

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

DISSERTATION

Untersuchung von humanem Mammagewebe mittels High Resolution Magic Angle Spinning Protonen Magnetresonanzspektroskopie (HRMAS¹HMRS) und Bestimmung der Cholinase zur Evaluation der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft einer metabolischen Bildgebung anhand der cholinhaltigen Metaboliten beim Mammakarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Nathalie Christina Anne-Marie Strittmatter
aus Rorschach (Schweiz)

Datum der Promotion: 7. Dezember 2018

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	9
2	ABSTRACT	11
3	EINLEITUNG.....	13
3.1	DAS MAMMAKARZINOM	13
3.1.1	EPIDEMIOLOGIE	13
3.1.2	DIAGNOSTISCHES UND THERAPEUTISCHES VORGEHEN	15
3.1.3	WEITERENTWICKLUNG IN DER DIAGNOSTIK UND THERAPIE.....	17
3.2	MAGNETRESONANZ	18
3.2.1	HISTORISCHER ÜBERBLICK	18
3.2.2	GRUNDLAGEN DER MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE (MRS).....	19
3.2.3	MAGNETRESONANZSPEKTROSKOPIE (MRS) UND BRUSTKREBS.....	22
3.2.4	HIGH RESOLUTION MAGIC ANGLE SPINNING (HRMAS) ¹ HMRS	23
3.3	PHOSPHATIDYLCHOLIN UND DER KENNEDY-ZYKLUS.....	25
3.4	CHOLINKINASE.....	28
3.5	CHOLINMETABOLISMUS UND KARZINOGENESE.....	31
4	FRAGESTELLUNG	32
5	MATERIALIEN UND METHODEN	34
5.1	PROBANDEN UND PROBEGEWINNUNG	34
5.2	MATERIALIEN	35
5.3	METHODEN.....	36
5.3.1	HRMAS ¹ HMRS.....	36
5.3.2	WESTERN BLOT	39
5.3.3	DATENVERARBEITUNG HRMAS ¹ HMRS.....	45
5.3.4	DATENVERARBEITUNG WESTERN BLOT	46
5.3.5	STATISTISCHE METHODEN	47
6	ERGEBNISSE	48
6.1	UNTERSUCHTE VARIABLEN	48

6.1.1	ALTER UND HISTOLOGISCHE DATEN	48
6.1.2	TUMORKLASSIFIKATION	49
6.1.3	CHOLINKINASE	51
6.1.4	OUTCOME	52
6.2	HRMAS-SPEKTROSKOPIE	53
6.2.1	UNTERSUCHTE METABOLITEN	53
6.2.2	ZUSAMMENHANG MIT HISTOLOGIE DER PROBE	54
6.2.3	EINFLUSS DES PATIENTENALTERS	55
6.2.4	DIE ROLLE DES TUMORZELL-ANTEILS	59
6.2.5	ZUSAMMENHANG MIT TUMORTYP	60
6.2.6	KORRELATION MIT TUMORGRÖÙE	60
6.2.7	¹ HRMAS-DATEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM TNM-STADIUM	61
6.2.8	KORRELATION MIT DEM HISTOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNGSGRAD DES TUMORS	66
6.2.9	EINFLUSS DES ÖSTROGENREZEPTORSTATUS	67
6.2.10	ZUSAMMENHANG MIT DEM PROGESTERONREZEPTORSTATUS	67
6.2.11	EINFLUSS DES HER2-REZEPTORSTATUS	68
6.2.12	¹ HRMAS-DATEN BEI TRIPLE-NEGATIVEN TUMOREN	69
6.2.13	ZUSAMMENHANG MIT DER CHOLINKINASE	69
6.2.14	ABHÄNGIGKEIT DER PHOSPHOCHOLINKONZENTRATION VOM CHOLINANGEBOT	72
6.2.15	DER EINFLUSS VON TRIPLE-NEGATIVEN TUMOREN AUF DIE CHOLINKINASEKONZENTRATION	73
6.2.16	ZUSAMMENHANG MIT OUTCOME	73
7	DISKUSSION	87
7.1	DIENT DAS HRMAS ¹HMRS METABOLITENPROFIL VON MAMMAGEWEBE ZUR RISIKOEINSCHÄTZUNG UND PROGNOSE BEIM MAMMAKARZINOM?	87
7.1.1	GLYCEROPHOSPHOCHOLIN	89
7.1.2	CHOLINKONZENTRATION	91
7.1.3	PHOSPHOCHOLINKONZENTRATION	92
7.1.4	UNTERSCHIEDE BEI MOLEKULAREN SUBTYPEN	93
7.2	ZUSAMMENHANG DER CHOLINKINASE MIT DEN METABOLITENKONZENTRATIONEN	94
7.3	LIMITIERUNGEN DER VORLIEGENDEN FORSCHUNGSPROJEKTE	97
7.4	AUSBLICK UND ANFORDERUNGEN FÜR WEITERE UNTERSUCHUNGEN	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	101
9	ANHANG	113

VI

9.1.1	ARBEITSMITTEL.....	113
9.1.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	113
9.1.3	KITS.....	114
9.1.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	114
9.1.5	ANTIKÖRPER	115
9.1.6	GERÄTE.....	115
9.1.7	MESS- UND AUSWERTUNGSSOFTWARE.....	116
10	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	117
11	<u>CURRICULUM VITAE.....</u>	118
12	<u>DANKSAGUNG</u>	121

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA1	Breast Cancer 1 Gen
BRCA2	Breast Cancer 2 Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
Cho	Cholin
CCl ₄	Tetrachlormethan
CHK	Cholinkinase
CK	Cholinkinase
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
¹³ C-MRS	Magnetresonanzspektroskopie mit Messung der Kernspinresonanz vom ¹³ C-Kohlenstoff Isotop
CTP	Cytidintriphosphat
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
ER	Östrogenrezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPC	Glycerophosphocholin
H & E - Färbung	Hämatoxylin und Eosin Färbung
Her2-neu	Human epidermal growth factor receptor 2
¹ HMRS	Protonen-Magnetresonanzspektroskopie
HRMAS ¹ HMRS	High Resolution Magic Angle Spinning Protonen-Magnetresonanzspektroskopie
HRP	Englisch: „horseradish peroxidase“
K _m	Michaeliskonstante
LK	Lymphknoten
MR-	Magnetresonanz
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie

VIII

n.s.	nicht signifikant
OCT	Tissue Tek Optimal Cutting Temperature
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIK3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
³¹ P-MRS oder	Magnetresonanzspektroskopie mit Messung der Kernspinresonanz vom ³¹ Phosphor Isotop
PP _i	Pyrophosphat (Diphosphat)
PR	Progesteronrezeptor
qRT-PCR	Quantitative Realtime-Polymerase Kettenreaktion
Raf	rat fibrosarcoma Proteinkinase
Ral	Ras-like
Ral-GDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
Ras	Rat sarcoma G-proteine
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	Trisbuffered Saline
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms für ein Substrat
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
5 % Milch TBST	5 % Magermilchpulver in Tris-buffered Saline mit 0,05 % Tween-20

1 Zusammenfassung

Zur besseren Risikoeinschätzung eines Mammakarzinoms bei Diagnosestellung sowie zur Erstellung eines individuellen Therapieschemas müssen die biochemischen Prozesse der Tumorentstehung erfasst werden noch bevor die Veränderungen im Gewebe sichtbar werden. (Marme and Schneeweiss, 2012). Mit High Resolution Magic Angle Spinning Protonen - Magnetresonanz Spektroskopie (HRMAS ¹HMRS) können einzelne Metaboliten im Gewebe aufgrund ihrer chemischen Verschiebung identifiziert sowie in hochauflösenden Spektren quantifiziert werden.

Beim Mammakarzinom lassen sich Veränderungen im Cholinmetabolismus (Kennedy - Zyklus) nachweisen (Glunde et al., 2004a, Eliyahu et al., 2007). Eines der Hauptenzyme im Kennedy - Zyklus ist die Cholinase, welche die Phosphorylierung von Cholin zu Phosphocholin katalysiert (Tse et al., 2007).

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit, (1) ob das Metabolitenprofil von Mammakarzinomgewebe in Zusammenhang mit klinischen Daten zur Einschätzung der Aggressivität des Tumors steht und (2) welche Rolle die Cholinase beim Mammakarzinom spielt; inwiefern sie für Konzentrationsveränderungen der Metaboliten verantwortlich ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden mittels HRMAS ¹HMRS die Metabolitenkonzentrationen von Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin in einer Kohorte von 142 malignen sowie 20 benignen Mamma-Gewebeproben gemessen und mit klinischen Parametern (Histologie, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad, Rezeptorstatus, Alter, Outcome) der entsprechenden Patientinnen verglichen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Cholinase mit den genannten Metaboliten quantitativ korrelierte.

Tiefgefrorene Mamma-Gewebeproben von 162 Patientinnen wurden am Martinos Nuclear Magnetic Resonance Center des Massachusetts General Hospital und der Harvard Universität, MA, USA mit einem 14 Tesla - Magnetresonanzspektrometer mit der HRMAS - Technologie gemessen und anschließend histopathologisch evaluiert. 50 ausgewählte Proben wurden außerdem mittels Western Blot semiquantitativ auf die Cholinase untersucht.

Hier zeigte sich, dass eine erhöhte Glycerophosphocholinkonzentration ein hochsignifikantes Merkmal für Malignität war ($p < 0,001$). Sie korrelierte außerdem positiv mit der Tumorzellzahl ($p = 0,003$) sowie mit einem jüngeren Alter (< 40 Jahre) ($p = 0,018$). Sehr hohe Konzentrationen standen in signifikantem Zusammenhang mit einer verbesserten Überlebensrate in der

univariaten Analyse ($p = 0,049$). Große Tumoren zeigten hingegen eine signifikant geringere Konzentration ($p = 0,023$). Die Cholinkonzentration war im gesunden Gewebe bei älteren Patientinnen signifikant erhöht ($p = 0,011$). Außerdem war die Cholinkonzentration in HER2-exprimierenden Proben signifikant erhöht ($p = 0,027$). Ferner konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen, dass Phosphocholin einer der wichtigsten Metaboliten im Tumorstoffwechsel ist und zu einer verschlechterten Prognose führt. Vielmehr ging eine erhöhte Phosphocholinkonzentration in der univariaten Analyse mit einer signifikant verbesserten Überlebensrate einher ($p = 0,048$). Außerdem zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Cholin- und der Phosphocholinkonzentration ($p < 0,001$). Die Cholinkinasekonzentration korrelierte im benignen Gewebe negativ mit der Phosphocholinkonzentration ($p = 0,005$).

Die Messwerte unserer Metabolite unterlagen sehr hohen Schwankungen, so dass einzelne Metabolite wahrscheinlich weniger aussagekräftig sind als das gesamte Metabolitenprofil mit dem Verhältnis der Metaboliten zueinander. Die untersuchten Metaboliten könnten jedoch eine maßgebliche Rolle in der Erprobung neuer Therapiestrategien spielen.

Mittels HRMAS ^1HMR S können molekulare Veränderungen im Mammakarzinom gut erfasst werden. Sie ist daher eine vielversprechende ergänzende Methode zur metabolischen Klassifizierung und Risikoeinschätzung. In zukünftigen Studien sollte die HRMAS ^1HMR S parallel zu den herkömmlichen Methoden evaluiert werden.

Erst im direkten Vergleich wird sich letztendlich zeigen, welchen Fortschritt und klinischen Nutzen sie bei der Diagnostik und Behandlung des Mammakarzinoms bringt.

2 Abstract

New strategies in discovery and personalized treatment of breast cancer are needed to avoid overtreatment of less aggressive tumors and to cure more aggressive tumors. Our aim was to find an additional diagnostic strategy, which is highly sensitive and specific and helps to evaluate the individual metabolic tumor subtype and aggressiveness in order to create highly personalized therapy concepts.

At the Martinos Nuclear Magnetic Resonance Center of the Massachusetts General Hospital and Harvard University, MA, USA we created metabolic profiles of 162 frozen breast tissue specimens by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy (HRMAS ¹H MRS). We specifically examined the role of choline metabolites in the Kennedy pathway, namely choline, phosphocholine and glycerophosphocholine. We compared our results with the individual outcome and histopathologic classification of each patient.

In 50 cases, we semiquantitatively measured choline kinase expression levels, one of the main enzymes within choline metabolism, by Western Blotting.

We demonstrated a highly significant higher level of glycerophosphocholine concentration in malignant tissue ($p < 0,001$). Glycerophosphocholine concentration was also positively correlated with younger age of patients ($p = 0,018$) and higher amounts of tumor cells ($p = 0,003$). Patient with a very high level of glycerophosphocholine, however, showed a significantly better survival rate in the univariate analysis ($p = 0,049$). Glycerophosphocholine concentration was significantly lower in big tumors ($p = 0,023$). Choline was significantly higher concentrated in healthy tissues of older patients ($p = 0,011$). Furthermore, choline concentration was significantly higher in HER2-positive tumors compared to HER2-negative tumors ($p = 0,027$). The importance of phosphocholine as a powerful biomarker in cancer other studies described could not be confirmed in our research panel. However, in our univariate analysis we found a significantly better survival rate in cases with higher phosphocholine concentration ($p = 0,048$). Phosphocholine is also highly significantly positive correlated with choline concentration ($p < 0,001$). In benign tissues, we discovered a significant negative correlation between the concentration of the enzyme choline kinase and the corresponding phosphocholine level ($p = 0,005$). Our investigations of different molecular tumor subtypes led to promising trends for being able to possibly differentiate these subtypes by their choline metabolite profiles, but we were mostly lacking significant results due to low case numbers.

In conclusion, the detected metabolite concentrations in choline metabolism showed a huge variability. We suggest that, in the future, considering the entire metabolic profile and metabolite ratios may increase the information gained from HRMAS ¹H MRS studies rather than evaluating individual metabolite concentrations. HRMAS ¹H MRS has the potential to provide a much better understanding of a given tumor's biochemistry and metabolic make-up. Additional future studies will be needed to clearly understand the metabolism of different breast cancer subtypes. This method in combination with currently existing diagnostic possibilities can give us a better picture of the individual tumor of each patient to develop personalized treatment plans, which improve cancer cure rates and minimize side effects of chemo- and radiotherapy.

3 Einleitung

Diese Dissertation ist im Rahmen des Berlin - Boston Forschungsaustauschs der Charité Universitätsmedizin mit der Harvard University, Cambridge, MA, USA, und dem Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA entstanden. Der Forschungsaustausch wurde von Herrn Dr. med. Piet Habbel, Charité Universitätsmedizin, und Herrn Dr. med. Johannes Nowak, Universitätsklinikum Würzburg, ins Leben gerufen. Die Experimente wurden am Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging des Massachusetts General Hospital und der Harvard University, MA, USA, im Labor für Radiopathologie von Herrn Professor Leo Ling Cheng durchgeführt. Es bestand außerdem eine Zusammenarbeit mit der Abteilung für Tumorbildgebung von Frau Professor Zaver M. Bhujwalla an der Johns Hopkins Medical University, Baltimore, MD, USA. Zurück in Berlin erfolgte die Betreuung maßgeblich durch Herrn Professor Dr. med. Carsten Denkert, Leiter der AG Transnationale Tumorforschung am Institut für Pathologie, Charité.

3.1 Das Mammakarzinom

3.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist vor allem in den Industrieländern eine weit verbreitete Erkrankung. In Deutschland wurden im Jahr 2016 rund 65.500 Neuerkrankungen bei Frauen festgestellt. Das Mammakarzinom ist damit die häufigste Krebserkrankung der Frau und für 30,8 % aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen verantwortlich (Abb. 1) (Robert Koch Institut, 2015a). Dies sind 158 pro 100.000 im Jahr.



Abb. 1: Prozentualer Anteil der derzeit häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), modifiziert nach (Robert Koch Institut, 2015b).

Statistisch gesehen erkrankt jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Mammakarzinome sind zwischen der 6. und 7. Lebensdekade am häufigsten. Vor dem 35. Lebensjahr kommen sie selten vor. Laut Angabe des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2014 in Deutschland 17.670 Frauen an Brustkrebs, welches damit die häufigste Krebserkrankung mit Todesfolge darstellt (Statistisches Bundesamt, 2014). Die Brustkrebserkrankung nimmt bei der Sterblichkeit mit 16,7 % den ersten Platz ein, gefolgt vom Bronchialkarzinom und dem Pankreaskarzinom. Die relative 5-Jahresüberlebensrate betrug 1992 noch 72% und stieg im Jahr 2010 auf 87% an (Abb. 2) (Robert Koch Institut, 2015a) (Kreienberg et al., 2012).

Mammakarzinom

	2012		2016	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	620	69.550	700	65.500
Standardisierte Erkrankungsrate*	1,1	117,4	1,1	106,1
Sterbefälle	150	17.748		
Standardisierte Sterberate	0,3	23,9		
5-Jahres-Prävalenz	2.300	317.200		

* je 100.000 Personen, altersstandardisiert

Abb. 2: Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Brustkrebs in Deutschland, modifiziert nach (Robert Koch Institut, 2015a).

Eine frühzeitige und eindeutige Diagnose bei Brustkrebs ist essenziell für die Prognose (Furnival, 1997, Nover et al., 2009). Um die Detektionsrate zu verbessern wurde im Jahr 2005 das Mammographiescreening flächendeckend eingeführt. Es ist Bestandteil der Richtlinien über die Früherkennung von Krebserkrankungen und kann von Frauen ab dem Alter von 50 Jahren bis zum Ende des 70. Lebensjahres in Anspruch genommen werden (Bundesministerium für Gesundheit, 2004). Mit Einführung der Mammographie als Vorsorgeuntersuchung stieg die Inzidenz des Brustkrebs zunächst deutlich an (Robert Koch Institut, 2015a) (Abb. 3). Dies liegt vor allem an der vermehrten Erfassung besonders der frühen Krebsstadien (Chu et al., 1991) (Kreienberg et al., 2012).

Jahre	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Erstdiagnose Brustkrebs	60.209	60.005	61.871	63.491	65.453	68.730	73.970	73.904	70.951	70.190	69.550

Abb. 3: Verlauf der Brustkrebs Inzidenz in Deutschland, modifiziert nach (Robert Koch Institut, 2013).

Anfangs ging man davon aus, dass dies erhöhte Überlebensraten sowie eine bessere Lebensqualität der Patientinnen zur Folge hat (Chu et al., 1991, Nover et al., 2009). Nover et al. geben hierfür eine 98% Überlebensrate für Stadium 0 und I bei Diagnosestellung an. Andere Studien vermuten eine Übertherapie von Brustkrebs ohne bedeutende Beeinflussung der Mortalität und Morbidität bei den fortgeschrittenen Stadien (Bleyer and Welch, 2012). Eine abschließende Aussage darüber, ob das Mammographie Screening die Sterblichkeit bei Brustkrebs senken kann, lässt sich derzeit jedoch noch nicht machen (Robert Koch Institut, 2015a).

3.1.2 Diagnostisches und therapeutisches Vorgehen

Die Mammographie gilt nach derzeitigem Wissenstand als gängigste Methode zur Früherkennung des Mammakarzinoms. Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität bei ebenfalls hoher Spezifität aus, vor allem bei älteren Frauen in der Menopause, deren Bruststruktur typischerweise einen höheren Fettanteil aufweist (Tab. 1). Dieser Nutzen überwiegt das Risiko für Folgeschäden durch die vergleichsweise geringe Strahlenbelastung (Mettler et al., 1996). Da das Verfahren außerdem günstig und ohne großen organisatorischen Aufwand flächendeckend durchführbar ist, ist es seit 2005 Bestandteil des deutschen Krebsvorsorge-Programms. Weitere Untersuchungstechniken wie die Brustselbstuntersuchung der Frau, Tastuntersuchung des Arztes oder die Mammasonographie sollten ergänzend durchgeführt werden

(Kreienberg et al., 2012). Dies gilt besonders bei Frauen mit hohem Risiko, zum Beispiel bei BRCA1 oder BRCA2 Mutation. Bei Schwangeren oder jungen Patientinnen mit bindegewebsdichter Brust können sie der Mammographie vorgezogen werden (Sehgal et al., 2006). Eine weitere Untersuchungsmethode, die vor allem bei den zuvor genannten Patientengruppen (bindegewebsreiche Brust, junge Patientin, Schwangere) angewandt wird, ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Sie zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität als bei der Kombination von Mammographie und Mammasonographie aus (Orel, 1998, Kriege et al., 2004). Auch eine intraduktale Ausbreitung des Tumors lässt sich hiermit besser feststellen (Hata et al., 2004). Allerdings kann es in Grenzfällen schwierig sein, benigne Läsionen sicher von den malignen zu unterscheiden (Orel, 1998). Die MRT-Untersuchung hat somit einen niedrigeren positiven prädiktiven Wert und ist außerdem sehr kostenintensiv (Tab. 1).

Untersuchung	Sensitivität	Spezifität
Mammographie (Carney et al., 2003)		
gesamt	75%	
- bei bindegewebsreicher Brust	62,9%	92,3%
- bei fettreicher Brust	87%	89,1%
- 40-44 Jahre	68,6%	96,9%
- 80-89 Jahre	83,3%	
MRT (Bluemke et al., 2004)	88,1%	67,7
Dopplersonographie (Raza and Baum, 1997)	68%	95%
Tastuntersuchung durch den Arzt (Ratanachaikanont, 2005)	57,14%	97,11%

Tab. 1: Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener Untersuchungsmethoden zur Diagnostik des Mammakarzinoms.

Sobald beim Screening eine verdächtige Läsion auffällt, wird eine Stanz-, Vakuum- oder offene Exzisionsbiopsie mit anschließender histologischer Diagnostik empfohlen (Kreienberg et al., 2012). Sollte sich die Diagnose Krebs auch in der Pathologie bestätigen, erfolgt eine chirurgische Entfernung des Tumors und eventuell der Lymphknoten mit anschließender pathologischer Evaluation in Form von histologischer Klassifikation nach WHO 2003, Grading nach WHO, Bestimmung des Östrogen-, des Progesteronrezeptorstatus sowie des Her2-Status, des Resektionserfolges und des Lymphknotenstatus. Hieraus ergibt sich die Prognose und eine postoperative Therapieempfehlung (Kreienberg et al., 2012).

3.1.3 Weiterentwicklung in der Diagnostik und Therapie

In der histologischen Untersuchung von Biopsien wird häufig weniger als 1% des gesamten fraglichen Brustgewebes entnommen, welches dann stellvertretend für den gesamten Tumor untersucht wird. Insbesondere aufgrund der histologischen Heterogenität des Mammakarzinoms kann es auch bei richtiger Diagnosestellung zu Schwierigkeiten in der Risikobeurteilung kommen (Mountford et al., 1993).

Neuerdings setzt man in der Diagnostik vom Mammakarzinom ergänzend zu morphologischen Beurteilungskriterien zunehmend auch auf molekulare Marker zur Klassifikation des Tumors. Sie dienen zur besseren Beurteilung, so dass nur die entsprechenden Risikopatientinnen besonders invasiven Therapieoptionen unterzogen werden (Kreienberg et al., 2012).

Auch die neuerliche Erkennung von sehr frühen Brustkrebsstadien und Krebsvorstadien wie zum Beispiel dem Duktalen Carcinoma In Situ (DCIS) erfordert eine neue Risiko-Nutzenanalyse der alten Therapiekonzepte. Da nur einige dieser diagnostizierten DCIS im Verlauf tatsächlich invasiv werden, ist ein weiterführendes Verständnis über deren biologisches und klinisches Verhalten essentiell. Nur so lassen sich zukünftig solche Läsionen mit hohem Risiko zur Invasion von den weniger gefährlichen unterscheiden (Kuerer et al., 2009).

Ohne dieses Wissen stellt sich heutzutage im Falle von Krebsvor- oder Frühstadien oft die Frage, wie aggressiv der Tumor behandelt werden muss, um ihn so zu entfernen, dass es zu keinem Rezidiv kommt, beziehungsweise um die Entstehung eines Mammakarzinoms zu verhindern, jedoch auch die Folgeschäden, die mit einer Therapie einhergehen, zu minimieren. Eine Veränderung der chirurgischen Therapie von der traditionellen radikalen Mastektomie hin zur brusterhaltenden Operation hat sich in den meisten Fällen als ebenso effektiv und nebenwirkungsärmer erwiesen (Baxter et al., 2004). In gleichem Maße stellt sich die Frage, ob eine präoperative Therapie sinnvoll ist, wie viel postoperative Chemo- oder Radiotherapie die jeweilige Patientin benötigt, und ob eine Lymphadenektomie notwendig erscheint (Attene et al., 2012). Diese Fragen müssen bei jeder Patientin individuell entschieden werden. Die Entwicklung sollte deshalb hin zu einer personalisierten und maßgeschneiderten Therapie gehen (Marme and Schneeweiss, 2012). Ein besseres Verständnis ihres jeweiligen Tumortyps und des vermeintlichen Risikos könnte zu einer erheblich präziseren und oft weniger invasiven Therapie führen (Klotz, 2012).

Bildgebende Methoden wie Mammographie, Sonographie, MRT und Positron-Emissions-Tomographie sind ein Schritt in Richtung dieser individualisierten Medizin (Feig, 1999, Edell

and Eisen, 1999, Brennan et al., 2009, Liu et al., 2009). Es gilt diese jedoch noch zu verbessern und zu ergänzen. Die genannten Methoden dienen lediglich der rein morphologischen Darstellung des Tumors. Sie vernachlässigen jedoch die biochemischen Vorgänge im Tumor, die eine Malignität eventuell schon vor dem Auftreten morphologischer Veränderungen anzeigen oder die Entwicklung und die Tumorprogression besser vorhersagen (Edell and Eisen, 1999, Giess et al., 2012, Brennan et al., 2009).

Hierzu gibt es bereits mehrere im klinischen Alltag erfolgreich verwendete pathologische Parameter, die als Marker für Brustkrebs zur Verfügung stehen. Östrogenrezeptor- (ER), Progesteronrezeptor- (PR) und Her2-Status sind Beispiele für molekulare Marker, die heute schon routinemäßig genutzt werden und in der Therapiefindung sowie in der Prognostik eine große Rolle spielen (Fitzgibbons et al., 2000, Payne et al., 2008). Diese genannten Parameter sind jedoch beispielsweise bei der Prognosestellung von DCIS nicht aussagekräftig genug (Altintas et al., 2009, Kuerer et al., 2009). Aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Brustkrebsarten sind außerdem weitere Marker erforderlich, um einen Tumor eindeutig zu klassifizieren (Payne et al., 2008). Es wäre wichtig zu wissen, welche biochemischen Prozesse im Tumor ablaufen schon bevor eine sichtbare Veränderung des Gewebes stattfindet. Einigen biochemischen Markern wird zugeschrieben, dass sie bei verschiedenen Krebsarten erhöht vorhanden sind. Es gilt diese Gesamtheit der biochemischen Veränderungen in einem Profil zusammenzufassen, um daraus ein individuelles Markerprofil für den einzelnen Tumor zu erstellen. Hieraus könnten sich dann prognostische Aussagen und therapeutisches Vorgehen ableiten. Eventuell könnte man daraus das Rezidivrisiko abschätzen oder diejenigen Krebsvorstufen mit hohem Potential zur malignen Entartung erkennen und eine entsprechend radikalere Therapieoption wählen (Klotz, 2012).

3.2 Magnetresonanz

3.2.1 Historischer Überblick

Der englische Begriff „Nuclear Magnetic Resonance“ NMR umfasst verschiedene radiologische Untersuchungstechniken, die sich eines magnetischen Felds bedienen, wie zum Beispiel die Magnetresonanztomographie (MRT), Magnetresonanzspektroskopie (MRS) oder Metabolische Bildgebung („MR Spectroscopic Imaging“ MRSI). Sie können sowohl ex vivo an humanem Gewebe als auch in vivo am lebenden Menschen durchgeführt werden.

Den Grundbaustein der heutigen Magnetresonanstechniken legte Wolfgang Pauli, der erstma-

lig von einem Kernspin, also einer Rotation des Atomkerns, ausging (Pauli, 1924). Die unabhängigen Forschergruppen um Purcell und Bloch konnten dann 1946 ein Kernspinresonanz-Signal von Protonen in Wasser bzw. in Paraffin detektieren (Bloch et al., 1946, Purcell et al., 1946). Hierfür wurden beide 1952 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet. In den darauffolgenden Jahren wurde die Magnetresonanz vor allem in der Physik und Chemie zur Untersuchung von chemischen Strukturen und Reaktionsgleichungen angewandt. In der Medizin gewann sie erst durch Herrn Lauterbur an Bedeutung. Er entwickelte 1973 die ersten magnetresonanztomographischen Bilder (Lauterbur, 1989). Auch er wurde im Jahr 2003 hierfür mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Zeitgleich zur Nutzung der Magnetresonanz in der Medizin entwickelte sich auch die Magnetresonanzspektroskopie. Hier liegt der Schwerpunkt auf der Messung von biochemischen Prozessen im Gewebe (Hoult et al., 1974, Moon and Richards, 1973). Über die Jahre entwickelten sich MRT und MRS zu wertvollen diagnostischen Bildgebungsverfahren in der Medizin, die auch bei der Auswahl der optimalen therapeutischen Strategie eine wichtige Rolle spielen.

3.2.2 Grundlagen der Magnetresonanzspektroskopie (MRS)

Magnetresonanzspektroskopie ist ein häufig angewandtes Verfahren zur Identifizierung der Struktur von Molekülen und deren Konzentrationsbestimmung (Shah et al., 2006, Friebolin, 2013). Im Gegensatz zur MRT, welche Bilder aus den starken Wasser- und Fettresonanzen generiert, erstellt die MRS nach Unterdrückung dieser Wasserresonanzen hochauflösende MR-Spektren der weiteren chemischen Zusammensetzung eines überwiegend flüssigen Gewebes (Sinha and Sinha, 2009, Friebolin, 2013).

Alle Atomkerne mit einer ungeraden Nukleonenzahl eignen sich für magnetresonanstechnische Untersuchungen, da ihr Gesamt-Kernspin ungleich „null“ ist (G. W. Kauffmann, 2006). In der Medizin misst man aufgrund ihrer Häufigkeit im menschlichen Körper oder ihrer hohen Sensitivität meist die Kernspinresonanz der Isotope ^1H und ^{13}C , ^{31}P und ^{19}F (Shah et al., 2006). Alle Atomkerne haben einen eigenen Kernspin s , was zu einem magnetischen Dipolmoment und somit zu einem eigenen magnetischen Feld führt (Friebolin, 2013):

$$\mu = \gamma \cdot s$$

μ : Magnetisches Moment, γ : Proportionalitätsfaktor Gyromagnetisches Verhältnis, s : Kernspin

Im menschlichen Körper haben diese einzelnen magnetischen Felder keine besondere Anordnung, sondern gleichen sich gegenseitig aus (Reiser, 2004). Die Atomkerne einer Gewebeprobe können elektromagnetische Energie absorbieren oder emittieren und generieren somit die zuvor erwähnte Kernspinresonanz. Ein Bild, beziehungsweise im Fall der MRS ein Spektrum wird erzeugt, indem diese Kernspinresonanz gemessen wird. Hierfür wird die zu untersuchende Probe in ein von außen angelegtes, konstantes elektromagnetisches Hauptfeld B_0 gebracht. Die magnetischen Dipole richten sich daraufhin entlang der Hauptflusslinie aus. Die Atomkerne lagern sich also größtenteils parallel, zu einem geringeren Teil auch antiparallel, zum Hauptfeld an, was zu einem longitudinalen Magnetfeld führt (Friebolin, 2013). Sie rotieren nun zusätzlich zur eigenen Spin-Achse um diese longitudinale Achse des Hauptmagnetfeldes. Diese Kreiselbewegung wird Präzessionsbewegung genannt. Die Geschwindigkeit der Bewegung hängt vom Hauptmagnetfeld ab. Ebenso die Frequenz, die sogenannte Larmor- oder Präzessionsfrequenz f_{Larmor} , hängt vom Hauptmagnetfeld und zusätzlich von einer stoffspezifischen Konstante, dem Gyromagnetischen Verhältnis γ , ab (Reiser, 2004):

$$f_{\text{Larmor}} = \gamma / 2\pi \cdot B_0$$

f_{Larmor}: Larmorfrequenz, γ : Gyromagnetisches Verhältnis, B: magnetische Flussdichte

Um die Probe herum wird eine Induktionsspule gesetzt. Diese Spule erzeugt senkrecht zum Hauptfeld ein elektromagnetisches Wechselfeld B_1 in Form eines Hochfrequenzimpulses. Die Atomkerne werden bei Eintreffen der Radiopulswelle, die der jeweiligen Larmorfrequenz entspricht, angeregt und ändern die Ausrichtung ihres Spins entlang B_1 , also 90° zum Hauptmagnetfeld B_0 . Nach der Beendigung der Pulswelle kehren die Kerne von der Gesamtquermagnetisierung zurück in den Grundzustand der Längsmagnetisierung vor Eintreffen des Hochfrequenzimpulses. Dies wird als Relaxation bezeichnet (Reiser, 2004). T1 beschreibt hierbei die Spin-Gitter bzw. die longitudinale Relaxationszeit. T2 entspricht der Spin-Spin, oder transversalen Relaxationszeit (Friebolin, 2013). In der kurzen Zeit zwischen Ende der Pulswelle und Relaxation oszillieren die Kernspins, jeweils in ihrer eigenen Larmorfrequenz, für kurze Zeit weiter senkrecht zum Hauptmagnetfeld. Die Summe der Oszillationen wird in der Zeitdomäne detektiert. Über die Fourier Transformation werden die kontinuierlichen aperiodischen Oszillationssignale über eine Extraktion der einzelnen Larmorfrequenzen in ein kontinuierliches Frequenzspektrum umgewandelt, welches die

Resonanzamplituden auf der y-Achse und die Resonanzfrequenzen auf der x-Achse abbildet (Abb. 4, Abb. 5) (Tse et al., 2007).

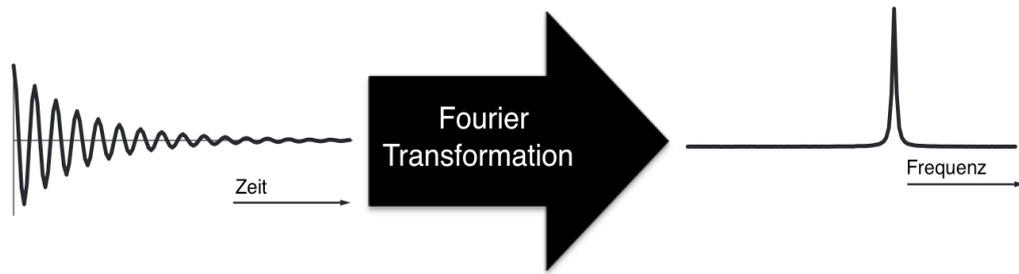


Abb. 4: Die Zeitdomäne (Englisch: free induction decay, FID) mit Darstellung der Summe der Oszillationssignale wird nach Fourier Transformation zum Frequenzspektrum, modifiziert nach (Keeler, 2002).

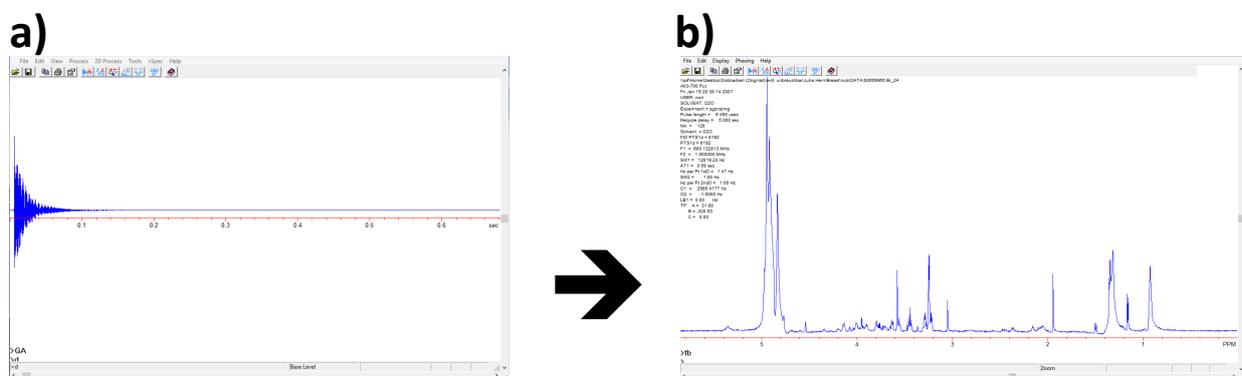


Abb. 5: Beispielspektrum aus unserer Datenbank. a) mit Darstellung der Zeitdomäne eines unserer Spektren b) mit Darstellung des dazugehörigen Frequenzspektrums nach Fourier Transformation.

Da ein Atomkern in unterschiedlichen Strukturformeln aufgrund der chemischen Bindungen auch unterschiedliche Resonanzsignale (Larmorfrequenzen) hat, lässt sich im frequenz aufgelösten MR-Spektrum jedes Molekül an einer eigenen Stelle auf der x-Achse lokalisieren. Dieses Phänomen nennt man Chemische Verschiebung mit der Einheit parts per million (ppm) (Deutsch: „Millionstel“) (Friebolin, 2013). Ein Wasserstoff Proton beispielsweise hat im Wassermolekül eine andere Chemische Verschiebung als im Fettmolekül. Im Frequenzspektrum entstehen an unterschiedlichen Stellen ein Anstieg für Wasser bei 4,7 ppm und für Fett bei 0,9 ppm. Anhand dieses Spektrums kann man somit Rückschlüsse über die Metabolitenzusammensetzung der Probe ziehen. Die Fläche unter der Kurve entspricht dabei der relativen Konzentration des jeweiligen Metaboliten, sofern das Spektrum unter vollständiger Relaxation aufgenommen wurde. Die Relaxationszeit ist die benötigte Zeit für einen Kernspin um vom angeregten und ausgerichtetem Zustand wieder in den Gleichgewichtszustand zurück zu gelangen. Auch diese gibt Hinweise über die Umgebung der Atomkerne, ihre Strukturverbindungen

gen und Dynamik (Friebolin, 2013). Je nach benötigter Relaxationszeit des zu untersuchenden Gewebes sollte die Pulssequenz gewählt werden, um eine vollständige Relaxation zu ermöglichen und den entsprechenden Kontrast zu erreichen. Die Auflösung des entstehenden Spektrums ist auch abhängig von der Intensität des magnetischen Felds und wird in Tesla $T = (Vs/m^2)$ angegeben. Durch eine Erhöhung der Feldstärke werden deutlich kleinere Voxel erreicht, was eine zunehmend verbesserte Auflösung zur Folge hat und mittlerweile auch eine 2D- und 3D-Bildgebung ermöglicht ((Rolf Gruetter, 1998). Die im klinischen Alltag verwendeten Kernspintomographen arbeiten meist mit 1,5 T (64 MHz) (Friebolin, 2013). Aktuell sind bis zu 7 T - Scanner kommerziell verfügbar.

