

Aus der Frauenklinik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluierung der Tumor M2-Pyruvatkinase (Tu M2-PK) als
Tumormarker beim Zervixkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Sophia Jeschke

aus Dresden

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
2. Prof. Dr. med. D. Elling
3. Prof. Dr. med. R. Kimmig

Datum der Promotion: 21. November 2008

Meinen Eltern gewidmet

Erst die Möglichkeit, einen Traum zu verwirklichen, macht unser Leben lebenswert.

Paulo Coelho „Der Alchimist“

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Zervixkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese.....	1
1.1.3 Klassifikation	4
1.1.4 Klassische Prognosefaktoren.....	5
1.1.5 Grundlagen der Therapie des Zervixkarzinoms.....	5
1.2 Tumormarker	6
1.2.1 Begriffsbestimmung „Tumormarker“	6
1.2.2 Testmethoden von Tumormarkern.....	6
1.2.3 Evaluierung von Tumormarkern.....	7
1.2.4 Einflussgrößen und Störfaktoren	7
1.2.5 Indikationen zur Bestimmung von Tumormarkern.....	8
1.2.6 Tumormarker beim Zervixkarzinom.....	9
1.3 Tumor M2-Pyruvatkinase	10
1.3.1 Besonderheiten des Stoffwechsels in Tumorzellen.....	10
1.3.2 Die Isoenzyme der Pyruvatkinase.....	10
1.3.3 Die M2-PK im Tumorstoffwechsel	11
1.3.4 Tu M2-PK als neuer Marker bei proliferierenden Erkrankungen	13
1.3.5 Tu M2-PK und das Zervixkarzinom	14
2. PROBLEMSTELLUNG	15
3. PATIENTENKOLLEKTIV	17
3.1 Einschlusskriterien	17
3.1.1 Histologische Aufarbeitung des Gewebes.....	17
3.2 Patientencharakteristika	18
3.2.1 Krankheitsstadien	18
3.2.2 Altersverteilung.....	19
3.2.3 Histologische Befunde.....	19
3.2.4 HPV-Status	21
3.2.5 Menopausenstatus.....	21
3.2.6 Raucheranamnese	22
3.3 Follow-up in der Gruppe „Rezidiv“	22
4. MATERIALGEWINNUNG UND METHODIK	24
4.1 Materialgewinnung	24
4.1.1 Blutentnahmen	24
4.1.2 Probenaufarbeitung und Lagerung.....	24

4.2	Methodik	24
4.2.1	Theoretisches Prinzip des Enzymimmunoassays	24
4.2.2	Theoretisches Prinzip des Sandwich-ELISA zur quantitativen Bestimmung von Tu M2-PK	25
4.3	Testanleitung	28
4.3.1	Vorbereitungen	28
4.3.2	Testdurchführung	30
4.3.3	Quantitative Auswertung	31
4.3.4	Präzision	31
4.3.5	Normwerte	31
4.4	Bestimmung von SCC	32
4.5	Statistik	32
4.5.1	Statistische Auswertung	32
4.5.2	Deskription der Ergebnisse	33
5.	ERGEBNISSE	35
5.1	Korrelationen von Tu M2-PK mit den Krankheitsstadien	35
5.1.1	Korrelationen von Tu M2-PK mit den 3 klinisch-pathologischen Subgruppen CIN, invasives Karzinom und Rezidiv	35
5.1.2	Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Grad der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN I-III)	36
5.1.3	Korrelationen von Tu M2-PK mit den Tumorstadien FIGO I-IV und Rezidiv	37
5.1.4	Diagnostische Sensitivität und Spezifität der Tu M2-PK	39
5.2.	Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Metastasierungsstatus	41
5.2.1	Korrelation von Tu M2-PK mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen	41
5.2.2	Korrelation von Tu M2-PK mit der Fernmetastasierung	42
5.2.3	Korrelation von Tu M2-PK mit N und M	42
5.2.4	Korrelation von Tu M2-PK mit der Lymphgefäßinvasion	43
5.2.5	Korrelation von Tu M2-PK mit der Veneninvasion	43
5.3	Korrelationen von Tu M2-PK mit der Tumorhistologie	44
5.3.1	Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Tumortyp	44
5.3.2	Korrelation von Tu M2-PK mit dem Grad der Tumorzellendifferenzierung	45
5.4	Korrelationen von Tu M2-PK mit dem HPV-Status	46
5.5	Korrelationen von Tu M2-PK mit Alter bei Erstdiagnose und Rauchgewohnheiten	47
5.5.1	Korrelation von Tu M2-PK mit dem Alter bei Erstdiagnose „Karzinom“	47
5.5.2	Korrelation von Tu M2-PK mit den Rauchgewohnheiten	47
5.6	Korrelationen von SCC mit klinischen, pathologischen und histologischen Faktoren	49
5.6.1	Korrelationen von SCC mit den Krankheitsstadien (FIGO I-IV/Rezidiv)	49
5.6.2	Korrelationen von SCC mit dem Metastasierungsstatus (N/M)	50
5.6.3	Korrelationen von SCC mit der Tumorhistologie	52
5.7	Korrelation von Tu M2-PK mit SCC beim Zervixkarzinom	53
5.8	Tu M2-PK als prädiktiver Faktor beim Zervixkarzinom – Der Marker im Therapieverlauf	54
5.9	Tu M2-PK als prognostischer Marker beim Zervixkarzinom – Survivalanalyse der Patientinnen mit Diagnose „Rezidiv“	56
5.9.1	Gesamtüberleben (OS)	56
5.9.2	Time to Progression (TTP)	57
5.9.3	Überlebenszeit mit Diagnose Rezidiv	57

