

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Untersuchung von metabolischen Biomarkern beim  
Mammakarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Scarlet Fiona Brockmüller  
aus Berlin

Datum der Promotion 16 Juni 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abstract Deutsch.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract English.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Allgemeines zum Mammakarzinom .....	3
1.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom .....	3
1.3 Krebs und Metabolomics .....	3
1.4 Fragestellung.....	5
<b>2 Methoden .....</b>	<b>6</b>
2.1 Patientinnenkollektiv.....	6
2.2 Immunhistologie .....	6
2.3 Metabolische Analysen.....	7
2.3.1 GC-TOFMS- und LC-MS-Analysen .....	7
2.4 mRNA-Analysen.....	8
2.5 Statistische Auswertungen .....	8
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>9</b>
3.1 Expression der Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase im Mammakarzinom in Korrelation mit Überlebensdaten sowie dem Hormonrezeptorstatus und dem metabolischen Profil .....	9
3.2 Umbau des zentralen Metabolismus im invasiven Mammakarzinom im Vergleich mit normalem Mammagewebe; eine GC-TOFMS-basierte Metabolomics-Studie .	10
3.3 Veränderungen im Glutamin- und Beta-Alanin-Stoffwechsel im Östrogenrezeptor- negativen Mammakarzinom im Gegensatz zum Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom.....	11
3.4 Relevanz des Lipidstoffwechsels in aggressiven Subtypen des Mammakarzinoms und Bedeutung für neue Therapieansätze .....	12
<b>4 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>13</b>
<b>5 Ausblick .....</b>	<b>18</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>19</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>20</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>23</b>

<b>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....</b>	<b>24</b>
<b>Anlage: Drucke der ausgewählten Publikationen .....</b>	<b>26</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>27</b>
<b>Komplette Publikationsliste.....</b>	<b>30</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>33</b>

## Abstract Deutsch

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau weltweit. Es weist eine Reihe von Subtypen mit unterschiedlicher Prognose und einem unterschiedlichen Therapieansprechen auf. Um die Subgruppen des Mammakarzinoms besser zu klassifizieren und die Therapiemöglichkeiten bzw. -entscheidungen zu verbessern, werden weitere prädikative, prognostische Marker sowie neue gewebebasierte Testverfahren benötigt. Die systematische Untersuchung von metabolischen Biomarkern im Tumorgewebe (sogenannte Metabolomics) ist hierbei ein interessanter methodischer Ansatz für die Identifizierung von potenziellen Biomarkern und Targets in der Tumorforschung, da Metabolitenprofile den Phänotyp und die Physiologie der Zelle darstellen. Veränderungen im Stoffwechsel werden bei einigen Tumortypen in der klinischen Diagnostik bereits routinemäßig untersucht.

Die vorliegende Arbeit umfasst schwerpunktmäßig immunhistologische Untersuchungen von Schlüsselenzymen des Fett- und Glutaminstoffwechsels. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinischen und metabolischen Daten sowie Genexpressionsdaten korreliert.

Die Arbeit zeigt erstmalig die mögliche biologische Rolle von Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAM), ein Schlüsselenzym des *De-novo*-Fettstoffwechsels bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Eine hohe zytoplasmatische GPAM-Expression korreliert hierbei signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben der Patientinnen auf RNA- und Proteinebene. Eine hohe zytoplasmatische GPAM-Expression korrelierte auch mit dem negativen Hormonrezeptor-Status der Mammakarzinome. Unsere Ergebnisse lassen unter anderem vermuten, dass die GPAM-Expression im humanen Mammakarzinomgewebe mit Veränderungen im zellulären Metabolismus assoziiert ist, insbesondere mit einer erhöhten Synthese von Phospholipiden, einem der wichtigsten Bausteine der zellulären Membran. Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse die generelle Relevanz von metabolischen Veränderungen bei der Krebsentstehung. Wir vermuten daher, dass GPAM eine Rolle in der Krebsprogression spielt.

Wir zeigen anhand einer großen Kohorte mit einer umfassenden Charakterisierung des Metaboloms (insgesamt über 600 Metaboliten), dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Stoffwechsel vom Mammakarzinomgewebe und normalem Brustgewebe gibt. Eine Zwei-Metaboliten-Ratio kann mit einer hohen Sensitivität und Spezifität das Gewebe als normales oder als Tumorgewebe zuordnen. Östrogenrezeptor-negatives Mammakarzinomgewebe zeigt eine Verschiebung des Stoffwechsels von Glutamin zu Glutamat und eine Erhöhung von *de novo* synthetisierten Fettsäuren. Die Aminogruppe von Glutamin kann für die Synthese von Nukleotiden verwendet werden, die vermehrt in stark profilierenden Krebszellen benötigt werden. Unsere Ergebnisse bilden eine Basis für weitere klinische Untersuchun-

gen und Studien von Glutaminase-Inhibitoren, die ein prognostisches und therapeutisches Ziel im Mammakarzinom abgeben könnten. Eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Gesamtüberleben zeigte sich für PC (14:0/16:0), PC (16:0/16:0), PC (31:1) und PC (32:2).

Die Untersuchungen zeigen, dass die Analyse des Tumor-Metaboloms geeignet ist, tumorspezifische Veränderungen nachzuweisen. Die Studie zeigt, dass Phospholipide und Glutamin potenzielle neue prognostische Biomarker und therapeutische Targets sein könnten.

## **Abstract English**

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Patients which are diagnosed in an early tumour stage (II or III) are potential candidates for biological and/or chemotherapies. Only approximately 60% of these patients will benefit from such therapies, which are associated with severe side effects. There are currently no established predictive or prognostic biomarkers available that can predict the response and benefit of the patients to these therapies. So far biomarker discovery has mainly focused on genes and gene expression but only little on metabolomics. Therefore metabolomics is an exciting new field for the discovery of biomarkers and therapeutic target. This thesis is evaluating the integrative analysis of breast cancer through the combination of transcriptomics, in-situ proteomics and metabolomics. The results of this research project show that GPAM is a potential biological biomarker in breast cancer. A significant difference is seen between the metabolome of normal and breast cancer (GC-TOFMS, NMR, LC-MS). A higher expression of phospholipids were seen in more aggressive and hormone receptor negative breast cancers. These results show that integrative metabolome analysis is able to define and investigate metabolic dysregulations in tumour tissue.

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines zum Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau(1). Patientinnen, die bei Diagnose ein frühes, lokalisiertes Tumorstadium aufweisen, sind potenzielle Kandidatinnen für eine systemische Therapie, von der allerdings nur ca. 60 % profitieren. Solche Therapien sind oft mit erheblichen Nebenwirkungen und Kosten verbunden. Klinisch wird eine Bestimmung des Subtypen des Mammakarzinoms für die optimale Therapieentscheidung vorgenommen(2). Aktuelle prognostische Marker wie z. B. Genexpressionstests, Proliferationsindex (Ki67), PIK3CA-Mutationen und andere Biomarker können teilweise nur eingeschränkt vorhersagen, ob die Patientin von einer spezifischen Therapie profitieren wird.

## 1.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom handelt es sich nicht um eine einheitliche Erkrankung, sondern um eine Reihe von Subtypen, die Unterschiede in molekularen Profilen, biologischem Verhalten und in den Risikoprofilen aufweisen(3). Aktuell werden klinisch für die Prognose des Mammakarzinoms die Tumorgroße, der histologische Tumorsubtyp, Differenzierungsgrad, Ki67, HER2, Hormonrezeptor- sowie Nodal- und Lymphgefäßinvasionsstatus herangezogen. Es werden mindestens fünf Subtypen des Mammakarzinoms differenziert: luminal A, luminal B, basal, HER2 und normal-like(3). Um die Mammakarzinom-Subgruppen besser zu klassifizieren und die Therapiemöglichkeiten bzw. -entscheidungen zu verbessern, werden weitere prädikative, prognostische Marker sowie neue gewebebasierte Testverfahren benötigt(4).

## 1.3 Krebs und Metabolomics

Die Programmierung des Energiestoffwechsels von Tumoren gehört zu den „Hallmarks of Cancer“, d. h. dass das Tumorwachstum davon abhängig ist(5). Veränderungen im Stoffwechsel werden bei einigen Tumortypen in der klinischen Diagnostik bereits durch Routineuntersuchungen detektiert. Hierbei zeigen *in vivo* Gehirntumore im Glucose-Stoffwechsel einen deutlichen Unterschied zum gesunden Gehirngewebe(6).

Das Metabolom ist definiert als „das terminale downstream Produkt des Genoms. Es besteht aus der Gesamtheit aller Metaboliten, welche in der Zelle, dem Gewebe oder Organismus vorhanden sind in einem bestimmten physiologischen Zustand“(7). Das Metabolom kann Veränderungen, die auf anderen -omics-Ebenen (DNA, RNA etc) stattfinden und dort nicht messbar sind, amplifizieren. Krebszellen haben im Gegensatz zu normalen Zellen einen veränderten Stoffwechsel. Sie haben eine erhöhte Fettsäure-, Protein- und Nukleotidsynthese

sowie eine anaerobe Glykolyse(5, 8). Glutamin kann durch die Glutaminolyse zur Synthese von diesen wichtigen Grundbausteinen der Zelle wie Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden verwendet werden(9). Wir untersuchten deshalb ein 4-Aminobutyrate-Aminotransferase (A-BAT) ein Enzym, das den Glutaminstoffwechsels reguliert. Glutaminstoffwechsels-Inhibitoren (BPTES, 968, CB-839) werden zurzeit in einer klinischen Studie der Phase I an Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom erprobt (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02071862>)(10). Mutationen in Schlüsselenzymen des Stoffwechsels können zu Krebserkrankungen führen. Es stellt sich sogar die Frage, ob Stoffwechseleränderungen und Stoffwechselprodukte (Onko-Metaboliten) Auslöser von Krebs sein können(11). Mutationen in Isocitrat-Dehydrogenase 1 und 2 (IDH1, IDH2) führen bei Leukämien und Gliomen zu einer Akkumulation von (R) 2-Hydroxyglutarat (2-HG), die zu einer gesteigerten Proliferation von Zellen führt(12). Diese Upstream-Effekte von Metaboliten stellen ein neues interessantes Spannungsfeld für neue Angriffspunkte der Krebsforschung dar und werden aktuell in klinischen Studien als Targets evaluiert(13).