3.2.3 Magnetresonanzspektroskopie (MRS) und Brustkrebs

Mehrere Studien haben mittels MRS einen Zusammenhang zwischen Brustkrebs und einer Änderung im Cholinmetabolismus feststellen können, wobei es sich maßgeblich um eine Erhöhung des Phosphocholingehalts handelt (Glunde et al., 2004a, Eliyahu et al., 2007). Dies legt nahe, dass ein besseres Verständnis des Cholinstoffwechsels und dessen Rolle in der Karzinogenese essentiell für zukünftige Diagnose- und Stagingmethoden ist.

Mountford et al. beispielsweise konnten mittels Protonen-Magnetresonanzspektroskopie von Tumorzellen schon vor dem Auftreten von lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen eine Modifikation im Cholinstoffwechsel erkennen (Mountford et al., 2009). Aber auch zur Beurteilung des Therapieverlaufs eignen sich die Cholinmetaboliten (Tse et al., 2007). Al-Saffar et al. nutzten die magnetresonanzspektroskopische Messung der Cholinmetaboliten bereits zur Verlaufskontrolle bei der Behandlung von Brustkrebszellen mit dem Cholinkinase Inhibitor MN58b. Die Cholinmetaboliten dienten hier also als pharmakodynamische Biomarker zur besseren Einschätzung der effektiven Inhibierung der Cholinkinase, wobei mit der Abnahme des Phosphocholins das Produkt der inhibierten enzymatischen Cholinkinasereaktion direkt gemessen wurde (Al-Saffar et al., 2006).

Ein großer Nachteil der heutzutage teilweise in der klinischen Routinediagnostik angewandten MRT ist die niedrige Spezifität. Die Spezifität ist bei der MRS jedoch vergleichsweise hoch. Mit nur geringem Mehraufwand könnte man mittels einer Kombination der beiden Methoden die Diagnosegenauigkeit stark erhöhen (Sinha and Sinha, 2009, Meisamy et al., 2005).

Speziell die Protonen-MRS (1H MRS) hat sich bei in vivo Untersuchungen der Brust bewährt (Tse et al., 2007). Sie ist hochauflösender als ^{31}P -MRS oder ^{13}C -MRS und erreicht damit eine höhere Sensitivität. Außerdem sind Protonen im Brustgewebe in hohen Konzentrationen

vorhanden. Um eine gute Auflösung zu erhalten ist ein MR-Spektrometer mit hoher Tesla-Zahl von Nöten, denn der Bereich der Chemischen Verschiebung von ^1H ist mit 10 ppm sehr schmal. Weiterhin besteht der Hauptanteil des Signals aus Protonen in Gewebewasser oder in Triglyceriden. Andere Metaboliten liegen in wesentlich geringeren Konzentrationen vor und werden vom Wasser beziehungsweise Fettsignal überlagert. Mit der Wahl der richtigen Pulssequenz kann man diese Wasser- und Fettsignale unterdrücken, was die anderen ^1H -enthaltenden Metaboliten besser erkennbar macht.

Leider blieben Studien zur Diagnostik von DCIS mittels $^1\text{HMRS}$ bislang erfolglos. DCIS zeigt im $^1\text{HMRS}$ überwiegend kein erhöhtes Signal der Cholinmetaboliten. Ob dies auf die verminderte Aggressivität des DCIS zurückzuführen ist, ist nicht sicher erwiesen (Tse et al., 2007).

In vivo $^1\text{HMRS}$ bleibt somit bis heute eine Herausforderung. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet ist jedoch vielversprechend, insbesondere hin zu einer verbesserten Auflösung mittels der Erhöhung der Feldstärke durch höhere Tesla - Geräte (Charles D. Blundell, 2006), (Tse et al., 2007).

3.2.4 High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) $^1\text{HMRS}$

Die Protonen-Magnetresonanzspektroskopie $^1\text{HMRS}$ wird vor allem bei flüssigen Proben angewendet (Friebolin, 2013). Bei Feststoffen sind die anisotropen Wechselwirkungen zwischen den Atomkernen stärker als bei Flüssigkeiten und können nicht durch Molekularbewegungen ausgeglichen werden. Dies hat zur Folge, dass die MR-Spektren von Feststoffen aufgrund einer Linienverbreiterung wesentlich schlechter aufgelöst sind, was die Auswertung erschwert (Cheng et al., 1998a). Besonders in fettreichen Geweben wie Brustgewebe gehen die Metabolitensignale oft im Fettsignal unter und sind nicht voneinander abgrenzbar (Mountford et al., 1993). Die Konzentrationen der einzelnen Cholinmetaboliten sind bis heute mit konventioneller $^1\text{HMRS}$ und den handelsüblichen 1,5 Tesla nicht voneinander abgrenzbar (Tse et al., 2007). Auch mit verschiedenen rechnerischen und technischen Methoden zur Unterdrückung der Fett- oder Wassersignale kann nur die Überlappung der Resonanzen aller Cholinmetaboliten zusammen, der sogenannte Gesamtcholin-Gipfel (Englisch: „total choline signal“), genutzt werden, um malignes von benignem Gewebe zu unterscheiden (Bolan et al., 2003, Tse et al., 2007).

In vielen MR-Studien werden die Inhaltsstoffe aus den Zellen extrahiert. So entsteht eine homogene Flüssigkeit, die für die MR-Messungen verwendet werden kann (Eliyahu et al., 2007). Eine weitere Untersuchung des Gewebes ist somit im Nachhinein nicht mehr möglich.

Außerdem können bereits die Bearbeitung des Gewebes und Zelllyse eine Veränderung der Metabolitenkonzentrationen zur Folge haben. Dies erschwert eine spätere Aussage über den tatsächlichen Gewebezustand (Mountford et al., 1993). Bei intaktem Gewebe kann deshalb das „High Resolution Magic Angle Spinning“ $^1\text{HRMAS}$ zum Einsatz kommen. Durch eine schnelle Rotation der Probe von bis zu 70 Hz um eine Achse, die um den sogenannten „Magic Angle“ (Deutsch: Magischer Winkel) zum Hauptmagnetfeld B_0 gekippt ist, erreicht man eine verbesserte Signalqualität. Dieser „Magic Angle“ beträgt $54,74^\circ$ und wurde erstmalig von Professor Raymond Andrew von der Nottingham Universität beschrieben. Die anisotropen und Dipolwechselwirkungen werden damit aufgehoben und die entstehenden MR-Spektren sind besser aufgelöst, die verschiedenen Metaboliten also genauer voneinander abgrenzbar (Abb. 6) (Andrew et al., 1959, Cheng et al., 1997), (Hesse M, 2007). Die typischerweise verwendete Probenmasse liegt bei ungefähr 10-60 mg. Durch den Einsatz spezieller Spulen, kann jedoch auch die Messung von bis zu 0,2 mg schwerem Gewebe verwertet werden (Hu, 2016).

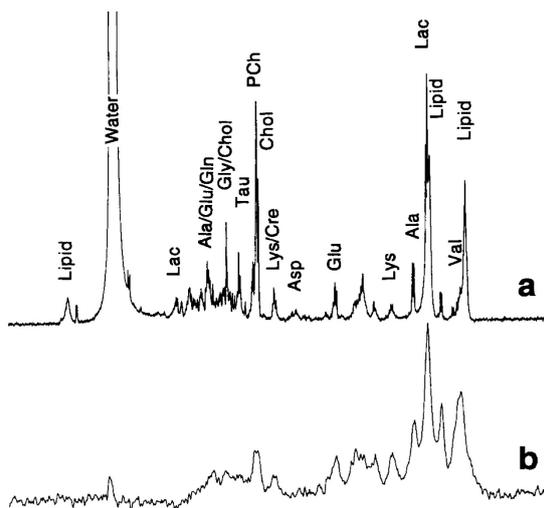


Abb. 6: Verbesserung der Auflösung mittels High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS). a) HRMAS ^1HMR -Spektrum von Brustkrebsgewebe, b) konventionelles ^1HMR -Spektrum desselben Gewebestücks. Modifiziert nach (Cheng et al., 1998b).

Man erreicht mittels HRMAS eine verbesserte Untersuchung von Feststoffen, insbesondere von intaktem ex vivo Gewebe. Eine anschließende histologische Untersuchung kann am selbigen Gewebeabschnitt vorgenommen werden und erlaubt somit präzisere Rückschlüsse (Cheng et al., 1997). Dies ist besonders bei Brustkrebsgewebe aufgrund der großen Heterogenität im Tumor sehr wertvoll. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch die durch Messdauer und Drehzahl eingeleitete Temperaturerhöhung zu Veränderungen im gemessenen Gewebe führen kann. Prof. Chengs Arbeitsgruppe am Institute of Radiopathology des Massachusetts General Hospital, Boston, MA und der Harvard University, Cambridge, MA, USA

erforscht seit vielen Jahren mit Hilfe des HRMAS ^1HMR S die metabolische Zusammensetzung der verschiedensten Gewebe für unterschiedliche biomedizinische Anwendungen (Cheng et al., 1997, Cheng et al., 2005, Jordan et al., 2009, DeFeo and Cheng, 2010). Im Hinblick auf das Mammakarzinom gelangen ihm bereits die folgenden Nachweise (Cheng et al., 1998b):

1. Es ist möglich mit HRMAS ^1HMR S hochauflösende Spektren von intakten Mammagewebestücken zu gewinnen. Dies geschieht unter Kühlung auf eine Temperatur von 4° im MR-Spektrometer, wodurch verhindert wird, dass das Gewebe degradiert. Eine vorherige Bearbeitung der Proben und damit das Risiko einer etwaigen Verfälschung der in vivo Bedingungen ist nicht notwendig.
2. Spektren von bösartigem Gewebe können von den Spektren von gutartigem Gewebe unterschieden werden.
3. Die Spektrenregion 3,0 – 4,2 ppm ist frei von Überlagerungen durch Fett- oder Wassersignale und enthält Metaboliten wie Phosphocholin, Cholin, Glycerophosphocholin, Laktat und Taurin, welche eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen und aufgrund ihrer Hydrophilie sehr gut mittels ^1HMR S darstellbar sind.

3.3 Phosphatidylcholin und der Kennedy-Zyklus

Phosphatidylcholin ist wie Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol ein Phospholipid. Phospholipide sind der Hauptbestandteil der strukturgebenden Zellmembranen eukaryotischer Zellen. Weiterhin kommen sie in Serum-Lipoproteinen sowie im Surfactant der Lunge vor und sind als Substrat der Phospholipasen Teil der Signaltransduktion in der Zelle (Exton, 1994, McDermott et al., 2004, Akella and Deshpande, 2013, Skipski et al., 1967, Goerke, 1998).

Die Biosynthese von Phosphatidylcholin im Menschen findet hauptsächlich im Rahmen des sogenannten Kennedy-Zyklus an der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums statt (Kennedy, 1958, Kennedy and Weiss, 1956).

Cholin wird vermehrt zur Synthese von Phosphatidylcholin bereitgestellt. Dies geschieht aus intrazellulären Reserven, gesteigertem Transport über die Zellmembran und durch die Glycerophosphocholin Phosphodiesterase, welche die Hydrolyse von Glycerophosphocholin zu Cholin und Glycerol-3-phosphat katalysiert (Abb. 7).

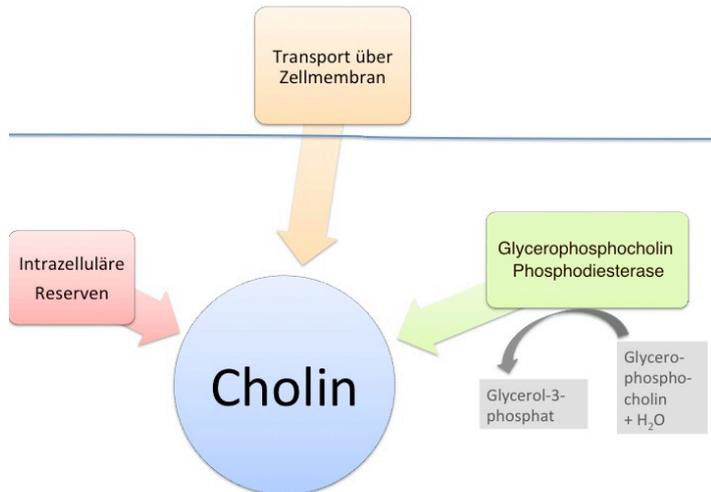


Abb. 7: Kennedy Zyklus, Wege zur Bereitstellung von Cholin (eigene Grafik basierend auf (Glunde et al., 2004b)).

Im nächsten Schritt wird Cholin zu Phosphocholin umgewandelt. Dieser Schritt wird von der Cholin Kinase mittels Verbrauch von ATP herbeigeführt. Dann wird Phosphocholin von der Phosphocholin Cytidylyltransferase zu CDP-Cholin umgewandelt. Anschließend katalysiert die Diacylglycerol Cholinphosphotransferase die Kondensation aus CDP-Cholin und Diacylglycerol zu Phosphatidylcholin (Abb. 8).

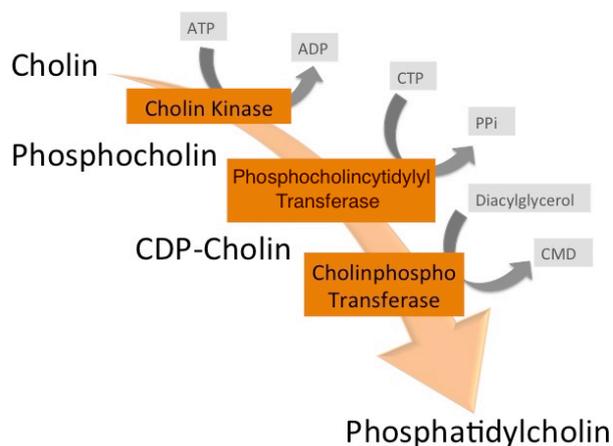


Abb. 8: Kennedy-Zyklus, Schritte der Phosphatidylcholin Synthese (eigene Grafik basierend auf (Glunde et al., 2004b)).

In der menschlichen Leber kann Phosphatidylcholin auch aus dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin gewonnen werden (Vance and Ridgway, 1988, Kanfer, 1980, Gaynor et al., 1991). Hierfür wird Phosphatidylethanolamin dreifach methyliert (Abb. 9). Dieser alternative Weg macht in der Leber etwa 30% der Phosphocholin-Synthese aus (DeLong et al., 1999).

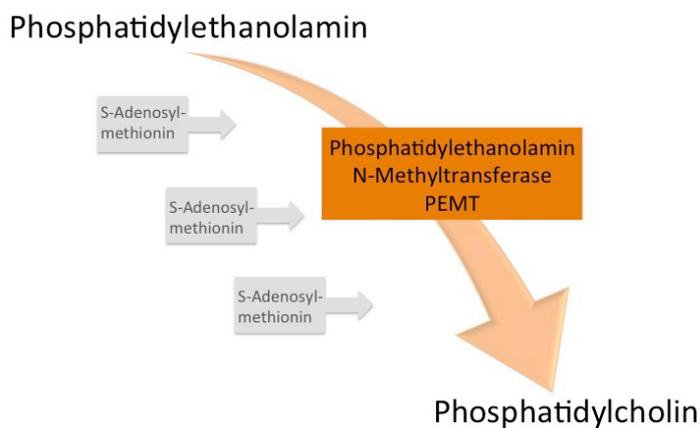


Abb. 9: Synthese von Phosphatidylcholin durch 3-malige Methylierung von Phosphatidylethanolamin. (eigene Grafik basierend auf (Glunde et al., 2004b)).

Mittels Transferproteinen oder Vehikeln werden die Phospholipide schließlich zur Membran transportiert und dort eingebaut.

Der Kennedy-Zyklus spielt vor allem dann eine Rolle, wenn die Zelle neue Membranen zur Zellteilung oder zum Wachstum benötigt. Heute wissen wir, dass er bei vielen Tumoren wie zum Beispiel beim Brustkrebs, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Neuroblastom, Meningeom oder Ovarialkarzinom eine wesentliche Rolle in der Karzinogenese spielt (Glunde et al., 2011), (Janardhan et al., 2006). Außerdem wurde entdeckt, dass der Kennedy-Zyklus an Entzündungsprozessen – auch hier findet Zellproliferation statt - maßgeblich beteiligt ist. Eine Studie von Glunde et al. konnte an malignen Zellen zeigen, dass die Gabe des Entzündungshemmers Indometacin zu einer Veränderung der Cholinmetaboliten führt. Das Metabolitenprofil glich nach der Behandlung eher dem Profil von gesunden Zellen (Glunde et al., 2002). Weiterhin sind die Metaboliten des Kennedy-Zyklus bei Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose und Morbus Gaucher von Bedeutung (Inglese et al., 2003, Bodenec et al., 2002, Pettegrew et al., 1997).

Die Regulierung des Kennedy-Zyklus ist sehr komplex und noch nicht hinreichend untersucht. Die beteiligten Enzyme befinden sich in verschiedenen Zellkompartimenten, wo sie unter anderem von Karzinogenen aktiviert werden können. Beispielsweise befindet sich die Phosphocholincytidyltransferase zu einem großen Teil inaktiv in Reservoiren im Zytosol. Die Anwesenheit von freien Fettsäuren führt zu einer Ausschüttung des Enzyms ins Zytosol. Dieses bindet dann meist an die Membran des endoplasmatischen Retikulums und liegt dort als aktive Form vor. Das Endprodukt Phosphatidylcholin führt wiederum zu einer Dissoziation des Enzyms von der Membran und somit zu einer Deaktivierung (Vance, 1990).

Auch für die Cholinase wurden verschiedene Regulatoren entdeckt. So können freies Calcium, eine hyperosmolare Umgebung, Hypoxie oder Onkogene wie Raf-1, Ral-GDS und PI3K die Produktion und Aktivierung der Cholinase herbeiführen (Huang et al., 2009, Casali et al., 2013, Glunde et al., 2008, Janardhan et al., 2006, Ramirez de Molina et al., 2002b). Eine Hemmung der Cholinase kann mit Hemicholinium-3, einem Hemmer des high-affinity Cholintransporters, herbeigeführt werden (Ratnam and Kent, 1995). Da Hemicholinium-3 aber auch gleichzeitig auch den Cholintransport hemmt, ist es nicht besonders spezifisch und sogar neurotoxisch. Das zuvor erwähnte MN58b zählt zu den spezifischen Hemmern der Cholinase (Al-Saffar et al., 2006).

Ras oder Ras-ähnliche Onkogene und durch Umweltfaktoren ausgelöster Zellstress sind ebenfalls auf unterschiedliche Arten regulatorisch wirksam. Sie führen zu vermehrter oder verminderter Produktion der verschiedenen Enzyme des Kennedy-Zyklus und können diese aktivieren beziehungsweise deaktivieren (Ronen et al., 2001, Janardhan et al., 2006, Zhu and Bakovic, 2012)

3.4 Cholinase

Die genauere Untersuchung der Cholinase ist der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit. Das Enzym wurde ausgewählt, weil es das erste der drei Hauptenzyme des Kennedy-Zyklus ist und somit direkten Einfluss auf die cholinhaltigen Metabolite hat. Es katalysiert die Reaktion von Cholin zu Phosphocholin unter Verbrauch von ATP.

Die Cholinase wurde 1952 von Wittenberg und Kornberg erstmalig beschrieben und aufbereitet. Mittlerweile kennt man verschiedene Isoformen des Enzyms. In jüngster Zeit gelang die Identifizierung zweier Gene im Menschen, die beide für die Cholinase kodieren: ck- α und ck- β (Aoyama et al., 2000, Hosaka et al., 1992). 1992 entdeckten Uchida et al. zuerst das Gen ck- α in Rattenleberzellen (Uchida and Yamashita, 1992). Es kodiert für die Isoformen α 1-Cholinase und α 2-Cholinase, die durch alternatives Splicing entstehen (Uchida, 1994). 1998 fanden Aoyama et al. ein zweites Gen ck- β im Genom von Rattennieren und später auch im Genom der Maus. Dieses zweite Gen ck- β ähnelt der Nukleotidsequenz des Gens ck- α mit einer Übereinstimmung von 65 %. Es kodiert die Isoform β -Cholinase (Aoyama et al., 1998). Die verschiedenen Isoformen werden ubiquitär und gleichzeitig in verschiedenen Organsystemen produziert (Aoyama et al., 2002).

Außerdem liegt das aktive Enzym später als Homo- oder Heterodimer vor.

Eine weitere Studie von Aoyama konnte an Leberzellen der Maus zeigen, dass 60% der aktiven Cholinkinase Enzyme als α/β -Heterodimer vorliegen, wogegen nur 20% jeweils α/α - beziehungsweise β/β -Homodimere sind (Aoyama et al., 2004). In der Studie konnte nicht zwischen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Cholinkinase Monomer unterschieden werden. Es war zunächst von keinem funktionellen Unterschied ausgegangen worden (Aoyama et al., 2004).

Setzte man die Leberzellen Karzinogenen wie Tetrachlormethan oder Polyzyklischen Kohlenwasserstoffen aus, so konnte dadurch die Aktivität der Cholinkinase sehr schnell und signifikant gesteigert werden (Ishidate et al., 1980, Ishidate et al., 1983). Dies ließ schon früh vermuten, dass die Cholinkinase eine bedeutsame Rolle in der Tumorentstehung spielt. Später fand man ebenfalls eine gesteigerte Cholinkinase Enzymaktivität in Lysaten von Tumorzellkulturen, ras-induzierten Zellen, sowie chirurgisch entnommenen menschlichen Tumorproben (Iorio et al., 2010, Iorio et al., 2005, Ramirez de Molina et al., 2001). Aoyama et al. fanden außerdem heraus, dass die Induktion durch Tetrachlormethan vor allem eine Expressionssteigerung des $ck-\alpha$ Gens, nicht aber des $ck-\beta$ Gens zur Folge hat (Aoyama et al., 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Iorio et al. Sie verglichen epitheliale Ovarialtumor-Zellkulturen mit gesunden epithelialen Ovarialzellen. Auch hier stellte man ein hochreguliertes $ck-\alpha$ Gen bei den Tumorzellen fest, während die Expression von $ck-\beta$ nicht signifikant verändert war (Iorio et al., 2010). Dementsprechend kommt es in Tumorzellen vor allem zu einem Anstieg von α -Cholinkinase Monomeren und somit häufiger zur Ausbildung des α/α -Homodimers (Abb. 10) (Aoyama et al., 2002).

	α/α	α/β	β/β
Normale Leber	20%	60%	20%
CCl₄ induzierte Leber	75%	15%	10%

Abb. 10: Konfiguration der aktiven Cholinkinase in gesunden Mäuseleberzellen und nach Zuführung von Tetrachlorkohlenstoff CCl₄ modifiziert nach (Aoyama et al., 2004)

Bis zum heutigen Zeitpunkt bleibt jedoch weitgehend ungeklärt, welche Funktion die drei unterschiedlichen Isoformen haben, die sowohl durch alternatives Splicing als auch zwei verschiedene Genloci entstehen (Aoyama et al., 2000). Bekannt ist allerdings, dass das α/α -Dimer eine höhere Spezifische Aktivität im Sinne von einer höheren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und Michaeliskonstante K_m für Cholin und ATP aufweist als das β/β -Dimer. Daraus lässt sich ableiten, dass die Spezifische Aktivität des α/β -Dimers wahrscheinlich dazwischen liegt (Aoyama et al., 2004). Weitere Forschung hat ergeben, dass vor allem die $\alpha 1$ -Cholinkinase in der Tumorgenese eine Rolle spielt. Ihre selektive Inhibition ist ein Hauptau-

genmerk gegenwärtiger Versuche spezifische Therapieansätze zu entwickeln (Gallego-Ortega et al., 2011, Banez-Coronel et al., 2008).

Viele der publizierten Studien weisen darauf hin, dass die Expressionssteigerung und Aktivierung der Cholinase zur vermehrten Produktion von Phosphocholin führt. In vielen Tumoren und Krebszellkulturen wurde ein erhöhter Phosphocholingehalt beobachtet (Evanochko et al., 1984, Daly et al., 1987, Hernandez-Alcoceba et al., 1997, Ackerstaff et al., 2003, Iorio et al., 2010, Iorio et al., 2005, Aboagye and Bhujwala, 1999, Ackerstaff et al., 2001, Eliyahu et al., 2007, Glunde et al., 2004b).

Karzinogene, Onkogene, Wachstumsfaktoren und auch mechanischer Zellstress stimulieren die Phosphocholinproduktion zwar hauptsächlich, aber nicht allein durch eine Überexpression beziehungsweise Aktivierung der Cholinase. Es gibt auch noch weitere Wege, über die Phosphocholin intra- und extrazellulär gewonnen werden kann:

1. Cholinase: Phosphorylierung von Cholin zu Phosphocholin (siehe oben)
2. Phospholipase D: Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Phosphatidssäure und Cholin, mit anschließender Phosphorylierung durch die Cholinase (Hammond et al., 1995, Kodaki and Yamashita, 1997)
3. C-reaktives Protein: Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Phosphocholin und Diacylglycerol bei Entzündung und Zellverwundung (Mookerjee and Hunt, 1995)
4. Sphingomyelinase: Hydrolyse von Sphingomyelin zu Phosphocholin (Spence, 1993, Marathe et al., 1998)

Das gewonnene Phosphocholin wiederum spielt eine entscheidende Rolle als Second Messenger in der Signaltransduktion zur wachstumsfaktorvermittelten Fibroblastenproliferation (Cuadrado et al., 1993, Jimenez et al., 1995, Kiss, 1999). Lacal et al. fanden heraus, dass eine Inhibition der Cholinase zu einem signifikanten Abfall der wachstumsfaktorvermittelten Mitose bei Zellkulturen führt (Hernandez-Alcoceba et al., 1997). Cholinase Überexpression führte dagegen in einem anderen Experiment zu einer onkogenen Zelltransformation und damit zu einem Anstieg der Kolonien (Ramirez de Molina et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass die Cholinase und ihr Produkt Phosphocholin essentielle Faktoren in der Mitogenese sind. Es bleibt die Frage, ob man an ihnen sogar die Zellteilungsrate von Tumoren ablesen kann und damit ihr malignes Potential erkennen oder eine Korrelation zum histologischen Grad herstellen kann. Um Cholin für die Synthese von Phosphocholin bereitzustellen, wird

auch Glycerophosphocholin abgebaut (Abb. 7). Daraus resultiert in Tumoren eine erhöhte Phosphocholin/Glycerophosphocholin Ratio (Bhakoo et al., 1996, Aboagye and Bhujwalla, 1999) (Glunde et al., 2004b). Diese Verhältnisverschiebung von Glycerophosphocholin in benignen Zellen zu Phosphocholin in malignen Zellen ist charakteristisch für unterschiedlichste Tumorentitäten und gilt deshalb als vielversprechender Marker für die Krebsdiagnostik (Glunde et al., 2004b).

Nicht zuletzt aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Inhibition der Cholin kinase ein vielversprechender Ansatzpunkt der gegenwärtigen Forschung zur Antitumorthherapie (Campos et al., 2003, Janardhan et al., 2006, Hernandez-Alcoceba et al., 1999, Lacal, 2001).

3.5 Cholinmetabolismus und Karzinogenese

Schon in den 80er Jahren begann man, mittels Phosphor-Magnetresonanzspektroskopie Metabolitenprofile von malignen und benignen Brustgeweben zu erstellen. Es gelang die einzelnen Metaboliten-Peaks zu identifizieren und anhand ihres Profils zwischen gesundem und malignem Gewebe zu unterscheiden. Eine wesentliche Rolle schienen schon damals die Cholinmetaboliten zu spielen (Merchant et al., 1988). Später fanden Ting et al. heraus, dass Phosphocholin, Phosphatidylcholin, Glycerophosphocholin und Cholin jeweils alle in malignen Brustzellkulturen signifikant vermehrt zu finden sind im Vergleich zu gesunden Zellkulturen (Ting et al., 1996). In den darauffolgenden Jahren wurden verschiedenste Tumorarten mit der Magnetresonanzspektroskopie untersucht. Fast allen ist eine Erhöhung des Phosphocholins und anderer cholinhaltiger Metabolite gemeinsam (Ackerstaff et al., 2003). Im Moment geht man davon aus, dass der Metabolit Glycerophosphocholin vor allem gesundes Gewebe charakterisiert. Kommt es zur onkogenen Transformation, so wird vermehrt Phosphocholin gebildet und die Phosphocholin/Glycerophosphocholin Ratio erhöht sich. Da diese Veränderungen schon sehr früh in der Zelle stattfinden, bestehen begründete Hoffnungen, dass sich daraus eines Tages die Aggressivität eines Tumors schon vor Ausbildung charakteristischer histopathologischer Merkmale ablesen lässt (Smith et al., 1993).

4 Fragestellung

Die histopathologische Untersuchung und die Bildgebung sind essentielle Instrumente der Diagnostik, Therapiefindung und Einschätzung der Prognose beim Mammakarzinom.

Dennoch spiegeln die morphologischen Veränderungen des Gewebes den aktuellen Metabolismus des Tumors nur bedingt wider, denn metabolische Modifikationen innerhalb der Zelle können schon lange vor morphologisch sichtbaren Zellveränderungen auftreten. Histologie, Mammographie und Magnetresonanztomographie erfassen diese nicht. Es ist deshalb zunehmend interessant auch molekulare Marker von Anfang an in die Klassifikation eines Tumors mit einzubeziehen (Hart et al., 2016). Dabei stellt sich nicht nur die Frage, wie sich die Tumorzelle auf Genomebene verändert, sondern welche Endprodukte sie tatsächlich produziert und was diese wiederum für Auswirkungen haben (Budczies et al., 2013). Mit einem genaueren Verständnis der Stoffwechselprodukte eines Tumors ergeben sich neben einer besseren Risikoeinschätzung auch neue Angriffspunkte für bessere Therapiestrategien. Diese Stoffwechselwege gilt es zu verstehen und dann spezifisch im nächsten Schritt therapeutisch zu beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage: Kann das HRMAS ¹HMRS Metabolitenprofil von intaktem, unbearbeitetem Brustkrebsgewebe Informationen liefern, die zur Risikoeinschätzung und Prognose beim Mammakarzinom dienen können?

In früheren Studien wurde herausgefunden, dass HRMAS ¹HMRS zwischen malignem und benignem Gewebe sowie zwischen verschiedenen Tumorentitäten unterscheiden kann. In dieser Studie wollten wir klären, ob die relative Metabolitenkonzentrationen von Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin in Zusammenhang stehen mit:

- Der Histologie der Probe
- Dem Patientenalter
- Dem Tumorzell-Anteil
- Der Tumor-Art
- Dem Rezeptorstatus (Östrogen-, Progesteron-, Her2-Rezeptor, Triple negativ)
- Dem TNM-Stadium
- Der lokalen Streuung des Tumors
- Der Tumorgröße
- Dem histologischen Differenzierungsgrad G
- Dem Outcome (Mortalität, Rezidivrate)

Folgend aus diesen Korrelationen erhoffen wir uns für die Zukunft die Möglichkeit mittels der Metabolitenprofile schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Aussage über das Krankheitsausmaß, die Tumorfolgen und die Aggressivität des Tumors treffen zu können.

Zusätzlich soll die Frage geklärt werden, ob das Enzym Cholinase in Zusammenhang mit Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen von Phosphocholin, Glycerophosphocholin und Cholin steht und diese womöglich bedingt.

Die Cholinase katalysiert die Reaktion von Cholin und ATP zu Phosphocholin und ADP. Besonders die α -Cholinase gilt im Tumorstoffwechsel als vermehrt aktiv, am ehesten um den gesteigerten Bedarf an Phosphatidylcholin für die Zellmembranen bei der Tumorzellproliferation zu decken. Wir stellten uns die Frage, ob die relative Enzymkonzentration der Cholinase mit relativen Konzentrationsänderungen der cholinhaltigen Metabolite Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin in Zusammenhang steht und für diese maßgeblich verantwortlich sein könnte. Hiermit wäre ein wichtiger Angriffspunkt für zukünftige Therapiestrategien zur Hemmung der Zellproliferation im Tumorstoffwechsel aufgedeckt.

5 Materialien und Methoden

5.1 Probanden und Probegewinnung

Uns wurden 162 maligne und benigne Gewebeproben aus chirurgischen Tumorexstirpationen nach klinischer und bioptisch bestätigter Erstdiagnose Mammakarzinom vom Cancer Center des Massachusetts General Hospital in Boston, MA, USA, bereitgestellt.

Diese wurden jeweils innerhalb von wenigen Minuten nach der chirurgischen Resektion von Pathologen zu kleinen Blöcken mit wenigen Millimetern Kantenlänge präpariert und weniger als zehn Minuten nach Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dies geschah ohne Zusatz von Pufferlösungen. Um eine Veränderung der Metabolitenzusammensetzung im Gewebe zu verhindern, wurde dieses in seiner Naturform eingefroren (Bourne et al., 2003). Die anschließende Lagerung in der Brustkrebsbank erfolgte für maximal 18 Monate in -80°C kalten Gefrierschränken, bevor die Gewebeproben an unsere Forschungsgruppe von Prof. Leo Ling Cheng, Leiter des Radiopathologischen Instituts der Harvard University in Cambridge, MA, United States of America, zur wissenschaftlichen Nutzung übergeben wurden.

In einer vorangegangenen Studie konnte Prof. Cheng bereits belegen, dass diese Art der Lagerung über mehrere Jahre mit keiner Gewebeveränderung im Metabolitenprofil einhergeht (Jordan et al., 2007). Alle Transporte und die Bearbeitung am Gewebe erfolgten auf Trockeneis um einen Tauprozess zu verhindern. Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Gesundes Gewebe stammte aus dem exzidierten und histologisch tumorfreien Randgebiet, dem sogenannten Sicherheitsabstand. Eventuelle Veränderungen der Metabolitenzusammensetzung in dieser Randregion sind durchaus möglich, allerdings ist eine Gewinnung von Brustgewebe gesunder Probanden zu wissenschaftlichen Zwecken ethisch nicht vertretbar.

Jede Gewebeprobe wurde halbiert. Ein Teil wurde zur HRMAS ^1HMR S Messung verwendet, mit dem anderen Teil wurde in 50 Fällen eine semiquantitative Analyse mittels Western Blot durchgeführt (Abb. 11).

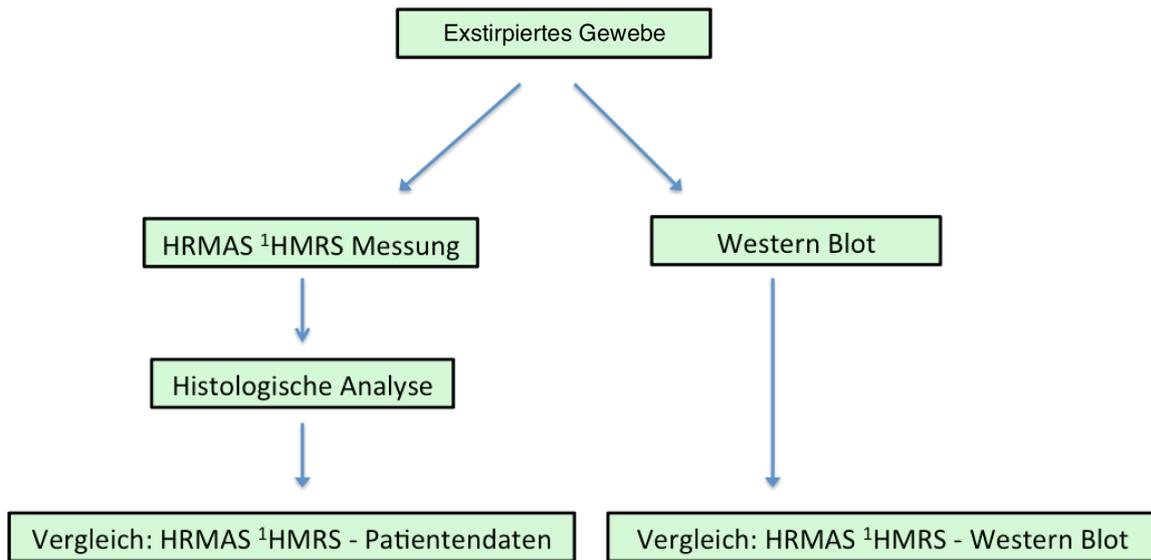


Abb. 11: Schaubild zur Erläuterung des Studienaufbaus.

Die dazugehörigen klinischen und pathologischen Patientendaten wie Alter, Tumortyp, TNM-Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Rezeptorstatus, Zeitpunkt des Rezidivs, falls zutreffend, Todeszeitpunkt, falls verstorben, konnten später, nachdem alle Messungen abgeschlossen waren, anonymisiert aus dem Patientendatensystem des Massachusetts General Hospital abgefragt werden.

Eingeschlossen wurden ausschließlich Proben von weiblichen Patienten mit nahezu vollständiger Krankenakte und dokumentierter erfolgreich durchgeführter Lagerung der Proben. Um eine möglichst genaue Metabolitenzusammensetzung des Gewebes im unbeeinflussten Tumorstoffwechsel zu erhalten, wurden Patientinnen mit präoperativer Antitumorthherapie und Patientinnen, die in den 12 Monaten vor der Exstirpation geboren oder gestillt hatten, von der Studie ausgeschlossen.

Die Studie war zuvor von der zuständigen Ethikkommission genehmigt worden und alle Patientinnen hatten nach ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

5.2 Materialien

Eine Liste aller verwendeten Geräte, Arbeitsmittel und Reagenzien befindet sich im Anhang.

5.3 Methoden

5.3.1 HRMAS ^1H MRS

5.3.1.1 HRMAS ^1H MRS Messungen

Die relativen Cholin-, Phosphocholin- und Glycerophosphocholinkonzentrationsmessungen wurden am Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging des Massachusetts General Hospitals und der Harvard University mit einem 600 MHz bzw. 14,1 Tesla Bruker AVANCETM Spektrometer (Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA) durchgeführt. Als Kopfspule wurde ein 4 mm großer Rotorkopf verwendet, in dem ein Kel-F Kunststoffeinsatz als kugelartiger 10 μl Probenbereich diente. Jede Probe wurde vor der HRMAS ^1H MRS Messung gewogen und daraufhin in die rotierende Induktionsspule eingebracht. Als externe Kontrolle zur Kalibrierung der Chemischen Verschiebung und der Quantifizierung wurde Silikongummi (Tetramethylsilan, $\delta = 0,1$ ppm) verwendet, welcher die Probe selbst nicht berührte. Als interne Referenz orientierten wir uns im MR-Spektrum am einfach erkennbaren Alanin-Signal bei 1,47 ppm. Dieses wurde als Nulllinienreferenz der Chemischen Verschiebung auf der x-Achse verwendet.

