

## **Pyruvatkinase-Isoenzyme in Tumoren**

### **Einleitung**

Tumoren können aufgrund der verschiedensten äußeren Ursachen entstehen. Zu den wichtigsten gehören heute Chemikalien (kanzerogene Substanzen), ionisierende und ultraviolette Strahlen sowie Viren. Es wird diskutiert, inwieweit diese sehr verschiedenen Faktoren eventuell über ähnliche Mechanismen zur Tumorentstehung führen können. Eine Möglichkeit hierfür wäre unter anderem eine Aktivitätsänderung von sogenannten zellulären Onc-Genen, die in jeder normalen Zelle vorhanden sind, deren physiologische Funktion jedoch für die meisten dieser Gene bisher nicht genau bekannt ist [1, 2].

Eine Änderung der Aktivität von zellulären Onc-Genen bei der Tumorentstehung kann man derzeit aber nur in einigen Fällen und nur mit sehr aufwendigen Methoden direkt messen [1–5]. Auch ist im realen Untersuchungsfall die Angelegenheit dadurch kompliziert, daß es eine Anzahl verschiedener Tumorgene gibt – bisher sind ungefähr 30 bekannt und es werden sicherlich noch mehr Onc-Gene entdeckt werden –, man aber nicht weiß, welches Onc-Gen denn im Einzelfall nun durch eine äußere Einwirkung wie z. B. eine kanzerogene Substanz aktiviert wurde [1–5].

Daher werden zur Zeit mögliche kanzerogene Wirkungen meist mit indirekten Methoden untersucht. Hierbei gilt es, zwei Aufgaben gleichzeitig zu erfüllen. Es sollen zum einen möglichst alle kanzerogenen Gefährdungen sicher erkannt werden, zum anderen müssen aber die Untersuchungen vom Aufwand her praktikabel sein und es sollen möglichst wenige Ver-

suchstiere hierfür eingesetzt werden müssen. Ein völliger Verzicht auf Versuchstiere ist derzeit nicht möglich, da krebserzeugende Substanzen u. U. erst nach einem Umbau des Mokeküls, wie er im Stoffwechsel des Tieres erfolgt, ihre tumorerzeugende Wirkung entfaltet. Solche Veränderungen der Substanz im Stoffwechsel eines Tieres lassen sich aber bisher nicht sicher außerhalb eines Organismus nachvollziehen. So sind Substanzen bekannt, die sich zwar an die Erbsubstanz anlagern oder sogar Veränderungen im Erbgut verursachen – beides außerhalb eines Tieres meßbare Vorgänge –, jedoch keine Tumoren induzieren. Umgekehrt gibt es auch chemische Verbindungen, die Tumoren erzeugen, ohne daß sie in einer solchen Untersuchung ohne Einsatz von Versuchstieren hierfür einen Hinweis geben würden. Daher muß das derzeit aktuelle Ziel sein, die für solche Studien benötigten Tierzahlen zu senken. Dies geschieht am besten, indem man Tests entwickelt, die möglichst früh eine tumorerzeugende Wirkung nachweisen können und gleichzeitig in der Lage sind, diese kanzerogene Potenz unabhängig von der einzelnen Ursache für möglichst viele Tumoren anzuzeigen.

Hierfür bietet sich die Untersuchung des Zuckerstoffwechsels in Tumorzellen an. Schon lange – seit den Veröffentlichungen von Otto Warburg 1920 – ist bekannt, daß Tumorzellen im Zuckerstoffwechsel alle eine gleichartige Veränderung gegenüber Normalzellen aufweisen. Die Interpretation und Nutzbarmachung dieser Befunde gelang allerdings nicht, solange sie unter

dem Gesichtspunkt des Energiestoffwechsels gesehen wurden. Wichtig erscheint heute eher, daß die Zuckerspaltung bei der Veränderung der Aktivitäten bestimmter Kontrollenzyme verstärkt für den Baustoffwechsel benutzt werden kann.

Wir untersuchen besonders intensiv das letzte der Kontrollenzyme der Zuckerspaltung (Glykolyse), die Pyruvatkinase. Durch die Bestimmung sehr ähnlicher aber nicht identischer Pyruvatkinase-Enzyme, sogenannter Isoenzyme, kann hier noch eine weitergehende Information erhalten werden, als dies bei einer Untersuchung ohne Berücksichtigung des Auftretens von Isoenzymen möglich wäre [6, 12, 14].

Gleichzeitig lassen diese Isoenzyme die vielversprechende Möglichkeit offen, daß Veränderungen in ihrem Muster schon im Blut erkennbar sein könnten. Sie sind im Zytoplasma der Zelle gelöst und werden bei Zellschädigungen, wie sie in Tumoren häufig auftreten, leicht in das Blutplasma abgegeben, wo sie nachgewiesen werden können. Damit eröffnet sich prinzipiell die Möglichkeit, kanzerogene Veränderungen zu erkennen, ohne das Versuchstier zum Tumornachweis töten und sezieren zu müssen bzw. beim Menschen operieren und Biopsiematerial entnehmen zu müssen.

## Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten, daß in allen Tumorgeweben, die von Zellen ausgehen, welche das Isoenzym der Pyruvatkinase Typ  $M_2$  enthalten, der Gehalt an diesem Isoenzym gesteigert ist [7–20]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Pyruvatkinase Typ  $M_2$  und der Malignität der Tumoren [8, 10, 15, 16, 20]. Je bösartiger ein Tumor ist, desto höher ist sein Gehalt an Pyruvatkinase Typ  $M_2$

(Abb. 1 u. 2) [8, 10, 11, 16, 20]. Diese statistisch signifikante positive Korrelation zwischen Malignität eines Tumors und seinem  $M_2$ -Pyruvatkinase-Gehalt gilt nicht nur beim Vergleich verschiedener Tumorarten (Abb. 1), sondern auch innerhalb einer Tumorart (Abb. 2). Dies gilt für biologisch so weit voneinander entfernte Tierarten wie Huhn, Hund und Ratte, so daß eine weite Verbreitung dieses Phänomens unter den Warmblütern bis hin zum Menschen angenommen werden kann [9, 15, 19, 26].

Unsere Untersuchungen zeigten aber auch, daß sich die Pyruvatkinase Typ  $M_2$  aus Tumoren (Tumor- $M_2$ -Pk) in ihren immunologischen Eigenschaften von Pyruvatkinase Typ  $M_2$  aus normaler Lunge unterscheidet [9]. So lassen sich Tumorzellen in der Lunge mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumor- $M_2$ -Pk sehr deutlich und spezifisch darstellen, obwohl das Lungengewebe selbst reich an normaler  $M_2$ -Pyruvatkinase ist, die aber von dem monoklonalen Antikörper nicht erkannt wird (Abb. 3) [10, 20].

Wir haben daher dieses Enzym aus Ratten- und Hühnertumoren gereinigt und seine Eigenschaften mit dem Lungenzym verglichen. Das Enzym aus Tumoren war bei normaler Konzentration seines Substrates Phosphoenolpyruvat sehr viel weniger aktiv als das Lungenzym. Es konnte durch Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukte und durch Aminosäuren sehr viel stärker aktiviert oder inaktiviert werden als normale  $M_2$ -Pk [9, 11, 15]. Bei der Umwandlung von normalen Zellen zu Tumorzellen wird sie in Virus-transformierten Fibroblasten durch ein Onc-Gen-Produkt, die pp60<sup>v-src</sup>-Kinase, zusätzlich durch Phosphateinbau inaktiviert [7, 17, 18, 27]. Gleichzeitig nimmt aber die Menge des Enzymproteins sehr stark zu. Mit diesen Befunden lassen sich die Steigerung des  $M_2$ -Pk-Gehaltes in