Eine wichtige, aber bisher nur partiell charakterisierte Stoffwechseleränderung von Krebszellen ist der gestörte Lipidstoffwechsel. Die gesunde Körperzelle deckt ihren Bedarf größtenteils durch die mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren. Es wurde gezeigt, dass bestimmte Krebsarten einen erhöhten Bedarf an Fettsäuren haben, der durch eine erhöhte *De-novo*-Synthese von Fettsäure in der Zelle abgedeckt wird. Die *de novo* synthetisierten Lipide unterscheiden sich von den Lipiden, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Hierdurch wird die Zusammensetzung der Lipide der Zellmembrane des Tumors verändert, was die Migrationsfähigkeit, das Invasionspotenzial und das Ansprechen auf Chemotherapie beeinflussen kann(14). Die *de novo* synthetisierten Lipide der Zellmembran enthalten mehr gesättigte Fettsäuren, welche die Zellmembran unempfindlicher gegenüber oxidativen Stress machen. Deshalb sind die Schlüsselenzyme der *De-novo*-Synthese von Fettsäure von besonderem Interesse. Forschungsergebnisse zeigten eine höhere Konzentration von *de novo* synthetisierten Phospholipiden in Östrogenrezeptor-negativen und bei schlechtem Differenzierungsgrad-3-Mammakarzinomen(15), welche prognostisch für das Überleben der Patientinnen sind. Dieses Ergebnisse veranlasste uns folgende Enzyme und Regulatoren des Fettstoffwechsels genauer zu untersuchen:

1. ACACA (Acetyl-CoA-Carboxylase Alpha) katalysiert den ersten Schritt der Synthese der Fettsäuren durch die Addition von Kohlenstoffdioxid an Acetyl-CoA. Hierbei entsteht Malonyl-CoA.
2. FASN (Fettsäure-Synthase) katalysiert die Synthese von Palmitinsäure (C16:0) aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA und zeigt in verschiedenen Karzinomen eine erhöhte Expression. FASN-Proteinexpression war erhöht im In-situ-Mammakarzinom und im invasiven Mammakarzinom im Gegensatz zum normalen Mammagewebe (16). Fett-

säure-Synthase-Inhibitor werden in klinischen Studien im Mammakarzinomen erprobt (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02223247>) (17).

3. GPAM (Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase) ist ein Schlüsselenzym der Phospholipid- und Triacylglyceridsynthese, das in malignen Erkrankungen von besonderem Interesse ist, da Phospholipide der Hauptbestandteil der zellulären Membran sind(14). Es wurde bisher nur gezeigt, dass GPAM eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Insulinresistenz, der Laktation, der Leberverfettung, der Adipositas und der Immunantwort spielen (18).
4. Die Regulation des Fettsäurestoffwechsels wird von INSIG1 (Insulin-induziertes Gen 1) und SREBP (sterol regulatory element-binding protein 1) beeinflusst(15).

Obwohl Studien einen Zusammenhang zwischen genetischen und Genexpressionsveränderungen im Fettstoffwechsel von Krebszellen zeigen, sind viele Fragen immer noch unbeantwortet(19).

Die Technologie der Metabolomics-Forschung hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert. Hervorzuheben sind hierbei die Verbesserung der Instrumente für die Analyse der Metaboliten, die Kombination verschiedener Metabolomic-Analysetechniken und die Entwicklung neuer bioinformatischer Programme(20). Diese Verbesserungen ermöglichen eine Kombination der metabolischen Veränderungen mit der Genexpression, der Proteinexpression und klinisch-pathologischen Daten. Potenziell klinisch relevant ist dieser Forschungsbe- reich u. a. durch verschiedene metabolische Medikamente, die zurzeit in klinischen Studien erprobt werden, und als mögliche prädiktive Biomarker für das Therapieansprechen(13).

## 1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit sind schwerpunktmäßig immunhistologische Untersuchungen, deren Ergebnisse mit den metabolischen Daten, Genexpressionsdaten und klinisch-pathologischen Parametern korreliert werden. Das zukünftige Ziel ist es, diese metabolischen Biomarker in einem systempathologischen Ansatz in Kombination mit den histopathologischen Parametern anzuwenden, um im klinischen Alltag eine bessere und optimalere individuelle Therapie für die Patientinnen zu ermöglichen.

Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Unterschiede gibt es im metabolischen Profil von normalem Mammagewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe?
- Können die molekularen Subgruppen des Mammakarzinoms auf den Stoffwechsel übertragen werden? Werden Metabolitenkonzentrationen vom HER2-Status oder Hormonrezeptorstatus beeinflusst?

- Sind Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels, insbesondere der *De-novo*-Lipidsynthese, potenzielle prognostische und prädiktive Biomarker im Mammakarzinom?
- Sind Schlüsselenzyme des Glutamin-Stoffwechsels potenzielle prognostische und prädiktive Biomarker im Mammakarzinom?
- Kann die In-situ-Expression von Proteinen mit anderen Biomarkern auf RNA- und Proteinebene korreliert werden?

## 2 Methoden

### 2.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv bestand aus 369 Proben von 271 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, die im Rahmen des EU-Projektes METAcancer (<http://www.metacancer-fp7.eu/index.php?id=363>) untersucht wurden. Von den 369 Proben zeigten 271 Proben ein invasives Mammakarzinom und 98 Proben normales Brustgewebe. Bei der Selektion der Tumorproben wurde nur Gewebe verwendet, in dem der Prozentsatz des Tumorgewebes zwischen 100 % und 40 % lag. Von allen 369 Proben standen frischgefrorene Proben für Metabolomanalysen zur Verfügung. Eine Teilkohorte von 235 gepaarten paraffineingebetteten Tumorproben wurde für immunhistologische Untersuchungen verwendet.

### 2.2 Immunhistologie

Die vorliegende Arbeit umfasst schwerpunktmäßig die immunhistologischen Untersuchungen, die Ergebnisse wurden anschließend mit den metabolischen Daten und Genexpressionsdaten korreliert. Von 235 Tumorproben wurde ein Tissue Micro Array (TMA) hergestellt, an dem dann die immunhistologischen Färbungen erfolgten. Zur Erstellung des TMAs erfolgte an den H&E-Färbungen eine Markierung des repräsentativen Tumorareals. Aus diesem Tumorareal wurde im nächsten Schritt aus dem Paraffinblock ein Gewebezylinder von 1,5 mm Durchmesser entnommen, der in einen neuen Paraffinblock eingebettet wurde. Die immunhistochemischen Färbungen am TMA wurden nach einem manuellen Färbeprotokoll durchgeführt. Diese Arbeit enthält die Ergebnisse der folgenden Antikörper: ABAT, ACACA, FASN, GPAM, INSIG1 und SREBP.

Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Abkürzung	Art von Antikörper	Seriennummer	Verdünnung
Aminobutyrate Aminotransferase	ABAT	Kaninchen polyklonaler Antikörper	HPA041528, ATLAS ANTIBODIES	Verdünnung 1:200
Acetyl-CoA-Carboxylase Alpha	ACACA	Kaninchen polyklonaler Antikörper	HPA006554; ATLAS ANTIBODIES	Verdünnung 1:50
Fettsäure Synthase	FASN	Mause monoklonaler Antikörper	Klone 3F2-3 1F3, h0002194-M01; Abnova	Verdünnung 1:1000
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	GPAM	Kaninchen polyklonaler Antikörper	LS-B2734-Lifespan Bioscience	Verdünnung 1:200
Insulin-induziertes Gen 1	INSIG 1	Kaninchen polyklonaler Antikörper	LS-B2420, Lifespan Biosciences	Verdünnung 1:1000
Sterol regulatory element-binding protein 1	SREBP	Maus monoklonaler Antikörper	NB600-582; Novus Biologicals	Verdünnung 1:750

Die Objektträger des TMAs wurden vorbehandelt und anschließend mit dem primären sowie nachfolgend mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der mit Peroxidase oder alkalischem Phosphat konjugierte sekundäre Antikörper wurde danach durch das Multilink-Biotin-Streptavidin-Detektionssystem amplifiziert. Positive und negative Kontrollen wurden für jeden Antikörper verwendet. Die Auswertung des TMAs erfolgte mit dem VMScope Slide Explorer (<http://vmscope.com/produkte-vm-slide-explorer.html>) bei Verblindung der Auswerter für die klinisch-pathologischen Daten. Es wurde der standardisierte „immunoreactivity score“ (IRS) benutzt, der sich aus der Multiplikation des Prozentsatzes der positiven Zellen und der Färbeintensität zusammensetzt. Der Prozentsatz der positiven Zellen war mit 0 (0 %), 1 (1-10 %), 2 (11-50 %), 3 (51-80 %) und 4 (über 81 %) bewertet. Die Färbeintensität wurde mit 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (moderat), 3 (stark) bewertet. Für den IRS ergibt sich hierdurch ein Wert zwischen 0-12.