Die maximal mögliche Aufbewahrung von schockgefrorenen Proben und der damit einhergehende Qualitätsverlust werden kontrovers diskutiert (Mountford et al., 2009, Sitter et al., 2002). Ein Auftauvorgang kann wiederum zur Zellyse führen (Mountford et al., 2009) (Bourne et al., 2003). In unseren Untersuchungen wurden alle Messungen bei 4°C durchgeführt um Gewebedegradation zu minimieren.

Die Genauigkeit der HRMAS ^1H MRS Messwerte nimmt bei längerer Messdauer zu, die Qualität der Probe nimmt jedoch ab. Beim HRMAS ^1H MRS könnte es auch durch die hohe Drehzahl zu einer kritischen Temperaturerhöhung kommen und einen Auftauvorgang einleiten. Für ein hochaufgelöstes und rauschfreies Spektrum ist jedoch eine hohe Drehzahl notwendig. (Abb. 12).

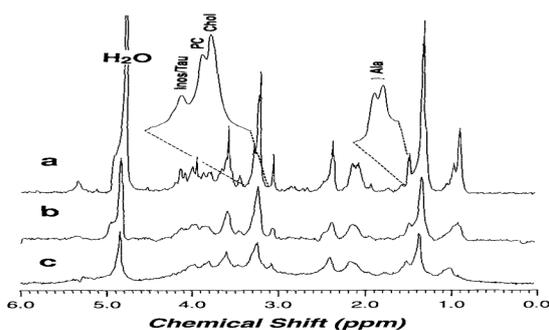


Abb. 12: HRMAS ^1H MRS Spektren von Lymphknotenmetastasen einer Ratte bei einer Drehzahl von a) 4,0 kHz, b) 1,0 kHz und c) ohne Spinning. Das Signal/Rausch Verhältnis und die Auflösung verbessern sich mit zunehmender Drehzahl. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von (Cheng et al., 1996)

Um die Stabilität des Gewebes während des Messvorgangs zu prüfen wurde in vorangegangenen Untersuchungen exakt dasselbe maligne Gewebestück zwei Mal im Abstand von zwei Stunden gemessen, damals noch bei 20°C. Beide Untersuchungen zeigten keine messbaren biochemischen Veränderungen (Abb. 13) (Cheng et al., 1998b).

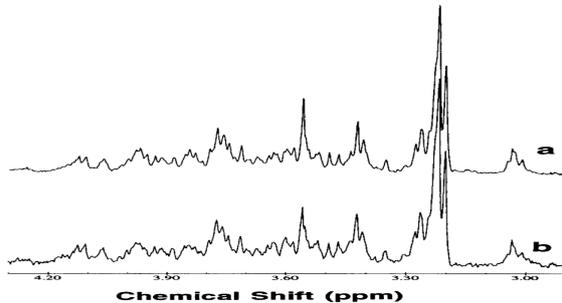


Abb. 13: HRMAS ^1HMR -Spektrum der Mamma-Gewebeprobe einer Patientin mit duktalem Mammakarzinom Grad 2 im Abstand von 2 Stunden bei 20°C. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von (Cheng et al., 1998b).

Das Hauptmagnetfeld B_0 wurde vor jeder Messung neu kalibriert um gleiche Ausgangsbedingungen für die einzelnen Messungen zu schaffen. Der Bruker Magic Angle Spinning Controller hielt die Drehgeschwindigkeit des Rotorkopfes während der Messungen bei 3600 Hz (± 1). Als T2-Filter, um eine Spektrenverbreiterung aufgrund von Lipiden zu reduzieren, wurde synchron zum Rotorkopf eine Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Sequenz verwendet. π -Zwischenpulse wurden durch ein um 90° phasenverschobenes Wechselfeld B_1 in Abständen von 10 μs erzeugt. Dadurch wurden 360 Spin-Echos und deren vollständigen Relaxationszeiten gemessen. Es ergab sich eine T2-Filterzeit von 200 ms (Jordan et al., 2010).

128 Messungen wurden gemittelt, wobei das Wiederholungsintervall 5 Sekunden und die Spektrenweite 8 kHz (20 ppm) betragen. Nach der Messung wurden die Proben sofort in Formalin eingelegt und bis zur weiteren Bearbeitung darin gelagert.

5.3.1.2 Histologische Evaluation

Nach der HRMAS $^1\text{HMRS}$ Messung wurden die Proben sofort über 8-12 Stunden mit 10% Formalin fixiert. Danach wurden sie in aufsteigender Reihe mit Alkoholkonzentrationen von 80, 90, 95 und 100% für jeweils mindestens 30 Minuten dehydriert. Daraufhin wurden die Proben mit Xylol gespült, in Paraffin Wachsblöcke gebettet und in 5 μm dünne Scheiben geschnitten. Von jeder Probe wurden auf diese Weise Serienschnitte mit einem Abstand von jeweils 100 μm geschnitten und auf geladene Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) eingefärbt (Tab. 2). Diese dient zur besseren Differenzierung zwischen eosinophilen Zellbestandteilen wie Zellplasmaproteinen, welche rot gefärbt werden

und basophilen Strukturen wie die Ribonukleinsäuren im Zellkern, die eine blaue Farbe annehmen. Zum Schluss wurden sie mit Deckgläschen eingedeckt (Abb. 14).

Xylol	10 Minuten
100% Ethanol	4 Minuten
95% Ethanol	2 Minuten
Spülen mit destilliertem Wasser	
Hämatoxylin	5 Minuten
Spülen mit destilliertem Wasser	
Bluing Reagent	10 Mal eintauchen
Spülen mit destilliertem Wasser	
95% Ethanol	10 Mal eintauchen
Eosin	10 Minuten
95% Ethanol	10 Mal eintauchen
100% Ethanol	10 Mal eintauchen
Xylol	5 Minuten

Tab. 2: H&E Färbeprotokoll für formalin-fixiertes und paraffin-gebettetes Gewebe

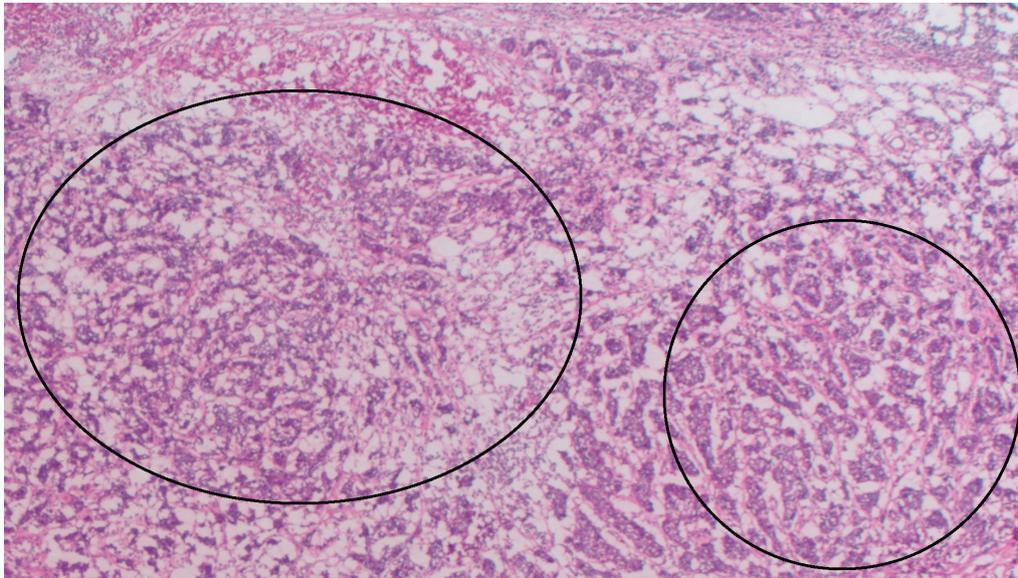


Abb. 14: Beispiel eines H&E-gefärbten Gewebeschnitts mit Mammakarzinom (umrandet).

Zur Beurteilung der histopathologischen Zusammensetzung der gemessenen Proben wurde ein Olympus BX41 Mikroskop verwendet. Der Anteil an Tumorzellen in Epithel und Stroma

wurde mit Hilfe der Bildanalyse Software MicroSuite ermittelt. Dies geschah ohne das Wissen des zugehörigen Ergebnisses aus der Spektrenanalyse. Die Zellanteilergebnisse der einzelnen Serienschnitte wurden für jeweils die gesamte Probe gemittelt.

5.3.2 Western Blot

5.3.2.1 Gewebeschnitte mit dem Kryostat

Der in 50 Fällen vor der HRMAS ¹HMRS Messung abgetrennte Teil der Gewebestücke wurde mittels Kryostat geschnitten. Die Temperatur lag zu allen Zeiten dieser Methode bei - 20 °C. Hierfür wurden die Gewebelöcke auf einen speziellen Halter gebracht und in das Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte OCT eingebettet. Daraufhin konnten sie mit dem Kryostat geschnitten werden. Es wurden jeweils 12 Gefrierschnitte gemacht. Für die Schnitte Nummer 1, 2, 11 und 12 der Folge wurde eine Dicke von 10 µm gewählt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und sofort zur Hämatoxylin und Eosin Färbung verwendet. Für die Schnitte Nummer 3 - 10 wurde eine Dicke von 50 µm gewählt, um später möglichst viel Gesamtprotein daraus gewinnen zu können. Die Schnitte wurden auf ungeladene Objektträger aufgetragen, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass die Ausrichtung genau der anatomischen Lage im Gewebestück entsprach. Sie wurden nicht mit Deckgläschen belegt und kurzzeitig wieder bei - 80 °C eingefroren (Abb. 15).

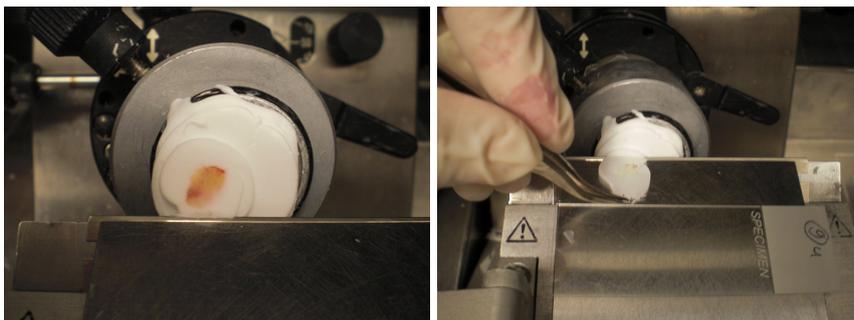


Abb. 15: Gewebeschnitte mit dem Kryostat.

5.3.2.2 Histologische Auswahl der Tumorbereiche

Für die mikroskopische Analyse der 10 µm Kryostat Gewebeschnitte erfolgte eine Hämatoxylin und Eosin Färbung (Tab. 3). Zum Schluss wurden die Objektträger mit Deckgläschen eingedeckt.

70% Ethanol	1 Minute
Spülen mit destilliertem Wasser	
Hämatoxylin	5 Minuten
Spülen mit destilliertem Wasser	
Bluing Reagent	30 Sekunden
Spülen mit destilliertem Wasser	
70% Ethanol	15 Mal eintauchen
95% Ethanol	15 Mal eintauchen
Eosin	1 Minute
95% Ethanol	15 Mal eintauchen
100% Ethanol	1 Minute
Xylol	2 Minuten

Tab. 3: H&E Färbeprotokoll zur Färbung von OCT-gebettetem Gewebe

Mit einem Olympus BX41 Mikroskop wurde geprüft, ob histologisch ein ausreichend großes Tumoraggregat vorlag. Je nach Ausdehnung auf dem angefärbten Präparat wurden die jeweils in Folge geschnittenen noch tiefgefrorenen Schnitte vollständig oder nur der Teil, der Tumor enthielt, für die Analyse weiter verwendet. Auch die Benignität der gesunden Gewebeproben wurde überprüft.

5.3.2.3 Proteinextraktion

Um die Cholinase genauer zu beurteilen, mussten zunächst alle Proteine von den übrigen Zellbestandteilen getrennt werden. Hierzu wurden zunächst die Zellen zerstört. Die Proteinextraktion wurde so durchgeführt, dass die Proteine nach Möglichkeit vollständig und intakt isoliert wurden, so dass die Auslese möglichst genau die in vivo Bedingungen repräsentierte.

Die Karzinomanteile wurden von den verbleibenden tiefgefrorenen Objektträgern genommen und in ein Eppendorf Gefäß mit 80 µl Proteinextraktionspuffer überführt (Abb. 16). Daraufhin erfolgte eine Aufspaltung der Zellwände mittels Ultraschallhomogenisator auf Eis (18 Watt, 10 Zyklen à 20 Sekunden mit 60 Sekunden Pausenintervall). Die Zelllysate wurden 20 min in Eis inkubiert und dann zentrifugiert (20.000 U/min, 40 min, 4 °C) um Zelltrümmer zu sedimentieren. Die Überstände mit dem enthaltenen Gesamtprotein wurden in neue Eppendorf Gefäße gefüllt und wieder bei - 80 °C eingefroren.

20 µl des jeweiligen Überstands wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford verwendet. Zum restlichen Überstand wurde 6X SDS-Sample Puffer hinzugefügt (1:1,2 Verdünnung) und für 5 min auf 50 - 80 °C erhitzt. Danach wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung im Western Blot wieder bei - 80 °C eingefroren.

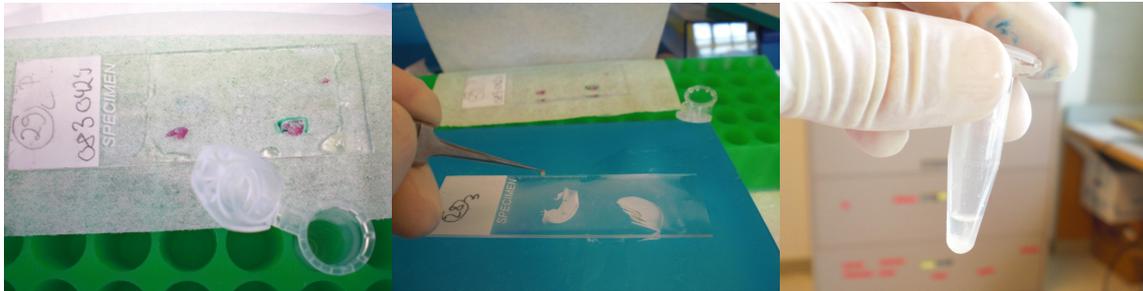


Abb. 16: Vorbereitung zur Proteinextraktion aus malignen Zellen.

5.3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bradford Methode dient zur photometrischen Konzentrationsbestimmung gelöster Proteine (Bradford, 1976). Sie beruht auf einer Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250 von 470 nm auf 595 nm bei spezifischer Bindung an Proteine (Compton & Jones, 1985). Je nach Proteinkonzentration fällt der Farbumschlag stärker oder schwächer aus. Die Absorptionzunahme des Farbstoff-Protein-Komplexes kann also bei 595 nm mit Hilfe eines Spektrometers quantitativ bestimmt werden. Der Vergleich mit einer Eichgeraden einer Substanz mit bekannter Proteinkonzentration ermöglicht eine relative Proteinquantifizierung der Probe.

Nach Empfehlung im Herstellerprotokoll wurde das Farbstoff-Reagenz-Konzentrat im Verhältnis 1:4 in destilliertem Wasser gelöst und gefiltert.

Zur Herstellung der Eichreihe wurde bovines Serumalbumin BSA (1 mg/ml dH₂O) in fünf verschiedenen Verdünnungen (0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 1,00µg/ml, 1,50 µg/ml, 2,00 µg/ml) erstellt. Je 10 µl Duplikate der BSA-Standardlösungen und Proteinproben wurden in separate Vertiefungen einer Mikrotitrierplatte gegeben. 200 µl des filtrierten Bradford-Reagenz wurden in jede Vertiefung hinzugegeben und mit der Pipettenfunktion vermischt. Die Pipettenspitzen wurden für jede Vertiefung erneuert. Zur Verstärkung des Farbumschlags wurde die Mikrotitrierplatte 10 min inkubiert.

Daraufhin wurde die Absorption der einzelnen Vertiefungen im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mittels linearer Regression der Eichgeraden wurde dann die Proteinkonzentration der Proben ermittelt (Abb. 17, 18).

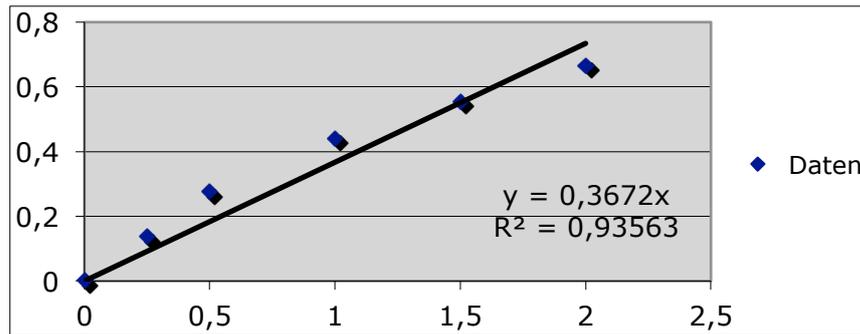


Abb. 17: Kalibrierungskurve zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford, $x \triangleq$ Absorption_{595 nm}, $y \triangleq$ Konzentration_{BSA} in µg/ml



Abb. 18: Versuchsaufbau Proteinquantifizierung nach Bradford.

5.3.2.5 Western Blot

Die Methode des Western Blottings erlaubt dem Untersucher mit Hilfe eines Antikörpers die relative Quantifizierung eines bestimmten Proteins in verschiedenen Proben. Die Proteingemische werden mittels Gelelektrophorese getrennt und per Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran, die sogenannte Trägermembran übertragen (engl. Blotting). Danach können die einzelnen Proteine immunologisch mit spezifischen Antikörpern und durch eine nachfolgende Farbreaktion nachgewiesen werden (Renart et al., 1979).

Für die Trennung der Proteine nach ihrer Größe wurde Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die proteinhaltigen Proben wurden hierzu zusammen mit dem SDS-Puffer für 10 Minuten bei 70°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Der Puffer hat die Eigenschaft sich um die bei der Denaturierung entstehenden Polypeptidketten zu lagern und deren Eigenladung zu verändern. Somit haben alle Polypeptidketten danach eine konstante negative Ladung pro Masseinheit. Wird nun eine elektrische Spannung angelegt, so trennen sich die Ketten ausschließlich nach dem jeweiligen Molekulargewicht und nicht nach ihrer Ladung.

Es wurden 100 µg Protein von jeder Probe verwendet. Das benötigte Volumen an Proteinlösung wurde aus der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt. Die Proteinlösung wurde mit 20 µl Ladepuffer und 4 µl β-Mercaptoethanol in ein Eppendorf-Gefäß auf Eis gegeben und mit destilliertem H₂O auf 80 µl aufgefüllt. Das Eppendorf-Gefäß wurde zur Denaturierung der Proteine 10 Minuten lang bei 70 °C auf einem Heizblock erhitzt um die Bindung von SDS zu ermöglichen. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelkassette. Die Proben durchliefen dabei zunächst ein großporiges Sammelgel um die Proteine zu konzentrieren und später als abgrenzbare Bande sichtbar zu machen. Dann durchliefen sie ein kleinporiges Trenngel (10% Polyacrylamid) zur Auftrennung nach ihrer Größe. Jede Probe wurde in eine Tasche gegeben. Des Weiteren wurde auf jedem Gel eine Tasche mit 30 µg überexprimierter Cholinkinase-Lösung als Standard mit bekannter Laufweite von 48 kDa befüllt.

Danach wurde eine Spannung von 160 Volt an die Gelkassette angelegt bis die Einfärbung der Proben auf dem Trenngel das Molekulargewicht der Cholinkinase, abzulesen an einer seitlichen Markierung für Molekülgewicht, deutlich überschritten hatte (Abb. 19). Im nächsten Schritt wurden nun die Proteine zur immunologischen Detektion vom Gel auf eine Membran transferiert. Hierzu wurde zunächst das Gel vorsichtig aus der Kammer entfernt und mit einem zugeschnittenen Filterpapier, das in Transferpuffer getränkt worden war, bedeckt. Eine ebenfalls zugeschnittene Nitrozellulose Membran wurde für 10 Sekunden in 100 % Methanol getaucht, mit destilliertem Wasser abgespült und dann ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Auch die unbedeckte Seite des Gels wurde mit Transferpuffer benetzt und die Membran wurde auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurde ein weiterer zugeschnittener und in Transferpuffer getränkter Filter gelegt, so dass ein Sandwich in der Anordnung Filter-Membran-Gel-Filter entstand. Nun wurde dieses Sandwich zwischen zwei getränkte 3 mm Blotting-Schwämme in eine Hoefer TE42 Gel-Elektrophorese-Einheit gelegt. Der Behälter wurde mit Transferpuffer aufgefüllt. Zur Kühlung wurden zwei bei - 20 °C vorgekühlte Kühlpads hinzugegeben. Es wurde eine zum Gel senkrechte Spannung von 60 Volt bei einer Stromstärke von 0,1 Ampère über Nacht appliziert um die Proteine auf die Membran zu transferieren. Im elektrischen Feld wanderten die Proteine nun aus dem Gel auf die Membran. Zuletzt erfolgte die indirekte Immunodetektion des Zielproteins. Zunächst ließen wir einen cholinkinasespezifischen Primärantikörper (Anti-CHK) an das membrangebundene Zielantigen binden. Der Pri-

märantikörper wurde dann von einem Sekundärantikörper gebunden, welcher wiederum mit einer Peroxidase konjugiert war.

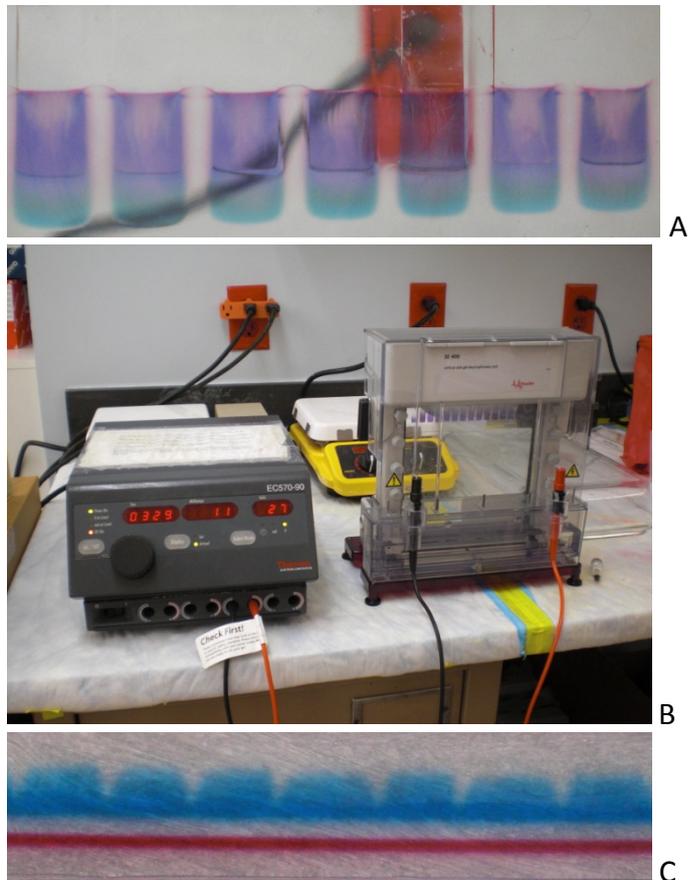


Abb. 19: A-C Versuchsaufbau Western Blot.

Im letzten Schritt wurde das Chemolumineszenzreagenz Luminol hinzugegeben. Die Peroxidase katalysierte daraufhin dessen Oxidation, bei der Licht entstand. Dieses Licht konnte mittels eines Röntgenfilms detektiert werden.

Hierzu wurde die Membran zunächst 1 Stunde lang bei Raumtemperatur mit 5 % Magermilchpulver in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween-20 – im Folgenden kurz als „5 % Milch TBST“ bezeichnet – inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und die Membran somit zu blocken. Dann wurde der Primärantikörper Anti-CHK (Glunde et al., 2005) in der Verdünnung 1:100 in 5 % Milch TBST auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Anti-CHK-Antikörper wurde uns freundlicherweise von der Forschungsgruppe um Frau Prof. Bhujwalla und Frau Prof. Glunde von der Johns Hopkins University in Baltimore zur Verfügung gestellt (Glunde et al., 2005).

Am nächsten Tag wurde drei Mal zehn Minuten mit 5 % Milch TBST bei Raumtemperatur gespült. Dann wurde der mit Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper Anti-Rabbit-HRP (Englisch: horseradish peroxidase) in 1:2000 Verdünnung in 5 % Milch TBST eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf der Membran belassen. Danach erfolgte das zehnmütige Spülen mit 5 % Milch TBST und zwei Mal 10 Minuten mit TBS Tween. Die Schritte wurden für das housekeeping Protein GAPDH mit dem Primärantikörper Anti-GAPDH (Verdünnung 1:50000) und dem Sekundärantikörper Anti-Mouse-HRP (Verdünnung 1:2000) wiederholt. Zur Detektion per Chemilumineszenz wurde die Membran nun auf eine Folie gelegt und Luminol bei Raumtemperatur darauf gegeben, so dass die Membran vollständig damit bedeckt war. Nach Inkubation von einer Minute wurde die Membran mit einer zweiten Folie bedeckt und bei Dunkelheit in eine Fotokassette gelegt. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in einem Kodak X-OMAT Processor M20.

5.3.3 Datenverarbeitung HRMAS ¹HMRS

Die Analyse der Spektren wurde mit einem speziell für die Studie in MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) implementierten Hilfsprogramm durchgeführt. Das Programm konnte Ergebnisse, die normalerweise mit der NUTS Software von AcornNMR (Livermore, CA) zur manuellen Quantifizierung von Signalanteilen erzielt werden, automatisiert gewinnen.

Zuerst wurde der freie Induktionszerfall (Englisch: free induction decay) jeder Messung einer Apodisation von 1 Hz ausgesetzt. Danach erfolgte eine Fouriertransformation und Nulllinienkorrektur (Abb. 4). Die Phasenkorrektur erfolgte in Übereinstimmung mit den üblichen und gut identifizierbaren Referenzpunkten. Hier diente Tetramethylsilan als externer Bezugspunkt bei der Zuweisung der Spektren-Gipfel zu den bekannten Metaboliten. Zur Ermittlung der Konzentration der Metabolite erfolgte zunächst eine Kurvenanpassung (Englisch: curve fitting) einer Summe von Gauss-Profilen an das gemessene Spektrum. Dann wurde die Kurve zum jeweiligen Metaboliten zugeordnet und danach das Integral der einzelnen Signalanteile ermittelt (Cheng et al., 1998b). Der Alanin Anstieg bei 1,47 ppm wurde individuell für jedes Spektrum als Referenz der Chemischen Verschiebung auf der x-Achse verwendet. Daraufhin lag der Cholin-Gipfel bei 3,19 ppm, der Phosphocholin-Gipfel bei 3,21 ppm und der Glycerophosphocholin-Gipfel bei 3,22 ppm (Sitter et al., 2002). Eine Wasserunterdrückung war aufgrund des HRMAS nicht notwendig (Abb. 20).

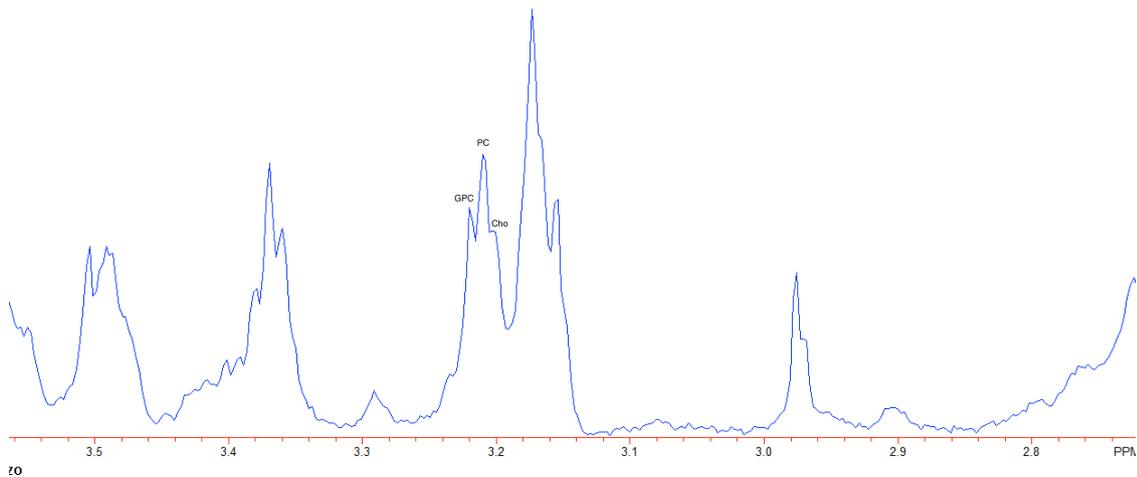


Abb. 20: Datenverarbeitung mittels laboreigenem MATLAB Hilfsprogramm zur Erstellung einer HRMAS ^1H MRS Metaboliten-profil: GPC: Glycerophosphocholin-Signal, PC: Phosphocholin-Signal, Cho: Cholin-Signal. Im vorliegenden Fall ist das Cholin-Signal bei 3,19 ppm wahrscheinlich durch das Phosphoethanolamin-Signal bei 3,20 ppm überschattet.

5.3.4 Datenverarbeitung Western Blot

Die Auswertung der Bilder aus den Western Blots erfolgte mit dem Grafikprogramm ImageJ, welches von den National Institutes of Health (NIH) zur Bildanalyse in Forschungsfragestellungen als freie Version im Internet zur Verfügung gestellt wird. Die Intensitäten der verschiedenen Western Blot Banden wurde ermittelt (Abb. 21).

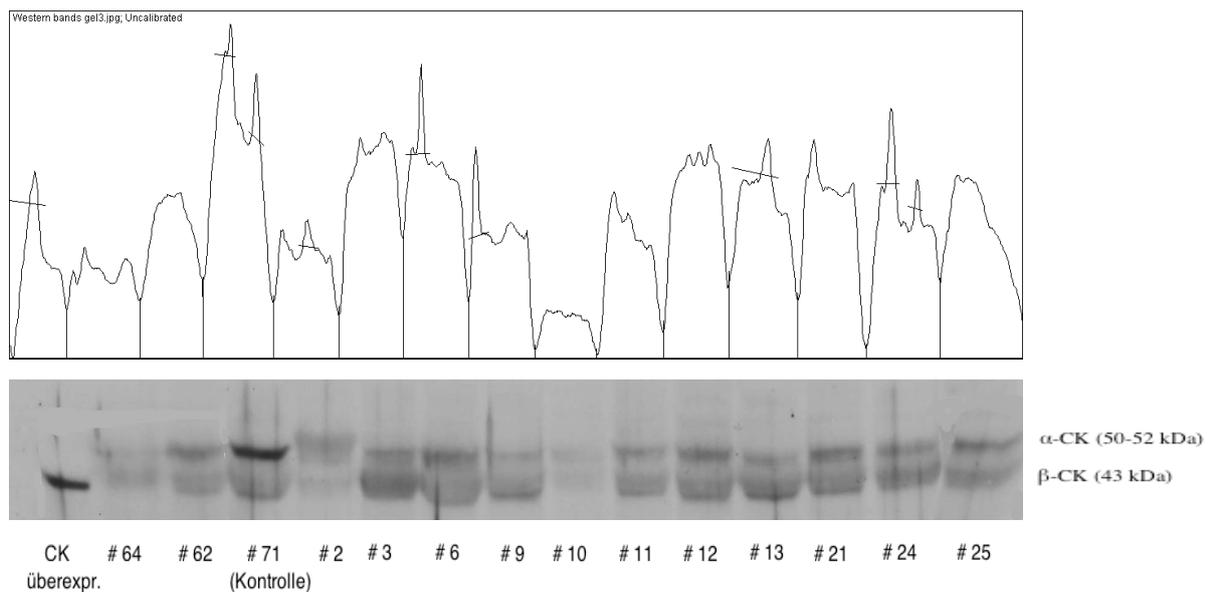


Abb. 21: Semiquantitative Ermittlung der Cholin kinase Konzentration anhand der Signalintensitäten der verschiedenen Western Blot Banden mittels ImageJ. CK überexpr.: Die überexprimierte Cholin kinase zeigt eine bekannte Laufweite von 48 kDa.

Somit konnte der jeweilige Proteingehalt quantifiziert und danach verglichen werden. Für jeden Blot wurden die Signalintensitäten der Cholinkinase bei einem Molekulargewicht von 48 kDa ins Verhältnis mit der Kontrolle GAPDH gesetzt. Zum Vergleich der verschiedenen Blots miteinander diente die Probe Nummer 71, beziehungsweise 64, welche auf jedem Blot vertreten waren. Je höher der Quotient der Signalintensität von Cholinkinase zu GAPDH, desto höher war deren Konzentration.

5.3.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SPSS Statistics von IBM (Version 22.0) und Microsoft Excel 2011. Häufigkeitsanalysen und Deskriptive Statistiken wie Mittelwerte, Standardabweichungen, mittlerer Standardfehler, 95 % - Konfidenzintervalle, sowie Mediane wurden berechnet und werden im Ergebnisteil präsentiert. T-Tests wurden angewandt um die Metabolitenkonzentrationen verschiedener Gruppen zu vergleichen. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als signifikantes Ergebnis betrachtet. Die lineare Regressionsanalyse wurde verwendet, um eine Korrelation zwischen zwei Variablen zu ermitteln. Des Weiteren erfolgten Kaplan-Meier-Analysen und Cox-Regressionsanalysen zur Einschätzung der rezidivfreien Zeit bzw. der Mortalitätsrate. Für die Kaplan-Meier- und Cox-Regressionsanalysen wurden nur die Fälle berücksichtigt, deren Proben als maligne identifiziert wurden. Es wurden Subgruppen gebildet, die möglichst gleich groß sein sollten. Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum betrug 95 Monate \pm 36 Monate (95% - Konfidenzintervall 89,18 – 101,44 Mon.). Für die Fälle, deren Patientinnen frühzeitig aus der Tumornachsorge ausschieden, z. B. aufgrund eines Umzugs oder weil der Nachsorgetermin nicht mehr wahrgenommen wurde, wurde der Rezidiv- bzw. Lebendstatus der letzten Visite angenommen. Der entsprechende Fall wird ab diesem Zeitpunkt für die Berechnungen nicht mehr berücksichtigt und im Schaubild als zensiert markiert. Für Patientinnen, die in ein Hospiz überwiesen wurden, wurde der Zeitpunkt der letzten Visite als Todeszeitpunkt angenommen.

Wir entschieden uns gegen den Ausschluss bestimmter Messungen zur Minderung der Anzahl an Ausreißern. Die Messwerte zeigen daher eine große Streubreite und sind nicht normalverteilt.

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchte Variablen

6.1.1 Alter und histologische Daten

Für die statistische Analyse wurden die Daten von insgesamt 162 Gewebeproben ausgewertet. In 88 % der Fälle handelte es sich hierbei um maligne und in 12 % der Fälle um benigne Proben. Letztere waren den Tumorrandgebieten entnommen worden und dienten als Kontrollgruppe.

Das mittlere Alter der Gesamtgruppe lag bei 53,8 Jahren. Zwischen den Patientinnen der beiden Subgruppen (benigne vs. maligne) lag kein statistisch signifikanter Altersunterschied vor (53,3 vs. 53,86; n.s.) (Tab. 4).

Probe	Anzahl	%	Mittleres Patientenalter	SEM	Min.	Max.
Benigne	20	12,35	53,3 *	3,18	38	89
Maligne	139	85,8	53,86 *	1,18	28	94
Alter unbekannt	3	1,85	-	-	-	-
Gesamt	162	100	53,8	1,11	28	94

Tab. 4: Altersverteilung der Patienten in Abhängigkeit vom histologischen Befund der Probe.
SEM = Standardfehler des Mittelwertes; * nicht signifikant.

Bei den 142 Gewebeproben mit pathologischem Histologiebefund lag der durchschnittliche prozentuale Tumorzell-Anteil bei 65,0 Prozent (Bezug: Zellen von Epithel + Stroma, SEM 2,81). Bei 60 zufällig ausgewählten Proben wurde der prozentuale Tumorzell-Anteil in Bezug zu den Epithelzellen alleine untersucht (ohne Stromazellen). Hierbei lag der mittlere Tumorzell-Anteil mit 30,9 Prozent nur etwa halb so hoch wie bei der Betrachtung aller Zellen (Epithel + Stroma, SEM 2,65) zusammen (Abb. 22).

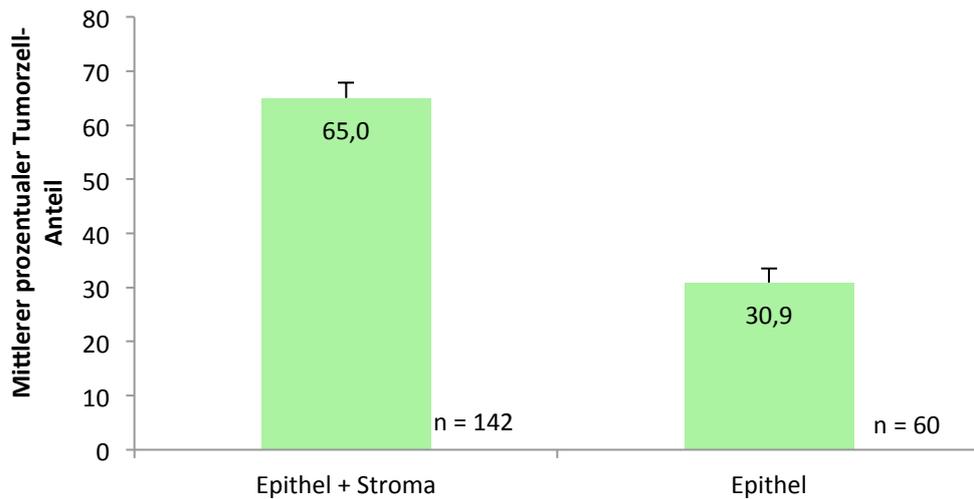


Abb. 22: Mittlerer prozentualer Tumorzell-Anteil.
Fehlerindikator: SEM = Standardfehler des Mittelwertes

Die Proben wurden außerdem auf ihren histologischen Tumortyp untersucht. Phylloide oder apokrine Typen sowie Sarkome spielten hierbei nur eine untergeordnete Rolle, da jeder dieser Tumor-Arten nur je einmal dokumentiert wurde. Am häufigsten wurden duktales Karzinome beobachtet (81 %), gefolgt von lobulären (10,6 %) und gemischt duktal-lobulären Karzinomen (4,2 %) (Tab. 5).