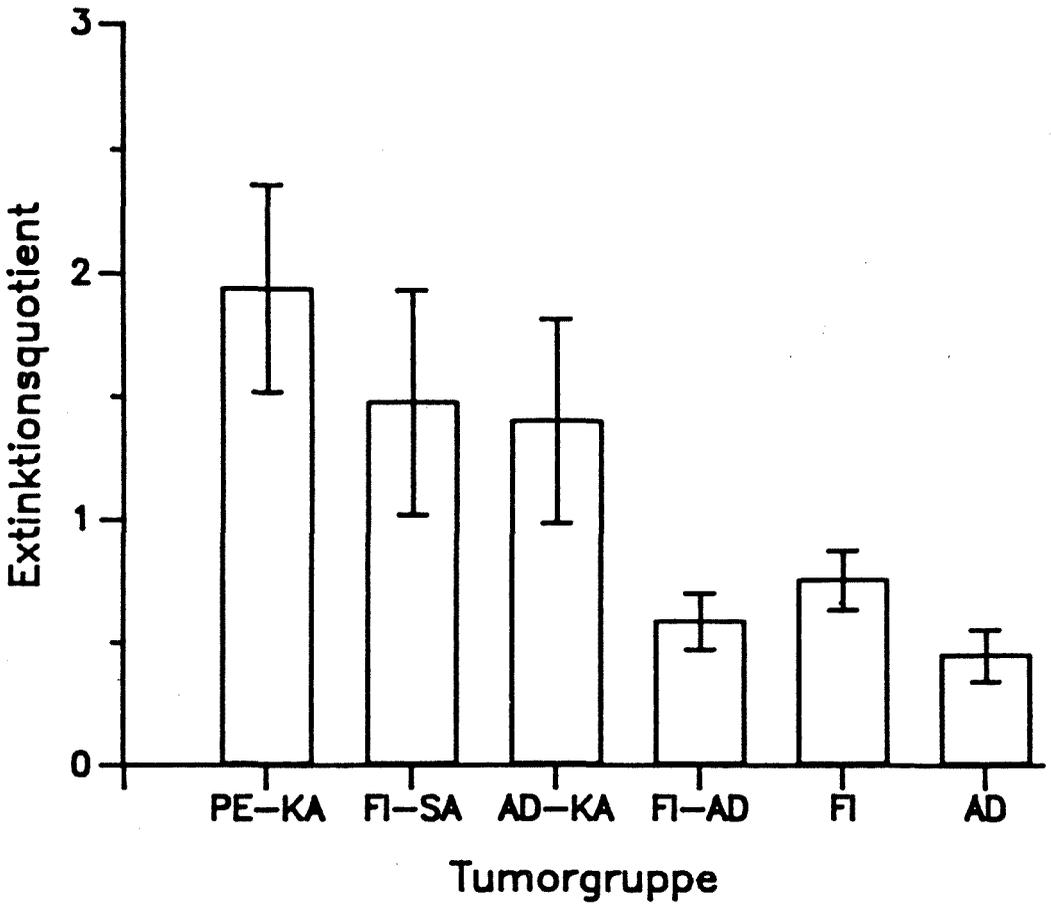


Abb. 1:  $M_2$ -Pk-Gehalt von benignen und malignen Tumoren der Ratte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung); PE-KA = Plattenepithelkarzinom; FI-SA = Fibrosarkom; AD-KA = Adenokarzinom der Mamma; FI-AD = Fibroadenom der Mamma; FI = Fibrom; AD = Adenom der Mamma.

Spontantumoren ebenso verstehen wie die immunologische Unterscheidbarkeit von normaler  $M_2$ -Pk. Der monoklonale Antikörper könnte z. B. eine phosphorylierte, Tumor-Pk-spezifische Region auf dem Molekül erkennen.

Tumorzellen enthalten somit eine große Menge eines Pyruvatkinasetyps, der unter physiologischen Bedingungen inaktiv ist, aber bei Sauerstoffmangel sofort voll reaktiviert werden kann. Dies erlaubt zum einen eine optimale Bereitstellung von

Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukten für die Zellbausteinsynthese und zum anderen eine optimale Bereitstellung von Energie durch die Glykolysekette bei Sauerstoffmangel. Es gibt Hinweise, daß die von Tumorzellen in Anwesenheit von Sauerstoff abgegebene Milchsäure nicht nur aus Glukose stammt, sondern aus der Aminosäure Glutamin, die in allen Körpergeweben in hohen Konzentrationen vorkommt. Dieser Stoffwechselzustand bevorteilt Tumorzellen gegenüber norma-