## 2.3 Metabolische Analysen

Das Metabolom der Tumorproben wurde durch drei verschiedene Technologien untersucht (GC-TOFMS, NMR und LC-MS), um ein umfassendes Spektrum an Metaboliten zu erfassen. Die Daten der GC-TOFMS und der LC-MS wurden in dieser Doktorarbeit verwendet und stammen von Kooperationspartnern. Die GC-TOFMS-Daten wurden von der Forschungsgruppe von Prof. Oliver Fiehn (Genome Center, University of California Davis, Kalifornien, USA) und die LC-MS-Daten von der Forschungsgruppe von Prof. Matje Orešič (Bio and Process Technology, VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland) erhoben.

### 2.3.1 GC-TOFMS- und LC-MS-Analysen

369 Proben wurden mittels GC-TOFMS analysiert. Das Extrakt wurde derivatisiert und analysiert (GC-TOFMS; Leco Pegasus IV) (21). Die Rohdaten wurden mit ChromaTOF (Leco ChromaTOF Software) bearbeitet, und das Massenspektrum der Probe wurde mit der BinBase-Datenbank (SetupX/BinBase metabolomics database system; <http://fiehnlab.ucdavis.edu/>) weiter verarbeitet. Zur Normalisierung erfolgte zuerst eine Transformation der Daten in eine Log<sub>2</sub>-Skala. Anschließend wurde jede Probe durch die Summe über dem Mittelwert der Metaboliten mit bekannter Struktur geteilt. Für die LC-MS-Analyse erfolgte als erster Schritt die Extraktion der Lipide von den Gewebeproben. Anschließend wurden diese mit einem Waters Q-Tof Premier Massenspektrometer in Kombination mit einem Acquity Ultra Performance LC TM (UPLC TM) analysiert (ESI+ und ESI- Elektrospray-Ionisation)

(15). ESI+ Elektrospray-Ionisation erfasst vor allem neutrale Lipide, und ESI- Elektrospray-Ionisation erfasst negativ geladene Lipide. Die Datenverarbeitung erfolgte mithilfe der Software MZmine 2 (<http://mzmine.sourceforge.net>). Zur Identifikation der Lipide wurde das interne Verzeichnis verwendet. Normalisiert wurden die Ergebnisse anhand der Proteinbestandteile der Probe (mg Proteine/mg des Gewebes) und nach internen Standards. Das Programm R (R: a language and environment for statistical computing; <http://www.r-project.org>; Version 2.9.1) wurde für die Analyse und die Grafiken verwendet.

## **2.4 mRNA-Analysen**

Diese Daten wurden im Rahmen des EU-Projektes METAcancer in Zusammenarbeit mit VTT (Technical Research Centre of Finland, University of Turku; Finnland) erstellt. Es wurde die GeneSapiens-Datenbank (<http://genesapiens.org>) für die Analysen der mRNA-Expression verwendet. Dies ist eine der weltweit größten Datenbanken für mRNA (22). Die mRNA-Daten wurden hierbei durch Affymetrix Arrays gewonnen (fünf verschiedene Generationen). Die GeneSapiens-Datenbank enthält Informationen über 10.000 Proben von 68 verschiedenen Tumortypen und 43 gesunden Geweben. 70 % der Gewebeproben sind Tumorgewebe. Für die Überlebensdaten der mRNA-Expression wurde eine Kohorte von 251 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom verwendet (Miller-Datensatz (23)).

## **2.5 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels der Statistiksoftware SPSS 15 (SPSS, Chicago, IL, USA), des Programms R und Graph Pad Prism 4 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>). Zur Korrelation der Expression der Bio-marker mit den klinisch-pathologischen Daten wurden der einseitige exakte Fisher-Test oder der Chi-Quadrat-Test verwendet. Für univariate Analysen des Überlebens und des progressionsfreien Überlebens wurde die Kaplan-Meier-Methode mit dem Logrank-Test eingesetzt. Multivariate Analysen erfolgten mit der Cox-Hazard-Ratio. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die signifikanten Metaboliten (GC-TOFMS) wurden mittels PROFIL-Clustering mit der In-situ-Proteinexpression korreliert(24).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression der Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase im Mammakarzinom in Korrelation mit Überlebensdaten sowie dem Hormonrezeptorstatus und dem metabolischen Profil

Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer – link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling

Scarlet F. Brockmüller, Elmar Bucher, Berit M. Müller, Jan Budczies, Mika Hilvo, Julian L Griffin, Matej Oresic, Olli Kallioniemi, Kristiina Iljin, Sibylle Loibl, Bruno V. Sinn, Frederick Klauschen, Judith Prinzler, Nikola Bangemann, Mahmoud Ismail, Oliver Fiehn, Manfred Dietel, Carsten Denkert. *Journal of Proteome Research* 2012 Feb 3:11(2):850-60. Epub. 2011 Dec 15.

Um das prognostische und prädiktive Potenzial von GPAM, einem Schlüsselenzym der Phospholipid- und Triacylglyceridsynthese, im Mammakarzinom zu demonstrieren, wurde dieses Enzym auf verschiedenen Omics-Ebenen untersucht. Die Bedeutung von GPAM wurde soweit wir wissen bisher, nicht mit Brustkrebs oder anderen Krebserkrankungen korreliert.

Die Tumore zeigten eine differenzielle (schwache, mittelstarke oder starke) zytoplasmatische Expression von GPAM im primären invasiven Mammakarzinom. 228 von 235 Tumorproben waren evaluierbar, von denen 63,2 % eine starke zytoplasmatische Expression von GPAM aufwiesen. Eine erhöhte GPAM-Proteinexpression korrelierte signifikant mit negativem Hormonrezeptorstatus ( $p = 0.013$ ,  $n = 228$ ). Weitere Korrelationen von GPAM mit anderen klinisch-pathologischen Parametern waren nicht signifikant. GPAM mRNA wurde in verschiedenen gesunden Geweben exprimiert, wobei normales Mammagewebe sowie Mammakarzinomgewebe eine erhöhte mRNA-GPAM-Expression zeigten (GeneSapiens in silico transcriptomics Database; Bio and Process Technology, VTT Technical Research Centre of Finland, Turku, Finnland). Die univariaten Kaplan-Meier-Überlebensanalysen (Miller-Datensatz) zeigten eine positive prognostische Rolle für erhöhte GPAM-mRNA- ( $p = 0.001$ ,  $n = 253$ ) und Proteinexpression ( $p = 0.048$ ,  $n = 210$ ). Eine hohe zytoplasmatische GPAM-Expression korreliert signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben der Patientinnen auf Protein-, mRNA-Ebene sowie mit Hormonrezeptor-negativem Status.

Die Ergebnisse der LC-MS-basierten Lipidomic-Analysen wurden im ESI- ion mode 126 Lipide und im ESI+ mode 425 Lipide identifiziert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine GPAM-Aktivität im Mammakarzinom den Phospholipidstoffwechsel beeinflusst; hierbei vor allem Phosphatidycholine und Phosphatidylethanolamine. Um die Abdeckung des zellulären Metaboloms zu erhöhen, wurden zusätzlich zur LC-MS- auch GC-TOFMS-Analysen durchgeführt. Insgesamt wurden 467 Metaboliten identifiziert, wovon 161 eine chemische

Struktur und ein Name zugeordnet werden konnte. Die GPAM-Expression war mit 57 Metaboliten signifikant korreliert. Sn-Glycerol-3-Phosphat, ein Substrat von GPAM, war im Mammakarzinomgewebe im Gegensatz zum normalen Mammagewebe erhöht.

Diese Studie zeigt als erste die mögliche biologische Rolle von GPAM bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die GPAM-Expression im humanen Mammakarzinomgewebe mit Veränderungen im zellulären Metabolismus assoziiert ist, insbesondere mit einer erhöhten Synthese von Phospholipiden, einem der wichtigsten Bausteine der zellulären Membran. Des Weiteren lassen unsere Ergebnisse auf die generelle Relevanz von metabolischen Veränderungen bei der Krebsentstehung schließen und deuten darauf hin, dass GPAM eine Rolle in der Krebsprogression haben könnte. Diese Ergebnisse bilden eine Basis für weitere funktionelle GPAM-Untersuchungen als prognostischen Markers im Mammakarzinom.

### **3.2 Umbau des zentralen Metabolismus im invasiven Mammakarzinom im Vergleich mit normalem Mammagewebe; eine GC-TOFMS-basierte Metabolomics-Studie**

Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissues – a GC-TOFMS based metabolomics study.

Jan Budczies, Carsten Denkert, Berit M Müller, Scarlet F Brockmüller, Frederick Klauschen, Manfred Dietel, Reza Salek, Jules L Griffin, Mika Hilvo, Matej Oresic, Gert Wohlgemuth, Oliver Fiehn. BMC Genomics. 2012 Jul 23;13:334.