Tumortyp	Maligne Proben	%
Duktales Karzinom	115	81
Lobuläres Karzinom	15	10,6
Gemischt duktal-lobuläres Karzinom	6	4,2
Maligner Phylloidentumor	1	0,7
Sarkom	1	0,7
Apokrines Karzinom	1	0,7
Unbekannt	3	2,1
Gesamt	142	100

Tab. 5: Verteilung der Tumortypen.

6.1.2 Tumorklassifikation

Bei 136 der 142 malignen Proben waren Angaben zur exakten Tumorgöße dokumentiert worden. Die mittlere Tumorgöße lag bei 3,09 cm (Tab. 6)

Histologie	Anzahl	Mittlere Tumorgröße (cm)	SEM	Min.	Max.
Maligne	136	3,09	0,22	0,4	17,0

Tab. 6: Mittlere Tumorgröße (cm).

Tumorgröße unbekannt: n = 8. Gesamt: n = 142. SEM = Standardfehler des Mittelwertes.

Bei etwa der Hälfte der Tumoren lag das Stadium T2 vor (50,7 %), also eine Tumorgröße von > 2 cm bis maximal 5 cm. Das Stadium T1c ($> 1 \leq 2$ cm) war mit 21,8 % am zweithäufigsten vertreten. Hinsichtlich des Lymphknoten-Stadiums N dominierten die Stadien N0 (keine Tumorzellen in Lymphknoten) mit 35,2 % und N1 (Tumorzellen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten) mit 32,4 %, gefolgt von N1mi (nur Mikrometastasen $\leq 0,2$ cm) mit 14,8 %. Das initiale Metastasen-Stadium war in nur 58 Fällen der malignen Proben bekannt oder dokumentiert. 5,6 % der malignen Proben waren von Patientinnen mit Fernmetastasen entnommen (Tab. 7).

T-Stadium	Anzahl	%	N-Stadium	Anzahl	%	M-Stadium	Anzahl	%
			N0	50	35,2	M0	50	35,2
T1a+b	20	14,1	N1mi	21	14,8	M1	8	5,6
T1c	31	21,8	N1	46	32,4			
T2	72	50,7	N2	9	6,3			
T3	17	12	N3	5	3,5			
Tx	2	1,4	Nx	11	7,7	Mx	84	59,2
Gesamt	142	100	Gesamt	142	100	Gesamt	142	100

Tab. 7: Häufigkeiten gemäß TNM-Klassifikation der untersuchten malignen Proben.

Bezüglich des Differenzierungsgrades der Proben fand sich am häufigsten Grad 2 (46,5 %), gefolgt von Grad 3 (43,7 %). Grad 1 lag in 7 % der Fälle vor (Tab. 8).

Differenzierungsgrad	G1	G2	G3	Gx	Gesamt
Anzahl	10	66	62	4	142
%	7	46,5	43,7	2,8	100

Tab. 8: Verteilung nach histologischem Differenzierungsgrad (G1-G3).

Bei Betrachtung des Tumor-Rezeptorstatus zeigten sich über zwei Drittel der Proben Östrogenrezeptor positiv (73,9 %). Ein positiver Progesteronrezeptor-Status fand sich in einem

Drittel der Fälle (67,6 %). Der Her2- Rezeptor war bei 17,6 % der Karzinome positiv (Tab. 9). In 18,3 % lag ein dreifach negativer Rezeptorstatus vor, welcher aufgrund mangelnder Therapieoptionen eine besonders schlechte Prognose für die Patientin bedeutet (Tab. 10).

Östrogen-rezeptor	Anzahl	%	Progesteron-rezeptor	Anzahl	%	Her2-Rezeptor	Anzahl	%
Negativ	32	22,5	Negativ	41	28,9	Negativ	112	78,9
Positiv	105	73,9	Positiv	96	67,6	Positiv	25	17,6
Unbekannt	5	3,5	Unbekannt	5	3,5	Unbekannt	5	3,5
Gesamt	142	100	Gesamt	142	100	Gesamt	142	100

Tab. 9: Häufigkeitsanalyse: Rezeptorstatus.

Triple negativ	Anzahl	%
Nein	111	78,22
Ja	26	18,3
Unbekannt	5	3,52
Gesamt	142	100

Tab. 10: Häufigkeitsanalyse: Dreifach negativer Rezeptorstatus.

6.1.3 Cholinkinase

Bei 50 der 162 Proben war zusätzlich semiquantitativ mittels Western Blot die Cholinkinasekonzentration bestimmt worden (Cholinkinase gesamt, sowie unterteilt in α -Cholinkinase und β -Cholinkinase). Die mittlere Cholinkinasekonzentration (gesamt) lag bei 1,49, die α -Cholinkinasekonzentration bei 2,76 und die β -Cholinkinasekonzentration bei 1,62. Da es sich um relative Konzentrationen zueinander handelt, sind die Werte ohne Einheit angegeben. Alle Messwerte wiesen eine große Variabilität auf. Für keine der drei Cholinkinase-Gruppen (α , β , gesamt) konnten zwischen den beiden Subgruppen (benigne vs. maligne) statistisch signifikante Unterschiede aufgezeigt werden (Tab. 11, Abb. 23).

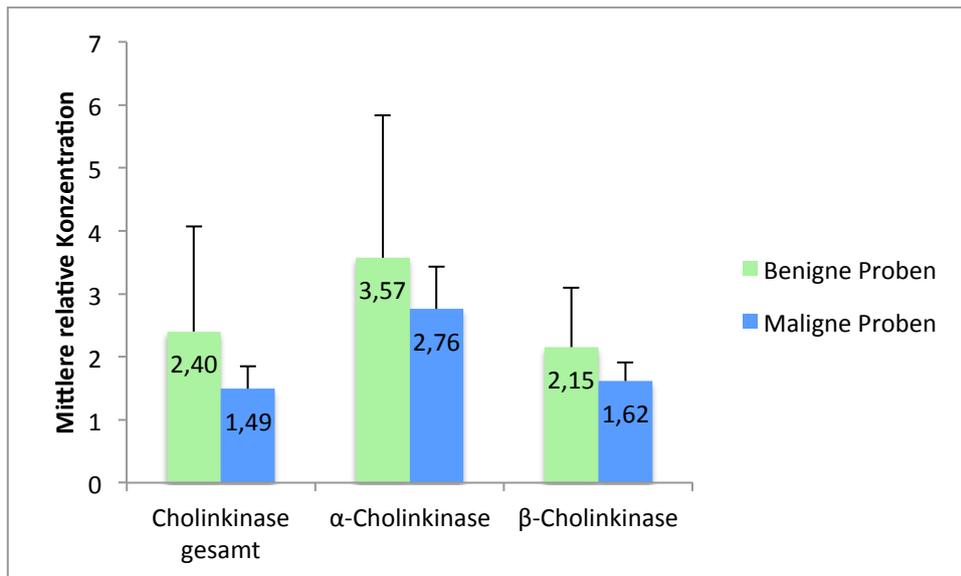


Abb. 23: Semi quantitative Cholinesterasekonzentration in malignen bzw. benignen Proben. Unterschiede nicht signifikant. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

	Benigne Proben n = 6	Maligne Proben n = 44
Mittlere Cholinesterasekonzentration ($\alpha+\beta$)	2,40*	1,49*
SEM	1,67	0,36
Min.	0,28	0,11
Max.	10,7	13,13
Mittlere α-Cholinesterasekonzentration	3,57*	2,76*
SEM	2,27	0,68
Min.	0,79	0,10
Max.	14,87	21,87
Mittlere β-Cholinesterasekonzentration	2,15*	1,62*
SEM	0,95	0,29
Min.	0,50	0,10
Max.	6,70	8,66

Tab. 11: Semi quantitative Konzentration der Cholinesterase gesamt ($\alpha+\beta$), α und β .
* Unterschiede nicht signifikant $p > 0,05$; SEM = Standardfehler des Mittelwertes.

6.1.4 Outcome

6.1.4.1 Rezidiv

Rezidive innerhalb der ersten 10 Jahre ab Diagnosestellung (= Probenentnahme) waren bei fast einem Drittel der Patientinnen mit maligner Probe (n = 142) aufgetreten (29,6 %) (Tab. 12).

Rezidiv	Maligne Proben n = 142	
	Anzahl	%
nein	100	70,4
ja	42	29,6
Gesamt	142	100

Tab. 12: Rezidivhäufigkeit des Tumors (Rezidiv ja/nein).

6.1.4.2 Mortalität

Von den 142 Proben der Gruppe mit malignen Tumorproben waren 30 Patientinnen innerhalb der ersten 10 Jahre nach Diagnosestellung verstorben (21,1 %) (Tab. 13).

Verstorben	Maligne Probe n = 142	
	Anzahl	%
nein	112	78,9
ja	30	21,1
Gesamt	142	100

Tab. 13: Mortalität (verstorben: ja/nein).

6.2 HRMAS-Spektroskopie

6.2.1 Untersuchte Metaboliten

Im Rahmen dieser Studie wurden die Metaboliten Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin näher untersucht. Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, wiesen alle drei Metaboliten eine sehr große Streubreite auf und waren nicht normalverteilt. In Bezug auf die Gesamtheit aller Proben (n = 162) ergab sich der größte durchschnittliche relative Messwert für Glycerophosphocholin mit 29,1, gefolgt von Phosphocholin mit 5,03 und Cholin mit 1,40 (Tab. 14). Da es sich auch hier um relative Messwerte handelt, wird keine Einheit angegeben.

	Anzahl	Mittelwert	SEM	Varianz	Min.	Max.
Cholin	162	1,40	0,34	17,97	0,00	42,5
Phosphocholin	162	5,03	1,60	409,78	0,00	232,4
Glycerophosphocholin	162	29,1	2,19	764,20	0,00	118,7

Tab. 14: Mittlere relative Konzentrationen der untersuchten Metaboliten der HRMAS-Spektroskopie. SEM: Standardfehler des Mittelwertes.

6.2.2 Zusammenhang mit Histologie der Probe

In der folgenden Tabelle sind die drei Metaboliten in Abhängigkeit vom Ergebnis der Histologie dargestellt (benigne vs. maligne). In den Proben mit pathologischem Befund wies Cholin einen etwa 4-fach höheren Mittelwert auf als in den tumorfreien Proben. Die Differenz war allerdings statistisch nicht signifikant (Relative mittlere Konzentration: 0,43 vs. 1,54; n.s.). Umgekehrt wiesen Phosphocholin und Glycerophosphocholin in den malignen Proben etwa 5-fach höhere Durchschnittswerte auf. Hinsichtlich Glycerophosphocholin war die Differenz zwischen malignen und benignen Proben statistisch hochsignifikant (6,44 vs. 32,29;

* $p < 0,001$) (Abb. 24).

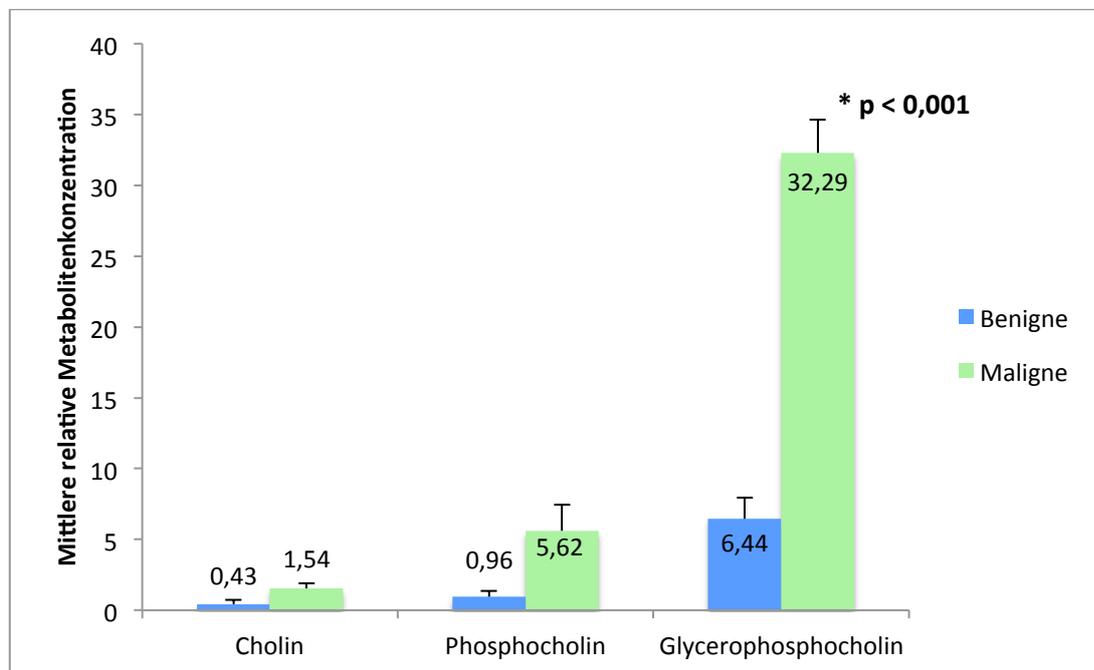


Abb. 24: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie in malignen und benignen Proben. Glycerophosphocholin (maligne) >> Glycerophosphocholin (benigne): * $p < 0,001$. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

6.2.3 Einfluss des Patientenalters

Interessanterweise fanden sich bei der Korrelation einzelner Metaboliten mit dem Alter signifikante Befunde. In der Gruppe der Proben mit benigner Histologie wies die Cholinkonzentration eine signifikant positive Korrelation mit dem Alter der Patientin auf (Rho 0,54;

* **p = 0,014**). Je älter die Patientinnen waren, desto höher war auch die Cholinkonzentration in der benignen Probe. Ferner ergab sich in der Gruppe der malignen Gewebeproben eine signifikant negative Korrelation zwischen Glycerophosphocholin und dem Alter der Patientin (Rho -0,17; * **p = 0,045**) (Tab. 15). In den übrigen Korrelationen mit dem Alter konnte kein weiterer Zusammenhang festgestellt werden. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten waren sehr klein und wiesen keine statistische Signifikanz auf.

Korrelation Alter	Benignes Gewebe n = 20		Malignes Gewebe n = 142	
	Rho	Signifikanz	Rho	Signifikanz
Cholin	0,54	* p = 0,014	0,082	n.s.
Phosphocholin	0,07	n.s.	-0,12	n.s.
Glycerophosphocholin	-0,34	n.s.	-0,17	* p = 0,045

Tab. 15: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und Alter der Patientinnen.

* Signifikant negative Korrelation zwischen Glycerophosphocholin und Alter in malignem Gewebe: * **p = 0,045**.

* Signifikant positive Korrelation zwischen Cholin und Alter in benignem Gewebe: * **p = 0,014**.

Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Um die Relevanz des obigen Ergebnisses zu veranschaulichen, ist in der folgenden Abbildung die mittlere Cholinkonzentration der gesunden Proben in Abhängigkeit vom Patientenalter dargestellt. Mit zunehmendem Alter stieg die Konzentration des Metaboliten an. Besonders auffällig war der hohe mittlere Cholinwert bei den über 70-jährigen Patienten (n = 3; 2,20), wobei im Vergleich zu den übrigen 17 Patienten (bis 70 J.) keine statistische Signifikanz vorlag (Abb. 25). In malignen Gewebeproben konnte keine derartige Tendenz festgestellt werden.

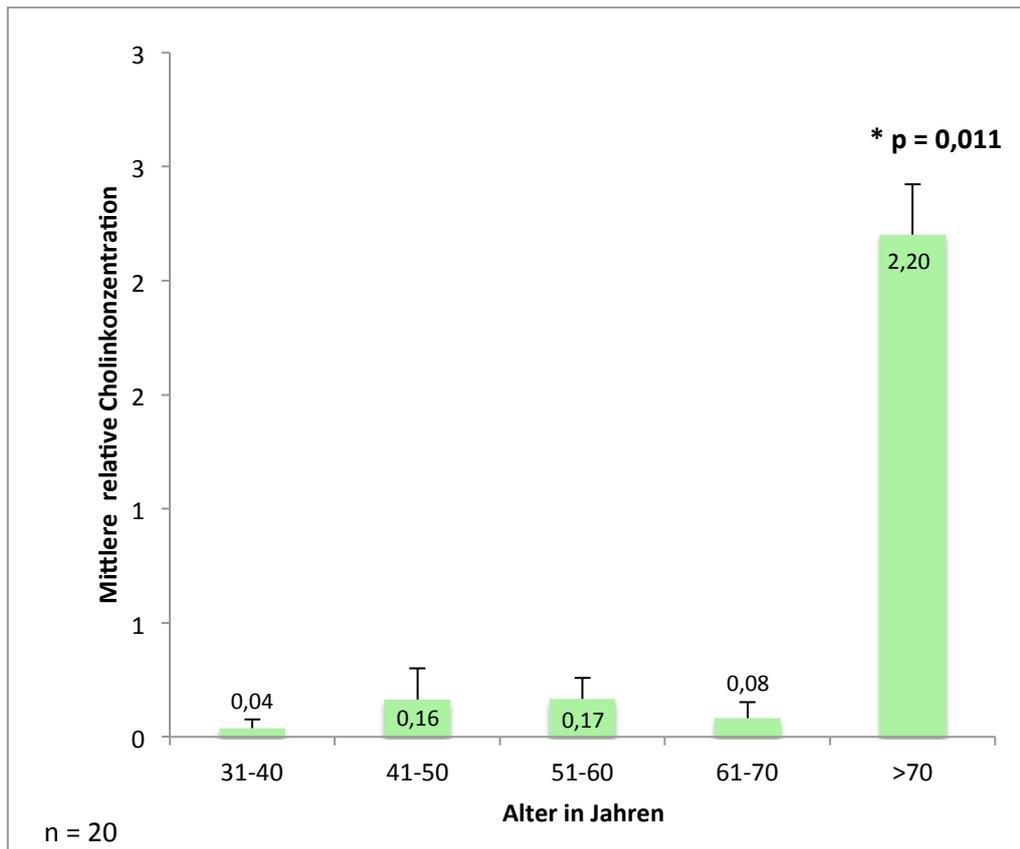


Abb. 25: Cholinkonzentration in Abhängigkeit vom Patientenalter in benignen Proben.

* Signifikanter Unterschied der Cholinkonzentration (bis 70 Jahre) vs. (> 70 Jahre): * $p = 0,011$.

Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes. SEM

In der folgenden Abbildung ist ferner die mittlere Glycerophosphocholinkonzentration der malignen Proben in Abhängigkeit vom Patientenalter dargestellt. Die Konzentration des Metaboliten nahm mit dem Alter der Patientinnen ab. Dabei spiegelt sich der niedrige Korrelationskoeffizient ($Rho = 0,17$) dergestalt wider, dass in den höheren Altersgruppen kein eindeutiger Trend vorlag. Die negative Korrelation war aber statistisch signifikant (* $p = 0,045$) (Abb. 26).

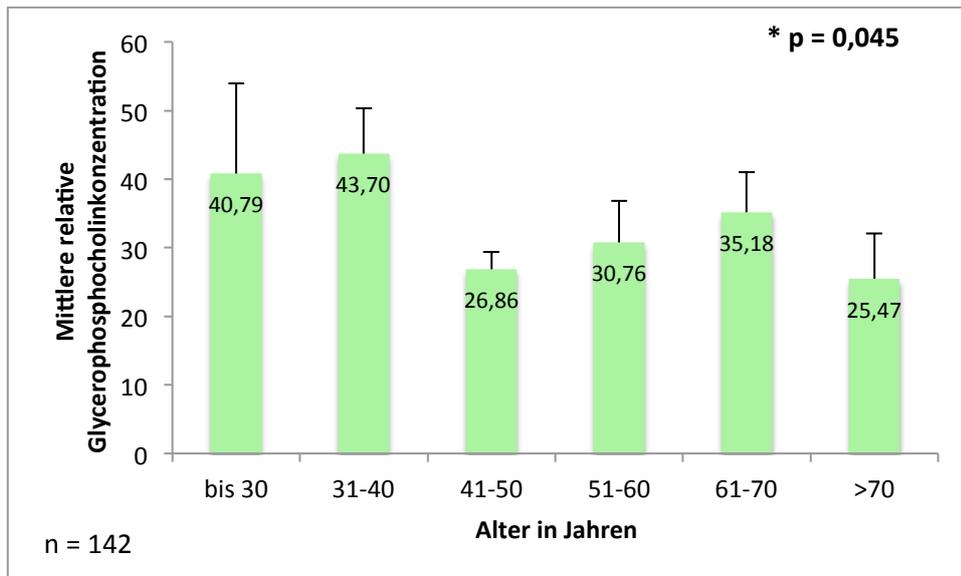


Abb. 26: Glycerophosphocholinkonzentration in Abhängigkeit vom Patientenalter in der Subgruppe der malignen Proben.
 * Signifikante negative Korrelation zwischen mittl. Glycerophosphocholinkonzentration und Alter: * $p = 0,045$.
 Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

In der folgenden Tabelle sind in Ergänzung zu den obigen Analysen die Mittelwerte der drei Metaboliten in Abhängigkeit von zwei Altersgruppen dargestellt (Alter bis 70 Jahre vs. Alter > 70 Jahre). Es sollte die Frage geklärt werden, ob ältere Patientinnen (> 70 Jahre) insgesamt andere Ergebnisse aufweisen als die übrigen Patientinnen. Statistisch signifikante Unterschiede konnten hierbei nicht festgestellt werden (Tab. 16).

	Patientenalter bis 70 Jahre n = 135		Patientenalter > 70 Jahre n = 22		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,38	0,39	1,45	0,50	n.s.
Phosphocholin	3,88	0,84	1,91	0,68	n.s.
Glycerophosphocholin	29,79	2,32	22,61	5,91	n.s.

Tab. 16: Untersuchte Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Alter bis 70 Jahre vs. Alter >70 Jahre. Alter bzw. Metabolit unbekannt: n = 5. Gesamtgruppe (maligne + benigne): n = 162. SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Sofern die obige Analyse nicht mit der Gesamtgruppe durchgeführt wurde, sondern nur mit der Subgruppe, bei der in der Probe ein maligner Histologiebefund vorlag (n = 142), ergab sich ein ähnliches Bild.

Neben dem obigen Vergleich „alte Patientinnen vs. übrige“ wurde auch ein Vergleich „junge Patientinnen vs. übrige“ durchgeführt (Alter bis 40 Jahre vs. Alter > 40 Jahre). Dabei konnte in der Gesamtgruppe aller Patientinnen hinsichtlich der Glycerophosphocholinkonzentration ein

signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Proben jüngerer Patientinnen wiesen unabhängig vom histologischen Befund eine höhere Konzentration an Glycerophosphocholin auf als die Proben älterer Patientinnen (38,16 vs. 26,48; * $p = 0,031$) (Tab. 17).

	Patientenalter bis 40 Jahre n = 31		Patientenalter > 40 Jahre n = 126		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,08	0,57	1,47	0,40	n.s.
Phosphocholin	3,13	1,26	3,72	0,86	n.s.
Glycerophosphocholin	38,16	5,63	26,48	2,28	* 0,031

Tab. 17: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Alter bis 40 Jahre vs. Alter > 40 Jahre. Alter bzw. Metabolit unbekannt: n = 5. Gesamtgruppe (maligne + benigne): n = 162.

* Signifikanter Unterschied Glycerophosphocholinkonzentration (> 40 Jahre) vs. (< 40 Jahre): * $p = 0,031$.
SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Sofern diese Analyse jedoch nicht mit der Gesamtgruppe durchgeführt wurde, sondern lediglich unter Berücksichtigung der malignen Proben (n = 142), wurde der signifikante Konzentrationsunterschied im Falle von Glycerophosphocholin zwischen jüngeren und älteren Patientinnen deutlicher. Bei den jüngeren Patientinnen (bis 40 Jahre) fand sich eine deutlich höhere mittlere Glycerophosphocholinkonzentration als bei den übrigen Patientinnen (> 40 Jahre) (43,48 vs. 29,37; * $p = 0,018$) (Abb. 27).

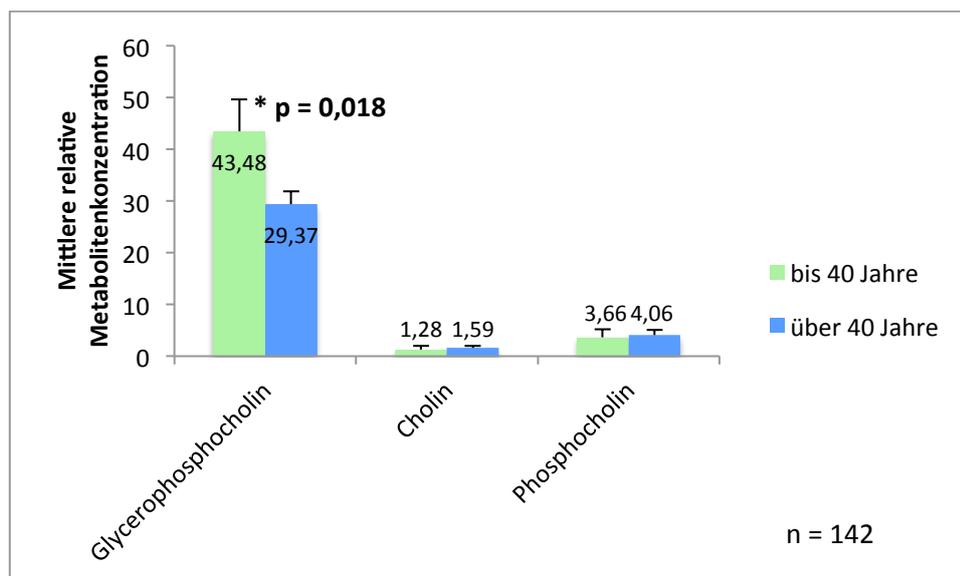


Abb. 27: Mittlere Metabolitenkonzentrationen in der HRMAS-Spektroskopie bei malignen Proben. Vergleich Alter bis 40 Jahre vs. Alter > 40 Jahre.

* Signifikanter Unterschied Glycerophosphocholinkonzentration (> 40 Jahre) vs. (< 40 Jahre): * $p = 0,018$.
Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

6.2.4 Die Rolle des Tumorzell-Anteils

Für die beiden Metaboliten Cholin und Phosphocholin konnte keine Korrelation mit dem Tumorzell-Anteil in der untersuchten Probe festgestellt werden. Eine signifikante positive Korrelation mit dem Tumorzellanteil zeigte sich jedoch im Hinblick auf die Glycerophosphocholinkonzentration (Rho 0,28; * $p = 0,003$) (Tab. 18).

Korrelation Tumorzell-Anteil	Malignes Gewebe n = 140	
	Rho	Signifikanz
Cholin	0,09	n.s.
Phosphocholin	0,06	n.s.
Glycerophosphocholin	0,28	* $p = 0,003$

Tab. 18: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und Tumorzell-Anteil in der Probe. Tumorzellanteil bzw. Metabolit unbekannt: n = 2; Gesamt: n = 142.

* Signifikante positive Korrelation zwischen Tumorzell-Anteil und Glycerophosphocholinkonzentration: * $p = 0,003$.
Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$)

Um das obige Ergebnis zu veranschaulichen, ist in der folgenden Abbildung die mittlere Glycerophosphocholinkonzentration in Abhängigkeit vom Tumorzell-Anteil (in Gruppen) dargestellt. Es ließ sich ein fast kontinuierlicher Anstieg der Metabolitenkonzentration mit zunehmendem Tumorzell-Anteil aufzeigen (signifikante Linearität * $p < 0,001$) (Abb. 28).

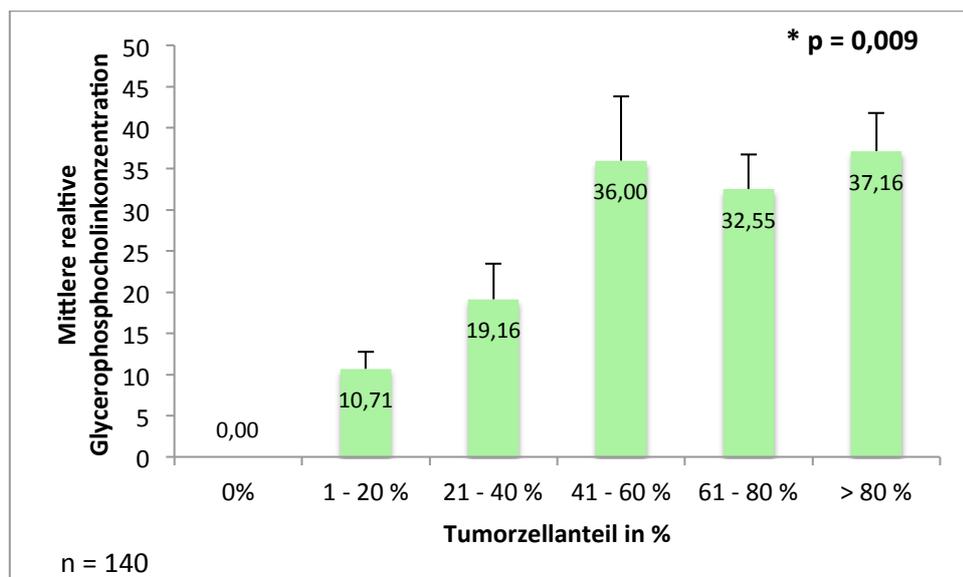


Abb. 28: Glycerophosphocholin in Abhängigkeit vom Tumorzell-Anteil in malignen Proben. Tumorzellanteil/Metabolit unbekannt: n = 2; Gesamt: n = 142.

* Signifikante pos. Korrelation zw. Glycerophosphocholinkonz. und Tumorzell-Anteil: * $p = 0,009$; Linearität sign.: * $p < 0,001$.

6.2.5 Zusammenhang mit Tumortyp

Bei 137 der malignen Proben waren sowohl Angaben zum Tumortyp als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert worden. Bei 113 Patientinnen lag ein duktales Tumor vor, bei 15 Patientinnen ein lobulärer Tumor. In 6 Fällen lag ein gemischt duktal/lobulärer Typ vor. Andere Tumorarten spielten eine untergeordnete Rolle (3 Fälle). Auffällig war, dass alle drei Metabolite im Falle von duktalem Tumoren deutlich höhere Mittelwerte aufwiesen als beim Vorliegen lobulärer Formen. Trotz der großen Unterschiede konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Tab. 19).

	Duktales Karzinom n = 115		Lobuläres Karzinom n = 15		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,71	0,46	0,98	0,41	n.s.
Phosphocholin	6,40	2,25	3,29	1,01	n.s.
Glycerophosphocholin	34,77	2,76	25,14	4,99	n.s.

Tab. 19: Metabolitenkonzentrationen in der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich im duktalem Karzinom vs. im lobulärem Karzinom. Gemischt duktal./lob. n = 6, anderer Tumortyp n = 3, unbekannter Tumortyp n = 3, Gesamt n = 142. SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.6 Korrelation mit TumorgroÙe

Im Tumorprobengut (n = 142) fanden sich 134 Proben, in denen sowohl Angaben zur TumorgroÙe als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert wurden.

Es konnte eine signifikant negative Korrelation zwischen der TumorgroÙe und dem Metaboliten Glycerophosphocholin festgestellt werden (Rho -0,20; * **p = 0,023**). Die Konzentration des Metaboliten nahm mit der TumorgroÙe ab. In Bezug auf Cholin und Phosphocholin lagen keine signifikanten Korrelationen vor (Tab. 20).

Korrelation TumorgroÙe in cm	Malignes Gewebe n = 134	
	Rho	Signifikanz
Cholin	-0,01	n.s.
Phosphocholin	-0,68	n.s.
Glycerophosphocholin	-0,20	* p = 0,023

Tab. 20: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und TumorgroÙe (größte Ausdehnung in cm). TumorgroÙe bzw. Metabolit unbekannt n = 8, Gesamt n = 142. Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; Signifikante negative Korrelation zwischen mittl. Glycerophosphocholinkonzentration und TumorgroÙe * **p = 0,023**; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Um die Relevanz des obigen Ergebnisses zu veranschaulichen, ist in der folgenden Abbildung die mittlere Glycerophosphocholinkonzentration in Abhängigkeit von der Tumorgröße dargestellt. Dabei wird deutlich, dass es sich um eine eher gering ausgeprägte Korrelation handelte, was in Übereinstimmung mit dem niedrigen Korrelationskoeffizienten (Rho) ist (Abb. 29).

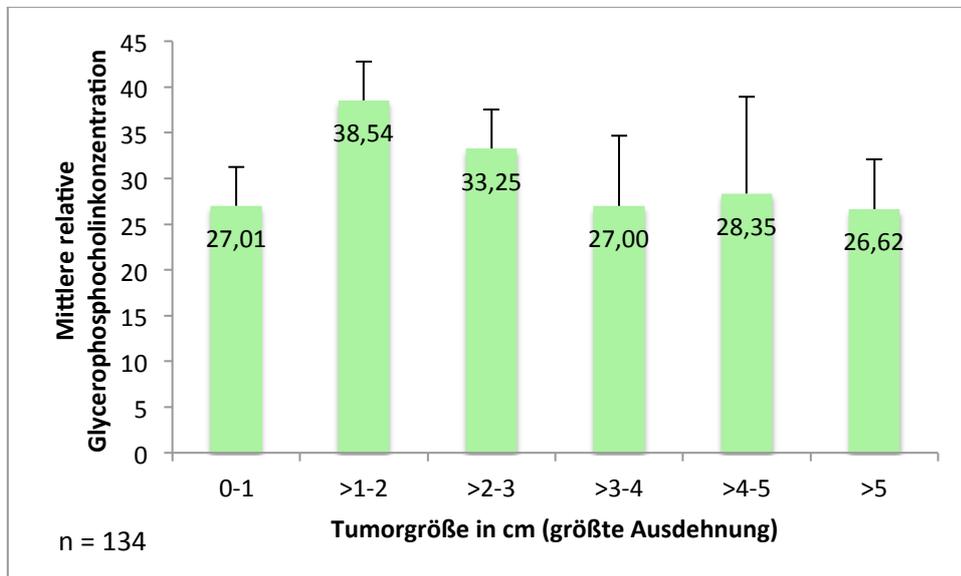


Abb. 29: Glycerophosphocholin in Abhängigkeit von der Tumorgröße. Exakte Tumorgröße/Metabolit unbekannt n = 8; Gesamt n = 142. Fehlerindikator: SEM Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante negative Korrelation: * $p = 0,023$.

6.2.7 ¹H¹RMAS-Daten in Abhängigkeit vom TNM-Stadium

Um prüfen zu können, ob der Parameter „T“ der TNM-Klassifikation mit den drei Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin) in Zusammenhang steht, sind im Folgenden die jeweiligen mittleren Konzentrationen in Bezug auf die einzelnen Stadien dargestellt.

6.2.7.1 Tumorstadium T

Für Cholin konnte keine systematische Abhängigkeit vom Tumorstadium T gezeigt werden. Zwar ließ sich hinsichtlich der Stadien T1a+b, T1c und T2 eine deutlich ansteigende Tendenz erkennen, das Stadium T3 wies jedoch wieder einen ähnlich geringen Mittelwert auf wie T1a+b. Tx lag bei 2 malignen Proben vor (Abb. 30).

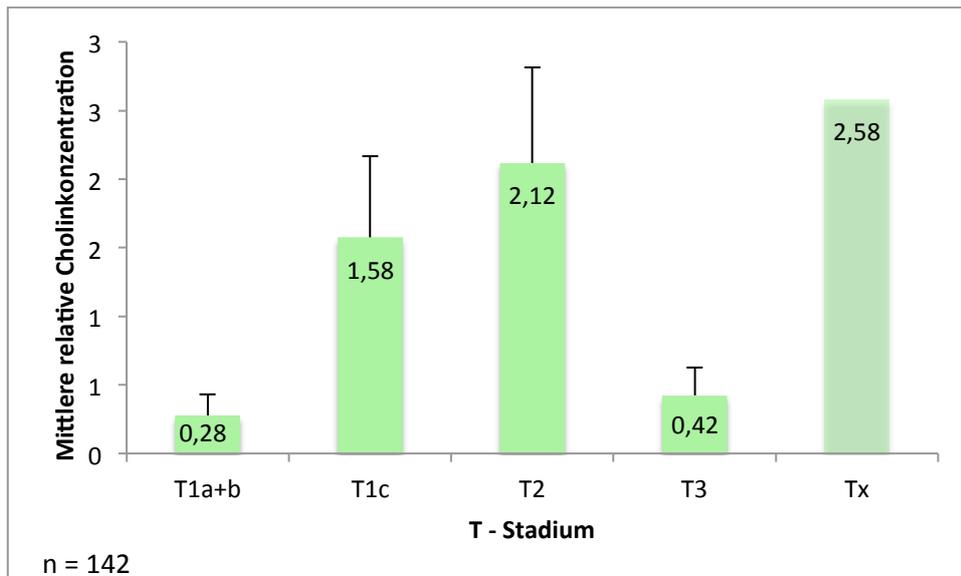


Abb. 30: Cholin in Abhängigkeit vom Tumorstadium gemäß TNM-System.
Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM. Korrelation n. s. = nicht signifikant.

In Bezug auf Phosphocholin konnte ebenfalls keine Systematik aufgezeigt werden (Abb. 31).

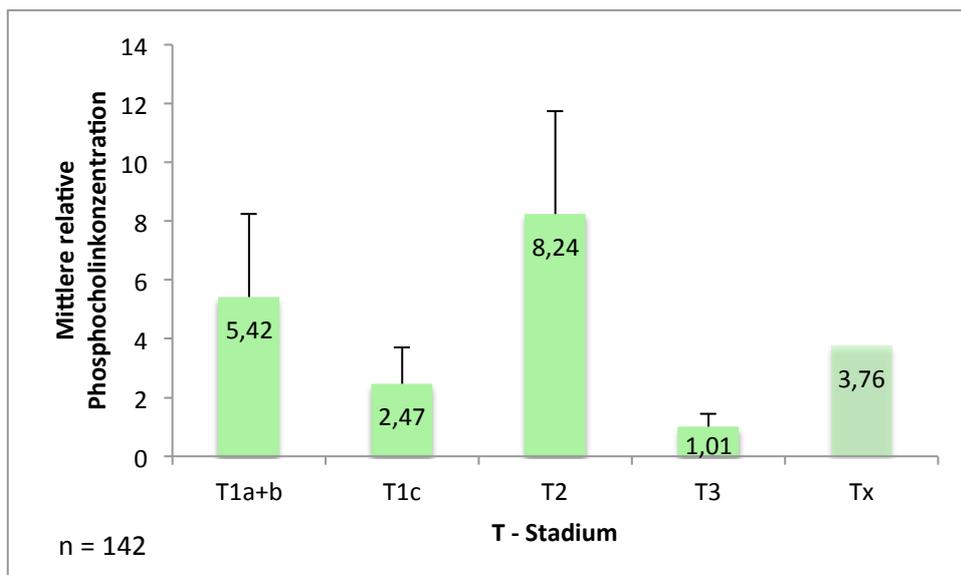


Abb. 31: Phosphocholin in Abhängigkeit vom Tumorstadium gemäß TNM-System.
Signifikante Unterschiede: T2 vs. T3 * $p = 0,031$. Fehlerindikator: SEM Standardfehler des Mittelwertes.