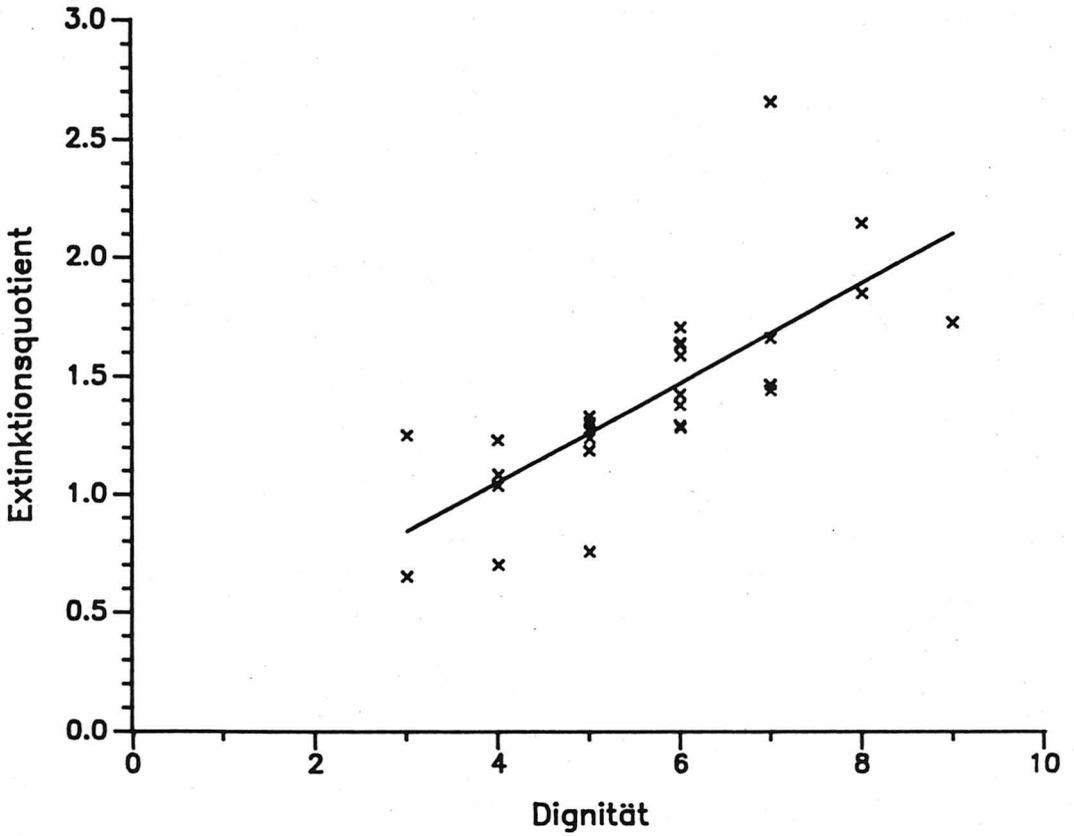


Abb. 2: Korrelation zwischen  $M_2$ -Pk-Gehalt von Adenokarzinomen der Mamma und deren Malignitätsgrad.

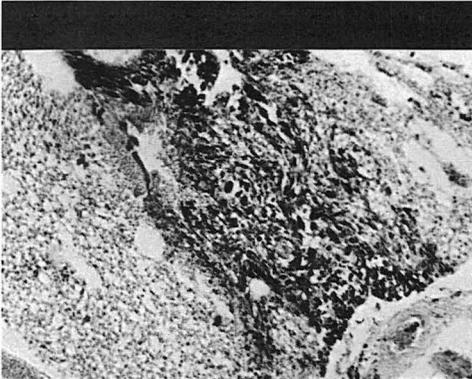


Abb. 3: Immunhistologischer Nachweis von "tumorspezifischer"  $M_2$ -Pyruvatkinase. Während die Tumorzellen einer Fibrosarkometastase in der Lunge stark reagieren, ist das Lungengewebe, das viel "normale"  $M_2$ -Pyruvatkinase enthält, negativ.

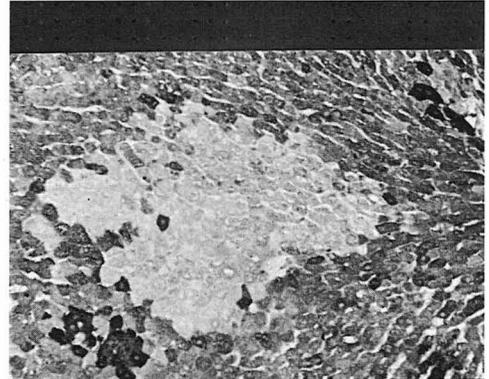


Abb. 4: Verlust von Pyruvatkinase Typ L (heller Herd) in einer Tumorstufe (präneoplastischer Herd) in der Rattenleber.