Um den Unterschied im metabolischen Profil von normalem Mammagewebe und Tumorgewebe zu untersuchen, wurden GC-TOFMS-Metaboliten des zentralen Stoffwechsels von 271 Mammakarzinom- und 98 normalen Brustgeweben untersucht. Es wurden insgesamt 478 Metaboliten gemessen, wovon 121 signifikant herunter- und 247 signifikant hochreguliert waren. Diese Ergebnisse wurden durch PROFILE-Clustering und metabolische Netzwerke visualisiert. Es wurde eine Herunterregulation von Zuckern (Glukose, Fruktose u.a.) und eine Hochregulation von Glucose-6-Phosphat beobachtet. Dies kann als eine verstärkte Aufnahme von Zuckern in die Krebszelle und eine erhöhte Glykolyse (Wartburg-Effekt) interpretiert werden. Viele Aminosäuren waren hochreguliert, wohingegen Glutamin keine Änderung in der Konzentration aufwies. Die Purin- und Pyrimidinmetaboliten waren im Mammakarzinom hochreguliert. Es wurden 13 Metaboliten identifiziert, die Marker für Tumorgewebe waren („Tumormarker“), und sieben Metaboliten, die Marker für normales Gewebe waren („Normalgewebemarker“). Diese Marker konnten mit einer Sensitivität und einer Spezifität von über 80 % normales Mammagewebe von Mammakarzinomgewebe trennen. Es wurde im nächsten Schritt eine Zwei-Metaboliten-Ratio gebildet, welche signifikante Tumor-

Metaboliten durch signifikante Metaboliten des normalen Gewebes teilt. Es zeigte sich auch für die Zwei-Metaboliten-Klassifizierung eine Sensitivität von 94,8 % und eine Spezifität von 93,9 %. Der beste Diskriminator zwischen Tumorgewebe und normalem Brustgewebe war die Ratio Cytidin-5-Monophosphat/Pentadecansäure.

Die Studie zeigte, dass es große Unterschiede im Metabolitenprofil zwischen Tumor- und normalem Mammagewebe gibt. Eine Zwei-Metaboliten-Ratio kann mit einer hohen Sensitivität und Spezifität das Gewebe als normales oder als Tumorgewebe zuordnen.

### **3.3 Veränderungen im Glutamin- und Beta-Alanin-Stoffwechsel im Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom im Gegensatz zum Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom**

Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism.

Jan Budczies, [Scarlet F. Brockmöller](#), Berit M. Müller, Dinesh K. Barupal, Christiane Richter-Ehrenstein, Anke Kleine-Tebbe, Julian L. Griffin, Matej Orešič, Manfred Dietel, Carsten Denkert, Oliver Fiehn. *J Proteomics*. 2013 Oct 11;94C:279-288. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.002.

Um die Signifikanz des Glutamin- und Beta-Alanin-Stoffwechsels im Östrogenrezeptor-negativen versus Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom zu bestimmen, wurden 204 Östrogenrezeptor-positive und 67 Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinome mittels GC-TOFMS analysiert. 19 bekannte Metaboliten waren im Trainings- (2/3) und im Validierungsdatensatz (1/3) signifikant verändert. Im Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom war Glutamin signifikant erniedrigt, und die folgenden Metaboliten waren signifikant erhöht: Beta-Alanin, 2-Hydroxyglutarat, Glutamat und Xanthin.

Die genomweiten Genexpressionsanalysen (DASL-Assay) wurden in einer Subkohorte von 154 Tumoren analysiert. Es konnten 1368 annotierte Enzyme identifiziert werden, die mit den Metaboliten korreliert wurden. Hierbei zeigte sich eine sehr starke negative Korrelation zwischen Beta-Alanin und ABAT.

Die ABAT-In-situ-Proteinexpression wurde immunhistochemisch untersucht. Nur drei Mammakarzinome zeigten keine zytoplasmatische Expression von ABAT. Alle anderen Mammakarzinome zeigten schwache bis starke zytoplasmatische Expression von ABAT. Es wurden drei Subgruppen gebildet (schwache, moderate und starke ABAT-Expression). Die In-situ-ABAT-Expression korrelierte signifikant mit dem Östrogenrezeptorstatus (2,1 % Östrogenrezeptorstatus-negative, 41,0 % Östrogenrezeptorstatus-positive Mammakarzinome) und der Tumordifferenzierung. Es zeigte sich hingegen keine Korrelation mit dem HER2-, dem Lymphknotenstatus oder dem Tumorstadium. Hingegen konnte eine Korrelation zwi-

schen der ABAT-Proteinexpression und der ABAT-Genexpression und Konzentration von Beta-Alanin gezeigt werden. Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinome zeigen eine Verschiebung des Stoffwechsels von Glutamin zu Glutamat. Die Aminogruppe von Glutamin kann für die Synthese von Nukleotiden verwendet werden, welche vermehrt in stark proliferierenden Krebszellen benötigt werden.

### **3.4 Relevanz des Lipidstoffwechsels in aggressiven Subtypen des Mammakarzinoms und Bedeutung für neue Therapieansätze**

Novel theranostic opportunities by characterisation of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression.

Mika Hilvo, Carsten Denkert, Laura Lehtinen, Berit Müller, Scarlet Brockmöller, Tuulikki Seppänen-Laakso, Jan Budczies, Elmar Bucher, Laxman Yetukuri, Sandra Castillo, Emilia Berg, Heli Nygren, Marko Sysi-Aho, Julian L. Griffin, Oliver Fiehn, Sibylle Loibl, Christiane Richter-Ehrenstein, Cornelia Radke, Tuulia Hyötyläinen<sup>1</sup> Olli Kallioniemi<sup>3</sup> Kristiina Iljin and Matej Orešič. *Cancer Research*. 2011; 71(9): 3236-3245.

Um die Relevanz des Lipidstoffwechsels im Mammakarzinom zu bestimmen, wurde dieser auf Proteinexpressionsebene, mRNA- und metabolischer Ebene untersucht. Auf Proteinexpressionsebene (GeneSapiens) zeigten folgende essenzielle Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels signifikante Ergebnisse: ACACA, FASN, SREBP1, INSIG1. Alle Schlüsselenzyme zeigten eine differenzielle Expression im Mammakarzinom. Eine hohe ACACA-In-situ-Proteinexpression korrelierte signifikant mit schlechtem Differenzierungsgrad-3-Tumoren. Es wurden keine weiteren signifikanten Korrelationen zwischen anderen Proteinexpressionen und den klinisch-pathologischen Parametern nachgewiesen. Die Korrelation zwischen der Proteinexpression der Enzyme (stark versus schwach) und des Lipidstoffwechsels wurde durch hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Einer starke Expression von FASN und ACACA zusammen mit einer schwachen Expression von SREBP1 war assoziiert mit einer Heraufregulation von Phosphatidylcholinen.

Die biologische Rolle der Enzyme wurde durch funktionelle Experimente an Brustzelllinien vertieft. Im Mammakarzinom zeigte sich, im Gegensatz zum normalen Mammagewebe, eine erhöhte Produktion der *de novo* synthetisierten Fettsäuren. Besonders interessant sind hierbei die *de novo* synthetisierten Lipide. Diese Fettsäuren waren am höchsten in Mammakarzinomen mit negativem Östrogenrezeptorstatus und schlechtem Differenzierungsgrad 3. Die Größenverhältnisse zwischen Myristinsäure (C14:0) und Palmitinsäure (C16:0) veränderten sich während der Tumorgenese, was vermuten lässt, dass die Funktion von FASN moduliert werden könnte. Die Expression von Genen des Fettstoffwechsels wurde durch *In-silico*-Transcriptomic-Datenbanken untersucht, und es wurden unterschiedliche Enzyme des Fettstoffwechsels evaluiert (ACACA, FASN, SREBP1, INSIG1), die auf Proteinebene durch eine hohe Expression im Mammakarzinomgewebe validiert wurden.

Eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Gesamtüberleben zeigte sich für PC (14:0/16:0), PC (16:0/16:0), PC (31:1) und PC (32:2). Die Studie zeigt, dass Phospholipide ein diagnostisches Potenzial besitzen und dass die Modulation des Stoffwechsels ein neues therapeutisches Target darstellen könnte.

## 4 Diskussion der Ergebnisse

Die optimale Behandlung jeder einzelnen Patientin steht im Zentrum der Arbeit des multidisziplinären klinischen Teams. Die translationale Forschung der Pathologie hat hierbei die Aufgabe, valide diagnostische, prognostische und prädiktive Biomarker, Biomarker zur Überwachung der Wirksamkeit und des Ansprechens von Therapien sowie therapeutische Zielstrukturen zu etablieren und zu validieren. Die systematische Untersuchung von metabolischen Biomarkern im Tumorgewebe (sogenannte Metabolomics) stellt hierbei einen neuen interessanten methodischen Ansatz für die Identifizierung von potenziellen Biomarkern und Targets in der Tumorforschung dar, da Metabolitenprofile den Phänotyp und die Physiologie der Zelle darstellen(13).

Das Ziel der Doktorarbeit war es, Schlüsselenzyme des Stoffwechsels zu untersuchen und diese Daten mit verschiedenen Biomarkern auf RNA- und Proteinebene sowie mit klinisch-pathologischen Daten zu korrelieren. Die vorliegende Arbeit zeigt als erste die mögliche biologische Rolle von GPAM bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom(25).