Anders als die beiden oben aufgezeigten Metaboliten, ließ Glycerophosphocholin eine Abhängigkeit vom Tumorstadium erkennen. Ein niedriges Stadium wies hier eine höhere durchschnittliche Konzentration auf (Abb. 32).

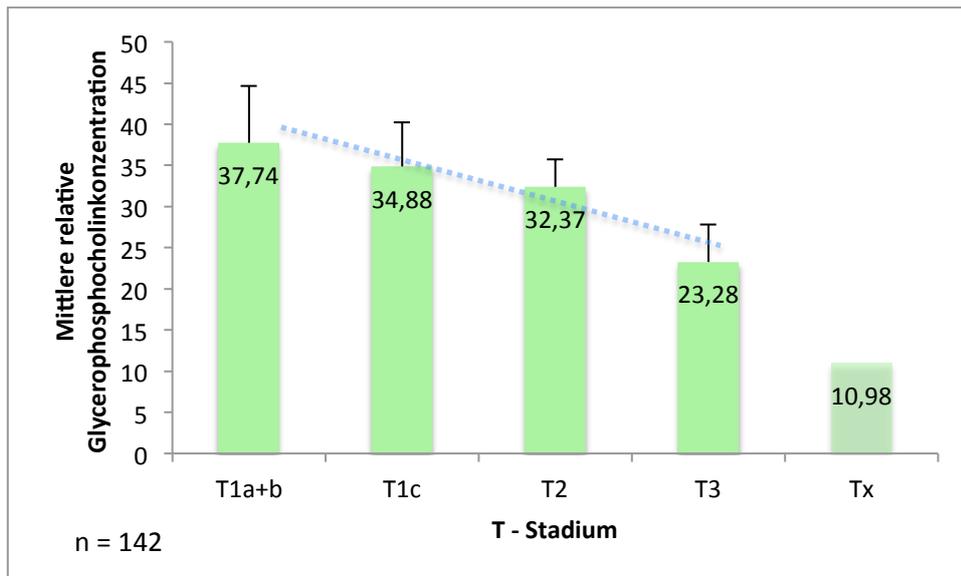


Abb. 32: Glycerophosphocholin in Abhängigkeit vom Tumorstadium gemäß TNM-System. Linearer Trend: $y = -4,5895x + 43,542$. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

Ergänzend zu den obigen Analysen sind in der folgenden Tabelle die mittleren Konzentrationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium in zwei Gruppen dargestellt (T1/T2 vs. T3). Es zeigte sich, dass höhergradige Tumore (T3) deutlich geringere Konzentrationen aller drei Metabolite aufwiesen als T1/T2-Tumore. Trotz der relativ großen Differenzen konnte jedoch keine statistische Signifikanz festgestellt werden (Tab. 21).

	Stadium T1/T2 n = 123		Stadium T3 n = 17		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	1,67	0,44	0,42	0,20	n.s.
Phosphocholin	6,29	2,10	1,01	2,10	n.s.
Glycerophosphocholin	33,90	2,63	23,28	4,52	n.s.

Tab. 21: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Tumorstadium T1/T2 vs. T3. Tx n = 2, maligne Proben gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.7.2 Lymphknoten - Stadium (N)

Um prüfen zu können, ob der Lymphknotenstatus N der TNM-Klassifikation mit den drei Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin) in Zusammenhang steht, sind im Folgenden die jeweiligen mittleren relativen Konzentrationen in Bezug auf die einzelnen Stadien dargestellt.

Für den Metaboliten Cholin konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus aufgezeigt werden. Die mittleren Konzentrationen lagen, mit Ausnahme von N2, auf ähnlichem Niveau. Ein Trend im Sinne einer Zunahme oder Abnahme von Cholin in Abhängigkeit vom LK - Stadium lag nicht vor (Abb. 33).

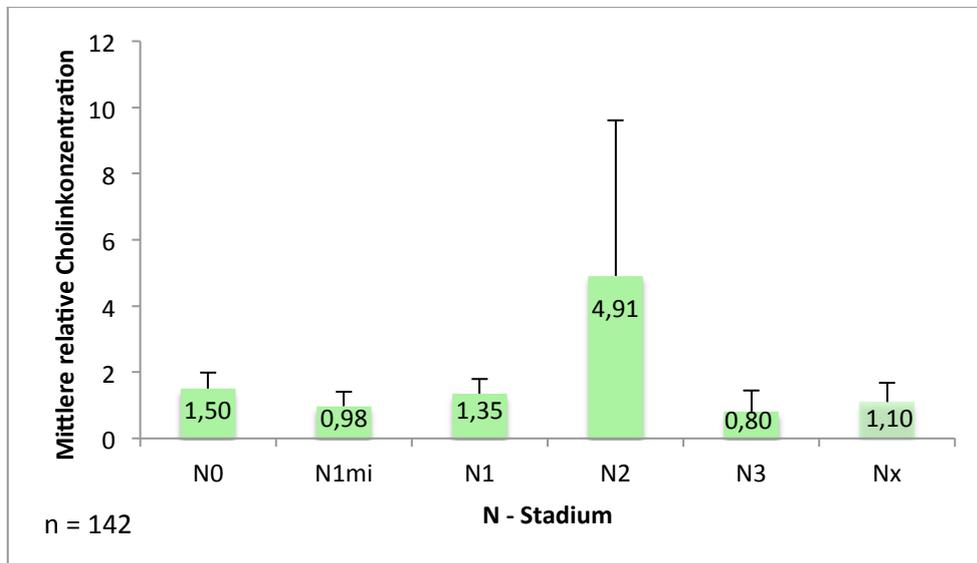


Abb. 33: Cholin in Abhängigkeit vom Lymphknoten-Status gemäß TNM-Klassifikation. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM. Korrelation n. s. = nicht signifikant.

Im Hinblick auf Phosphocholin konnte ebenfalls kein Trend in Abhängigkeit vom LK-Status gezeigt werden. Auffällig waren jedoch auch hier wiederum die relativ geringe mittleren Konzentration bei N3 (Abb. 34).

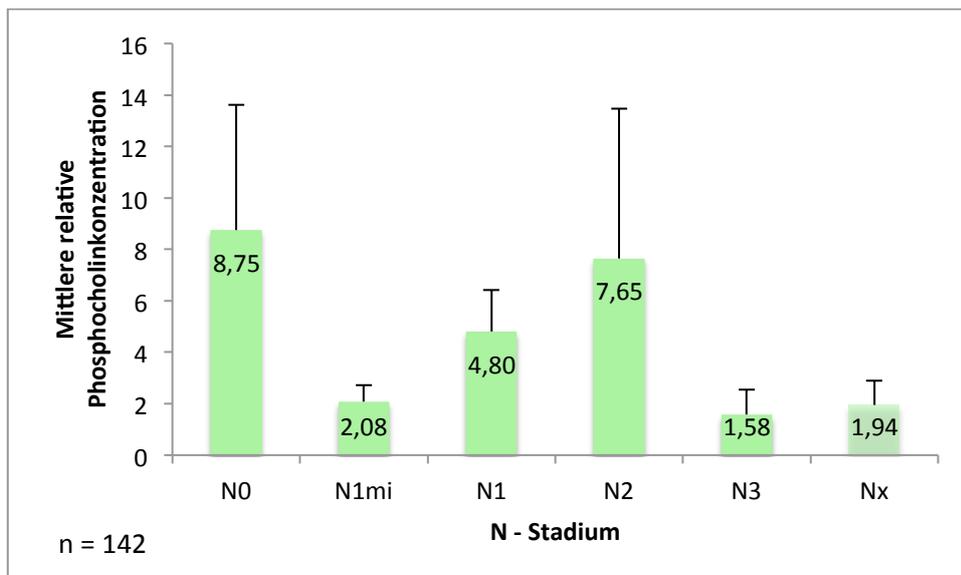


Abb. 34: Phosphocholin in Abhängigkeit vom Lymphknoten - Status gemäß TNM-Klassifikation. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM. Korrelation n. s. = nicht signifikant.

Für den Metaboliten Glycerophosphocholin ließ sich ein leichter Abwärtstrend mit zunehmendem LK - Status erkennen. Hier wiesen die mittleren Konzentrationen mit Ausnahme von N2 einen stetigen Rückgang auf (Abb. 35).

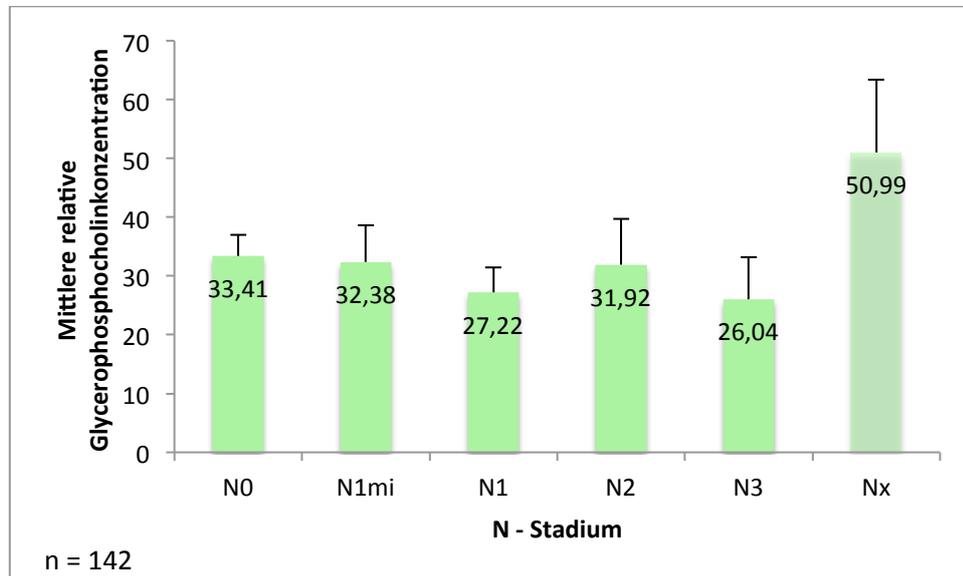


Abb. 35: Glycerophosphocholin in Abhängigkeit vom Lymphknoten - Status gemäß TNM Klassifikation. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM. Korrelation n. s. = nicht signifikant.

In Ergänzung zu den obigen Analysen sind in den folgenden beiden Tabellen die mittleren Konzentrationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium in zwei Gruppen dargestellt (N0/N1 vs. N2/N3). Die mittleren Konzentrationen von Cholin bei den Patientinnen mit höherem LK-Stadium (N2/N3) lagen deutlich höher als in der N0/N1-Gruppe. Für Glycerophosphocholin und Phosphocholin lag die mittlere Konzentration in beiden Gruppen auf etwa ähnlichem Niveau. Trotz des großen Unterschiedes zwischen den beiden Subgruppen (N0/N1 vs. N2/N3) im Falle von Cholin konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Tab. 22).

	Stadium N0-N1 n = 117		Stadium N2-N3 n = 14		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	1,35	0,28	3,44	3,02	n.s.
Phosphocholin	5,98	2,17	5,48	3,77	n.s.
Glycerophosphocholin	30,8	2,51	28,82	5,49	n.s.

Tab. 22: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Lymphknotenstadium N0/N1 vs. N2/N3. Nx n = 11, Gesamt n = 142. SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.7.3 Metastasen-Stadium (M)

Im Hinblick auf das Metastasen-Stadium M des TNM-Systems lagen lediglich für 58 Tumorproben verwertbare Angaben vor. M0 bedeutet, dass keine Fernmetastasen diagnostiziert wurden. M1 steht für das Vorliegen einer Fernmetastasierung bei Diagnosestellung.

Signifikante Unterschiede der Metabolitenkonzentrationen zwischen M0 vs. M1 konnten nicht festgestellt werden. Zwar fanden sich bei allen Metaboliten im Falle von Metastasen deutlich geringere mittlere Konzentrationen. Die Unterschiede blieben jedoch ohne statistische Signifikanz (Tab. 23).

	Stadium M0 n = 50		Stadium M1 n = 8		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,34	0,50	0,58	0,34	n.s.
Phosphocholin	9,14	4,86	7,74	7,03	n.s.
Glycerophosphocholin	30,00	3,70	11,73	3,53	n.s. (p = 0,055)

Tab. 23: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Metastasen-Stadium M0 vs. M1. Mx n = 84. Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.8 Korrelation mit dem histologischen Differenzierungsgrad des Tumors

Im Tumorprobengut (n = 142) fanden sich 138 Proben, in denen sowohl Angaben zum Differenzierungsgrad des Tumors als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert waren. Bei 10 Tumoren lag ein hoher Differenzierungsgrad vor (Grad 1), bei 128 Tumoren schon ein geringer Grad (2 oder 3). Die Metabolitenkonzentrationen von Cholin und Glycerophosphocholin standen mit dem Differenzierungsgrad in keinem erkennbaren Zusammenhang. Die mittleren Konzentrationen lagen in etwa auf ähnlichem Niveau. Ein deutlicher Unterschied fiel allerdings hinsichtlich Phosphocholin auf. Bei hohem Differenzierungsgrad waren die Konzentrationen in der untersuchten Probe etwa 4-mal geringer als bei geringer Tumordifferenzierung. Der Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz (1,39 vs. 6,07; n.s.) (Tab. 24).

	Differenzierung hoch (Grad 1) n = 10		Differenzierung gering (G2 + G3) n = 128		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	1,00	0,48	1,58	0,42	n.s.
Phosphocholin	1,39	0,81	6,07	2,02	n.s.
Glycerophosphocholin	36,26	10,26	31,85	2,39	n.s.

Tab. 24: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Tumordifferenzierung hoch vs. gering. Gx n = 4, Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.9 Einfluss des Östrogenrezeptorstatus

In der Gruppe maligner Proben (n = 142) fanden sich 137 Proben, bei denen sowohl Angaben zum Östrogenrezeptor-Status des Tumors als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert waren. Bei 32 Tumoren fanden sich keine Östrogenrezeptoren (negativ), bei 105 Tumoren war der Befund positiv.

Auf Glycerophosphocholin hatte der Östrogenrezeptorstatus keinen erkennbaren Einfluss. Hinsichtlich der beiden anderen Metaboliten ergab sich folgendes Bild: Cholin wies bei negativem Rezeptorstatus einen Durchschnittswert auf, der etwa halb so hoch war wie in Proben mit positivem Rezeptorstatus. In Bezug auf Phosphocholin war das Ergebnis in etwa umgekehrt. Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch in keinem dieser Fälle festgestellt werden (Tab. 25).

	Östrogenrezeptor negativ n = 32		Östrogenrezeptor positiv n = 105		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	0,65	0,25	1,82	0,50	n.s.
Phosphocholin	10,84	7,62	4,19	0,95	n.s.
Glycerophosphocholin	37,20	5,31	31,71	2,73	n.s.

Tab. 25: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Östrogenrezeptor negativ vs. positiv. Östrogenrezeptorstatus unbekannt: n = 5. Gesamt n = 142.

SEM: Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.10 Zusammenhang mit dem Progesteronrezeptorstatus

In der Gesamtgruppe (n = 142) fanden sich 137 Proben, in denen sowohl Angaben zum Progesteronrezeptorstatus des Tumors als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert waren. Bei

41 Proben fanden sich keine Progesteronrezeptoren (negativ), bei 96 Tumorproben war der Befund positiv.

Auf die beiden untersuchten Metaboliten Cholin und Glycerophosphocholin hatte der Progesteronrezeptorstatus keinen größeren Einfluss. Ein etwas deutlicherer Befund konnte lediglich in Bezug auf Phosphocholin festgestellt werden. Hierbei wiesen Proben mit negativem Rezeptorstatus einen etwa dreifach so hohen Mittelwert auf, als solche mit positivem Progesteronrezeptorstatus. Allerdings lag keine statistische Signifikanz vor (10,03 vs. 3,90; n.s.) (Tab. 26).

	Progesteronrezeptor negativ n = 41		Progesteronrezeptor positiv n = 96		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,05	0,46	1,77	0,52	n.s.
Phosphocholin	10,03	6,01	3,90	0,90	n.s.
Glycerophosphocholin	34,73	4,73	32,23	2,83	n.s.

Tab. 26: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Progesteronrezeptor negativ vs. positiv. Progesteronrezeptorstatus unbekannt: n = 5. Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.11 Einfluss des HER2-Rezeptorstatus

In der Gesamtgruppe (n = 142) fanden sich 137 Proben, in denen sowohl Angaben zum HER2-Rezeptorstatus des Tumors als auch zu den drei Metaboliten dokumentiert waren. Bei 112 Proben fanden sich keine HER2-Rezeptoren (negativ), bei 25 Proben war der Befund positiv.

Auf die beiden Metaboliten Phosphocholin und Glycerophosphocholin hatte der HER2-Rezeptorstatus keinen erkennbaren Einfluss. Die jeweiligen Mittelwerte lagen auf vergleichbarem Niveau. Hinsichtlich Cholin fiel auf, dass Tumorproben mit positivem Rezeptorstatus einen mehr als doppelt so hohen Mittelwert aufwiesen wie HER2-negative Proben. Die Differenz war statistisch signifikant (1,14 vs. 3,37; * $p = 0,027$) (Tab. 27).

	HER2-Rezeptor negativ n = 112		HER2-Rezeptor positiv n = 25		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	1,14	0,26	3,37	1,77	* p = 0,027
Phosphocholin	5,82	2,26	5,26	2,40	n.s.
Glycerophosphocholin	32,72	2,70	34,10	5,72	n.s.

Tab. 27: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich HER2-Rezeptor negativ vs. positiv. HER2-Rezeptorstatus unbekannt: n = 5. Gesamt n = 142.

Signifikanter Unterschied CholinKonzentration bei HER2 positiv vs. negativ: * p = 0,027; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$). SEM = Standardfehler des Mittelwertes.

6.2.12 ¹HRMAS-Daten bei Triple-negativen Tumoren

In der Gesamtgruppe (n = 142) fanden sich 137 Proben, in denen sowohl Angaben zu allen drei Rezeptortypen (Östrogen, Progesteron, HER2) vorlagen, als auch zu den drei Metaboliten Werte dokumentiert waren. Es fanden sich 26 Proben mit Triple-negativen Tumoren und 111 Proben, bei denen mindestens einer der drei Rezeptortypen positiv war.

Deutlichere Unterschiede hinsichtlich der mittleren Konzentrationen konnten für Cholin und Phosphocholin festgestellt werden. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Tab. 28).

	Triple-Rezeptor negativ n = 26		1-3 Rezeptor(en) positiv n = 111		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	0,39	0,13	1,82	0,48	n.s.
Phosphocholin	12,60	9,43	4,15	0,90	p = 0,082
Glycerophosphocholin	39,73	6,22	31,44	2,62	n.s.

Tab. 28: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Triple-Rezeptor negative Tumoren vs. min. 1 Rezeptor positive Tumoren. Rezeptorstatus unbekannt n = 5. Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.13 Zusammenhang mit der Cholinkinase

6.2.13.1 Cholinkinase gesamt ($\alpha + \beta$)

In der Gesamtgruppe aller Proben (n = 162) wurden 50 Proben mittels Western Blot hinsichtlich der Cholinkinase untersucht. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Cholinkinase und den drei untersuchten Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycero-

phosphocholin) festgestellt werden. Dasselbe galt für die Subgruppe der Patienten mit malignen Proben. In der Subgruppe der Proben mit benignem Histologiebefund fiel jedoch eine starke negative Korrelation zwischen der Cholinkinase und dem Metaboliten Phosphocholin auf (Rho -0,94; * $p = 0,005$). Mit zunehmendem Cholinkinasewert konnte demnach eine Verminderung der Phosphocholinkonzentration beobachtet werden (Tab. 29).

Korrelation Cholinkinase (alpha+beta)	Benigne n = 6		Maligne n = 44	
	Rho	Signifikanz	Rho	Signifikanz
Cholin	-0,40	n.s.	-0,14	n.s.
Phosphocholin	-0,94	* p = 0,005	0,01	n.s.
Glycerophosphocholin	0,14	n.s.	0,25	n.s.

Tab. 29: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und Cholinkinase. Gesamt n = 50.

Signifikante Korrelation zwischen Phosphocholinkonzentration und Cholinkinase -0,94 (* $p = 0,005$) in benignem Gewebe. Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Um die Relevanz des obigen Ergebnisses zu veranschaulichen, ist in der folgenden Abbildung die mittlere Phosphocholinkonzentration in Abhängigkeit von der Cholinkinase dargestellt (für Subgruppe benigne). Mit zunehmender Cholinkinasekonzentration fiel die Konzentration des Metaboliten Phosphocholin ab. Besonders auffällig war die hohe mittlere Phosphocholinkonzentration bei Cholinkinasewerten bis 0,5 (n = 2; 4,11), wobei im Vergleich zu den anderen beiden Cholinkinase-Gruppen keine statistische Signifikanz vorlag (Abb. 36).

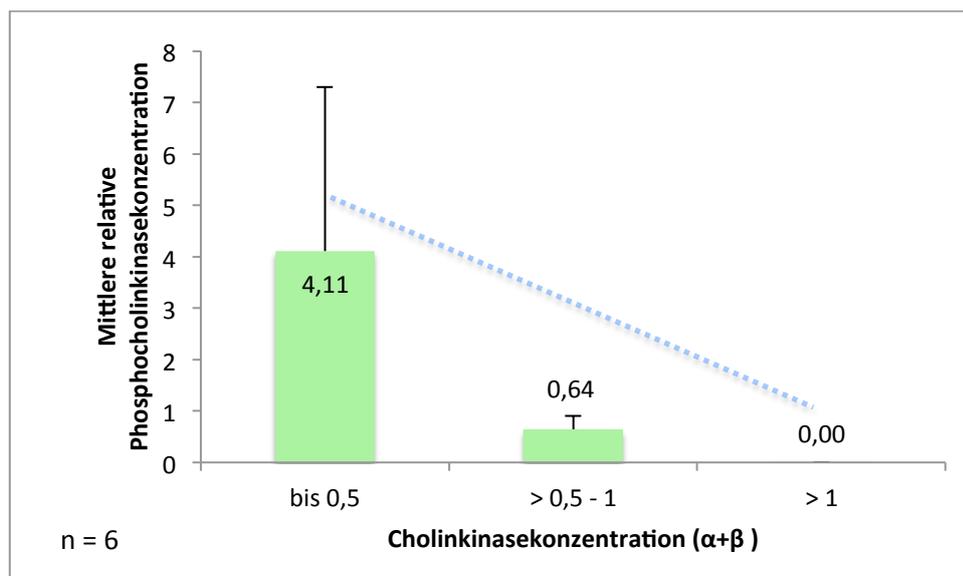


Abb. 36: Phosphocholinkonzentration in Abhängigkeit von der Cholinkinase ($\alpha+\beta$).

Subgruppe benigne Proben. Linearer Trend: $y = -2,0533x + 5,6955$.

6.2.13.2 α -Cholinkinase

Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der α -Cholinkinase und den drei untersuchten Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin) festgestellt werden. In der Subgruppe der Proben mit benignem Histologiebefund fiel jedoch wiederum eine stärkere negative Korrelation zwischen der α -Cholinkinase und dem Metaboliten Phosphocholin auf, wobei eine statistische Signifikanz verfehlt wurde (Rho -0,77; $p = 0,072$). Mit zunehmender α -Cholinkinasekonzentration konnte demnach, zumindest tendenziell, eine Verminderung der Phosphocholinkonzentration beobachtet werden (Tab. 30).

Korrelation α -Cholinkinase	Benigne n = 6		Maligne n = 44	
	Rho	Signifikanz	Rho	Signifikanz
Cholin	-0,03	n.s.	-0,13	n.s.
Phosphocholin	-0,77	$p = 0,072$	0,12	n.s.
Glycerophosphocholin	-0,26	n.s.	0,05	n.s.

Tab. 30: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und α -Cholinkinase. Gesamt n = 50. Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.13.3 β -Cholinkinase

Auch in Bezug auf die β -Cholinkinase konnte keine statistisch signifikante Korrelation mit den drei untersuchten Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin) festgestellt werden. In der Subgruppe der benignen Proben fiel jedoch auch hier wieder eine stärkere negative Korrelation zwischen der β -Cholinkinase und dem Metaboliten Phosphocholin auf, wobei eine statistische Signifikanz auch tendenziell nicht mehr vorhanden war (Rho -0,71; $p = 0,11$) (Tab. 31).

Korrelation β -Cholinase	Benigne n = 6		Maligne n = 44	
	Rho	Signifikanz	Rho	Signifikanz
Cholin	-0,21	n.s.	-0,15	n.s.
Phosphocholin	-0,71	n.s.	0,11	n.s.
Glycerophosphocholin	-0,20	n.s.	0,03	n.s.

Tab. 31: Korrelationen zwischen Metabolitenkonzentrationen und β -Cholinase. Gesamt n = 50. Rho = Spearman Korrelationskoeffizient; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.14 Abhängigkeit der Phosphocholinkonzentration vom Cholinangebot

In der Gruppe maligner Proben (n = 142) waren bei 140 Proben Informationen zur Cholin- und zur Phosphocholinkonzentration vorhanden. Es zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Cholinkonzentration und der Phosphocholinkonzentration (Rho = 0,321; * $p < 0,001$). Je mehr Cholin vorhanden war, desto höher war die Phosphocholinkonzentration. Dies soll am folgenden Diagramm verdeutlicht werden. Es zeigt sich ein linearer Trend. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 37).

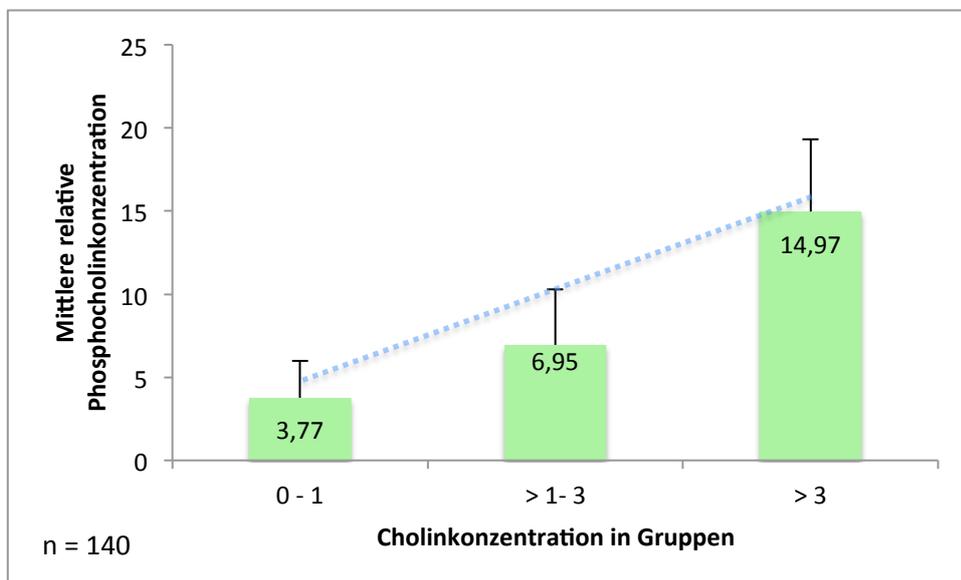


Abb. 37: Mittlere Phosphocholinkonzentration in Abhängigkeit vom Cholinangebot. Metabolitenkonz. unbekannt: n = 2; Gesamt n = 142. Linearer Trend: $y = 5,599x - 2,6376$. Fehlerindikator: Standardfehler des Mittelwertes SEM.

6.2.15 Der Einfluss von Triple-negativen Tumoren auf die Cholinkinasekonzentration

In der Gruppe maligner Proben (n = 142) fanden sich 44 Proben, in denen sowohl Angaben zu allen drei Rezeptortypen (Östrogen, Progesteron, HER2) als auch zur Cholinkinase vorlagen. Es fanden sich 8 Proben von Triple-negativen Tumoren und 36 Proben, bei denen mindestens einer der drei Rezeptortypen positiv war.

Deutlichere Unterschiede hinsichtlich der mittleren Konzentrationen konnten für alle drei Enzymformen festgestellt werden. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Tab. 32).

	1-3 Rezeptor(en) positiv n = 36		Triple-Rezeptor negativ n = 8		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
α -Cholinkinase	3,01	0,81	1,65	0,73	n.s.
β -Cholinkinase	1,79	0,34	0,81	0,27	n.s.
Cholinkinase gesamt	1,60	0,43	0,92	0,85	n.s.

Tab. 32: Semiquantitative Cholinkinasekonzentrationen. Vergleich Triple-Rezeptor negativ vs. min. 1 Rezeptor positiv. Cholinkinase unbekannt n = 98. Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.16 Zusammenhang mit Outcome

6.2.16.1 Allgemeine Vorbemerkung

Hinsichtlich von Cholin und Phosphocholin konnten hierbei Einteilungen wie folgt vorgenommen werden: (1) Metabolitenkonzentration 0 - 0,1; (2) Metabolitenkonzentration > 0,1 - 5; (3) Metabolitenkonzentration > 5.

Hinsichtlich Glycerophosphocholin war eine solche Einteilung nicht möglich, da nur wenige Proben Nullwerte aufwiesen. Daher erfolgte die Einteilung in die drei Subgruppen wie folgt: (1) Metabolitenkonzentration 0 - 10; (2) Metabolitenkonzentration > 10 - 40; (3) Metabolitenkonzentration > 40. Anhand dieser Einteilung konnten drei ca. gleich große Subgruppen gebildet werden.

6.2.16.2 Rezidiv

In der Gruppe maligner Proben ($n = 142$) fanden sich bei 140 Proben Angaben zur Rezidivfreiheit bzw. zum Vorhandensein eines Rezidivs im Beobachtungszeitraum bis zu 120 Monaten nach Diagnosestellung (= Probenentnahme) und zu den jeweiligen Metabolitenkonzentrationen. Bei 99 Proben entwickelten die entsprechenden Tumore kein Rezidiv bis zur letzten dokumentierten Kontrollvisite. In 41 Fällen wurde im Verlauf ein Tumorrezidiv diagnostiziert. Bei den Tumorproben mit Rezidiv fand sich hinsichtlich Cholin eine deutlich geringere mittlere Konzentrationen als in der rezidivfreien Gruppe. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Im Fall von Phosphocholin und Glycerophosphocholin lagen die mittleren Konzentrationen in Proben der rezidivfreien Gruppe niedriger als in Proben der Gruppe mit Rezidiv. Auch hier lag keine statistische Signifikanz vor (Tab. 33).

	Rezidiv nein n = 99		Rezidiv ja n = 41		Signifikanz p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Cholin	1,75	0,50	0,99	0,45	n.s.
Phosphocholin	4,57	1,08	8,33	5,96	n.s.
Glycerophosphocholin	30,98	2,73	35,67	4,72	n.s.

Tab. 33: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich Rezidiv nein vs. ja. Rezidivstatus unbekannt $n = 2$. Gesamt $n = 142$.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Das mittlere Intervall bis zum Auftreten eines Rezidivs lag bei $87,16 \pm 41,31$ Monaten (95%-Konfidenzintervall: 80,26 - 93,70 Mon.). Im Falle eines Rezidivs trat dieses nach einem mittleren Intervall von $46,18 \pm 31,60$ Monaten auf (95%-Konfidenzintervall: 36,31 - 55,86 Mon.).

Das mittlere Rezidivintervall (Intervall zwischen Probenentnahme und Rezidiv) lag in der Gruppe mit einem geringen Cholinnachweis (rel. Konzentration = 0 - 0,1) in der Probe bei 99,67 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 91,17 - 108,16 Mon.). In der Gruppe mit rel. Cholin-konzentrationen > 0,1 - 5 lag dieses Intervall mit 91,64 Monaten etwas darunter (95%-Konfidenzintervall: 80,59 - 102,70 Mon.). In der Gruppe mit einer vergleichsweise hohen Cholinkonzentration (rel. Konzentration > 5) lag das mittlere Rezidivintervall bei 113,44 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 101,33 - 125,56 Mon.).

Das Ergebnis spiegelt sich auch in der nachfolgend dargestellten Kaplan-Meier-Grafik wider. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Subgruppen konnte nicht festgestellt werden ($p \geq 0,05$) (Abb. 38).

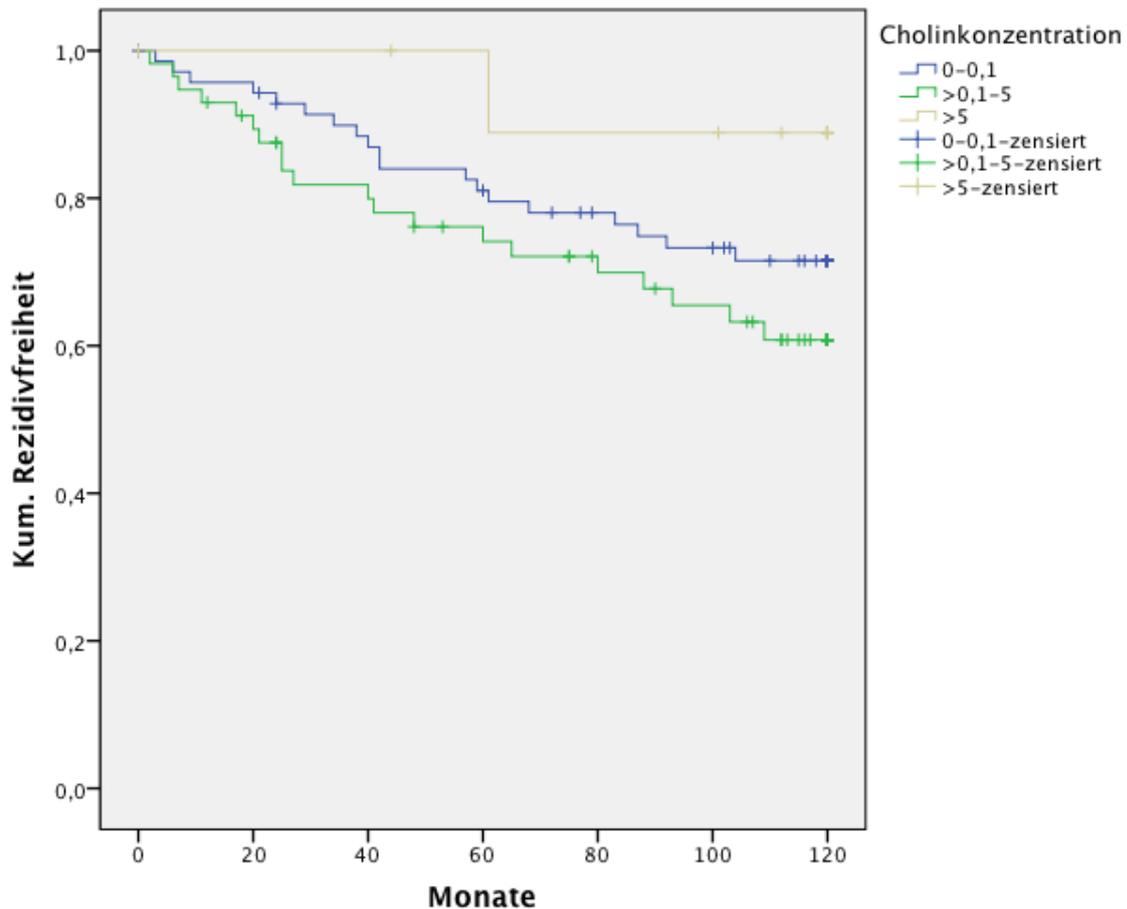


Abb. 38: Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Im Hinblick auf den Metaboliten Phosphocholin ergab sich folgendes Bild: Das mittlere Rezidivintervall lag in der Gruppe mit geringer Phosphocholinkonzentration (rel. Konzentration 0 - 0,1) bei 90,71 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 79,60 - 101,82 Mon.). In der Gruppe mit rel. Konzentrationen $> 0,1 - 5$ lag dieses Intervall mit 99,48 Monaten etwas darüber (95%-Konfidenzintervall: 89,61 - 109,35 Mon.). In der Gruppe mit der höchsten Phosphocholinkonzentration (rel. Konzentration > 5) lag das mittlere Rezidivintervall bei 108,02 Monaten (95%.Konfidenzintervall: 97,70 – 118,34 Mon.). Man kann den Trend erkennen, dass bei einer höheren Phosphocholinkonzentration weniger Rezidive zu verzeichnen sind und auch das rezidivfreie Überleben länger ist.

Das Ergebnis spiegelt sich auch in der nachfolgend dargestellten Kaplan-Meier-Grafik wider. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Subgruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden ($p \geq 0,05$) (Abb. 39).