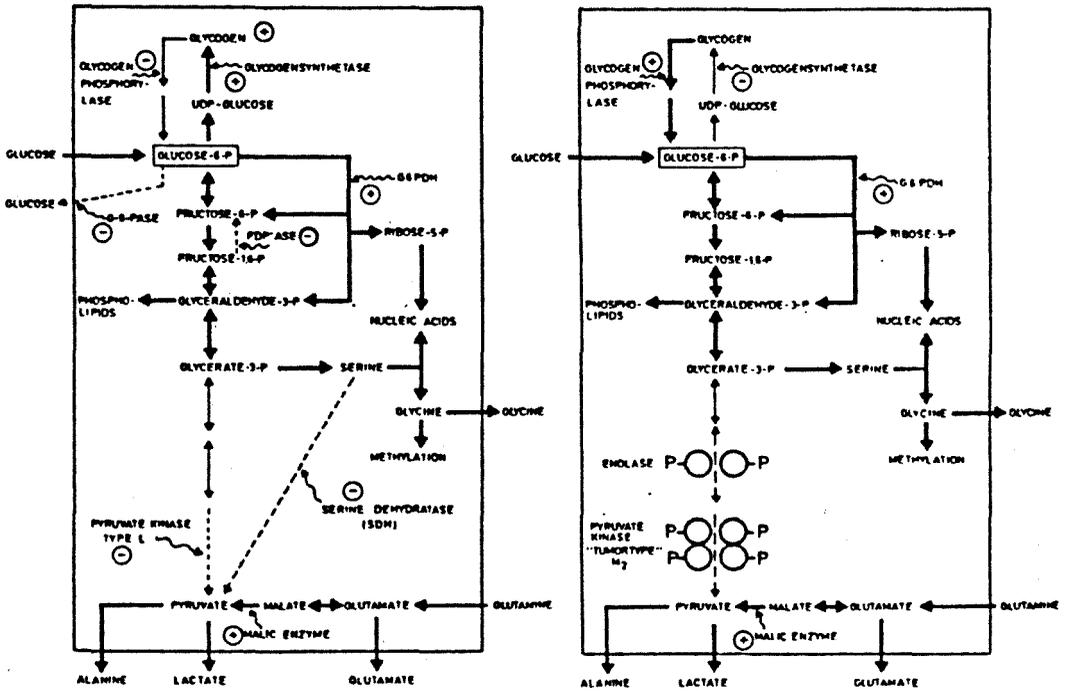


Abb. 5: Schematische Darstellung des Zuckerabbaues in Lebertumoren und ihren Vorstufen (links) sowie in Tumoren, die von  $M_2$ -Pyruvatkinase enthaltenden Zellen ausgehen (rechts). Dicke Pfeile geben die Hauptstoffwechselwege an. Bekannte Aktivitätsänderungen von Enzymen sind mit + bzw. - gekennzeichnet. In der Abbildung links gilt der oberhalb des Glukose 6-Phosphats eingezeichnete Zustand für die Tumorstufen, während in den eigentlichen Tumoren eine ähnliche Situation vorliegt, wie sie in der Abbildung rechts eingezeichnet ist. Im Bereich der Pyruvatkinase unterscheiden sich beide Schemata dadurch, daß in der Abbildung links eine Abnahme der Pyruvatkinase (Typ L) eingetragen ist, während in der Abbildung rechts mehr Pyruvatkinasemoleküle (Typ  $M_2$ ) vorliegen als in Normalzellen, diese jedoch durch Phosphateinbau – außer im Sauerstoffmangel – weitgehend inaktiviert sind.

len Zellen und führt dazu, daß sie sich auch bei schlechter Blutgefäßversorgung und unter wechselnder Nährstoffversorgung weiterleben oder zumindest überleben können [6, 11, 14, 15].

Eine ähnliche Stoffwechselsituation wird auch in Lebertumoren, deren Ausgangszellen keine  $M_2$ -Pk sondern das Isoenzym Typ L enthalten, durch einen etwas anderen Vorgang hergestellt. In den Lebertumoren sowie in ihren Vorstufen findet sich mit verschiedenen Methoden nachweisbar ein starker Abfall des Gehaltes an Pyru-

vatkinase Typ L (Abb. 4) [16, 21–25, 28]. Dies ist inzwischen in ersten biochemischen Untersuchungen auch für Lebertumoren des Menschen gezeigt worden.

Das Fehlen von Pyruvatkinase Typ L führt ähnlich wie eine durch Tumorgenprodukte inaktivierte Pyruvatkinase Typ  $M_2$  zu einer Verminderung der Glykolyse und zu einer optimalen Bereitstellung von Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukten zur Zellbausteinsynthese. Da abweichend von anderen Tumortypen hier jedoch keine Reaktivierung erfolgen

kann, ist zu erwarten, daß diese Leberzell-tumoren gegenüber Sauerstoffmangel wesentlich empfindlicher sind.

Leberzellen sind aufgrund ihrer vielschichtigen Bedeutung für den Körper in ihren Stoffwechselfunktionen vielseitiger als viele  $M_2$ -Pk-haltige Zellen. Um den gleichen Stoffwechselzustand zu erreichen, wie man ihn z. B. in transformierten Fibroblasten findet, müssen einige strategisch wichtige Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in den Leberzellen an- oder abgeschaltet werden. Diese Enzyme haben wir in Lebertumoren bestimmt und tatsächlich verändern sie sich so im Vergleich zur normalen Leber, daß der gleiche Stoffwechselzustand wie in  $M_2$ -Pyruvatkinase-haltigen Tumoren entsteht (Abb. 5).

## Diskussion

Die Untersuchung der Pyruvatkinase-Isoenzyme in Tumorzellen ist besonders erfolgversprechend, da durch die Pyruvatkinase ein zentraler Punkt eines Stoffwechselweges gesteuert wird, der in praktisch allen Tumorzellen verändert ist. Der Fortschritt im Verständnis dieser Abweichung vom normalen Stoffwechsel resultiert daraus, daß die Zuckerspaltung nicht mehr nur unter dem Gesichtspunkt der Energiegewinnung gesehen wurde, sondern daß die bei der Zuckerspaltung entstehenden Bruchstücke als Bausteine zum Aufbau neuer, für eine Tumorzelle wesentlicher Bestandteile betrachtet wurden (Abb. 5). Die breite biologische Bedeutung dieser Beobachtungen ergibt sich daraus, daß so weit entfernte Tierarten wie Huhn und Ratte gleichartige Veränderungen aufwiesen. Hieraus ist abzuleiten, daß diese Stoffwechselmechanismen auch beim Menschen ablaufen. Tatsächlich sind biochemische Untersuchungen menschlicher Tumoren bekannt, die unse-

re Befunde bestätigen [6]. In jüngster Zeit konnten wir entsprechende Befunde auch immunhistologisch an menschlichen Tumoren erhalten [26].