Wir zeigten an einer großen Kohorte von 271 Patientinnen, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Stoffwechsel von Mammakarzinomgewebe und normalem Mammagewebe gibt. Das wurde durch alle drei metabolischen Analyseverfahren einzeln und in Kombination der Ergebnisse von bis zu zwei metabolischen Analyseverfahren (GC-TOFMS, NMR, LC-MS) nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Studien, in denen verschiedene Tumorarten Unterschiede im Metabolom von normalem und Tumorgewebe zeigten(24, 26). Soweit uns bekannt ist, ist diese Studie aber die bisher umfassendste Charakterisierung des Metaboloms im Mammakarzinom. Es wurden insgesamt über 600 Metaboliten identifiziert. Eine Zwei-Metaboliten-Ratio kann mit einer hohen Sensitivität und Spezifität das Gewebe als normales oder als Tumorgewebe zuordnen. Hierbei war der beste Diskriminator zwischen Tumorgewebe und normalem Brustgewebe die Ratio: Cytidin-5-Monophosphat/Pentadecansäure(27).

In unserer Studie, die 271 Mammakarzinome und 98 Gewebeproben von normalem Mammagewebe (GC-TOFMS) beinhaltet, zeigte sich eine Herunterregulation von vielen freien Fettsäuren und eine starke Korrelation der folgenden freien Fettsäuren: C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0 und C20:0 (27) im Mammakarzinom. Hauptsyntheseprodukte des En-

zyms FASN sind Palmitate (C:16) und geringere Mengen von Myristin-(C14:0) und Stearinsäuren (C18:0).

In einer weiteren Analyse der METAcancer-Kohorte (LC-MS) konnte eine Heraufregulation von Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidylcholinen im Mammakarzinom im Gegensatz zum normalen Gewebe: PC (14:0/16:0), PC (16:0/16:0), PC (32:1), PC (16:0/20:4), PC (18:0/20:4), PC (18:0/22:6), PC (16:0/16:1) u. a. festgestellt werden (15). Die bekannten klinischen Subtypen zeigten deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil, die mögliche Ansätze für neue Therapien sein könnten (15). Innerhalb der molekularen Subgruppen waren viele Phospholipide in Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen und Tumoren mit einem schlechten Differenzierungsgrad (3) hochreguliert, z. B. PC (14:16). Der HER2-Rezeptorstatus zeigte in unseren Studien keine signifikante Korrelation mit dem Fettstoffwechsel. Eine hohe Konzentration von PC (14:0/16:0), PC (16:0/16:0), PC (31:1) und PC (32:2) war signifikant assoziiert mit schlechterem Gesamtüberleben. Funktionelle Experimente zeigten, dass das Ausschalten von Genen des Fettstoffwechsels (u. a. FASN) die Viabilität der Zellen herabsetzt und Veränderung im Fettstoffwechsel bewirkt(15).

Die Ergebnisse aus den beiden Datensätzen unterstützen zusammen die Hypothese, dass im Mammakarzinom die Enzyme des Fettstoffwechsels hochreguliert (u. a. FASN) sind und die *de novo* synthetisierten Fettsäuren in Membran-Phospholipide weiterverarbeitet werden. Die Subgruppe der aggressiveren Tumore mit negativem Östrogenrezeptorstatus und schlechtem Differenzierungsgrad 3 sind hier besonders hervorzuheben.

Erste Ergebnisse von klinischen Studien mit FASN-Inhibition sind vielversprechend. TVB-2640, ein Fettsäure-Synthase-Inhibitor, wird in einer Phase-I-klinischen Studie an fortgeschrittenen soliden Tumoren inklusive triple-negativen Mammakarzinomen in Kombination mit Chemotherapie oder als Monotherapie erprobt (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02223247>) [5]. Protonen-Pumpen-Inhibitoren (z. B. Omeprazol) zeigten *in vitro* eine effektive Inhibition von FASN und eine Reduktion des Überlebens der Mammazelllinien. Neoadjuvante Gabe von Omeprazol in Kombination mit Chemotherapie (Anthracycline und Taxane) wird zurzeit in einer Phase-II-klinischen Studie erprobt. Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom und Stage Ic, II oder III können in die Studie eingeschlossen werden. Die Studie erhebt die Rate der pathologischen Komplettremissionen (pCR); <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02595372>).

Verschiedene Lipide wie Choline, Phosphocholine und Glycerophosphocholine können durch bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomografie *in vivo* in der Klinik untersucht und zur Tumorklassifizierung benutzt werden. Viele Studien zeigten eine Hochregulierung des Cholinmetabolismus, einen sogenannten „Cholin-Peak“. Hierbei war vor allem die Konzentration von Phosphocholinen erhöht, die Bestandteile der Zellmembran sind (Phosphatidylcholi-

ne, Phosphatidylethanolamine). Triple-negative Mammakarzinome zeigen, im Gegensatz zum normalen Gewebe, eine erhöhte Gesamtkonzentration von cholinhaltigen Metaboliten, besonders von Phosphocholin. Diese Metaboliten werden nicht nur für die erhöhte Proliferation der Zellen, sondern auch für die Bildung von Membranbestandteilen benötigt. Enzyme, welche den ersten (Cholinkinase, CHKA) und den zweiten Schritt (Phosphocholin-Cytidyltransferase, CTP) der Phosphocholinsynthese katalysieren, sind in einer Reihe von Tumoren inklusive Ovar- und Mammakarzinomen erhöht [18]. CHKA-Inhibitor TCD-717 wird zurzeit in einer Phase-I-klinischen Studie an fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet und die Ansprechrate über Magnetresonanztomografie überwacht (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01215864>) [19].

Weiterführende Untersuchungen des Lipidstoffwechsels im Mammakarzinom wurden durch ein DAAD-gefördertes Stipendium im Institut für Biochemie der Universität Cambridge durchgeführt. In der Zellkultur zeigten unterschiedliche Subtypen von metastasierten Zelllinien Veränderungen im Lipidstoffwechsel, und zwar vor allem eine Erhöhung der *de novo* synthetisierten Lipide. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem Mammakarzinomgewebe (METAcancer). Die folgenden Lipide waren assoziiert mit einem Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom: PC (30:1), PC (31:1), PC (32:0), PC (32:2), PC (36:0), PC (40:6), PC (33:1), PC (38:3), PC (35:1), PC (40:6), PC (38:4) und PC (35:1). In den univariaten Analysen waren PC (30:1), PC (31:1) und PC (32:2) signifikant verändert. PC (30:1) könnte das Lipid 16:1 oder 16:0 beinhalten, das in der METAcancer-Kohorte mit dem Östrogenrezeptorstatus assoziiert war (15). Die Zellkultur-Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass der Östrogenrezeptorstatus einen wichtigen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel des Mammakarzinoms hat. In den aggressiveren Subtypen des Mammakarzinoms zeigte sich in der Wachstumskurve eine signifikant erhöhte Produktion dieser *de novo* synthetisierten Lipide. Die folgenden Metaboliten waren während des Zellwachstums erhöht: PC (32:0), PC (32:1), PC (33:1), PC (34:1), PC (36:2) und PC (36:3). In der multivariaten Analyse waren folgende Metaboliten signifikant: PC (32:0), PC (33:1), PC (34:1), PC (34:2) und PC (36:3). Während der Wachstumskurve der Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomzelllinie (BT-549) wurden signifikante Veränderungen in den *de novo* synthetisierten Phospholipiden gezeigt, u. a. von PC (32:0). Die Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass PC (34:1) eine wichtige Rolle während der Proliferation von Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom-Subtypen haben könnte. Die Arbeit zeigt die Wichtigkeit der *de novo* synthetisierten Lipide in aggressiven, proliferierenden Mammakarzinom-Zelllinien, welche einen möglichen prädiktiven und prognostischen Biomarker darstellen könnten. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Studien mit Brustzelllinien, die ein spezifisches Metabolitenprofil von Subtypen des Mammakarzinoms zeigten [11-15]. Eine funktionelle biologische Frage, die sich aus diesen Studienergebnissen ergibt, ist, ob die *de novo* syntheti-

sierten Fettsäuren – wie Palmitate-enthaltende Phospholipide – sich im Zytoplasma anreichern oder in die Zellmembran eingebaut werden. Die Analyse der Stoffwechselflüsse der Zelle im Mammakarzinomgewebe, mit z. B. einer genauen Lokalisation der *de novo* synthetisierten Fettsäuren innerhalb der Zelle (zytoplasmatisch oder membranär) [50], könnte im Zellversuch durch Markierung der Stoffwechselflüsse mit unterschiedlichen C<sup>13</sup>-markierten Metaboliten des Mediums untersucht werden.

Im Gegensatz zu den im Mammagewebe gefundenen Biomarkern sind Biomarker des Blutes und des Urins einfacher zu gewinnen. Es wurden weiterführende Untersuchungen des Serums von 142 Mammakarzinom- Patientinnen vor und nach neoadjuvanter Therapie unternommen (28). Es waren keine signifikanten Veränderungen im Phosphocholin-Serumspiegel darstellbar. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Veränderung des Serumspiegels von Oleinsäure mit dem Therapieansprechen vom Mammakarzinom korreliert [15]. Weitere Studien zeigten heterogene Ergebnisse in der Markersignatur vom Metaboliten inklusive der Lipidsignaturen, die unter anderem auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückgeführt werden können (29).