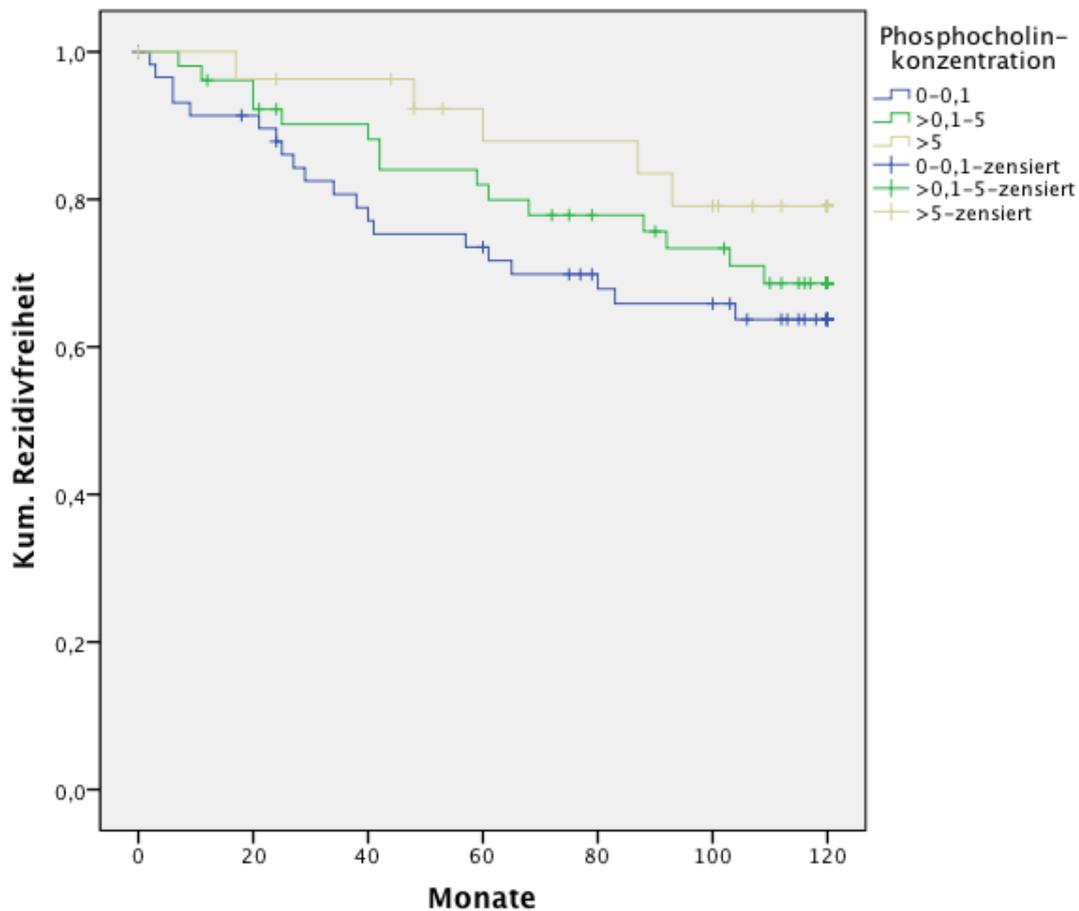


Abb. 39: Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der Phosphocholinkonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Auch hinsichtlich des Metaboliten Glycerophosphocholin konnte kein signifikanter Einfluss auf das Rezidivintervall gezeigt werden. Die Proben mit einer relativen Konzentrationen von 0 - 10 wiesen ein mittleres Intervall von 91,58 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 76,38 - 106,73 Mon.) auf. Die Proben mit relativen Konzentrationen > 10 - 40 zeigten ein mittleres Rezidivintervall von 99,80 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 90,76 - 108,85 Mon.). Die Proben mit der höchsten relativen Glycerophosphocholinkonzentration von > 40 zeigten ebenfalls ein mittleres Rezidivintervall von 98,80 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 88,00 - 109,59 Mon.). Anhand der Kaplan-Meier-Analyse konnte hierbei keine statistische Signifikanz festgestellt werden ($p \geq 0,05$) (Abb. 40). Auffallend ist, dass unabhängig von der Glycerophosphocholinkonzentration der Proben nach 10 Jahren in allen Gruppen ungefähr gleich viele Patientinnen an einem Rezidiv erkrankt waren. Während die Gruppe mit geringen Glycerophosphocholinkonzentrationen tendenziell früher ein Rezidiv aufwies, zeichnete sich ein Rezidiv in den Gruppe mit mittlerer oder hoher Glycerophosphocholinkonzentration in der Tumorprobe eher im späteren Verlauf ab.

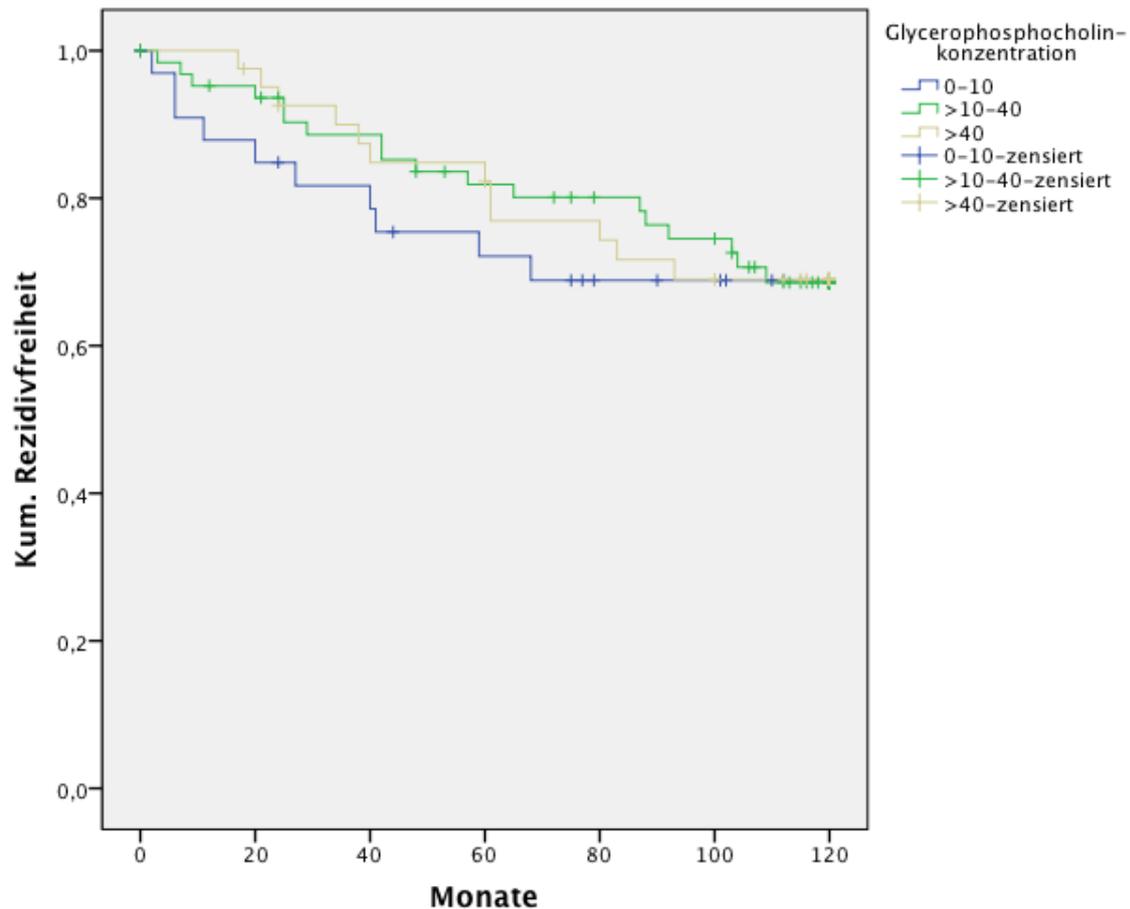


Abb. 40: Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der Glycerophosphocholinkonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Unter den 50 Western-Blot Proben fanden sich 42 maligne Proben, bei denen Informationen über die Rezidiv- und Mortalitätsrate dokumentiert waren. Die Rezidivrate wurde mit der relativen Konzentration der Cholinkinase verglichen. Bei erhöhter Enzymkonzentration zeigten sich eine verringerte Rezidivrate und ein verlängertes rezidivfreies Überleben. Die Auswertungen blieben statistisch nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abb. 41).

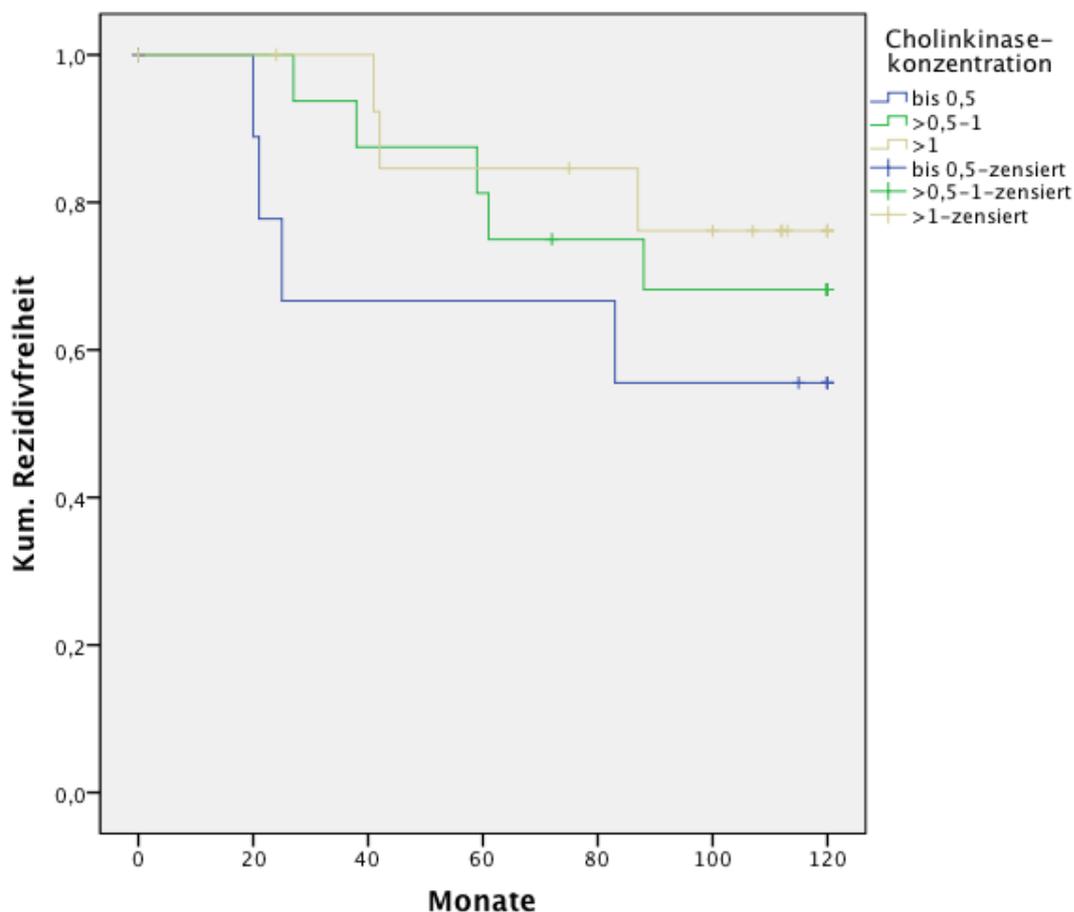


Abb. 41: Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der Cholinkinasekonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Mittels der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde geprüft, ob die drei Metabolite Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin gemeinsam einen Einfluss auf die Rezidivrate haben. Im Omnibustest der Modellkoeffizienten zeigte sich jedoch keine Signifikanz (Tab. 34).

Metabolite	Signifikanz der Metabolite	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Cholin	0,38	1,83	3	0,61
Phosphocholin	0,47			
Glycerophosphocholin	0,64			

Tab. 34: Gemeinsamer Einfluss der drei Metabolite aus HRMAS-Spektroskopie auf die Rezidivrate. Omnibustest der Modellkoeffizienten per Cox-Regressionsanalyse: n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

6.2.16.3 Mortalität

In der Gruppe der Tumorproben ($n = 142$) lagen in 140 Fällen Informationen zum Überleben der jeweiligen Patientinnen sowie zu den Metabolitenkonzentrationen vor. Es waren 30 To-

desfälle dokumentiert. Die mittleren Konzentrationen der Metaboliten waren bei diesen 30 Patientenproben deutlich geringer als bei den Proben der Überlebenden. Dies traf insbesondere für Cholin und Phosphocholin zu. Trotz der deutlichen Differenzen lag keine statistische Signifikanz vor (Tab. 35).

	Überlebt n = 110		Verstorben n = 30		Signifikanz
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	p-Wert
Cholin	1,74	0,47	0,78	0,30	n.s.
Phosphocholin	6,93	2,31	0,81	0,31	n.s.
Glycerophosphocholin	34,15	2,69	25,44	4,83	n.s.

Tab. 35: Metabolitenkonzentrationen der HRMAS-Spektroskopie. Vergleich überlebt vs. verstorben. Überleben bzw. Metabolitenkonzentration nicht dokumentiert n = 2. Gesamt n = 142.

SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n.s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Die mittlere Überlebensdauer aller Patientinnen lag bei $95,31 \pm 36,98$ Monaten (95%-Konfidenzintervall: 88,59 - 101,05 Mon.). Die mittlere Überlebensdauer aller verstorbenen Patientinnen lag bei $62,9 \pm 34,49$ Monaten (95%-Konfidenzintervall: 50,05 - 74,86 Mon.).

In der folgenden Grafik ist das kumulative Überleben (= Intervall der Probenentnahme bis zum Todeszeitpunkt) der Patientinnen in Abhängigkeit von der relativen Cholinkonzentration ihrer Probe dargestellt. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer relativen Cholinkonzentration bis 0,1 in der entsprechenden Tumorprobe mit 105,74 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 98,68 - 102,80 Mon.) ungefähr genauso lange überleben wie Patientinnen, deren Proben eine relative Cholinkonzentration $> 0,1 - 5$ zeigten (106,56 Monate; 95%-Konfidenzintervall: 98,74 - 114,37 Mon.) aufweisen. Tendenziell höhere Überlebensraten und ein längeres Überleben zeigten Patientinnen, deren Proben eine relative Cholinkonzentration > 5 aufwiesen (113,78 Monate; 95%-Konfidenzintervall: 102,28 - 125,28 Mon.). Die Ergebnisse stellen lediglich eine Tendenz dar. Eine statistische Signifikanz ließ sich nicht darstellen ($p \geq 0,05$) (Abb. 42).

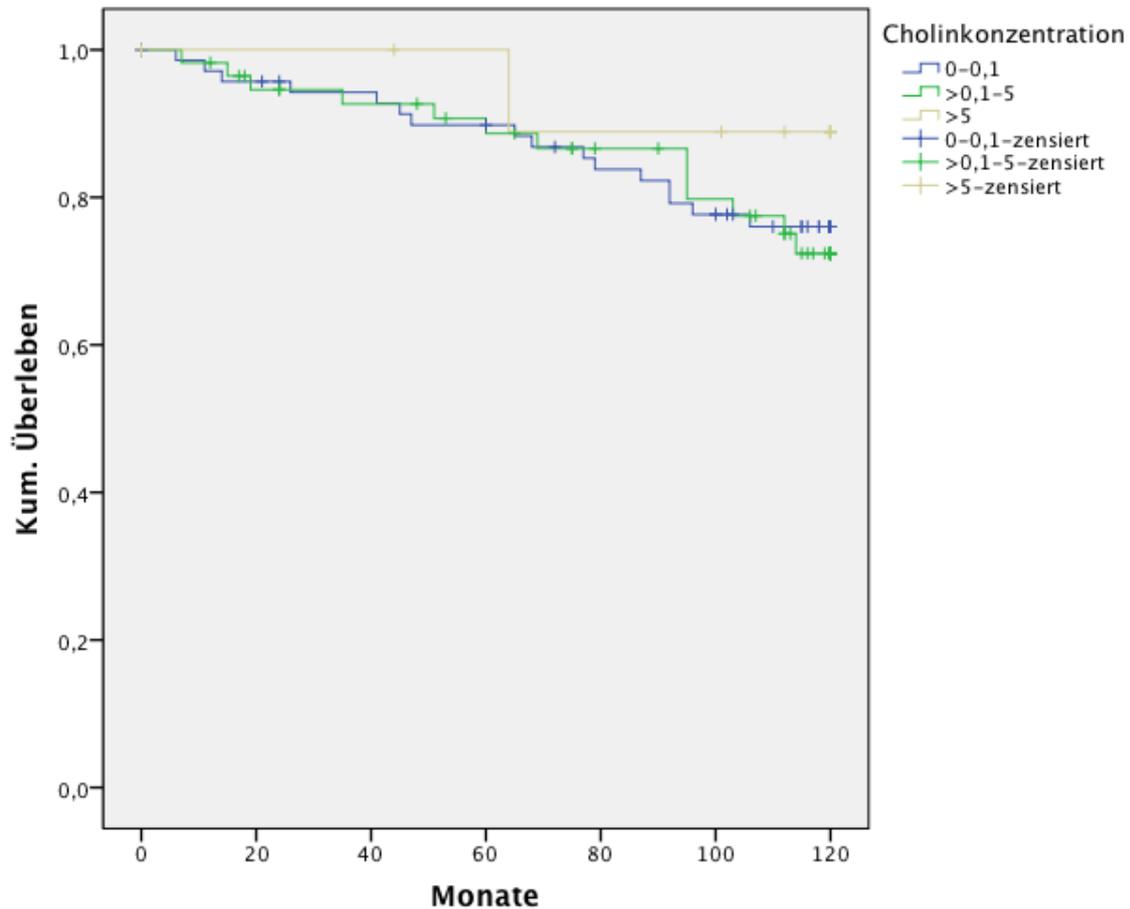


Abb. 42: Überleben in Abhängigkeit von der Cholinkonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Für die Phosphocholinkonzentration konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben festgestellt werden. Das mittlere Überleben der Patientinnen, deren Proben eine relative Phosphocholinkonzentration von 0 - 0,1 aufwiesen, lag bei 100,96 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 92,31 - 109,61 Mon.). In der Gruppe mit einer relativen Phosphocholinkonzentration $> 0,1 - 5$ lag das Überleben durchschnittlich bei 107,75 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 99,81 - 116,69 Mon.). Die Subgruppe mit der höchsten relativen Phosphocholinkonzentration (> 5) zeigte auch die längste mittlere Überlebensrate von 117,59 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 114,40 - 120,78 Mon.). Die Kaplan-Meier-Analyse erwies sich als statistisch signifikant (* $p = 0,048$). Je höher die Phosphocholinkonzentration der Probe, desto länger blieben die Patientinnen am Leben und desto weniger Patientinnen verstarben (Abb. 43).

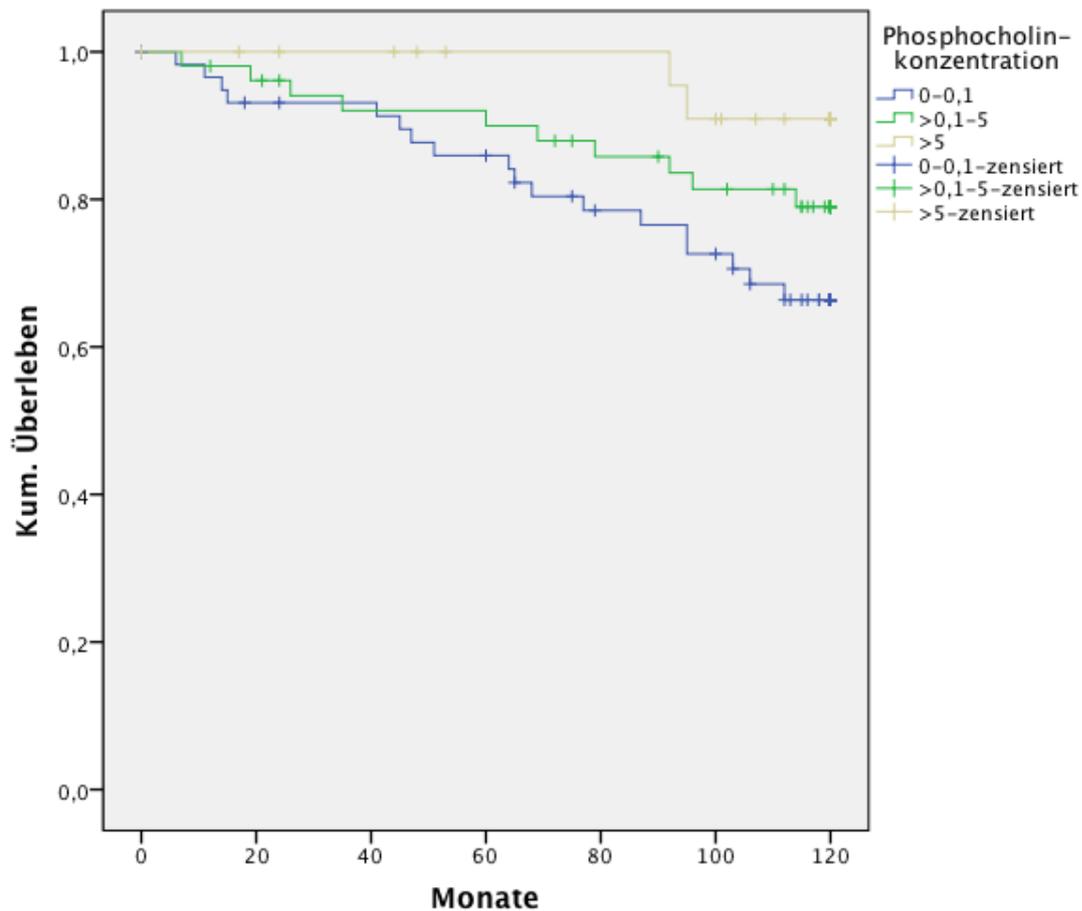


Abb. 43: Überleben in Abhängigkeit von der Phosphocholinkonzentration. Signifikante Abhängigkeit: * $p = 0,048$ Log Rank (Mantel-Cox).

Zur Prüfung der Relevanz dieses Ergebnisses wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurde geprüft, ob die Phosphocholinkonzentration gemeinsam mit den etablierten Parametern wie TNM-Stadium, Differenzierungsgrad sowie Alter einen Einfluss auf das Überleben hat. Im Omnibustest der Modellkoeffizienten ergab sich jedoch keine Signifikanz (Tab. 36).

Variablen	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Phosphocholin	6,06	6	0,41
T-Stadium			
N-Stadium			
M-Stadium			
Differenzierungsgrad			
Alter			

Tab. 36: Cox-Regressionsanalyse zur Prüfung des gemeinsamen Einflusses von Phosphocholin, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad und Alter auf die Mortalität. Omnibussignifikanz der Modellkoeffizienten: n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Ebenso wurde geprüft, ob Phosphocholin einen gemeinsamen Einfluss auf die Mortalität mit den etablierten Tumormarkern Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, Her2-Rezeptorstatus und dem dreifach negativen Rezeptorstatus hat. Auch hier zeigte der Omnibustest der Modellkoeffizienten in der Cox-Regressionsanalyse keine statistische Signifikanz (Tab. 37).

Variablen	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Phosphocholin	6,77	5	0,24
Östrogenrezeptorstatus			
Progesteronrezeptorstatus			
Her2-Rezeptorstatus			
Triple-negativer Rezeptorstatus			

Tab. 37: Cox-Regressionsanalyse zur Prüfung des gemeinsamen Einflusses von Phosphocholin, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad und Alter auf die Mortalität. Omnibussignifikanz der Modellkoeffizienten: n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Für den Metaboliten Glycerophosphocholin zeigten die Patientinnen tendenziell eine bessere Überlebensrate, je höher die Glycerophosphocholinkonzentration in der Tumorprobe gemessen wurde. Das mittlere Überleben der Patientinnen, deren Proben eine relative Glycerophosphocholinonzentration von 0 - 10 zeigten, lag mit 101,76 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 90,27 - 113,26 Mon.) tendenziell unter der mittleren Überlebensdauer der Patientinnen, deren Proben eine relative Glycerophosphocholinkonzentration $> 10 - 40$

aufwiesen (106,48 Monate; 95%-Konfidenzintervall: 98,98 - 113,96 Mon.). Die höchste Überlebensrate hatten Patientinnen, in deren Proben die höchste relative Glycerophosphocholinkonzentration (> 40) gemessen wurde. Hier lag das mittlere Überleben bei 110,82 Monaten (95% Konfidenzintervall: 103,75 - 117,89 Mon.). Die Kaplan-Meier-Analyse erbrachte jedoch keinen statistisch signifikanten Befund ($p \geq 0,05$) (Abb. 44).

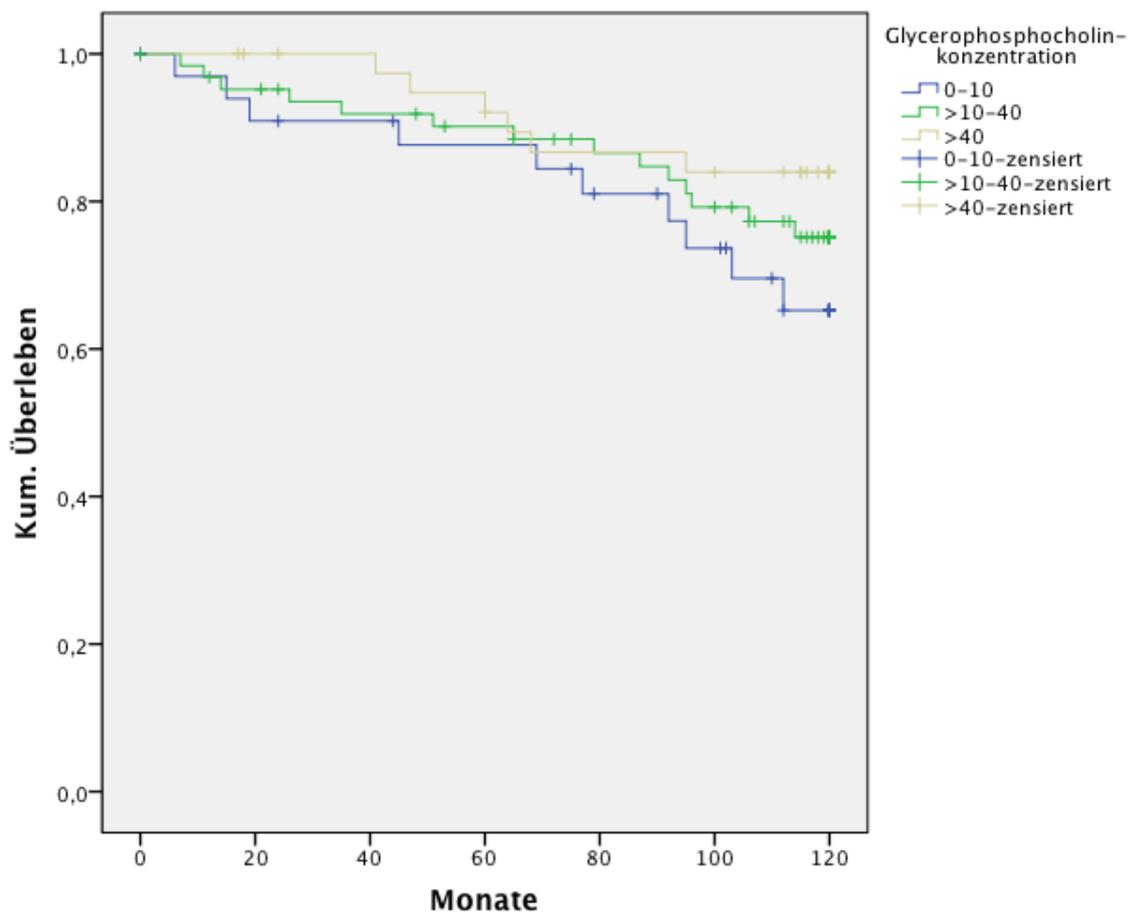


Abb. 44: Überleben in Abhängigkeit von der Glycerophosphocholinkonzentration. Abhängigkeit n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Teilte man die Proben nur in zwei Subgruppen (rel. Konzentration 0 - 50 bzw. > 50) ein, zeigte sich die zuvor angedeutete Tendenz statistisch signifikant. In der Subgruppe mit einer relativen Glycerophosphocholinkonzentration von 0 - 50 in der Probe zeigten die Patientinnen eine signifikant niedrigere mittlere Überlebensrate (104,25 Monate; 95%-Konfidenzintervall: 98,2 - 110,3 Mon.) als die Patientinnen, deren Proben eine relative Glycerophosphocholinkonzentration von > 50 aufwiesen (114,83 Monate; 95%-Konfidenzintervall: 108,83 - 120,83). Die Kaplan-Meier-Analyse wird unten dargestellt und zeigte sich statistisch signifikant (* $p = 0,049$) (Abb. 45).

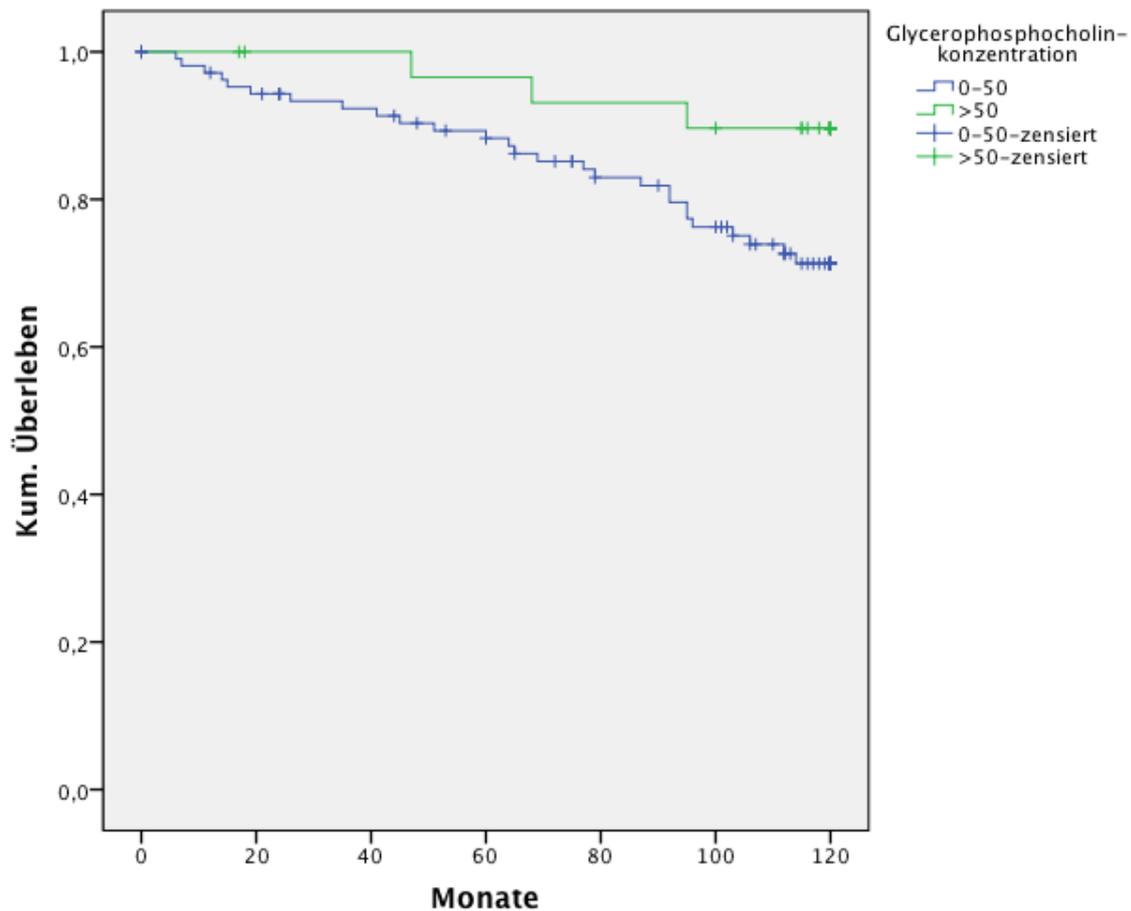


Abb. 45: Überleben in Abhängigkeit von der Glycerophosphocholinkonzentration bei zwei Faktorengruppen (Konz. > 50 vs. 0 - 50). Signifikante Abhängigkeit: * $p = 0,049$ Log Rank (Mantel-Cox).

Zur Prüfung der Relevanz dieses Ergebnisses wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurde geprüft, ob die Glycerophosphocholinkonzentration gemeinsam mit den etablierten Parametern wie TNM-Stadium, Differenzierungsgrad sowie Alter einen Einfluss auf das Überleben hat. Im Omnibustest der Modellkoeffizienten ergab sich jedoch keine Signifikanz (Tab. 38).

Variablen	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Glycerophosphocholin	4,84	6	0,57
T-Stadium			
N-Stadium			
M-Stadium			
Differenzierungsgrad			
Alter			

Tab. 38: Cox-Regressionsanalyse zur Prüfung des gemeinsamen Einflusses von Glycerophosphocholin, TNM-Stadium, Differenzierungsgrad und Alter auf die Mortalität. Omnibussignifikanz der Modellkoeffizienten: n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Ebenso wurde geprüft, ob Glycerophosphocholin einen gemeinsamen Einfluss auf die Mortalität mit den etablierten Tumormarkern Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, Her2-Rezeptorstatus und dem dreifach negativen Rezeptorstatus hat. Auch hier zeigte der Omnibustest der Modellkoeffizienten in der Cox-Regressionsanalyse keine statistische Signifikanz (Tab. 39).

Variablen	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Glycerophosphocholin	4,76	5	0,45
Östrogenrezeptorstatus			
Progesteronrezeptorstatus			
Her2-Rezeptorstatus			
Triple-negativer Rezeptorstatus			

Tab. 39: Cox-Regressionsanalyse zur Prüfung des gemeinsamen Einflusses von Glycerophosphocholin, Östrogen-, Progesteron-, Her2-Rezeptorstatus und dreifach negativem Rezeptorstatus auf die Mortalität. Omnibussignifikanz der Modellkoeffizienten: n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Im Hinblick auf die Cholinasekonzentration lag keine statistisch signifikante Korrelation mit der Überlebensdauer vor. Hier zeigte sich die Überlebensrate in allen 3 Gruppen ungefähr ähnlich. Allerdings starben die Patientinnen, deren Proben eine niedrigere relative Enzymkonzentration (0 - 0,5) aufwiesen tendenziell früher (nach durchschnittlich 101,89 Monaten) als die Patientinnen, deren Proben eine höhere relative Enzymkonzentration aufwiesen (> 0,5 - 1 bzw. > 1). Diese Gruppen wiesen eine mittlere Überlebensdauer von 112,99 Monaten (Gruppe

> 0,5 - 1) bzw. von 116,52 Monaten (Gruppe > 1) auf. Die Kaplan-Meier-Analyse blieb nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Mittels der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde geprüft, ob die drei Metaboliten Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin gemeinsam einen Einfluss auf die Mortalitätsrate haben. Im Omnibustest der Modellkoeffizienten zeigte sich jedoch keine Signifikanz (Tab. 40).

Metabolite	Signifikanz der Metaboliten	Omnibus-Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Omnibus-Signifikanz
Cholin	0,18	4,99	3	0,17
Phosphocholin	0,59			
Glycerophosphocholin	0,58			

Tab. 40: Gemeinsamer Einfluss der drei Metaboliten aus HRMAS-Spektroskopie auf die Mortalitätsrate. Omnibustest der Modellkoeffizienten per Cox-Regressionsanalyse: nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

7 Diskussion

Die wissenschaftliche Aussagekraft von HRMAS ¹HMRS bei der Erstellung von Metabolitenprofilen wurde bereits an verschiedenen Geweben validiert. Beim Mammakarzinom gelang es mit HRMAS ¹HMRS hochauflösende Spektren aus intaktem Brustkrebsgewebe zu gewinnen. Eine besondere Bearbeitung der Gewebeproben und das damit verbundene Risiko einer Verfälschung der in vivo Bedingungen war nicht erforderlich.

Wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt, kann im MR-Spektrum bösartiges Gewebe von gutartigem Gewebe unterschieden werden. Die Spektrenregion 3,0 – 4,2 ppm ist frei von Überschattungen durch Fett- oder Wassersignale und beinhaltet die Metabolite Phosphocholin, Cholin, und Glycerophosphocholin, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Karzinogenese assoziiert sind und aufgrund ihrer Hydrophilie sehr gut mittels ¹HMRS darstellbar sind (Cheng et al., 1998b, Cheng et al., 1997, Cheng et al., 2005, Jordan et al., 2009, DeFeo and Cheng, 2010).

Metabolische Veränderungen innerhalb der Zelle treten möglicherweise lange vor morphologischen Zellveränderungen auf (Sitter et al., 2002). Deshalb haben wir uns folgende Fragen gestellt:

- Dienen die Metaboliten Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin eines HRMAS ¹HMRS Metabolitenprofils von intaktem, unbearbeitetem Brustkrebsgewebe zur Risikoeinschätzung und Prognose beim Mammakarzinom?
- Steht die Cholin kinase in Zusammenhang mit Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen von Phosphocholin, Glycerophosphocholin und Cholin, und ist sie Ursache für eine erhöhte Phosphocholinkonzentration?

7.1 Dient das HRMAS ¹HMRS Metabolitenprofil von Mammagewebe zur Risikoeinschätzung und Prognose beim Mammakarzinom?

Um die Frage zu klären, ob das HRMAS ¹HMRS Metabolitenprofil von intaktem, unbearbeitetem Brustkrebsgewebe als Prognosefaktor beim Mammakarzinom dienen kann, wurden die Metabolitenkonzentrationen von Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin in Mammagewebeproben untersucht und mit klinischen Parametern der jeweiligen Patientinnen verglichen. Es interessierte uns besonders, ob die Metaboliten mit der Histologie, dem TNM-Stadium, dem Differenzierungsgrad, dem Rezeptorstatus, dem Alter sowie Outcome der jeweiligen Patientin in Zusammenhang standen.

Wir konnten in dieser Untersuchung nur geringfügige Zusammenhänge der drei Metabolite mit vereinzelt Tumorkategorien oder Subgruppen feststellen. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Varianz und die Standardabweichung war aufgrund der kleinen Stichproben sehr hoch.

Andere Studien haben bei malignem Brustgewebe mittels *in vitro* und *in vivo* ^1H MRS eine erhöhte Gesamtkonzentration der cholinhaltigen Metaboliten, den sogenannten „total choline-containing compound peak“ (Gesamtcholin-Signal) im Spektrum feststellen können. An diesem Gesamtpeak scheint im Falle einer Malignität maßgeblich Phosphocholin beteiligt zu sein, wohingegen die Rolle des Glycerophosphocholins weiterhin umstritten bleibt. (Ackerstaff et al., 2003, Cao et al., 2012a, Moestue et al., 2012).

Laut eines Reviews von Katz-Brull konnten die Messungen der Gesamtcholin-Resonanz (Gesamtcholin-Peak) im ^1H MRS insbesondere bei jungen Frauen mit sehr hohem Bindegewebsanteil in der Mamma eine erhöhte Sensitivität und Spezifität von je bis zu 100 % erreichen (Katz-Brull et al., 2002a).

Eine Ergänzung der Diagnostik um ^1H MRS wäre vor allem bei jungen Patientinnen von großer Bedeutung, da diese besonders häufig an aggressiven Mammakarzinomen erkranken. Eine Zuhilfenahme der ^1H MRS könnte aus folgenden Gründen gut zu einer zuverlässigen Diagnose beitragen (Chen et al., 2011):

1. Die Sensitivität der Mammographie ist aufgrund der bindegewebsreichen Brust bei jüngeren Frauen niedriger und benötigt deshalb oft zusätzliche diagnostische Methoden wie zum Beispiel MRT oder MRS.
2. Die Wahrscheinlichkeit der Diagnose einer benignen Läsion ist bei jungen Frauen etwas höher. Hier könnte die Spezifität mittels ^1H MRS erhöht werden.