Diese Ergebnisse sind nicht nur in der Untersuchung kanzerogener Wirkungen verwendbar, sondern sie sind auch für die Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren in der klinischen Diagnostik von Bedeutung. Die statistisch signifikante Korrelation zwischen Malignitätsgrad und  $M_2$ -Pk-Gehalt innerhalb einer Tumorart läßt zudem eine differenziertere Prognose zu. Auch für die Tumorthherapie lassen sich hilfreiche Schlüsse aus dem Zustand des Zuckerstoffwechsels ziehen, da dieser auch für die Entgiftung der dabei eingesetzten Zytostatika von wesentlicher Bedeutung ist. Der Nachweis der Pyruvatkinase-Isoenzyme läßt sich also sowohl experimentell, d. h. zur Erkennung kanzerogener Gefahren durch unbekannte Stoffe, als auch klinisch zur Tumordiagnostik verwenden. Er ist sowohl am lebenden Organismus – Tier oder Mensch – als auch in der Gewebekultur, die den Tierversuch soweit wie möglich ersetzen soll, anwendbar und weist direkt Kanzerogenität unabhängig von dem Entstehungsmechanismus des Tumors nach [8, 10, 11, 16, 21, 25].

Hierin liegt auch ein Vorteil dieses Tests gegenüber der Untersuchung der Bindung von chemischen Substanzen an die Nukleinsäuren (Erbinformationsträger) und Proteine isolierter Zellen. Letztere kann nur einen Verdacht in Richtung kanzerogener Wirkungen belegen, jedoch eine solche weder beweisen noch ausschließen. Eine nicht chemisch bedingte Tumorinduktion – z. B. durch Strahlung oder Viren – kann damit nicht erfaßt werden.

Da „tumorspezifische“ Anteile an einem Isoenzym mit monoklonalen Antikörpern nachweisbar sind, ist der Test sehr spezifisch. Bei diesen „tumorspezifischen“ Ver-

änderungen könnte es sich z. B. um phosphorylierte Bereiche des Enzyms handeln. So ist von einem Onc-Gen-Produkt, der pp60<sup>v-src</sup>-Kinase, bekannt, daß sie den Phosphorylierungsgrad eines Pyruvatkinase-Isoenzym erhöht. Hier ist der Kreis zur Onc-Gen-Forschung geschlossen, der Tumorstoffwechselveränderungen mit Onc-Genaktivitätswechseln in Zusammenhang bringt.

All diese Ergebnisse wurden erzielt, ohne daß von unserer Arbeitsgruppe auch nur ein einziges Tier mit Kanzerogenen behandelt worden ist. Es wurden ausschließlich Spontantumoren und von anderen Arbeitsgruppen für deren eigene Untersuchungen induzierte experimentelle Tumoren verwandt. Schon allein durch diese gemeinsame Verwendung experimentell erzeugter Tumoren läßt sich die Zahl der Tierversuche in der Krebsforschung vermindern.

### **Perspektiven**

Es muß ein möglichst breites Spektrum an Tumoren auf Veränderungen des Pyruvatkinase-Isoenzymgehaltes untersucht werden, um die Sicherheit der Methode zu belegen. Nach den bisherigen Ergebnissen ist zu erwarten, daß durch den Nachweis der Pyruvatkinase-Isoenzyme praktisch alle Tumoren erfaßt werden. Dadurch hat dieser Test gegenüber anderen Tumormarkern wie CEA, TPA usw. den großen Vorteil, daß er nicht nur für einen Tumortyp bzw. ein eingeschränktes Tumorspektrum verwendbar ist. Dieser Vorteil beruht darauf, daß eine Stoffwechselsituation nachgewiesen wird, wie sie in allen Tumoren vorkommt, unabhängig von der Entstehungsart und unabhängig von dem entstandenen Tumortyp.

Durch die Erzeugung weiterer monoklonaler Antikörper gegen den „Tumortyp“

des Pyruvatkinase-Isoenzym  $M_2$  wird es möglich sein, neben dem immunhistologischen Nachweis von Tumoren schon im Frühstadium einen Test zur Erkennung solcher „Tumor-Isoenzyme“ im Blut aufzubauen. Ein entsprechender Test für das L-Isoenzym der Pyruvatkinase konnte bereits entwickelt werden, da hierfür inzwischen genügend verschiedene monoklonale Antikörper isoliert und charakterisiert werden konnten.