Weitere Untersuchungen des Glutaminstoffwechsels in der METAcancer-Kohorte zeigten, dass es im Mammakarzinom, im Gegensatz zum normalen Mammagewebe, eine signifikante Erhöhung von Glutamat, aber keine Veränderung von Glutamin gab. Die Glutamat/Glutamin-Ratio (GGR) zeigte eine Anreicherung von Glutamat in 88 % der Östrogenrezeptorstatus-negativen Mammakarzinome, in 56 % der Östrogenrezeptorstatus-positiven Mammakarzinome und in 2 % des normalen Mammagewebes (30). Dies bedeutet, dass vor allem Östrogenrezeptor-negatives Mammakarzinomgewebe eine Verschiebung des Stoffwechsels von Glutamin zu Glutamat ausweist. Die Aminogruppe von Glutamin kann für die Synthese von Nukleotiden verwendet werden, welche vermehrt in stark proliferierenden Krebszellen benötigt werden(30).

Die Veränderungen im Glutaminstoffwechsel in der Krebszelle haben zu der Entwicklung von neuen Glutaminase-Inhibitoren geführt (BPTES, 968, CB-839). Der Inhibitor CB-839 wird zurzeit in einer Phase-I-klinischen Studie in soliden Tumoren getestet(10). Bestärkt durch die GGR-Ergebnisse in der METAcancer-Kohorte, konzentriert sich die klinische Studie besonders auf triple-negativen Mammakarzinome (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02071862>).

Mutationen in Schlüsselenzymen des Glutaminstoffwechsels können zu Krebserkrankungen führen. Es stellt sich sogar die Frage, ob Stoffwechselveränderungen und Stoffwechselprodukte (Onko-Metaboliten) Auslöser von Krebs sein können. Mutationen in Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) führen bei Leukämien und Gliomen zu einer Akkumulation von (R) 2-Hydroxyglutarat, welche zu einer gesteigerten Proliferation von Zellen führt(12). Diese

neuen „Upstream“-Effekte von Metaboliten stellen ein neues interessantes Spannungsfeld für neue Angriffspunkte der Krebsforschung dar und werden aktuell in klinischen Studien als Targets evaluiert(13). Es wurden Metaboliten des Glutaminstoffwechsels identifiziert, die nur im Tumorgewebe existieren (2-HG) und durch die Mutationen der Enzyme IDH1 und IDH2 produziert werden. Hierbei wird durch eine „Gain of Function“-Mutation des Enzyms IDH1 eine Reduktion von Alpha-Ketoglutarat zu 2-HG ermöglicht. Diesen sogenannten Onko-Metaboliten wird eine immer größere Rolle in der Krebsentstehung und Progression zugeordnet. Studien zeigten, dass aggressivere Glioblastomen (Grad II-III) eine erhöhte Mutationsrate von IDH1 (70 %) aufweisen, im Gegensatz zu Grad-I-Glioblastomen (10 %) (12). Studien zeigten in Östrogenrezeptorstatus-negativen Mammakarzinomen eine erhöhte Konzentration von 2-HG, aber interessanterweise keine Assoziation mit der somatischen Expression von IDH1 und IDH2 (31). In der METAcancer-Kohorte zeigten sich ähnliche Ergebnisse mit einer Erhöhung von 2-HG, Glutamat und Oxoprolin und einer Verminderung von Alpha-Ketoglutarat im Mammakarzinom im Gegensatz zum normalen Mammagewebe. Im Östrogenrezeptorstatus-negativen Mammakarzinom, im Gegensatz zum Östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom, zeigte sich eine Erhöhung von Glutamat und 2-HG sowie eine Verminderung von Glutamin. Weitere Studien zeigten eine Assoziation zwischen der Krebsprogression im Mammakarzinom und der Myc-assoziierten Akkumulation von 2-HG (32).

Glutamin ist neben den Tumorzellen auch für die den Tumor infiltrierenden T-Lymphozyten und Makrophagen von essenzieller Bedeutung. Es kann deshalb zu einer Konkurrenz zwischen Immunzellen und Tumorzellen um z. B. Glutamin kommen. Diese möglichen Verbindungen zwischen Metabolomics und Immunsystem müssen weiter untersucht werden, um eine medikamentöse Manipulation der Progression des Tumors zu ermöglichen (33).

Eine Stärke der hier vorliegenden Arbeit ist die große Tumorkohorte mit 271 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Die Gewebeproben wurden außerhalb einer klinischen Studie erfasst, weshalb keine standardisierten Daten zu Therapien vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit gibt es gepaarte Proben: frisches und in Paraffin eingebettetes Mammagewebe. Dieses ermöglicht die Untersuchung derselben Tumore durch „in situ proteomics“ (immunhistochemische Untersuchungen) und durch Metabolomics (GC-TOFMS, NMR und LC-MS). Tumorerheterogenität wurde nicht untersucht. Studien zeigten auf metabolischer Ebene und DNA-Ebene Unterschiede innerhalb eines Tumors(34).

Die hier gezeigten validen Ergebnisse der Metabolitenprofile vom Mammakarzinomen werden den Goldstandard der histopathologischen Untersuchungen nicht ersetzen können. Mit histopathologischen Untersuchungen kann, im Gegensatz zu Metabolitenprofilen, die räumliche Inhomogenität und Komplexität des Gewebes analysiert werden. Eine Verwendung der

Metabolitenprofile in Zusammenarbeit mit histologisch schwierigen Klassifikationen oder in Situationen, in denen eine schnelle Diagnose nötig ist, wären in der Zukunft denkbar.

Wichtig für die Anwendung in der täglichen Routine ist eine standardisierte und zuverlässig bestimmbare Analyse der Proben. Um die in dieser Studie identifizierten potenziellen Biomarker und Pathways klinisch anzuwenden, sind Validierungen an weiteren klinischen und experimentellen Kohorten notwendig. Metaboliten umfassen eine große Bandbreite von unterschiedlichen Molekülen, die eine extreme Vielfalt von unterschiedlichen räumlichen Strukturen bilden. Obwohl die Bibliothek der zur Verfügung stehenden Metaboliten stetig erweitert wird, konnten einige Metaboliten, die stark signifikante Ergebnisse zeigten, nicht identifiziert werden. In den kommenden Jahren wird es durch die Messung von neuen, bisher nicht enthaltenen Standards zur Erweiterung der spektralen Bibliotheken kommen. Durch die Erweiterung und Kombination von spektralen Datenbanken wird eine immer genauere und vollständigere Abdeckung des Stoffwechsels wahrscheinlich möglich werden.

## 5 Ausblick

Die Behandlung jeder einzelnen Patientin ist abhängig von einer Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren, weshalb ein systematischer Therapie-Algorithmus ausgeschlossen ist. Die aktuelle Biomarkerforschung konzentriert sich deshalb unter anderem auf Signalwege, welche die Aktivität der Tumorprogression und das Therapieansprechen beeinflussen. Das Metabolom kann mit verschiedenen technisch validen Verfahren bestimmt (GC-MS, NMR, LS-MS) und, wie in dieser Arbeit gezeigt, mit In-situ-Proteomics und mRNA zu einem Netzwerk kombiniert werden. Korrelationsnetzwerke von verschiedenen biologischen Ebenen erweitern unser Verständnis von biologischen Abläufen sowie Tumorprogression und können zu einer besseren Therapie der Patientinnen leiten. Durch das genauere Verständnis der Tumorbiologie können systembiologisch bessere Vorhersagen über das Ansprechen von Medikamenten gemacht werden (35).

In der Tumorprogression zeigt sich eine erhöhte Lipidsynthese frühzeitig, wobei die Zelle bis zu 95 % der Phospholipide *de novo* synthetisiert. Unsere Studie zeigt, dass *de novo* synthetisierte Phospholipide ein neues therapeutisches Target darstellen könnten(36). Unsere Ergebnisse bilden eine Basis für weitere klinische Untersuchungen von Glutaminase-Inhibitoren, die ein prognostisches und therapeutisches Ziel im Mammakarzinom darstellen könnten(10). Die hier vorgestellten Daten sind regeneriert aus retrospektiven Studien, die nur Korrelationen und keine Kausalitäten aufzeigen können. Eine Validierung der metabolischen Biomarker ist in prospektiven Studien notwendig, in denen ein experimentelles Eingreifen möglich ist. Weiterführende Untersuchungen der Hypothesen in randomisierten klinischen

Studien wie die Phase-I-klinische Studie zu Glutaminase-Inhibitoren im triple-negativen Mammakarzinom, wären ideal (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02071862>).

## Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30.
2. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkila P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Begin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, Garcia-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010;7(5):e1000279.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, Goldhirsch A, Gray R, Peto R, Pritchard KI, Wood WC. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2008;371(9606):29-40.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
6. Ferda J, Ferdova E, Hes O, Mracek J, Kreuzberg B, Baxa J. PET/MRI: Multiparametric imaging of brain tumors. *Eur J Radiol.* 2017.
7. Goodacre R. Metabolic profiling: pathways in discovery. *Drug Discov Today.* 2004;9(6):260-1.
8. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008;13(6):472-82.
9. Lu W, Pelicano H, Huang P. Cancer metabolism: is glutamine sweeter than glucose? *Cancer Cell.* 2010;18(3):199-200.
10. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, Mackinnon AL, Parlati F, Rodriguez ML, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, Bennett MK. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(4):890-901.
11. Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer.* 2014;135(10):2237-48.
12. Yan H, Parsons DW, Jin GL, McLendon R, Rasheed BA, Yuan WS, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New Engl J Med.* 2009;360(8):765-73.
13. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(4):267-77.
14. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven PP, Waltregny D, Daniels VW, Machiels J, Vanderhoydonc F, Smans K, Waelkens E, Verhoeven G, Swinnen JV. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* 2010;70(20):8117-26.
15. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Muller B, Brockmoller S, Seppanen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, Berg E, Nygren H, Sysi-Aho M, Griffin JL, Fiehn O, Loibl S, Richter-Ehrenstein C, Radke C, Hyotylainen T, Kallioniemi O, Iljin K, Oresic M. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research.* 2011;71(9):3236-45.
16. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(11):2115-20.
17. Angeles TS, Hudkins RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(12):1187-99.
18. Hammond LE, Neschen S, Romanelli AJ, Cline GW, Ilkayeva OR, Shulman GI, Muoio DM, Coleman RA. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J Biol Chem.* 2005;280(27):25629-36.
19. Hirsch HA, Iliopoulos D, Joshi A, Zhang Y, Jaeger SA, Bulyk M, Tschlis PN, Shirley Liu X, Struhl K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell.* 2010;17(4):348-61.

