn J Clin Oncol*, 2007. **37**(2): p. 127-34.
113. Dungwa, J.V., L.P. Hunt, and P. Ramani, *HIF-1alpha up-regulation is associated with adverse clinicopathological and biological factors in neuroblastomas*. *Histopathology*, 2012. **61**(3): p. 417-27.
114. Noguera, R., et al., *HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially regulated in vivo in neuroblastoma: high HIF-1alpha correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(23): p. 7130-6.

115. Yang, Q.C., et al., *Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by trichostatin A via suppression of HIF-1 α activity in human osteosarcoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2006. **25**(4): p. 593-9.
116. Ryan, H.E., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4010-5.
117. Dang, C.V. and G.L. Semenza, *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(2): p. 68-72.
118. Bartrons, R. and J. Caro, *Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(3): p. 223-9.
119. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 343-54.
120. Bhaskara, V.K., et al., *Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30905.
121. Hussein, D., et al., *Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1 α -dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(9): p. 2241-50.
122. Luo, W., et al., *Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1*. Cell, 2011. **145**(5): p. 732-44.
123. Guminska, M., et al., *Tumor-specific pyruvate kinase isoenzyme M2 involved in biochemical strategy of energy generation in neoplastic cells*. Acta Biochim Pol, 1997. **44**(4): p. 711-24.
124. Spoden, G.A., et al., *Isotype-specific inhibitors of the glycolytic key regulator pyruvate kinase subtype M2 moderately decelerate tumor cell proliferation*. Int J Cancer, 2008. **123**(2): p. 312-21.
125. Langbein, S., et al., *Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted*. Br J Cancer, 2006. **94**(4): p. 578-85.
126. Xu, X., et al., *Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells*. Int J Cancer, 2009. **124**(6): p. 1330-7.
127. Stern, R., et al., *Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited*. Exp Cell Res, 2002. **276**(1): p. 24-31.
128. Diaz-Moralli, S., et al., *Transketolase-like 1 expression is modulated during colorectal cancer progression and metastasis formation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25323.
129. Krockenberger, M., et al., *Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(1): p. 101-6.
130. Zerilli, M., et al., *Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases*. Cancer, 2008. **113**(5): p. 936-44.
131. Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA. *General mechanisms of metastasis*. Cancer, 1997. **80**(8): p. 1529-37.
132. Wittig, R. and J.F. Coy, *The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer*. Perspect Medicin Chem, 2008. **1**: p. 64-82.
133. Kayser, G., et al., *Poor outcome in primary non-small cell lung cancers is predicted by transketolase TKTL1 expression*. Pathology, 2011. **43**(7): p. 719-24.
134. Wu, H.T., et al., *Anaplastic neuroblastomas express transketolase-like enzyme 1*. J Clin Pathol, 2009. **62**(5): p. 460-3.

135. Hawkins, D.S., et al., *Evaluation of chemotherapy response in pediatric bone sarcomas by [F-18]-fluorodeoxy-D-glucose positron emission tomography*. *Cancer*, 2002. **94**(12): p. 3277-84.
136. Kim, D.H., et al., *Assessment of Chemotherapy Response Using FDG-PET in Pediatric Bone Tumors: A Single Institution Experience*. *Cancer Res Treat*, 2011. **43**(3): p. 170-5.
137. Denecke, T., et al., *Assessment of histological response of paediatric bone sarcomas using FDG PET in comparison to morphological volume measurement and standardized MRI parameters*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **37**(10): p. 1842-53.
138. Generali, D., et al., *Predictive immunohistochemical biomarkers in the context of neoadjuvant therapy for breast cancer*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2011. **2011**(43): p. 99-102.
139. Shioya, M., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha predicts clinical outcome after preoperative hyperthermo-chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2011. **52**(6): p. 821-7.
140. Koda, M., et al., *Relationships between hypoxia markers and the leptin system, estrogen receptors in human primary and metastatic breast cancer: effects of preoperative chemotherapy*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 320.
141. Havelund, B.M., et al., *Immunohistological expression of HIF-1alpha, GLUT-1, Bcl-2 and Ki-67 in consecutive biopsies during chemoradiotherapy in patients with rectal cancer*. *APMIS*, 2013. **121**(2): p. 127-38.

7. Anhang

Danksagung

Herzlich möchte ich mich für die engagierte Betreuung durch Herrn Dr. med. Stefan Schönberger bedanken, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bin ich Herrn PD Dr. med. Hautzel dankbar für die Einblicke in die nuklearmedizinische Welt und in das Forschungszentrum Jülich, die er mir ermöglicht hat. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Feldhoff und Frau Schneeloch, Institut für Pathologie Düsseldorf, die mich mit Geduld und Hingabe in den Laboralltag eingeführt haben. Ihre Energie und rheinische Lebensfreude haben mir die Arbeit erleichtert. Ein herzlicher Dank für die histologischen Auswertungen gilt den Herren Prof. Dr. med. Christopher Poremba, PD Dr. med. Sebastian Heikau sowie Dr. med. Mathias Drach.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Zürich, den 27.11.2015

Tim Finkenstädt