Da die weite Verbreitung des beschriebenen Stoffwechselzustandes durch die eigenen vergleichenden Untersuchungen an Huhn und Ratte sowie durch die Befunde anderer Arbeitsgruppen inzwischen belegt ist, werden Untersuchungen am Huhn an Interesse verlieren. Im Vordergrund künftiger Studien werden die Ratte als wichtiges Versuchstier zur Ermittlung kanzerogener Wirkungen und der Mensch als letzten Endes betroffener Patient stehen. Der Nachweis eines entsprechenden „tumorspezifischen“ Isoenzym der Pyruvatkinase Typ  $M_2$  wie bei Huhn und Ratte könnte ebenso wie die Demonstration von Ausfällen der Pyruvatkinase Typ L bei der Lebertumorentstehung im Menschen wesentlich zu einer Frühdiagnostik und zur Therapiekontrolle bei menschlichen Tumorerkrankungen beitragen.

Durch das Ansprechen auf die verschiedensten kanzerogenen Wirkungen ist der Test auch für derzeit noch nicht übliche Untersuchungen gut geeignet. So wird wahrscheinlich die Frage des Zusammenwirkens verschiedener kanzerogener Ursachen in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Unter natürlichen Bedingungen ist ein Organismus einer kombinierten Wirkung unterschiedlichster Krebsursachen ausgesetzt – zu denen auch Viren und Strahlung gehören – und nicht nur einer einzelnen Substanz. Da alle diese Ursachen erfaßt werden, können auch Kombinationswirkungen sicher erkannt werden.

Die Pyruvatkinase-Isoenzyme weisen schon in Tumor-Vorstufen spezifische Veränderungen auf und lassen somit sehr früh und empfindlich kanzerogene Wirkungen vor der eigentlichen Tumorentstehung erkennen. Deshalb ist ihre Bestimmung für Schwellenwertuntersuchungen, wie sie im Rahmen der Ökotoxikologie immer wichtiger werden, eine vielversprechende Methode [10, 21–25].

Diese Untersuchungen werden vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (Prüfung von Chemikalien auf Carcinogenität, Mutagenität und Teratogenität, CMT 32A) (M. R., E. E.), dem Fonds der Chemischen Industrie (E. E.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (M. R.) unterstützt. Die Autoren erhielten dafür 1986 den Forschungspreis des Bundesministers für Jugend, Familie, Frauen und Gesundheit zur Einschränkung und zum Ersatz von Tierversuchen.

#### Literatur

1. Duesberg, P. H. (1985) Activated proto-oncogenes: Sufficient or necessary for cancer? *Science* 228, 669–677.
2. Hunter, T. (1984) Oncogenes and proto-oncogenes: How do they differ? *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 77–786.
3. Yaswen, P., M. Goyette, P. R. Shank, N. Fausto (1985) Expression of c-ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 5, 780–786.
4. Ishikawa, F., F. Takaku, M. Ochiai, K. Hayashi, S. Hirohashi, M. Terada, S. Takayama, M. Nagao, T. Sugimura (1985) Activated c-raf gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 186–192.
5. Corral, M., L. Tichonicky, C. Guguen-Guillouzo, D. Corcos, M. Raymondjean, B. Paris, J. Kruh, N. Defer (1985) Expression of c-fos oncogene during hepatocarcinogenesis, liver regeneration and in synchronized HTC cells. *Exp. Cell Res.* 160, 427–434.
6. Eigenbrodt, E., P. Fister, M. Reinacher (1985) New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells (review). In *Beitner, R.* (ed.): Regulation of carbohydrate metabolism, Vol. II, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p 141–179
7. Eigenbrodt, E., P. Fister, H. Rübsamen, R. R. Friis (1983) Influence of transformation by Rous sarcoma virus on the amount, phosphorylation and enzyme kinetic properties of enolase. *EMBO J.* 2, 1565–1570.
8. Reinacher M., E. Eigenbrodt (1981) Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M<sub>2</sub>-PK) in tumors of chicken and rat. *Virchow Arch. B* 37, 79–88.
9. Eigenbrodt, E., S. Leib, W. Krämer, R. R. Friis, W. Schoner (1983) Structural and kinetic differences between the M<sub>2</sub> type pyruvate kinase from lung and various tumors. *Biomed. Biochim. Acta* 42, 278–282.
10. Eigenbrodt, E., M. Reinacher (1985) Biochemical and immunological characterization of a special subtype of pyruvate kinase type M<sub>2</sub> in tumors. Vortrag auf dem „Symposium Tumormarker, Aktuelle Aspekte und klinische Relevanz“, Münster, Abstract 61.
11. Eigenbrodt, E., M. Reinacher (1986) Carbohydrate metabolism in neoplastic tissues. *Infusionsther. klin. Ernähr.* 13, 85–90.
12. Eigenbrodt, E. (1981) Der Kohlenhydratstoffwechsel als ein Schlüssel zum Krebs. *Umschau in Wissenschaft und Technik* 81, 247–248.
13. Glossmann H., P. Presek, E. Eigenbrodt (1981) Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp 60<sup>src</sup>. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317, 100–102.
14. Eigenbrodt E, H. Glossmann (1980) Glycolysis – one of the keys to cancer? *Trends Pharmacol. Sci.* 1, 240–245.
15. Eigenbrodt E. (1983) Zur Bedeutung der Pyruvatkinase-Isoenzyme für die Steuerung des Kohlenhydrat- und Nucleinsäurestoffwechsels. Habilitationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin und Tierzucht der Justus-Liebig-Universität Gießen.
16. Reinacher M. (1983) Immunhistologischer Nachweis pathologischer Veränderungen des Pyruvatkinase-Isoenzymgehaltes in Organen und Tumoren bei Huhn und Ratte. Habilitationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin und Tierzucht der Justus-Liebig-Universität Gießen.
17. Presek, P., H. Glossmann, E. Eigenbrodt, W. Schoner, H. Rübsamen, R. R. Friis, H. Bauer (1980) Similarities between a phosphoprotein (pp 60<sup>src</sup>)-associated protein kinase of Rous sarcoma virus and a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-independent protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase type M<sub>2</sub>. *Cancer Res.* 40, 1733–1741.