20. Suhre K, Shin SY, Petersen AK, Mohny RP, Meredith D, Wägele B, Altmaier E, CardioGram, Deloukas P, Erdmann J, Grundberg E, Hammond CJ, de Angelis MH, Kastenmuller G, Kottgen A, Kronenberg F, Mangino M, Meisinger C, Meitinger T, Mewes HW, Milburn MV, Prehn C, Raffler J, Ried JS, Romisch-Margl W, Samani NJ, Small KS, Wichmann HE, Zhai G, Illig T, Spector TD, Adamski J, Soranzo N, Gieger C. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*. 2011;477(7362):54-60.
21. Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, Fiehn O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(24):10038-48.
22. Kilpinen S, Autio R, Ojala K, Iljin K, Bucher E, Sara H, Pisto T, Saarela M, Skotheim RI, Bjorkman M, Mpindi JP, Haapa-Paananen S, Vainio P, Edgren H, Wolf M, Astola J, Nees M, Hautaniemi S, Kallioniemi O. Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues. *Genome Biol*. 2008;9(9):R139.
23. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, Pawitan Y, Hall P, Klaar S, Liu ET, Bergh J. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13550-5.
24. Denkert C, Budczies J, Weichert W, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Niesporek S, Noske A, Buckendahl A, Dietel M, Fiehn O. Metabolite profiling of human colon carcinoma--deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. *Mol Cancer*. 2008;7:72.
25. Brockmoller SF, Bucher E, Muller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, Oresic M, Kallioniemi O, Iljin K, Loibl S, Darb-Esfahani S, Sinn BV, Klauschen F, Prinzler J, Bangemann N, Ismael F, Fiehn O, Dietel M, Denkert C. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(2):850-60.
26. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):551-61.
27. Budczies J, Denkert C, Muller BM, Brockmoller SF, Klauschen F, Gyorffy B, Dietel M, Richter-Ehrenstein C, Marten U, Salek RM, Griffin JL, Hilvo M, Oresic M, Wohlgemuth G, Fiehn O. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue - a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics*. 2012;13:334.
28. Hilvo M, Gade S, Hyotylainen T, Nekljudova V, Seppanen-Laakso T, Sysi-Aho M, Untch M, Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Oresic M, Loibl S. Monounsaturated fatty acids in serum triacylglycerols are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *International Journal of Cancer*. 2014;134(7):1725-33.
29. Tenori L, Oakman C, Morris PG, Gralka E, Turner N, Cappadona S, Fournier M, Hudis C, Norton L, Luchinat C, Di Leo A. Serum metabolomic profiles evaluated after surgery may identify patients with oestrogen receptor negative early breast cancer at increased risk of disease recurrence. Results from a retrospective study. *Mol Oncol*. 2015;9(1):128-39.
30. Budczies J, Pfitzner BM, Gyorffy B, Winzer KJ, Radke C, Dietel M, Fiehn O, Denkert C. Glutamate enrichment as new diagnostic opportunity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(7):1619-28.
31. Tang X, Lin CC, Spasojevic I, Iversen ES, Chi JT, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):415.
32. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathe EA, Dorsey TH, Yi M, Wallace TA, Issaq HJ, Zhou M, Killian JK, Stevenson HS, Karoly ED, Chan K, Samanta S, Prieto D, Hsu TY, Kurley SJ, Putluri V, Sonavane R, Edelman DC, Wulff J, Starks AM, Yang Y, Kittles RA, Yfantis HG, Lee DH, Ioffe OB, Schiff R, Stephens RM, Meltzer PS, Veenstra TD, Westbrook TF, Sreekumar A, Ambs S. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):398-412.
33. Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell*. 2017;169(4):570-86.
34. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;168(4):613-28.
35. Yizhak K, Chaneton B, Gottlieb E, Ruppin E. Modeling cancer metabolism on a genome scale. *Molecular systems biology*. 2015;11(6):817.
36. Vazquez A, Kamphorst JJ, Markert EK, Schug ZT, Tardito S, Gottlieb E. Cancer metabolism at a glance. *J Cell Sci*. 2016;129(18):3367-73.

## Abkürzungsverzeichnis

2-HG	2-Hydroxyglutarat
ABAT	Aminobutyrate Aminotransferase
ACACA	Acetyl-CoA-Carboxylase Alpha
CHKA	Cholinkinase
CL	Citrat-Lyase
CS	Citrat-Synthase
CTP	Phosphocholin-Cytidyltransferase
DASL	cDNA-mediated annealing, selection, extension, and ligation assay (Methode zur genomweiten Expressionsanalyse)
ER	Ostrogenrezeptor
FASN	Fettsäure Synthase
FFPE	in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettetes Gewebe GC Gaschromatographie
GC-TOFMS	<i>Gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry</i> (Gaschromatographie mit Flugzeit-Massenspektrometrie)
<i>HER2</i>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
GPAM	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase
GLS1	Glutaminase 1
GLS2	Glutaminase 2
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IDH1	Isocitrat Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
INSIG1	Insulin-induziertes Gen 1
IRS	Immun-reaktiver Score
Ki67	Proliferationsindex
LC-MS	<i>Liquid chromatography combined with mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie)

METAcancer	Verbundprojekt April 2008 - März 2011, Forderung im 7. EU-Forschungsrahmenprogramm ( <a href="http://www.metacancer-fp7.eu">http://www.metacancer-fp7.eu</a> )
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
PC	Phosphatidylcholine
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PE	Phosphatidylethan
R	Softwareumgebung für statistisches Rechnen und Visualisierung ( <a href="http://www.r-project.org">http://www.r-project.org</a> )
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TG	Triglyceride
TMA	<i>tissue micro array</i>

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Scarlet Fiona Brockmoeller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung von metabolischen Biomarkern beim Mammakarzinom selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

---

Unterschrift

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Scarlet Fiona Brockmüller hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Scarlet F. Brockmüller, Elmar Bucher, Berit M. Müller, Jan Budczies, Mika Hilvo, Julian L Griffin, Matej Oresic, Olli Kallioniemi, Kristiina Iljin, Sibylle Loibl, Bruno V. Sinn, Frederick Klauschen, Judith Prinzler, Nikola Bangemann, Mahmoud Ismail, Oliver Fiehn, Manfred Dietel, Carsten Denkert. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer – link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling. Journal of Proteome Research. 2012 Feb 3;11(2):850-60. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22070544

*Impact Factor* 5,460 Anteil: 60%. Planung und Auswertung der Proteinexpression, Datenauswertung, Erstellung der Abbildungen, Verfassen des Manuskripts und Erstellung des Kollektives.

**Publikation 2:** Jan Budczies, Carsten Denkert, Berit M Müller, Scarlet F Brockmüller, Frederick Klauschen, Manfred Dietel, Reza Salek, Jules L Griffin, Mika Hilvo, Matej Oresic, Gert Wohlgemut, Oliver Fiehn. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissues – a GC-TOFMS based metabolomics study. BMC Genomics. 2012 Jul 23;13:334.

*Impact factor:* 4.073 Anteil: 10%. Erstellung des Kollektives und Beitrag zum Manuskript.

**Publikation 3:** Jan Budczies, Scarlet F. Brockmüller, Berit M. Müller, Dinesh K. Barupal, Christiane Richter-Ehrenstein, Anke Kleine-Tebbe, Julian L. Griffin, Matej Orešič, Manfred Dietel, Carsten Denkert, Oliver Fiehn. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. J Proteomics. 2013 Oct 11;94C:279-288. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.002

*Impact Factor* 5,460 Anteil: 30%. Auswertung der Proteinexpression, Erstellung von Kommentaren zu Abbildungen, Verfassen von Teilen des Manuskripts und Erstellung des Kollektives.

**Publikation 4:** Mika Hilvo, Carsten Denkert, Laura Lehtinen, Berit Müller, **Scarlet Brockmöl-  
ler**, Tuulikki Seppänen-Laakso, Jan Budczies, Elmar Bucher, Laxman Yetukuri, Sandra Cas-  
tillo, Emilia Berg, Heli Nygren, Marko Sysi-Aho, Julian L. Griffin, Oliver Fiehn, Sibylle Loibl,  
Christiane Richter-Ehrenstein, Cornelia Radke, Tuulia Hyötyläinen<sup>1</sup> Olli Kallioniemi<sup>3</sup> Kristiina  
Ilijin and Matej Orešič. Novel theranostic opportunities by characterization of altered mem-  
brane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research*. 2011; 71(9): 3236-  
3245.