Die Validität dieser herkömmlichen und niedrigauflösenden ^1H MRS Messungen zur Erkennung von Malignität anhand eines Anstiegs des Gesamtcholin-Peaks ist allerdings wegen der Ungenauigkeit umstritten (Bolan et al., 2003, Stanwell and Mountford, 2007). So wurden laut Katz-Brull besonders kleine Tumoren als benigne diagnostiziert, weil sie keinen ausreichend großen Gesamtcholin-Peak aufwiesen. Diese Limitierungen waren aber eher technischer Natur und nicht durch intrinsische Tumoreigenschaften bedingt (Katz-Brull et al., 2002a).

Der große Unterschied zwischen der *in vivo* ^1H MRS und unserer *ex vivo* HRMAS ^1H MRS liegt in der Auflösung. Derzeitiger Standard bei *in vivo* ^1H MRS Messungen ist eine Feldstärke von ungefähr 1,5 Tesla. Unter diesen Bedingungen können nur Gewebemengen von mindestens 1

cm³ analysiert werden. Mit unserer Methode, HRMAS ¹HMRS, können Gewebestücke analysiert werden, die hundertfach kleiner (< 50 mm³) sind. Damit können Fluktuationen der Metabolitenkonzentrationen in einzelnen Tumorarealen genauer identifiziert werden. Die Analyse größerer Bereiche mittels niedrigauflösender in vivo ¹HMRS mit niedrigem Signal/Rausch-Verhältnis mittelt diese Fluktuationen und kann sie somit nicht erkennen. Eine Erhöhung der Feldstärke führt zu einer linearen Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, woraus eine Verbesserung der Sensitivität folgt (Katz-Brull et al., 2002a, Bolan et al., 2003). Unser Labor war mit einem der weltweit seltenen 14 Tesla Scanner ausgestattet. So konnten wir unsere HRMAS ¹HMRS Messungen mit einer extrem hohen Feldstärke (10-fach höher) durchführen. Es bleibt zu erforschen, ob eine höhere Auflösung und damit die Möglichkeit der Messung kleinerer Bereiche zu einer Verbesserung der Diagnostik führt, oder welche Probengröße und Auflösung zur optimalen Einschätzung des Tumors dienen.

Des Weiteren untersuchten wir lediglich drei interessante Metaboliten eines Metabolitenprofils, welches um ein Vielfaches mehr Metaboliten enthält. Zunächst sollte man auch die anderen Metaboliten genauer untersuchen. Sitter et al. empfiehlt beispielsweise auch besser das gesamte Profil und das Verhältnis der Metaboliten zueinander zu untersuchen an Stelle von einzelnen Metaboliten (Sitter et al., 2010).

7.1.1 Glycerophosphocholin

In unseren Untersuchungen war der Metabolit Glycerophosphocholin im Tumorgewebe signifikant höher konzentriert als in benignem Gewebe. Hier ließ sich also benignes Mammagewebe anhand der Glycerophosphocholinkonzentration von malignem Mammagewebe diskriminieren. Bei anderen malignen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, Glioblastom oder Chronisch Lymphatischer Leukämie fanden sich ebenfalls erhöhte Glycerophosphocholinkonzentrationen im Falle von Malignität (Rocha et al., 2010, Ackerstaff et al., 2001, Franks et al., 2002, McKnight et al., 2011). Zudem hatten Tumore mit einem hohen Tumorzellanteil in unserer Studie einen signifikant erhöhten Glycerophosphocholinwert. Je höher also der Glycerophosphocholinanteil war, desto dichter war der Tumor an Tumorzellen. Dies könnte für eine negative Prognose im Falle einer erhöhten Glycerophosphocholinkonzentration sprechen (Moestue et al., 2012). Oder aber es kann bedeuten, dass Glycerophosphocholin sich vor allem als Marker für einen kleinen, im Wachstum befindlichen Tumor eignet. Interessanterweise fand sich nämlich bei größeren - wahrscheinlich weniger dichten - Tumoren eine signifikant geringere Glycerophosphocholinkonzentration. Mög-

licherweise liegt dies an den vermehrten Anteilen von Tumornekrosen bei den größeren Tumoren. Auch Mountford et al. zeigten, dass neuauftretene Metastasen mehr Glycerophosphocholin beinhalten als ältere Metastasen, welche langsamer wachsen und eher Phosphocholin als dominanten Metaboliten zeigen (Mountford et al., 2009). Zunächst im Widerspruch hierzu scheint zu stehen, dass das kumulative Überleben und auch die Überlebenszeit von Patientinnen, deren Proben mit außerordentlich hohen Glycerophosphocholinwerten einhergingen, etwas besser sind. Hier ist zu vermuten, dass vor allem frühe Karzinome in der Entstehungs- und Wachstumsphase diese außerordentlich hohe Glycerophosphocholinkonzentration zeigen und somit der frühe Zeitpunkt der Diagnosestellung die bessere Überlebensrate bedingt. Tumore, die auch im weiteren Verlauf eine erhöhte Konzentration an Glycerophosphocholin aufwiesen, schienen insgesamt eher aggressiver zu sein. Im Therapieverlauf ließ sich eine Verminderung der Glycerophosphocholinkonzentration mit einem besseren Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie assoziieren (Cao et al., 2012b). Außerdem fand sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter; insbesondere wiesen jüngere Patientinnen im pathologischen Gewebe hohe Glycerophosphocholinwerte auf. Hier scheint die Messung der Glycerophosphocholinkonzentration folglich eher bei jüngeren Patientinnen sinnvoll zu sein, da im Falle einer Malignität Glycerophosphocholin vor allem im Gewebe bei jüngeren Patientinnen erhöht war. Der Anstieg bei älteren Patientinnen war nicht so hoch, was zu falsch negativen Ergebnissen trotz vorhandener Malignität führen könnte. Die Glycerophosphocholinkonzentration könnte also bei kleineren, schnell wachsenden Tumoren, die insbesondere bei jungen Patientinnen mit hohem Bindegewebsanteil schwerer zu erkennen sind, ein guter sensitiver Marker sein. Ein großer Tumor wird mit den heutigen Verfahren ohnehin erkannt. Auch Chen et al. haben in ihrer in vivo ^1HMR Studie einen solchen Zusammenhang nachgewiesen und fanden bei jüngeren Patientinnen einen höheren Gesamtcholin-Peak als bei Älteren (Chen et al., 2011). Es ist allerdings nicht bekannt, welche cholinhaltigen Metaboliten an dieser Erhöhung des Gesamtcholin-Peaks maßgeblich beteiligt waren. Sitter et al. wiesen in einer der unseren ähnlichen HRMAS ^1HMR Untersuchung einen aggressiveren Verlauf bei erhöhtem Glycerophosphocholin nach (Sitter et al., 2010). Unsere Hypothese, dass ein persistierend hoher Glycerophosphocholinspiegel ein Merkmal für die Aggressivität des Tumors darstellt, wird von mehreren anderen Studien untermauert (Moestue et al., 2012, Gribbestad et al., 1999, Aboagye and Bhujwalla, 1999). So fanden Cao et al. heraus, dass Brustkrebspatientinnen mit neoadjuvanter Chemotherapie einen Rückgang der Glycerophos-

phocholinkonzentration in der Biopsie aufwiesen (Cao et al., 2012c). Auch Biopsien von Hormonrezeptor-negativen Tumoren, welche als schlechter therapierbar gelten, da sie keine Differenzierung durch den Rezeptorstatus besitzen, zeigten erhöhte Glycerophosphocholinlevel (Giskeodegard et al., 2010). Der genaue Stoffwechsel von Glycerophosphocholin im Tumor ist noch nicht definitiv geklärt und wird in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert. Einige Autoren sehen Glycerophosphocholin auch als Charakteristikum für Benignität und postulieren einen Abfall von Glycerophosphocholin bei Tumorentstehung und -wachstum (Iorio et al., 2005, Ackerstaff et al., 2003, Albers et al., 2005). Aboagye et al. hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Glycerophosphocholinkonzentration und der Krebszellteilungsrate beziehungsweise einer erhöhten Zelldichte finden (Aboagye and Bhujwalla, 1999). Eine erhöhte Glycerophosphocholinkonzentration kann auch Ausdruck einer azidotischen Umgebung sein, ein Zustand der im entnommenen Gewebe möglichst vermieden werden sollte, aber nie ganz verhindert werden kann (Ackerstaff et al., 2001).

Dieser nicht einheitliche und zum Teil widersprüchlich erscheinende Metabolismus könnte sich mit der Heterogenität der Mammakarzinome erklären lassen. Die Rolle von Glycerophosphocholin im Stoffwechsel des Mammakarzinoms und seine Bedeutung für die Prognose der Patientinnen lässt sich noch nicht eindeutig klären. Hierzu sind noch weiterführende Forschungen und genauere Erkenntnisse der Grundlagen des Tumorstoffwechsels notwendig.

7.1.2 Cholinkonzentration

In unseren ex vivo HRMAS ¹HMRS Untersuchungen an intaktem benignem und malignem Mammagewebe fanden wir heraus, dass die Cholinkonzentration in benignem Gewebe signifikant mit dem Alter der Patientin korreliert. Je älter die Patientin war, desto höher war auch die Cholinkonzentration. Eine Messung der Cholinkonzentration kann bei gesunden älteren Patientinnen folglich zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn man davon ausgeht, dass Cholin ein Marker für malignes Gewebe ist. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Ergebnissen von Mountford et al., deren Forschungsgruppe ein erhöhtes Alter sogar als Störfaktor für die Tumordiagnostik mittels ¹HMRS betrachtet, weil es erhöhte Konzentrationen des Gesamtcholin-Peaks verursacht und zu falschen Rückschlüssen führt (Mountford et al., 2009). Dies legt nahe, dass eine Messung der Cholinkonzentration im Gewebe weniger bei älteren Patientinnen als vielmehr bei jüngeren Patientinnen als Ergänzung der Diagnostik sinnvoll wäre.

In unseren Ergebnissen war die CholinKonzentration insbesondere in Proben mit positivem HER2 - Rezeptorstatus signifikant erhöht gegenüber Proben mit negativem HER2 - Rezeptorstatus. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CholinKonzentration und der Rezidiv- oder Mortalitätsrate konnten wir nicht nachweisen. Bezüglich der Rezidivrate zeigte sich jedoch ein eindeutiger Trend, dass eine erniedrigte CholinKonzentration mit einem vermehrten und frühen Auftreten von Rezidiven in Zusammenhang stehen könnte. Hier haben unsere Untersuchungen knapp die Signifikanz verfehlt. Dies könnte mit der signifikant verminderten CholinKonzentration in Zusammenhang stehen, die wir bei HER2 - negativen Tumorproben nachweisen konnten. Hier fehlt ein wichtiger molekularer Ansatzpunkt, der sich zur Therapie des Mammakarzinoms nutzen lässt.

In weiteren Studien zeigten histologisch unterschiedliche Mammakarzinomtypen keinen Unterschied im Cholinstoffwechsel (Chen et al., 2011, Bolan et al., 2003). Auch bei uns ließ sich bezüglich der CholinKonzentration der Proben kein signifikanter Unterschied zwischen lobulären und duktalem Karzinomen erkennen.

7.1.3 PhosphocholinKonzentration

In unseren Ergebnissen war die PhosphocholinKonzentration unmittelbar abhängig von der CholinKonzentration. Je höher die Konzentration des Substrates Cholin lag, desto höher war auch die PhosphocholinKonzentration. Dies könnte bedeuten, dass die Bereitstellung von Cholin in malignen Zellen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Produktion von Phosphocholin darstellt (Eliyahu et al., 2007). Wir konnten außerdem zeigen, dass eine erhöhte PhosphocholinKonzentration mit einem vermehrten und verlängerten Überleben korreliert. Dieses Ergebnis war nur grenzwertig signifikant und steht nicht im Einklang mit der gegenwärtigen Literatur. Viele Studien messen Phosphocholin hingegen eine maßgebliche Rolle bei der Zellproliferation und der Entstehung von Neoplasien bei (Sitter et al., 2010, Eliyahu et al., 2007, Cao et al., 2012a, Iorio et al., 2010). Oft wird eine Erhöhung der PhosphocholinKonzentration bei Tumorentstehung bzw. -wachstum beschrieben (DeFeo and Cheng, 2010). Auch in den in vivo ¹H MRS Studien soll der Erhöhung des Gesamtcholin-Peaks bei malignen Tumoren vor allem eine gesteigerte PhosphocholinKonzentration zugrunde liegen (Eliyahu et al., 2007, Ackerstaff et al., 2003, Aboagye and Bhujwalla, 1999). So konnten Ackerstaff et al. zeigen, dass die PhosphocholinKonzentration insbesondere in Metastasenzellen erhöht war (Ackerstaff et al., 2003). Chen et al. fanden heraus, dass der Gesamtcholin-Peak bei höhergradigen Tumoren höher ist als bei niedriggradigen Tumoren (Chen et al., 2011). Allerdings wurde

der Peak im MR-Spektrum bei 17 der 62 Fälle nicht gefunden. Dies war vor allem bei niedriggradigen und HER2-negativen Tumoren der Fall. Möglicherweise war die Phosphocholinkonzentration zu niedrig, um als Peak erkannt zu werden. Chen et al. hingegen fanden eine erhöhte Phosphocholinkonzentration bei tripple negativen Tumoren (Chen 2011). Sitter et al. konnten einen positiven Zusammenhang zwischen der Phosphocholinkonzentration und dem Tumolvolumen in Prozent sowie einer schlechteren Prognose feststellen (Sitter et al., 2010). In unseren weiteren Berechnungen zu Phosphocholin konnten wir keine statistische Signifikanz zeigen. Choi et al. führten HRMAS ¹HMRS Messungen an 36 Mammabiopsien durch und sahen wie wir keine Korrelation zwischen der Phosphocholinkonzentration, dem histologischen Differenzierungsgrad, Tumorgroße und Lymphknotenbefall (Choi et al., 2012). Auch Aboagye et al. fand in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen keine signifikante Korrelation zwischen der Phosphocholinkonzentration und der Zellteilungsrate (Aboagye and Bhujwalla, 1999).

7.1.4 Unterschiede bei molekularen Subtypen

Bezüglich der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms wird unterschieden zwischen

1. dem Luminalen Typ (A/B), welcher Östrogen- und, im Falle von Luminal A, auch Progesteronrezeptoren ausbildet
2. dem HER2-Typ, welcher den HER2-Rezeptor ausbildet
3. dem Basalen bzw. Triple negativen Typ, welcher keine der genannten Rezeptoren ausbildet

Insbesondere der Basale Subtyp zeigt sich besonders therapieresistent, da die herkömmlichen therapeutischen Angriffspunkte größtenteils an die bekannten Rezeptoren binden. Da beim Basalen Subtyp diese Rezeptoren nicht vorliegen, geht er mit einer besonders schlechten Prognose einher. HRMAS ¹HMRS Messungen könnten hier neue Therapieansätze eröffnen bzw. über eine Veränderung des Metabolitenprofils prätherapeutisch Aussagen zum Ansprechen auf eine Therapie zulassen. Gegebenenfalls könnte schon in frühen Phasen der Erforschung einer neuen Therapieoption entschieden werden, ob der Basale Subtyp darauf reagiert oder resistent ist und bei gewünschtem Ergebnis die Forschung im entsprechenden Bereich schneller vorangetrieben werden (Fuss and Cheng, 2016, Liedtke et al., 2008).

Unsere Fallzahlen waren zu klein um valide Aussagen über das Metabolitenprofil der unterschiedlichen Subtypen zu treffen. Es zeigten sich zwar deutliche Tendenzen, jedoch fehlte oft die statistische Signifikanz. Beim Luminalen Subtyp deutete eine hohe Cholinkonzentration

tendenziell auf den positiven Östrogenrezeptor-Status hin. Ein hoher Phosphocholinspiegel war tendenziell typisch für einen negativen Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status. Trotz deutlicher Unterschiede verfehlten die Berechnungen eine statistische Signifikanz. Beim HER2-Status zeigte sich eine statistische Signifikanz. Die CholinKonzentration war deutlich höher bei HER2-exprimierenden Tumortypen. Bei Betrachtung des Basalen Subtyps mit dreifach negativem Rezeptorstatus zeigten sich ebenfalls nur Tendenzen, jedoch keine statistische Signifikanz. Tendenziell standen eine niedrige CholinKonzentration, eine hohe Glycerophosphocholinkonzentration und eine hohe Phosphocholinkonzentration in Zusammenhang mit einem triple-negativen Rezeptorstatus. Diese Tendenz bei triple-negativen Tumortypen wurde in ähnlichen Arbeiten ebenfalls gesehen (Giskeodegard et al., 2010, Chen et al., 2011). Studien, in denen das gesamte Metabolitenprofil statt einzelne Metaboliten betrachtet wurde, bestätigen, dass die Subtypen unterschiedliche Metabolitenprofile aufweisen und anhand derer differenziert werden können. Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, welcher Teil des Profils für welchen Subtyp spezifisch ist (Li et al., 2011, Cao et al., 2014). Insbesondere der Basale Subtyp ist aktueller Gegenstand der HRMAS ¹HMRS Forschung. Im Zell- und Tiermodell werden immer wieder neue Angriffsmöglichkeiten für diesen relativ therapieresistenten Tumortyp erprobt. Beispielsweise wurde mittels Phosphoinositol-3-Kinase-Hemmern erfolgreich ein Rückgang der Basaltyp-Tumoren mit primär erhöhter PI3K-Aktivität erreicht. Hier diente unter anderem Glycerophosphocholin als molekularer Marker im Therapiemonitoring. Ein Rückgang der Glycerophosphocholinkonzentration im HRMAS ¹HMRS deutete auf ein Therapieansprechen hin (Moestue et al., 2013). Die Fallzahlen lagen hier bei n = 8 pro Gruppe. In HRMAS ³¹Phosphor-MRS Untersuchungen erwiesen sich die cholinhaltigen Metaboliten ebenfalls als geeignete Marker im Therapiemonitoring der PI3K-Inhibitoren, insbesondere beim Basaltyp (Esmaeili et al., 2014). Van Asten et al. postulieren eine Veränderung des Metabolitenprofils cholinhaltiger Metaboliten von Mammakarzinomen in Mäusen nach Applikation des Chemotherapeutikums Docetaxel, jedoch nur bei Ansprechen auf die Therapie. Bei Docetaxel-resistenten Tumoren konnte keine Änderung des Metabolitenprofils gezeigt werden (van Asten et al., 2015).

7.2 Zusammenhang der Cholinase mit den Metabolitenkonzentrationen

Wir stellten uns die Frage, ob die Cholinase mit einer veränderten Konzentration cholinhaltiger Metaboliten beim Mammakarzinom in Zusammenhang steht und somit eine mögliche

Ursache dafür wäre. Für diese Konzentrationsänderung kommen verschiedene Stoffwechselmechanismen in Betracht. Ein Mechanismus könnte die Regulierung auf enzymatischer Ebene durch Enzymaktivierung in Form der Rezeptortyrosinkinase-Kaskade oder der differenziellen Induktion der Cholinase-Isoenzyme sein. Ein anderer möglicher Regulationsmechanismus könnte auf der Genomebene mittels Amplifikation der Cholinase-, Phospholipase C-, D-beziehungsweise A-Gene mit konsekutiver Über- oder Unterexpression stattfinden (Aboagye and Bhujwalla, 1999).

Lacal et al., die sich vorwiegend mit der Cholinaseaktivität bei Tumoren beschäftigt haben, kamen beispielsweise an Zelllinien zu dem Ergebnis, dass eine Inhibition der Cholinase einen Abfall von Phosphocholin zur Folge hat. Gleichzeitig konnten sie *in vivo* und *in vitro* nachweisen, dass die Inhibition der Cholinase zu einer Verlangsamung des Tumorstwachstums führt (Ramirez de Molina et al., 2002a, Ramirez de Molina et al., 2004). Bei der Behandlung von Brustkrebszellen mit dem Cholinase-Inhibitor MN58b dienten die Cholinmetaboliten in einer MRS-Studie von Al-Saffar et al. als Biomarker, die eine Tumorentwicklung wieder spiegelten (Al-Saffar et al., 2006).

Neben der Cholinase muss es jedoch noch andere Faktoren geben, die den Gesamtcholin-Peak im Spektrum beeinflussen. Dieser konnte in einer weiteren Studie in 83 % der malignen Proben *per in vivo* MRS nachgewiesen werden, während eine erhöhte Cholinase Aktivität nur in 40 % der malignen Proben messbar war (Katz-Brull et al., 2002a). Eliyahu et al. fanden hingegen sowohl in gesunden Zellen als auch in Karzinomzellen keine Korrelation zwischen dem Phosphocholingehalt und der Cholinase. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Phosphocholinsynthese sei vielmehr die Bereitstellung des Substrats Cholin durch vermehrten Transport in die Zelle und nicht die Aktivität der Cholinase. Die folgende Cholinase-reaktion sei zu schnell und somit nicht der limitierende Faktor, wenngleich eine Enzyminduktion zu einer Erhöhung der Phosphocholinkonzentration führe (Eliyahu et al., 2007). In unseren Ergebnissen bestätigte sich dies: Eine hochsignifikant vermehrte Phosphocholinkonzentration fand sich bei vermehrtem Cholin. Hier scheint die Phosphocholinkonzentration unmittelbar von der Bereitstellung des Substrates Cholin abzuhängen. Eliyahu et al. fanden außerdem katabole Stoffwechselwege zur Phosphocholinproduktion katalysiert durch die Phospholipase D (Eliyahu et al., 2007). Nach Glunde et al. ist am hohen Phosphocholinwert maßgeblich eine erhöhte Expression der Phospholipase C beteiligt. Sie produziert Phos-

phocholin aus Phosphatidylcholin (Membranen). Demzufolge spiele die Cholinkinase eine weniger bedeutende Rolle als postuliert wurde (Glunde et al., 2004b).

Auch zeigten Experimente mit verschiedenen malignen Zelllinien, dass die erhöhte Phosphocholinkonzentration mit von 5-facher bis 17-facher Erhöhung sehr schwankend ist.

In unseren semiquantitativen Untersuchungen der Cholinkinase bei 50 ausgewählten benignen und malignen Proben konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Cholinkinasekonzentration und Phosphocholinkonzentration in benignem Gewebe zeigen. Benignes Gewebe war dadurch gekennzeichnet, dass trotz einer erhöhten Cholinkinasekonzentration eine niedrigere Phosphocholinkonzentration zu messen war. Die Untersuchung der α - und β -Cholinkinase getrennt voneinander zeigte einen ähnlichen Trend, steht aber nicht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Dies könnte bedeuten, dass die Cholinkinase in gesundem Gewebe größtenteils in seiner inaktiven Form vorliegt oder eine verminderte Bereitstellung des Substrats Cholin erfolgt. Beide Fälle würden zu einer verminderten Phosphocholinproduktion führen. Die Diskrepanz zu anderen Arbeiten lässt sich am wahrscheinlichsten mit der geringen Patientenzahl in der benignen Subgruppe erklären ($n = 6$). Den bereits existierenden Untersuchungen zur Cholinkinase zufolge wäre ein Anstieg der Phosphocholinkonzentration bei erhöhter Cholinkinasekonzentration zu erwarten gewesen (Cao et al., 2012a). Lacal et al. konnten sogar eine positive Korrelation zwischen einer Cholinkinase Überexpression und höherem Tumorstadium feststellen (Ramirez de Molina et al., 2002a).

Ein weiterer Grund für die Diskrepanz könnte in der Methode liegen. In unseren Untersuchungen wurde die Cholinkinasekonzentration semiquantitativ bestimmt um Rückschlüsse auf die Enzymkonzentration und -aktivität zu ziehen. Ein Großteil der anderen Studien beschränkt sich auf Untersuchung der Expression des Enzyms. Eine Überexpression, wie von Glunde et al. beschrieben, steht nicht zwingend in Konflikt mit einer fehlenden Aktivierung der Cholinkinase, sondern bedeutet nur, dass das Enzym vermehrt produziert wird (Glunde et al., 2004b). Es kann jedoch in seiner inaktiven Form vorliegen. Da die Aktivierung erst kurz vor der Enzymreaktion stattfindet, kann die Untersuchung auf enzymatischer Ebene präzisere Aussagen über die tatsächliche katalytische Eigenschaft eines Enzyms treffen. Auch Plathow und Weber kamen zu dem Schluss, dass die Cholinkinaseaktivität und die Phosphocholinkonzentration nicht gut mit der Proliferationsrate korrelieren (Plathow and Weber, 2008). Dies zeigt, dass eine Aktivierung der Cholinkinase und konsekutive Erhöhung des Phosphocholinlevels nicht die alleinige Erklärung für maligne Zellproliferationen sein können. Weitere statistisch signifi-

kante Korrelationen zwischen den drei Cholinasegruppen (α , β , gesamt) und den drei untersuchten Metaboliten (Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin) ließen sich nicht feststellen.

Erkenntnisse der metabolischen Ursachen für Konzentrationsänderungen cholinhaltiger Metaboliten bei Tumorzellen wären für neue Therapieansätze auf enzymatischer Ebene entscheidend. Nur mit einem besseren Verständnis der Stoffwechselmechanismen könnten beispielsweise Phosphocholin, Cholin und Glycerophosphocholin als Biomarker dienen, und es ergäbe sich die Option den Therapieerfolg mittels MRS zu überwachen.

7.3 Limitierungen der vorliegenden Forschungsprojekte

Für ein genaues Verständnis und zur Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit sind insbesondere auch die Limitierungen zu beachten. Hier waren Grenzen in Bezug auf die Kohortengröße, die Heterogenität der Messwerte und auf technische Aspekte auszumachen.

Aufgrund der relativ geringen Größe der Kohorte blieben viele Korrelationen ohne Signifikanz. Die Ausreißer hatten dadurch einen besonders hohen Impact auf das Gesamtergebnis. Es war nicht erkennbar, ob es sich im jeweiligen Fall um einen Ausreißer handelte oder ob die Statistik das normale Ausmaß der Ergebnisstreuung widerspiegelte. Durch unterschiedlich große Subgruppen kam es unter Umständen zu einem beta-Fehler, der fälschlicherweise zur Annahme der Nullhypothese führte.

Es ist gilt als erwiesen, dass die Metabolitenkonzentrationen in den verschiedenen Karzinomregionen sehr fluktuierend ist und eine hohe Variabilität aufweisen. Dies lässt sich mit der Heterogenität des Mammakarzinoms erklären (Sitter et al., 2006, Chen et al., 2011, Sitter et al., 2010, Gribbestad et al., 1993, Katz-Brull et al., 2002b). Es ist also wichtig einen möglichst repräsentativen Ausschnitt des Tumors zu untersuchen. Unserer Studie wurde je eine Gewebeprobe von zufälliger Lokalität im Tumor zur Verfügung gestellt. Das benigne Gewebe stammte aus verschiedenen, u. a. ethischen Gründen aus den gesunden Randarealen der exstirpierten Karzinome, dem sogenannten Sicherheitsabstand. Möglicherweise gibt es in diesem histopathologisch benignen Gewebe aber schon maligne Stoffwechseleränderungen ähnlich derer im benachbarten Malignom, die bei der histologischen Begutachtung nicht zu identifizieren sind (Sitter et al., 2002). In unseren Untersuchungen müssen also alle Ergebnisse, die nur in vermeintlich benignem Gewebe auftraten, kritisch gesehen werden.

Des Weiteren können Enzymaktivitäten in Zelllysaten durch die Destruktion der Zellen verfälscht werden und nicht mehr dem ursprünglichen intrazellulären Befund entsprechen (Jackowski and Fagone, 2005). Die Enzymfunktion ist außerdem vom vorhandenen ATP abhängig. So könnte möglicherweise nach Schockgefrierung des Gewebes nicht mehr genug ATP zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität vorhanden sein. Die Cholin kinase ist zudem nicht nur ein Enzym im Kennedy - Stoffwechselweg sondern spielt auch eine Rolle in vielerlei anderen Stoffwechselvorgängen, wie zum Beispiel als second messenger. So unterliegt sie mehreren Regulationsmechanismen, deren Wechselwirkungen noch nicht hinreichend erforscht sind.

Im HRMAS ¹H MRS Spektrum können die Metaboliten mit niedrigen Resonanzen von Lipiden und Makromolekülen überlappt werden. Dadurch wird die Messung unsichtbar und verfälscht (Sitter 2002). Dies kann bei Kontamination durch Hämorrhagien, Fett, Stroma oder Entzündungszellen auftreten (Chen et al., 2011, Sitter et al., 2010, Mountford et al., 2009). Auch bei guter Auflösung der HRMAS ¹H MRS Spektren können Fehler in der Datenverarbeitung und bei der Festlegung der Nulllinienreferenz für die Chemische Verschiebung auftreten (Mountford et al., 2009). Schon geringfügige Verschiebungen oder Fehlinterpretationen einzelner Anstiege können zu einer falschen Identifizierung der anderen Metaboliten führen. Um eine Verbesserung des Signals cholinhaltiger Metaboliten zu erreichen, eignen sich auch Pulssequenzen (31-450 ms), die speziell dafür optimiert sind Signale im Bereich von 3,2 ppm zu erkennen. Kurze Echozeiten erlauben eine höhere Signalintensität der Resonanzen während lange Echozeiten einen höheren Kontrast im Spektrum bieten. Bisher wurde meist ein langes Echo (135-270 ms) verwendet. Dies geht zu Lasten der Signalintensität, aber der Gesamtcholin-Peak ist besser zu erkennen und es gibt keine Überlappung mit dem Lipidsignal. Auch unpassende und nicht mammaspezifische Induktionsspulen können Fehlerquellen darstellen (Katz-Brull et al., 2002a, Bolan et al., 2003).

7.4 Ausblick und Anforderungen für weitere Untersuchungen

Zukünftig werden neben der bisherigen histopathologischen Klassifizierung mit Rezeptor-merkmalbestimmung auch stoffwechselbezogene Tumormerkmale in Form einer Klassifikation zur Identifikation eines Tumors aufgenommen werden. Aufgrund der neuartigen metabolischen Angriffspunkte an Tumorzellen wird eine stoffwechselbezogene Einteilung zu einer

individuell maßgeschneiderten Therapie beitragen. Präzisere Therapieansätze lassen auf eine effektivere Tumorbekämpfung hoffen. Aber auch die Radikalität der Therapie kann gegebenenfalls bei einigen weniger aggressiven Tumoren reduziert werden. Anders als die heute üblichen Chemo- und Radiotherapien können präzise Angriffspunkte im Tumormetabolismus zu einer möglichst geringfügigen Schädigung gesunder Zellen und damit zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führen.

Seit vielen Jahren scheint daher der Schlüssel in der Behandlung des Mammakarzinoms in einem besseren Verständnis der Stoffwechselfvorgänge im Tumor zu liegen. Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass unterschiedliche molekulare Subtypen des Mammakarzinoms zu verschiedenen Stoffwechselfvorgängen sowie Metabolitenausprägungen führen und sogar wie unterschiedliche Erkrankungen behandelt werden müssen (Haukaas et al., 2016).

Im Bereich der cholinhaltigen Metaboliten sollte zukünftig vor allem das Metabolitenprofil in seiner Gesamtheit betrachtet werden statt sich auf einzelne Metaboliten zu konzentrieren, die für sich zu wenig aussagekräftig sind. Nur mit dem Gesamtprofil kann auch eine Aussage über das Verhältnis der Metaboliten zueinander getroffen werden (Fuss and Cheng, 2016).

Auch können die Ratios aus zwei Metaboliten bessere Aussagen liefern als einzelne Konzentrationen. Eine Vielzahl an statistischen Auswertungsmöglichkeiten dieser riesigen Datenbanken ist bereits in Anwendung (Denkert et al., 2006, Cao et al., 2014), Mountford 2009). Zur Erstellung der Metabolitenprofile werden derzeit verschiedene Methoden analysiert. Massenspektrometrie und Magnetresonanzspektroskopie haben sich vielfach bewährt, sind jedoch nur zwei Möglichkeiten unter einer Vielzahl an Forschungsansätzen. Auch beim Ovarialkarzinom beispielsweise geben MRS-Profile cholinhaltiger Metaboliten vielversprechende Hinweise auf tumorspezifische Prozesse und mögliche Therapieansätze (Canese et al., 2016).

Des Weiteren müssen die Enzymaktivitäten anderer am Kennedy Zyklus beteiligter Enzyme im Detail untersucht werden. Dies kann auf den unterschiedlichen Ebenen passieren, sowohl auf Gen-Ebene per PCR, auf RNA-Ebene per Northern Blot oder qRT-PCR, als auch posttranslational per Western Blot. Auch die Bedeutung der verschiedenen regulatorischen Mechanismen des Zyklus muss noch besser geklärt werden. Nur so können der Tumorstoffwechsel insgesamt und auch Unterschiede im Stoffwechsel von Tumorsubtypen besser verstanden und genutzt werden.

Neben dem Cholinstoffwechsel gibt es eine Vielzahl weiterer vielversprechender molekularer und metabolischer Angriffspunkte. So haben beispielsweise östrogenrezeptorpositive Tumore

eine andere Metabolitenzusammensetzung als östrogenrezeptornegative und sollten daher auch entsprechend unterschiedlich behandelt werden (Budczies et al., 2013). Der Glutaminmetabolismus ist aufgrund der Entdeckung von Glutaminaseinhibitoren ebenfalls Gegenstand der neueren Forschung. Auch hier kann das Mammakarzinom auf molekularer Ebene bekämpft werden. Hierzu ist ein genaues Verständnis des Glutaminmetabolismus in Tumorzellen notwendig (Budczies et al., 2015). Verschiedene Genexpressionstests sind ebenfalls im Einsatz um das jeweilige Genexpressionsprofil eines Tumors als Vorstufe zum Metabolitenprofil zu eruieren (Denkert et al., 2015). Schlussendlich bleibt jedoch zu bedenken, dass eine realistische klinische Einschätzung nur mittels randomisierter klinischer Studien erfolgen kann. Viele der genannten Forschungsansätze sind noch in sehr frühen Phasen. Ob sie letztendlich im klinischen Alltag Anwendung finden werden, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vorherzusehen. Allerdings scheinen sie vielversprechend zu sein, so dass weitere Untersuchungen in diesem Bereich notwendig sind und lohnenswert sein können.

8 Literaturverzeichnis

- ABOAGYE, E. O. & BHUJWALLA, Z. M. 1999. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 59, 80-4.
- ACKERSTAFF, E., GLUNDE, K. & BHUJWALLA, Z. M. 2003. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J Cell Biochem*, 90, 525-33.
- ACKERSTAFF, E., PFLUG, B. R., NELSON, J. B. & BHUJWALLA, Z. M. 2001. Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Res*, 61, 3599-603.
- AKELLA, A. & DESHPANDE, S. B. 2013. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J Exp Biol*, 51, 5-22.
- AL-SAFFAR, N. M., TROY, H., RAMIREZ DE MOLINA, A., JACKSON, L. E., MADHU, B., GRIFFITHS, J. R., LEACH, M. O., WORKMAN, P., LACAL, J. C., JUDSON, I. R. & CHUNG, Y. L. 2006. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models. *Cancer Res*, 66, 427-34.
- ALBERS, M. J., KRIEGER, M. D., GONZALEZ-GOMEZ, I., GILLES, F. H., MCCOMB, J. G., NELSON, M. D., JR. & BLUML, S. 2005. Proton-decoupled 31P MRS in untreated pediatric brain tumors. *Magn Reson Med*, 53, 22-9.
- ALTINTAS, S., LAMBEIN, K., HUIZING, M. T., BRAEMS, G., ASJOE, F. T., HELLEMANS, H., VAN MARCK, E., WEYLER, J., PRAET, M., VAN DEN BROECKE, R., VERMORKEN, J. B. & TJALMA, W. A. 2009. Prognostic significance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a clinicopathologic study. *Breast J*, 15, 120-32.
- ANDREW, E. R., BRADBURY, A. & EADES, R. G. 1959. Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation. *Nature*, 183, 1802-1803.
- AOYAMA, C., LIAO, H. & ISHIDATE, K. 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res*, 43, 266-81.
- AOYAMA, C., NAKASHIMA, K., MATSUI, M. & ISHIDATE, K. 1998. Complementary DNA sequence for a 42 kDa rat kidney choline/ethanolamine kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1390, 1-7.
- AOYAMA, C., OHTANI, A. & ISHIDATE, K. 2002. Expression and characterization of the active molecular forms of choline/ethanolamine kinase-alpha and -beta in mouse tissues, including carbon tetrachloride-induced liver. *Biochem J*, 363, 777-84.
- AOYAMA, C., YAMAZAKI, N., TERADA, H. & ISHIDATE, K. 2000. Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *J Lipid Res*, 41, 452-64.
- ATTENE, F., PALIOGIANNIS, P., SCOGNAMILLO, F., TRIGNANO, E., PALA, C. & TRIGNANO, M. 2012. Axillary lymph node dissection in patients with breast cancer and sentinel lymph node micrometastasis or isolated tumor cells: is it necessary? *Tumori*, 98, 320-3.