18. *Glossmann, H., P. Presek, E. Eigenbrodt* (1981) Association of the src-gene product of Rous sarcoma virus with a pyruvate kinase inactivating factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 23, 49–63.
19. *Becker, K.J., H. Geyer, E. Eigenbrodt, W. Schoner* (1986) Purification of pyruvate kinase isoenzymes type M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> from dog (*canis familiaris*) and comparison of their properties with those from chicken and rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B, 823–829.
20. *Bahnmann, R.* (1989) Quantitative immunohistologische Untersuchung des Gehaltes an Pyruvatkinase Typ M<sub>2</sub> in Tumoren der Ratte. Diss. vet. med., Gießen.
21. *Reinacher, M., E. Eigenbrodt, U. Gerbracht, G. Zenk, I. Timmermann-Trosiener, P. Bentley, F. Waechter, R. Schulte-Hermann* (1986) Pyruvate kinase isoenzymes in altered foci and carcinoma and rat liver. *Carcinogenesis* 7, 1351–1357.
22. *Gerbracht, U., D. Weiße, B. Schlatter, M. Reinacher, R. Schulte-Hermann, E. Eigenbrodt* (1988) Comparative study on the effect of different treatment schedules on some carbohydrate metabolizing enzyme activities in rats during hepatocarcinogenesis. In: *F. Feo, P. Pani, A. Columbano, R. Garcea* (eds): *Chemical Carcinogenesis: Models and Mechanisms*, Vol. 4, Plenum Press; New York, p 323–335.
23. *Gerbracht, U., E. Roth, K. Becker, M. Reinacher, E. Eigenbrodt* (1988) A study of the activities of carbohydrate-metabolizing enzymes and the levels of carbohydrate metabolites and amino acids in normal liver and in hepatocellular carcinoma. In: *M. Roberfroid, P. Preat* (eds) *Experimental Hepatocarcinogenesis*, Plenum Press, New York, p 163–174.
24. *Yanagi S., M. Sakamoto, Y. Ninomiya, T. Kamiya* (1984) Decrease in L-type pyruvate kinase activity in rat liver by some promoters of hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 887–894.
25. *Yanagi, S., M. Sakamoto, S. Takahashi, A. Hasuike, Y. Konishi, K. Kumazawa, T. Nakano* (1985) Enhancement of hepatocarcinogenesis by sorbitan fatty acid ester, a liver pyruvate kinase activity-reducing substance. *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 381–384.
26. *Fischer, G., S. Holzrichter, M. Reinacher, M. Heinrichs, J. Dembowski, E. Eigenbrodt* (1989) Immunhistochemische Darstellung der L- und M<sub>2</sub>-Pyruvatkinase in primären Nierenzellkarzinomen und deren Metastasen. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 73 (im Druck).
27. *Presek, P., M. Reinacher, E. Eigenbrodt* (1988) Pyruvate kinase type M<sub>2</sub> is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus. *FEBS letters* 242, 194–198.
28. *Fischer G., M. Domingo, D. Lodder, N. Katz, M. Reinacher, E. Eigenbrodt* (1987) Immunohistochemical demonstration of decreased L-pyruvate kinase in enzyme altered rat liver lesions produced by different carcinogens. *Virchows Arch. B* 53, 359–364.