*Impact Factor* 7,856 Anteil: 20%. Im Einzelnen: Durchführung aller Proteinexpressionsaus-  
wertungen. Verfassen des Teils Material und Methoden im Manuskript für Immunhistoche-  
mie, Erstellen von Abbildungen und Erstellung des Kollektives.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hoch-  
schullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Anlage: Drucke der ausgewählten Publikationen

1. Expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling. *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):850-60. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22070544 *Impact factor: 5.113*
2. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissues – a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics.* 2012 Jul 23;13:334. *Impact factor: 4.073*
3. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics.* 2013 Oct 11;94C:279-288.10.1016/j.jprot.2013.10.002. *Impact factor: 5.113*
4. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res.* 2011 May 1;71(9):3236-45. Epub 2011 Mar 17. PMID:21415164. *Impact factor: 7.856*

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





# Komplette Publikationsliste

## Originalarbeiten

1. **Brockmoeller, S.**; Bucher E.; Müller, B.; Budczies, J.; Hilvo M.; Griffin J.; Oresic, M.; Kallioniemi O.; Iljin, K.; Loibl S.; Darb-Esfahani, S.; Sinn, B.; Klauschen, F.; Prinzler, J.; Bangemann, N.; Ismaeel, F.; Fiehn, O.; Dietel, M.; Denkert, C. Expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling. *J Proteome Res.* 2012 Feb 3;11(2):850-60. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22070544 *Impact factor: 5.113*
2. Jan Budczies, Carsten Denkert, Berit M Müller, **Scarlet F Brockmüller**, Frederick Klauschen, Manfred Dietel, Reza Salek, Jules L Griffin, Mika Hilvo, Matej Oresic, Gert Wohlgemut, Oliver Fiehn. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissues – a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics.* 2012 Jul 23;13:334. *Impact factor: 4.073*
3. Jan Budczies, **Scarlet F. Brockmoeller**, Berit M. Müller, Dinesh K. Barupal, Christiane Richter-Ehrenstein, Anke Kleine-Tebbe, Julian L. Griffin, Matej Orešič, Manfred Dietel, Carsten Denkert, Oliver Fiehn. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics.* 2013 Oct 11;94C:279-288. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.002. *Impact factor: 5.113*
4. Hilvo, M.; Denkert, C.; Lehtinen; L.; Muller, B.; **Brockmoeller, S.**; et al. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res.* 2011 May 1;71(9):3236-45. Epub 2011 Mar 17. PMID:21415164. *Impact factor: 7.856*

## Review

1. Carsten Denkert, Elmar Buche, Mika Hilvo, Reza Salek, Matej Orešič, Julian Griffin, Scarlet Brockmüller, Frederick Klauschen, Sibylle Loibl, Dinesh Kumar Barupal, Jan Budczies, Kristiina Iljin, Valentina Nekljudova and Oliver Fiehn. Integrated metabolomics of human breast cancer – new approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med.* 2012 Apr 30;4(4):37. PMID: 22546809 *Impact factor: 4.073*

## Kongressbeiträge

1. **Brockmoeller, S.**; Toh E.; Fleming S.; Morris E.; Quirke P. Improving the management of early colorectal cancer: assessment of quantitative markers to predict the need for major resection.  
Abstract printed The Lancet [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(17\)30425-7.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(17)30425-7.pdf) Academy of Science Spring meeting 2017.
2. **Brockmoeller, S.**; Young C.; Lee JL.; Arends M.; Jones JL.; Salto-Tellez M.; Thomas GJ.; Oien KA. Survey of UK Pathology Consultants' Attitudes towards Academic and Molecular Pathology. Lecture Notes British Division of the International Academy of Pathology and the Pathological Society of Great Britain and Ireland 2017.
3. **Brockmoeller, S.**; Toh E.; Morris E.; Quirke P. Comparison of three different tumour budding methods to evaluate the prediction of lymph node metastasis in pT1 colorectal carcinomas. Abstract printed NCRI Cancer Conference 2016.
4. **Brockmoeller, S.**; Budczies J.; Hilvo M.; Müller B.; Oresic M.; Dietel M.; Griffin J. and Denkert C. Expression of SFRP-1 in breast cancer is associated with lipid profile and prognosis of the patients Lecture Notes International conference of the German Society of Pathology 2014
5. **Brockmoeller, S.**; Ament Z.; Kreuzaler P.; Dietel M.; Denkert C.; Griffin JL. Lipidomic profiling of oestrogen positive and negative breast cancer cell lines shows distinct differences in the lipid profile. Abstract printed International conference of the German Society of Pathology 2014
6. **Brockmoeller, S.**; Denkert C.; Frew V.; Lonsdale R. Predictive value of cervical smears reported as ?glandular neoplasia: 10 years' experience with ThinPrep liquid based cytology. Lecture Notes International conference of the German Society of Pathology 2012.
7. **Brockmoeller, S.**; Bucher E.; Müller B.; Budczies, J.; Hilvo M.; Griffin J.; Oresic M.; Kallioniemi O.; Iljin K.; Loibl S.; Darb-Esfahani S.; Sinn B.; Klauschen F.; Prinzler J.; Bangemann N.; Ismaeel F.; Fiehn O.; Dietel M.; Denkert C. Expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling. Abstract printed Conference of the German Society of Pathology 2011.
8. **Brockmoeller, S.**; Müller B.; Budczies J.; Griffin J.; Oresic M.; Fiehn O.; Dietel M.; Denkert C. Correlation of fatty acid synthase expression in invasive breast cancer with metabolic profiles. Abstract printed Metabolism in Cancer Congress 2010.
9. Budczies J.; Denkert C.; Muller B.; **Brockmoeller S.** et al. METAtarget – extracting key enzymes of metabolic regulation from high-throughput metabolomics data using

KEGG REACTION Information. Lecture Notes in Informatics, GI-Edition German Conference on Bioinformatics 2010.

10. Budczies J.; Denkert C.; Müller B.; Dietel M.; **Brockmoeller S.**; Radke C.; Griffin J.; Oresic M.; Wohlgemut G.; Fiehn O. GC-TOF Mass spectrometry reveals strong dependence of breast cancer metabolome on estrogen receptor , but not on HER2 status. Abstract printed Metabolism in Cancer Congress 2010.
11. Müller B.; **Brockmoeller S.**; Budczies J.; Griffin J.; Oresic M.; Fiehn O.; Dietel M.; Denkert C. Acetyl-CoA carboxylase 1 expression in invasive breast cancer in correlation with metabolic profiles. Abstract printed Metabolism in Cancer Congress 2010.

## **Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Carsten Denkert und Berit-Maria Pfitzner für die gute Betreuung und die Vergabe des Dissertationsthemas. Professor Dietel danke ich für seine Unterstützung. Petra Wachs, Ines Koch, Lisa Glanz und Britta Beyer möchte ich für Ihre Einarbeitung in Theorie und Praxis von Labormethoden danken. Jan Budczies und Elmar Bucher danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung in der Datenanalyse. Mein Dank gilt vor allem der gesamten Arbeitsgruppe für translationale Forschung sowie dem METAcancer Consortium für Ihre Unterstützung und Anregungen. Meinem Dank gibt besonders dem DAAD für die Unterstützung meine Forschung in der Arbeitsgruppe von Julian Griffin und der Arbeitsgruppe von Gerard Evan an der Universität Cambridge zu vertiefen.

Publikation 1: Scarlet F. Brockmüller, Elmar Bucher, Berit M. Müller, Jan Budczies, Mika Hilvo, Julian L Griffin, Matej Oresic, Olli Kallioniemi, Kristiina Iljin, Sibylle Loibl, Bruno V. Sinn, Frederick Klauschen, Judith Prinzler, Nikola Bangemann, Mahmoud Ismail, Oliver Fiehn, Manfred Dietel, Carsten Denkert. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer – link to patient survival, hormone receptor status and metabolic profiling. *Journal of Proteome Research*. 2012 Feb 3;11(2):850-60. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22070544

<https://doi.org/10.1021/pr200685r>





















Publikation 2: Jan Budczies, Carsten Denkert, Berit M Müller, Scarlet F Brockmüller, Frederick Klauschen, Manfred Dietel, Reza Salek, Jules L Griffin, Mika Hilvo, Matej Oresic, Gert Wohlgemut, Oliver Fiehn. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissues – a GC-TOFMS based metabolomics study. BMC Genomics. 2012 Jul 23;13:334.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-334>





















Publikation 3: Jan Budczies, Scarlet F. Brockmüller, Berit M. Müller, Dinesh K. Barupal, Christiane Richter-Ehrenstein, Anke Kleine-Tebbe, Julian L. Griffin, Matej Orešič, Manfred Dietel, Carsten Denkert, Oliver Fiehn. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics*. 2013 Oct 11;94C:279-288. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.002

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.002>



















Publikation 4: Mika Hilvo, Carsten Denkert, Laura Lehtinen, Berit Müller, Scarlet Brockmöller, Tuulikki Seppänen-Laakso, Jan Budczies, Elmar Bucher, Laxman Yetukuri, Sandra Castillo, Emilia Berg, Heli Nygren, Marko Sysi-Aho, Julian L. Griffin, Oliver Fiehn, Sibylle Loibl, Christiane Richter-Ehrenstein, Cornelia Radke, Tuulia Hyötyläinen<sup>1</sup> Olli Kallioniemi<sup>3</sup> Kristiina Iljin and Matej Orešič. Novel theranostic opportunities by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research*. 2011; 71(9): 3236-3245.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3894>





