- BANEZ-CORONEL, M., RAMIREZ DE MOLINA, A., RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., SARMENTERO, J., RAMOS, M. A., GARCIA-CABEZAS, M. A., GARCIA-OROZ, L. & LACAL, J. C. 2008. Choline kinase alpha depletion selectively kills tumoral cells. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 709-19.
- BAXTER, N. N., VIRNIG, B. A., DURHAM, S. B. & TUTTLE, T. M. 2004. Trends in the Treatment of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 443-448.
- BHAKOO, K. K., WILLIAMS, S. R., FLORIAN, C. L., LAND, H. & NOBLE, M. D. 1996. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res*, 56, 4630-5.
- BLEYER, A. & WELCH, H. G. 2012. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N Engl J Med*, 367, 1998-2005.
- BLOCH, F., HANSEN, W. W. & PACKARD, M. 1946. The Nuclear Induction Experiment. *Physical Review*, 70, 474-485.
- BLUEMKE, D. A., GATSONIS, C. A., CHEN, M. H., DEANGELIS, G. A., DEBRUHL, N., HARMS, S., HEYWANG-KOBRUNNER, S. H., HYLTON, N., KUHL, C. K., LEHMAN, C., PISANO, E. D., CAUSER, P., SCHNITT, S. J., SMAZAL, S. F., STELLING, C. B., WEATHERALL, P. T. & SCHNALL, M. D. 2004. Magnetic resonance imaging of the breast prior to biopsy. *JAMA*, 292, 2735-42.
- BODENNEC, J., PELLÉD, D., RIEBELING, C., TRAJKOVIC, S. & FUTERMAN, A. H. 2002. Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by glucosylceramide. *FASEB J*, 16, 1814-6.
- BOLAN, P. J., MEISAMY, S., BAKER, E. H., LIN, J., EMORY, T., NELSON, M., EVERSON, L. I., YEE, D. & GARWOOD, M. 2003. In vivo quantification of choline compounds in the breast with ¹H MR spectroscopy. *Magn Reson Med*, 50, 1134-43.
- BOURNE, R., DZENDROWSKYJ, T. & MOUNTFORD, C. 2003. Leakage of metabolites from tissue biopsies can result in large errors in quantitation by MRS. *NMR Biomed*, 16, 96-101.
- BRENNAN, M., SPILLANE, A. & HOUSSAMI, N. 2009. The role of breast MRI in clinical practice. *Aust Fam Physician*, 38, 513-9.
- BUDCZIES, J., BROCKMOLLER, S. F., MULLER, B. M., BARUPAL, D. K., RICHTER-EHRENSTEIN, C., KLEINE-TEBBE, A., GRIFFIN, J. L., ORESIC, M., DIETEL, M., DENKERT, C. & FIEHN, O. 2013. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics*, 94, 279-88.
- BUDCZIES, J., PFITZNER, B. M., GYORFFY, B., WINZER, K. J., RADKE, C., DIETEL, M., FIEHN, O. & DENKERT, C. 2015. Glutamate enrichment as new diagnostic opportunity in breast cancer. *Int J Cancer*, 136, 1619-28.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT, B. 2004. Bundesanzeiger der Ärzte und Krankenkassen über eine Änderung der Richtlinien über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungsrichtlinie). *Bundesanzeiger* 2004, 2.
- CAMPOS, J., NUNEZ, M. C., CONEJO-GARCIA, A., SANCHEZ-MARTIN, R. M., HERNANDEZ-ALCOCEBA, R., RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., LACAL, J. C., GALLO, M. A. & ESPINOSA, A. 2003. QSAR-derived choline kinase inhibitors: how rational can antiproliferative drug design be? *Curr Med Chem*, 10, 1095-112.

- CANESE, R., MEZZANZANICA, D., BAGNOLI, M., INDRACCOLO, S., CANEVARI, S., PODO, F. & IORIO, E. 2016. In vivo Magnetic Resonance Metabolic and Morphofunctional Fingerprints in Experimental Models of Human Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 6, 164.
- CAO, M. D., DÖPKENS, M., KRISHNAMACHARY, B., VESUNA, F., GADIYA, M. M., LØNNING, P. E., BHUJWALLA, Z. M., GRIBBESTAD, I. S. & GLUNDE, K. 2012a. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR in Biomedicine*, 25, 1033-1042.
- CAO, M. D., GISKEØDEGÅRD, G. F., BATHEN, T. F., SITTER, B., BOFIN, A., LØNNING, P. E., LUNDGREN, S. & GRIBBESTAD, I. S. 2012b. Prognostic value of metabolic response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*, 12, 39.
- CAO, M. D., LAMICHHANE, S., LUNDGREN, S., BOFIN, A., FJOSNE, H., GISKEODEGARD, G. F. & BATHEN, T. F. 2014. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 941.
- CAO, M. D., SITTER, B., BATHEN, T. F., BOFIN, A., LONNING, P. E., LUNDGREN, S. & GRIBBESTAD, I. S. 2012c. Predicting long-term survival and treatment response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy by MR metabolic profiling. *NMR Biomed*, 25, 369-78.
- CARNEY, P. A., MIGLIORETTI, D. L., YANKASKAS, B. C., KERLIKOWSKE, K., ROSENBERG, R., RUTTER, C. M., GELLER, B. M., ABRAHAM, L. A., TAPLIN, S. H., DIGNAN, M., CUTTER, G. & BALLARD-BARBASH, R. 2003. Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography. *Ann Intern Med*, 138, 168-75.
- CASALI, C. I., WEBER, K., FAVALE, N. O. & TOME, M. C. 2013. Environmental hyperosmolality regulates phospholipid biosynthesis in the renal epithelial cell line MDCK. *J Lipid Res*, 54, 677-91.
- CHARLES D. BLUNDELL, M. A. C. R., MICHAEL OVERDUIN AND ANDREW ALMONDA 2006. NMR spectra of oligosaccharides at ultra-high field (900 MHz) have better resolution than expected due to favourable molecular tumbling. *Carbohydr Res.* , 341, 1985–1991.
- CHEN, J. H., MEHTA, R. S., BAEK, H. M., NIE, K., LIU, H., LIN, M. Q., YU, H. J., NALCIOGLU, O. & SU, M. Y. 2011. Clinical characteristics and biomarkers of breast cancer associated with choline concentration measured by 1H MRS. *NMR Biomed*, 24, 316-24.
- CHENG, L. L., BURNS, M. A., TAYLOR, J. L., HE, W., HALPERN, E. F., MCDOUGAL, W. S. & WU, C. L. 2005. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res*, 65, 3030-4.
- CHENG, L. L., CHANG, I. W., LOUIS, D. N. & GONZALEZ, R. G. 1998a. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res*, 58, 1825-32.
- CHENG, L. L., CHANG, I. W., SMITH, B. L. & GONZALEZ, R. G. 1998b. Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 135, 194-202.

- CHENG, L. L., LEAN, C. L., BOGDANOVA, A., WRIGHT, S. C., JR., ACKERMAN, J. L., BRADY, T. J. & GARRIDO, L. 1996. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med*, 36, 653-8.
- CHENG, L. L., MA, M. J., BECERRA, L., PTAK, T., TRACEY, I., LACKNER, A. & GONZALEZ, R. G. 1997. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6408-13.
- CHOI, J. S., BAEK, H. M., KIM, S., KIM, M. J., YOUK, J. H., MOON, H. J., KIM, E. K., HAN, K. H., KIM, D. H., KIM, S. I. & KOO, J. S. 2012. HR-MAS MR spectroscopy of breast cancer tissue obtained with core needle biopsy: correlation with prognostic factors. *PLoS One*, 7, e51712.
- CHU, K. C., KRAMER, B. S. & SMART, C. R. 1991. Analysis of the role of cancer prevention and control measures in reducing cancer mortality. *J Natl Cancer Inst*, 83, 1636-43.
- CUADRADO, A., CARNERO, A., DOLFI, F., JIMENEZ, B. & LACAL, J. C. 1993. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*, 8, 2959-68.
- DALY, P. F., LYON, R. C., FAUSTINO, P. J. & COHEN, J. S. 1987. Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by ³¹P NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 262, 14875-8.
- DEFEO, E. M. & CHENG, L. L. 2010. Characterizing human cancer metabolomics with ex vivo ¹H HRMAS MRS. *Technol Cancer Res Treat*, 9, 381-91.
- DELONG, C. J., SHEN, Y. J., THOMAS, M. J. & CUI, Z. 1999. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J Biol Chem*, 274, 29683-8.
- DENKERT, C., BUDCZIES, J., KIND, T., WEICHERT, W., TABLACK, P., SEHOULI, J., NIESPOREK, S., KONGSEN, D., DIETEL, M. & FIEHN, O. 2006. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res*, 66, 10795-804.
- DENKERT, C., PFITZNER, B. M., HEPPNER, B. I. & DIETEL, M. 2015. [Molecular pathology for breast cancer: Importance of the gene expression profile]. *Pathologe*, 36, 145-53.
- EDELL, S. L. & EISEN, M. D. 1999. Current imaging modalities for the diagnosis of breast cancer. *Del Med J*, 71, 377-82.
- ELIYAHU, G., KREIZMAN, T. & DEGANI, H. 2007. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int J Cancer*, 120, 1721-30.
- ESMAEILI, M., BATHEN, T. F., ENGEBRATEN, O., MAELANDSMO, G. M., GRIBBESTAD, I. S. & MOESTUE, S. A. 2014. Quantitative (³¹P) HR-MAS MR spectroscopy for detection of response to PI3K/mTOR inhibition in breast cancer xenografts. *Magn Reson Med*, 71, 1973-81.
- EVANOCHKO, W. T., SAKAI, T. T., NG, T. C., KRISHNA, N. R., KIM, H. D., ZEIDLER, R. B., GHANTA, V. K., BROCKMAN, R. W., SCHIFFER, L. M., BRAUNSCHWEIGER, P. G. & ET AL. 1984. NMR study of in vivo RIF-1 tumors. Analysis of perchloric acid extracts and identification of ¹H, ³¹P and ¹³C resonances. *Biochim Biophys Acta*, 805, 104-16.

- EXTON, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1212, 26-42.
- FEIG, S. A. 1999. Role and evaluation of mammography and other imaging methods for breast cancer detection, diagnosis, and staging. *Semin Nucl Med*, 29, 3-15.
- FITZGIBBONS, P. L., PAGE, D. L., WEAVER, D., THOR, A. D., ALLRED, D. C., CLARK, G. M., RUBY, S. G., O'MALLEY, F., SIMPSON, J. F., CONNOLLY, J. L., HAYES, D. F., EDGE, S. B., LICHTER, A. & SCHNITT, S. J. 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 966-78.
- FRANKS, S. E., SMITH, M. R., ARIAS-MENDOZA, F., SHALLER, C., PADAVIC-SHALLER, K., KAPPLER, F., ZHANG, Y., NEGENDANK, W. G. & BROWN, T. R. 2002. Phosphomonoester concentrations differ between chronic lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Res*, 26, 919-26.
- FRIEBOLIN, H. 2013. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH Verlag.
- FURNIVAL, C. M. 1997. Breast cancer: current issues in diagnosis and treatment. *Aust N Z J Surg*, 67, 47-58.
- FUSS, T. L. & CHENG, L. L. 2016. Evaluation of Cancer Metabolomics Using ex vivo High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS). *Metabolites*, 6.
- G. W. KAUFFMANN, E. M., R. SAUER 2006. Radiologie. *Radiologie*. Elsevier.
- GALLEGO-ORTEGA, D., GOMEZ DEL PULGAR, T., VALDES-MORA, F., CEBRIAN, A. & LACAL, J. C. 2011. Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions. *Adv Enzyme Regul*, 51, 183-94.
- GAYNOR, P. M., GILL, T., TOUTENHOOFD, S., SUMMERS, E. F., MCGRAW, P., HOMANN, M. J., HENRY, S. A. & CARMAN, G. M. 1991. Regulation of phosphatidylethanolamine methyltransferase and phospholipid methyltransferase by phospholipid precursors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1090, 326-32.
- GIESS, C. S., FROST, E. P. & BIRDWELL, R. L. 2012. Difficulties and errors in diagnosis of breast neoplasms. *Semin Ultrasound CT MR*, 33, 288-99.
- GISKEODEGARD, G. F., GRINDE, M. T., SITTER, B., AXELSON, D. E., LUNDGREN, S., FJOSNE, H. E., DAHL, S., GRIBBESTAD, I. S. & BATHEN, T. F. 2010. Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *J Proteome Res*, 9, 972-9.
- GLUNDE, K., ACKERSTAFF, E., NATARAJAN, K., ARTEMOV, D. & BHUJWALLA, Z. M. 2002. Real-time changes in ¹H and ³¹P NMR spectra of malignant human mammary epithelial cells during treatment with the anti-inflammatory agent indomethacin. *Magn Reson Med*, 48, 819-25.
- GLUNDE, K., BHUJWALLA, Z. M. & RONEN, S. M. 2011. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer*, 11, 835-48.
- GLUNDE, K., JIE, C. & BHUJWALLA, Z. M. 2004a. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 4270-6.
- GLUNDE, K., JIE, C. & BHUJWALLA, Z. M. 2004b. Molecular Causes of the Aberrant Choline Phospholipid Metabolism in Breast Cancer. *Cancer Research*, 64, 4270-4276.

- GLUNDE, K., RAMAN, V., MORI, N. & BHUJWALLA, Z. M. 2005. RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res*, 65, 11034-43.
- GLUNDE, K., SHAH, T., WINNARD, P. T., JR., RAMAN, V., TAKAGI, T., VESUNA, F., ARTEMOV, D. & BHUJWALLA, Z. M. 2008. Hypoxia regulates choline kinase expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling in a human prostate cancer model. *Cancer Res*, 68, 172-80.
- GOERKE, J. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*, 1408, 79-89.
- GRIBBESTAD, I. S., FJOSNE, H. E., HAUGEN, O. A., NILSEN, G., KRANE, J., PETERSEN, S. B. & KVINNSLAND, S. 1993. In vitro proton NMR spectroscopy of extracts from human breast tumours and non-involved breast tissue. *Anticancer Res*, 13, 1973-80.
- GRIBBESTAD, I. S., SITTER, B., LUNDGREN, S., KRANE, J. & AXELSON, D. 1999. Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anticancer Res*, 19, 1737-46.
- HAMMOND, S. M., ALTSHULLER, Y. M., SUNG, T. C., RUDGE, S. A., ROSE, K., ENGBRECHT, J., MORRIS, A. J. & FROHMAN, M. A. 1995. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem*, 270, 29640-3.
- HART, C. D., TENORI, L., LUCHINAT, C. & DI LEO, A. 2016. Metabolomics in Breast Cancer: Current Status and Perspectives. *Adv Exp Med Biol*, 882, 217-34.
- HATA, T., TAKAHASHI, H., WATANABE, K., TAKAHASHI, M., TAGUCHI, K., ITOH, T. & TODO, S. 2004. Magnetic resonance imaging for preoperative evaluation of breast cancer: a comparative study with mammography and ultrasonography. *J Am Coll Surg*, 198, 190-7.
- HAUKAAS, T. H., EUCEDA, L. R., GISKEODEGARD, G. F., LAMICHHANE, S., KROHN, M., JERNSTROM, S., AURE, M. R., LINGJAERDE, O. C., SCHLICHTING, E., GARRED, O., DUE, E. U., MILLS, G. B., SAHLBERG, K. K., BORRESEN-DALE, A. L. & BATHEN, T. F. 2016. Metabolic clusters of breast cancer in relation to gene- and protein expression subtypes. *Cancer Metab*, 4, 12.
- HERNANDEZ-ALCOCEBA, R., FERNANDEZ, F. & LACAL, J. C. 1999. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res*, 59, 3112-8.
- HERNANDEZ-ALCOCEBA, R., SANIGER, L., CAMPOS, J., NUNEZ, M. C., KHALESS, F., GALLO, M. A., ESPINOSA, A. & LACAL, J. C. 1997. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene*, 15, 2289-301.
- HESSE M, M. H., ZEEH B 2007. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemi. *Thieme Stuttgart*, Ausgabe 7, 74 - 293.
- HOSAKA, K., TANAKA, S., NIKAWA, J. & YAMASHITA, S. 1992. Cloning of a human choline kinase cDNA by complementation of the yeast cki mutation. *FEBS Lett*, 304, 229-32.
- HOULT, D. I., BUSBY, S. J., GADIAN, D. G., RADDA, G. K., RICHARDS, R. E. & SEELEY, P. J. 1974. Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Nature*, 252, 285-7.

- HU, J. Z. 2016. Magic Angle Spinning NMR Metabolomics. *Metabolomics (Los Angel)*, 6.
- HUANG, C., HYDO, L. M., LIU, S. & MILLER, R. T. 2009. Activation of choline kinase by extracellular Ca²⁺ is Ca²⁺-sensing receptor, Galpha12 and Rho-dependent in breast cancer cells. *Cell Signal*, 21, 1894-900.
- INGLESE, M., LI, B. S., RUSINEK, H., BABB, J. S., GROSSMAN, R. I. & GONEN, O. 2003. Diffusely elevated cerebral choline and creatine in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Magn Reson Med*, 50, 190-5.
- IORIO, E., MEZZANZANICA, D., ALBERTI, P., SPADARO, F., RAMONI, C., D'ASCENZO, S., MILLIMAGGI, D., PAVAN, A., DOLO, V., CANEVARI, S. & PODO, F. 2005. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res*, 65, 9369-76.
- IORIO, E., RICCI, A., BAGNOLI, M., PISANU, M. E., CASTELLANO, G., DI VITO, M., VENTURINI, E., GLUNDE, K., BHUJWALLA, Z. M., MEZZANZANICA, D., CANEVARI, S. & PODO, F. 2010. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 70, 2126-35.
- ISHIDATE, K., ENOSAWA, S. & NAKAZAWA, Y. 1983. Actinomycin D-sensitive induction of choline kinase by carbon tetrachloride intoxication in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 111, 683-9.
- ISHIDATE, K., TSURUOKA, M. & NAKAZAWA, Y. 1980. Induction of choline kinase by polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 96, 946-52.
- JACKOWSKI, S. & FAGONE, P. 2005. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem*, 280, 853-6.
- JANARDHAN, S., SRIVANI, P. & SASTRY, G. N. 2006. Choline kinase: an important target for cancer. *Curr Med Chem*, 13, 1169-86.
- JIMENEZ, B., DEL PESO, L., MONTANER, S., ESTEVE, P. & LACAL, J. C. 1995. Generation of phosphorylcholine as an essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors-induced mitogenic stimulation. *J Cell Biochem*, 57, 141-9.
- JORDAN, K. W., ADKINS, C. B., SU, L., HALPERN, E. F., MARK, E. J., CHRISTIANI, D. C. & CHENG, L. L. 2010. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung Cancer*, 68, 44-50.
- JORDAN, K. W., HE, W., HALPERN, E. F., WU, C. L. & CHENG, L. L. 2007. Evaluation of Tissue Metabolites with High Resolution Magic Angle Spinning MR Spectroscopy Human Prostate Samples After Three-Year Storage at -80 degrees C. *Biomark Insights*, 2, 147-54.
- JORDAN, K. W., NORDENSTAM, J., LAUWERS, G. Y., ROTHENBERGER, D. A., ALAVI, K., GARWOOD, M. & CHENG, L. L. 2009. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum*, 52, 520-5.
- KANFER, J. N. 1980. The base exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue. *Can J Biochem*, 58, 1370-80.

- KATZ-BRULL, R., LAVIN, P. T. & LENKINSKI, R. E. 2002a. Clinical utility of proton magnetic resonance spectroscopy in characterizing breast lesions. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1197-203.
- KATZ-BRULL, R., SEGER, D., RIVENSON-SEGAL, D., RUSHKIN, E. & DEGANI, H. 2002b. Metabolic Markers of Breast Cancer: Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Research*, 62, 1966-1970.
- KEELER, J. 2002. Fourier transformation and data processing. *Understanding NMR*.
- KENNEDY, E. P. 1958. The biosynthesis of phospholipids. *Am J Clin Nutr*, 6, 216-20.
- KENNEDY, E. P. & WEISS, S. B. 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222, 193-214.
- KISS, Z. 1999. Regulation of mitogenesis by water-soluble phospholipid intermediates. *Cell Signal*, 11, 149-57.
- KLOTZ, L. 2012. Cancer overdiagnosis and overtreatment. *Curr Opin Urol*, 22, 203-9.
- KODAKI, T. & YAMASHITA, S. 1997. Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J Biol Chem*, 272, 11408-13.
- KREIENBERG, R., ALBERT, U., FOLLMANN, M., KOPP, I., KÜHN, T., WÖCKEL, A. & ZEMMLER, T. 2012. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *Leitlinienprogramm Onkologie*, 32-40.
- KRIEGE, M., BREKELMANS, C. T., BOETES, C., BESNARD, P. E., ZONDERLAND, H. M., OBDEIJN, I. M., MANOLIU, R. A., KOK, T., PETERSE, H., TILANUS-LINTHORST, M. M., MULLER, S. H., MEIJER, S., OOSTERWIJK, J. C., BEEEX, L. V., TOLLENAAR, R. A., DE KONING, H. J., RUTGERS, E. J. & KLIJN, J. G. 2004. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med*, 351, 427-37.
- KUERER, H. M., ALBARRACIN, C. T., YANG, W. T., CARDIFF, R. D., BREWSTER, A. M., SYMMANS, W. F., HYLTON, N. M., MIDDLETON, L. P., KRISHNAMURTHY, S., PERKINS, G. H., BABIERA, G., EDGERTON, M. E., CZERNIECKI, B. J., ARUN, B. K. & HORTOBAGYI, G. N. 2009. Ductal carcinoma in situ: state of the science and roadmap to advance the field. *J Clin Oncol*, 27, 279-88.
- LACAL, J. C. 2001. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs*, 4, 419-26.
- LAUTERBUR, P. C. 1989. Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973. *Clin Orthop Relat Res*, 3-6.
- LI, M., SONG, Y., CHO, N., CHANG, J. M., KOO, H. R., YI, A., KIM, H., PARK, S. & MOON, W. K. 2011. An HR-MAS MR metabolomics study on breast tissues obtained with core needle biopsy. *PLoS One*, 6, e25563.
- LIEDTKE, C., MAZOUNI, C., HESS, K. R., ANDRE, F., TORDAI, A., MEJIA, J. A., SYMMANS, W. F., GONZALEZ-ANGULO, A. M., HENNESSY, B., GREEN, M., CRISTOFANILLI, M., HORTOBAGYI, G. N. & PUSZTAI, L. 2008. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1275-81.
- LIU, H., JIANG, Y. X., LIU, J. B., ZHU, Q. L., SUN, Q. & CHANG, X. Y. 2009. Contrast-enhanced breast ultrasonography: imaging features with histopathologic correlation. *J Ultrasound Med*, 28, 911-20.

- MARATHE, S., SCHISSEL, S. L., YELLIN, M. J., BEATINI, N., MINTZER, R., WILLIAMS, K. J. & TABAS, I. 1998. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem*, 273, 4081-8.
- MARME, F. & SCHNEEWEISS, A. 2012. Personalized therapy in breast cancer. *Onkologie*, 35 Suppl 1, 28-33.
- MCDERMOTT, M., WAKELAM, M. J. & MORRIS, A. J. 2004. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*, 82, 225-53.
- MCKNIGHT, T. R., SMITH, K. J., CHU, P. W., CHIU, K. S., CLOYD, C. P., CHANG, S. M., PHILLIPS, J. J. & BERGER, M. S. 2011. Choline metabolism, proliferation, and angiogenesis in nonenhancing grades 2 and 3 astrocytoma. *J Magn Reson Imaging*, 33, 808-16.
- MEISAMY, S., BOLAN, P. J., BAKER, E. H., POLLEMA, M. G., LE, C. T., KELCZ, F., LECHNER, M. C., LUIKENS, B. A., CARLSON, R. A., BRANDT, K. R., AMRAMI, K. K., NELSON, M. T., EVERSON, L. I., EMORY, T. H., TUTTLE, T. M., YEE, D. & GARWOOD, M. 2005. Adding in vivo quantitative ¹H MR spectroscopy to improve diagnostic accuracy of breast MR imaging: preliminary results of observer performance study at 4.0 T. *Radiology*, 236, 465-75.
- MERCHANT, T. E., GIERKE, L. W., MENESES, P. & GLONEK, T. 1988. ³¹P magnetic resonance spectroscopic profiles of neoplastic human breast tissues. *Cancer Res*, 48, 5112-8.
- METTLER, F., UPTON, A., KELSEY, C., ASHBY, R., ROSENBERG, R. & LINVER, M. 1996. Benefits versus risks from mammography: a critical reassessment. *Cancer Research*, 77, 903-9.
- MOESTUE, S. A., DAM, C. G., GORAD, S. S., KRISTIAN, A., BOFIN, A., MAELANDSMO, G. M., ENGEBRATEN, O., GRIBBESTAD, I. S. & BJORKOY, G. 2013. Metabolic biomarkers for response to PI3K inhibition in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15, R16.
- MOESTUE, S. A., GISKEODEGARD, G. F., CAO, M. D., BATHEN, T. F. & GRIBBESTAD, I. S. 2012. Glycerophosphocholine (GPC) is a poorly understood biomarker in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2506; author reply E2507.
- MOOKERJEA, S. & HUNT, D. 1995. A novel phosphatidylcholine hydrolysing action of C-reactive protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 208, 1046-52.
- MOON, R. B. & RICHARDS, J. H. 1973. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem*, 248, 7276-8.
- MOUNTFORD, C., RAMADAN, S., STANWELL, P. & MALYCHA, P. 2009. Proton MRS of the breast in the clinical setting. *NMR Biomed*, 22, 54-64.
- MOUNTFORD, C. E., LEAN, C. L., MACKINNON, W. B. & RUSSELL, P. 1993. The Use of Proton MR in Cancer Pathology. In: WEBB, G. A. (ed.) *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Academic Press.
- NOVER, A. B., JAGTAP, S., ANJUM, W., YEGINGIL, H., SHIH, W. Y., SHIH, W. H. & BROOKS, A. D. 2009. Modern breast cancer detection: a technological review. *Int J Biomed Imaging*, 2009, 902326.
- OREL, S. G. 1998. High-resolution MR imaging for the detection, diagnosis, and staging of breast cancer. *Radiographics*, 18, 903-12.

- PAULI, W., JR. 1924. Zur Frage der theoretischen Deutung der Satelliten einiger Spektrallinien und ihrer Beeinflussung durch magnetische Felder. *Naturwissenschaften*, 12, 741-743.
- PAYNE, S. J., BOWEN, R. L., JONES, J. L. & WELLS, C. A. 2008. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology*, 52, 82-90.
- PETTEGREW, J. W., KLUNK, W. E., PANCHALINGAM, K., MCCLURE, R. J. & STANLEY, J. A. 1997. Magnetic resonance spectroscopic changes in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 826, 282-306.
- PLATHOW, C. & WEBER, W. A. 2008. Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med*, 49 Suppl 2, 43S-63S.
- PURCELL, E. M., TORREY, H. C. & POUND, R. V. 1946. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*, 69, 37-38.
- RAMIREZ DE MOLINA, A., BANEZ-CORONEL, M., GUTIERREZ, R., RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., OLMEDA, D., MEGIAS, D. & LACAL, J. C. 2004. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res*, 64, 6732-9.
- RAMIREZ DE MOLINA, A., GALLEGO-ORTEGA, D., SARMENTERO, J., BANEZ-CORONEL, M., MARTIN-CANTALEJO, Y. & LACAL, J. C. 2005. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res*, 65, 5647-53.
- RAMIREZ DE MOLINA, A., GUTIERREZ, R., RAMOS, M. A., SILVA, J. M., SILVA, J., BONILLA, F., SANCHEZ, J. J. & LACAL, J. C. 2002a. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, 21, 4317-22.
- RAMIREZ DE MOLINA, A., PENALVA, V., LUCAS, L. & LACAL, J. C. 2002b. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene*, 21, 937-46.
- RAMIREZ DE MOLINA, A., RODRIGUEZ-GONZALEZ, A., PENALVA, V., LUCAS, L. & LACAL, J. C. 2001. Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 873-9.
- RATANACHAIKANONT, T. 2005. Clinical breast examination and its relevance to diagnosis of palpable breast lesion. *J Med Assoc Thai*, 88, 505-7.
- RATNAM, S. & KENT, C. 1995. Early increase in choline kinase activity upon induction of the H-ras oncogene in mouse fibroblast cell lines. *Arch Biochem Biophys*, 323, 313-22.
- RAZA, S. & BAUM, J. K. 1997. Solid breast lesions: evaluation with power Doppler US. *Radiology*, 203, 164-8.
- REISER, M. K., F.; DEBUS J. 2004. Duale Reihe Radiologie. *Duale Reihe Radiologie*. Georg Thieme Verlag.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- ROBERT KOCH INSTITUT, G. 2015a. Krebs in Deutschland Robert Koch Institut. http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf, Accessed 09.08.2016

- ROBERT KOCH INSTITUT, R. 2013. Tabelle erstellt mit der online Datenbankabfrage.
http://www.rki.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe_2_form.html, Accessed 10.12.2013
- ROBERT KOCH INSTITUT, R. 2015b. Schaubild aus online Datenbankabfrage.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html,
Accessed 01.10.2017
- ROCHA, C. M., BARROS, A. S., GIL, A. M., GOODFELLOW, B. J., HUMPFER, E., SPRAUL, M., CARREIRA, I. M., MELO, J. B., BERNARDO, J., GOMES, A., SOUSA, V., CARVALHO, L. & DUARTE, I. F. 2010. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by 1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J Proteome Res*, 9, 319-32.
- ROLF GRUETTER, S. A. W., VASANTHAM RAJANAYAGAN, MELISSA TERPSTRA, HELLMUT MERKLE, CHARLES L. TRUWIT, MICHAEL GARWOOD, SCOTT L. NYBERG, AND KAMIL UGURBIL 1998. Resolution Improvements in in Vivo 1H NMR Spectra with Increased Magnetic Field Strength. *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE*, 135, 260-264.
- RONEN, S. M., JACKSON, L. E., BELOUECHE, M. & LEACH, M. O. 2001. Magnetic resonance detects changes in phosphocholine associated with Ras activation and inhibition in NIH 3T3 cells. *Br J Cancer*, 84, 691-6.
- SEHGAL, C. M., WEINSTEIN, S. P., ARGER, P. H. & CONANT, E. F. 2006. A review of breast ultrasound. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 11, 113-23.
- SHAH, N., SATTAR, A., BENANTI, M., HOLLANDER, S. & CHEUCK, L. 2006. Magnetic resonance spectroscopy as an imaging tool for cancer: a review of the literature. *J Am Osteopath Assoc*, 106, 23-7.
- SINHA, S. & SINHA, U. 2009. Recent advances in breast MRI and MRS. *NMR Biomed*, 22, 3-16.
- SITTER, B., BATHEN, T. F., SINGSTAD, T. E., FJOSNE, H. E., LUNDGREN, S., HALGUNSET, J. & GRIBBESTAD, I. S. 2010. Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR Biomed*, 23, 424-31.
- SITTER, B., LUNDGREN, S., BATHEN, T. F., HALGUNSET, J., FJOSNE, H. E. & GRIBBESTAD, I. S. 2006. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed*, 19, 30-40.
- SITTER, B., SONNEWALD, U., SPRAUL, M., FJOSNE, H. E. & GRIBBESTAD, I. S. 2002. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed*, 15, 327-37.
- SKIPSKI, V. P., BARCLAY, M., BARCLAY, R. K., FETZER, V. A., GOOD, J. J. & ARCHIBALD, F. M. 1967. Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J*, 104, 340-52.
- SMITH, T. A., BUSH, C., JAMESON, C., TITLEY, J. C., LEACH, M. O., WILMAN, D. E. & MCCREADY, V. R. 1993. Phospholipid metabolites, prognosis and proliferation in human breast carcinoma. *NMR Biomed*, 6, 318-23.
- SPENCE, M. W. 1993. Sphingomyelinases. *Adv Lipid Res*, 26, 3-23.
- STANWELL, P. & MOUNTFORD, C. 2007. In vivo proton MR spectroscopy of the breast. *Radiographics*, 27 Suppl 1, S253-66.

- STATISTISCHES BUNDESAMT, D. 2014. *Todesursachen in Deutschland* [Online]. STATISTISCHES BUNDESAMT. Available: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c50_brust.pdf?__blob=publicationFile, Accessed 09.08.2016.
- TING, Y. L., SHERR, D. & DEGANI, H. 1996. Variations in energy and phospholipid metabolism in normal and cancer human mammary epithelial cells. *Anticancer Res*, 16, 1381-8.
- TSE, G. M., YEUNG, D. K., KING, A. D., CHEUNG, H. S. & YANG, W. T. 2007. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of breast lesions: an update. *Breast Cancer Res Treat*, 104, 249-55.
- UCHIDA, T. 1994. Regulation of choline kinase R: analyses of alternatively spliced choline kinases and the promoter region. *J Biochem*, 116, 508-18.
- UCHIDA, T. & YAMASHITA, S. 1992. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding mammalian choline kinase. *J Biol Chem*, 267, 10156-62.
- VAN ASTEN, J. J., VETTUKATTIL, R., BUCKLE, T., ROTTENBERG, S., VAN LEEUWEN, F., BATHEN, T. F. & HEERSCHAP, A. 2015. Increased levels of choline metabolites are an early marker of docetaxel treatment response in BRCA1-mutated mouse mammary tumors: an assessment by ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *J Transl Med*, 13, 114.
- VANCE, D. E. 1990. Boehringer Mannheim Award lecture. Phosphatidylcholine metabolism: masochistic enzymology, metabolic regulation, and lipoprotein assembly. *Biochem Cell Biol*, 68, 1151-65.
- VANCE, D. E. & RIDGWAY, N. D. 1988. The methylation of phosphatidylethanolamine. *Prog Lipid Res*, 27, 61-79.
- ZHU, L. & BAKOVIC, M. 2012. Breast cancer cells adapt to metabolic stress by increasing ethanolamine phospholipid synthesis and CTP:ethanolaminephosphate cytidyltransferase-Pcyt2 activity. *Biochem Cell Biol*, 90, 188-99.

9 Anhang

9.1.1 Arbeitsmittel

Deckgläschen 24x40mm Rectangular No 1½	Corning Inc., Corning, NY
Einmalpipetten 5 ml Pyrex Disposable Serological Pipets	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Eppendorf Gefäße Falcon Tubes (14, 45ml)	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ
Film HyBlot CL Autoradiographie	Denville Scientific, Metuchen, NJ
Filterpapier Whatman #1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Nitrozellulosemembran Trans-Blot Transfer Medium 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Objektträger Fisherbrand *Superfrost*	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Pipettenspitzen Aerosol Resistant Tips ART (0.1-1000µl)	Molecular BioProducts, San Diego, CA
Pipettenspitzen BD Falcon Disposable Serological Pipet Tips (5ml, 10ml)	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ
Pipettenspitzen Costar Gel Loading Tips 1-200µl	Daigger, Vernon Hills, IL
„Well“-Platte Microtest96	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ

9.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bis Lösung 29:1 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Ammoniumperoxodisulfat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Bluing Reagent Shandon	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
B-Mercaptoethanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Bovines Serum Albumin BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Chemilumineszenz SuperSignal West Pico Luminol Enhancer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Chemilumineszenz SuperSignal West Pico Stable Peroxid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Chlorwasserstoffsäure ACS Reagenz 37%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Dimethylsulfoxid Lösung DMSO für Brustgewebe und -extrakte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Eosin Y, Shandon alkoholisch	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Ethanol HistoPrep 95% Reagent	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Ethanol HistoPrep 100% Denatured	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Fettfreies Trockenmilchpulver	Nestle, Vevey, Schweiz
Gewebeeinbettmedium Tissue-Tec OCT Compound	Sakura Finetek, Torrance, CA

Glycin	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Hämatoxylin Harris	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
4x Laemmli SDS Ladepuffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Methanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Natriumchlorid	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
OCT Cryostat Medium Tissue Tec	Sakura Finetek, Torrance, CA
Permout Lademedium, Toluene Lösung	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Ponceau S Lösung 0,1% (W/v) in 5% Essigsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Tris Base	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Tris Buffered Saline TBS (10x)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Ultra Pure TEMED Beschleuniger	Invitrogen, Carlsbad, CA
Xylene Histoprep	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA

9.1.3 Kits

Laemmli SDS-Laufpuffer (4x)	Boston Bioproducts Worcester, MA
Protein Assay Farbreagenz Konzentrat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Schnellstart Bradford Farbreagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
RIPA Lysepuffer mit EDTA	Boston Bioproducts Worcester, MA

9.1.4 Puffer und Lösungen

Elektrophorese Sammelgel (4% Polyacrylamid)	4,11 ml H ₂ O bidest 1,75 ml Sammelgelpuffer (4x) 1,05 ml Polyacrylamid (30 %) 80 µl APS (10 %) 6 µl TEMED Lagerung bei 4 °C
Elektrophorese Trenngel (10% Polyacrylamid)	13,18 ml H ₂ O bidest 8 ml Trenngelpuffer (4x) 10,6 ml Polyacrylamid (30 %) 216 µl APS (10 %) 10,8 µl TEMED Lagerung bei 4 °C
Elektrophorese Laufpuffer	3 g Tris 14.4 g Glyzin 1 g SDS H ₂ O bidest. ad 1 l

	Lagerung bei Raumtemperatur
4x Trenngel Puffer pH 8,8	80 ml H ₂ O bidest 2 ml SDS (20 %) 10 ml HCl (2N) 18,1 g Tris pH-Wert einstellen, dann H ₂ O bidest. ad 100 ml Lagerung bei Raumtemperatur
Transferpuffervorstufe (10x)	30,2 g Tris 142,5 g Glycin H ₂ O bidest. ad 1 l Lagerung bei Raumtemperatur
Transferpuffer	350 ml H ₂ O bidest. 100 ml Methanol 50 ml Transferpuffervorstufe (10x) Lagerung bei Raumtemperatur
TBS Tween	2 l TBS 2 l Tween Lagerung bei Raumtemperatur

9.1.5 Antikörper

ECL anti-mouse IgG HRP	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
ECL anti-rabbit IgG HRP	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Monoclonal anti-GAPDH (mouse)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO

9.1.6 Geräte

Analysewaage APX-200	Denver Instruments, Bohemia, NY
Elektrophorese Einheit SE400-15-1.5 Sturdier Vertical	Hoefer Inc, San Fransisco, CA
Forschungskryostat Leica CM3050	Leica, Wetzlar
Geltransfer Elektrophorese Einheit TE 42 Transfer Gel	Hoefer Inc, San Fransisco, CA
Heizblock Isotemp	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Heizrührplatte Cimarec Digital Hot Plate Stirrer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Inkubierer ProBlot Rocker 35	Labnet International, Woodbridge, NJ
Mikroskop Olympus BX40F4	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Pipettenspitzen (0.1-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe BD Falcon Express	Becto Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ
Röntgenfilm Entwickler Kodak X-OMAT Processor M20	Kodak, Rochester, NY

Spannungsgeber EC570-90 Electrophoresis Power Supply	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Spektrometer OpsysMR Plate Reader	Dynex Technologies, Chantilly, VA
Ultraschall Homogenisator Sonic Dismembrator Model 100	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Vortexer Refurbished Vortex Genie 2	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge AccuSpin 3R	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA

9.1.7 Mess- und Auswertungssoftware

Endnote X6	Thomson Reuters, USA
IBM SPSS Statistics	IBM SPSS Inc., USA
Image J Imaging Program	National Institute of Health, USA
MATLAB R2009b/R2009a	MathWorks Inc., USA
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, USA
MicroSuite Histopathologische Bildanalyse	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
MRS - Spektrenanalyse NUTS Software	AcornNMR (Livermore, CA)

10 Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

„Ich, Nathalie Christina Anne-Marie Strittmatter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung von humanem Mammagewebe mittels High Resolution Magic Angle Spinning Protonen Magnetresonanzspektroskopie (HRMAS ¹HMRS) und Bestimmung der Cholinkinase zur Evaluation der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft einer metabolischen Bildgebung anhand der cholinhaltigen Metaboliten 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) 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.

Da eine aus dieser Dissertation hervorgehende Publikation noch nicht veröffentlicht wurde, entfällt die Anteilserklärung.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 7.12.2018

Nathalie Strittmatter

11 Curriculum vitae

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

14 Danksagung

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