6. DISKUSSION	58
6.1 Das Patientenkollektiv.....	58
6.2 Der Tumormarker	60
6.2.1 Etablierte Tumormarker beim Zervixkarzinom	60
6.2.2 Tu M2-PK als neuer Marker bei proliferierenden Erkrankungen	60
6.3 Evaluation der Tu M2-PK als Tumormarker beim Zervixkarzinom	61
6.3.1 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Krankheitsstadien.....	61
6.3.2 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Tumorstadien	62
6.3.3 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Metastasierungsstatus.....	63
6.3.4 Korrelationen von Tu M2-PK mit der Tumorhistologie	64
6.3.5 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Grad der Präkanzerose und dem HPV-Status	65
6.4 Tu M2-PK und SCC in der Diagnostik des Zervixkarzinoms	66
6.4.1 SCC als etablierter Tumormarker beim Zervixkarzinom	66
6.4.2 Vergleich von Tu M2-PK und SCC in der Diagnostik des Zervixkarzinoms.....	68
6.4.3 Kombination von Tu M2-PK und SCC.....	70
6.5 Tu M2-PK als prädiktiver Faktor beim Zervixkarzinom – Der Marker im Therapieverlauf.....	71
6.6 Tu M2-PK als prognostischer Marker beim Zervixkarzinom	72
6.7 Die Methode	74
7. ZUSAMMENFASSUNG	76
LITERATUR	78
ERKLÄRUNG.....	87
DANKSAGUNG.....	88
LEBENS LAUF.....	90

1. Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das invasive Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) ist weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau. Bis zu einer halben Million Neuerkrankungen werden pro Jahr diagnostiziert, ca. 274.000 Frauen sterben jährlich an dieser Erkrankung.

Bezüglich der Inzidenz und Mortalität bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zwischen höher entwickelten Industriestaaten und niedriger entwickelten Ländern. In Industriestaaten beträgt die Inzidenz des Zervixkarzinoms durchschnittlich 10.3/100.000 bei einer Mortalität von 4.0/100.000. Das Zervixkarzinom nimmt somit die 7. Stelle unter den malignen Erkrankungen der Frau ein. In den niedriger entwickelten Staaten liegt die Inzidenzrate mit 19.1/100.000 dagegen deutlich höher. Ein Tumor der Cervix uteri steht in der Häufigkeit der Krebserkrankungen hier an zweiter, bezüglich der Mortalitätsrate mit 11.2/100.000 sogar an erster Stelle [35].

In Deutschland werden laut „Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister“ und dem Robert Koch-Institut etwa 6.500 neue Fälle von Gebärmutterhalskrebs im Jahr diagnostiziert. Das sind 3.4% aller weiblichen Krebserkrankungen und Platz neun in der Rangfolge der Inzidenzen. Im Jahre 2004 starben in Deutschland laut Statistischem Bundesamt 1.660 Frauen an Gebärmutterhalskrebs. Europaweit weist die Inzidenz des Zervixkarzinoms von Anfang der 70er Jahre bis Mitte der 80er Jahre einen deutlich rückläufigen Trend auf und ist seitdem annähernd konstant [3].

Typischerweise treten invasive Zervixkarzinome bei älteren Frauen auf. Gleichwohl werden derzeit etwa 20-25% der Tumore bei jungen Frauen bis 35 Jahre beobachtet [7]. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 54.1 Jahren. Die Altersverteilung zeigt folglich einen Gipfel um das 35. Lebensjahr, sowie einen zweiten um das 65. Lebensjahr herum [22].

1.1.2 Pathogenese

Das Zervixkarzinom entsteht in den meisten Fällen aus einer nichtinvasiven Vorstufe, der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN). Je nach Schweregrad und Ausbreitung der zellulären Atypien werden 3 Grade der CIN (I-III) unterschieden. CIN I entspricht einer leichten Dysplasie. Die atypischen Zellen bleiben auf die untere Schicht des Epithels beschränkt. CIN II

entspricht einer mittelschweren Dysplasie. Atypische Zellen breiten sich von der Basalzellschicht bis zur Mitte des Epithels aus. Bei CIN III liegt eine schwere Dysplasie vor. Atypische Zellen finden sich hier über die ganze Epitheldicke hinweg mit nur geringer Differenzierung und Ausreifung an der Oberfläche.

Typische Lokalisation dieser Präkanzerose ist die Transformationszone der Zervix, der Bereich in dem das normale Zylinderepithel des distalen Zervikalkanals zu Plattenepithel umgewandelt wird. Das metaplastische Epithel dieser Zone ist während der Geschlechtsreife für Veränderungen anfällig. Zellveränderungen finden sich als Reaktion auf chronische Entzündungen, Reparationsvorgänge am Epithel und im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion. Ein Zeitraum von min. 10 Jahren ist nötig, bis sich aus einer Vorstufe ein invasives Karzinom entwickeln kann.

Die Inzidenz der zervikalen intraepithelialen Neoplasie hat in den letzten 20 Jahren kontinuierlich zugenommen [8]. Für schwergradige Präkanzerosen (CIN II-III) liegt sie derzeit bei ca. 1% und damit im Vergleich zum Zervixkarzinom um das 100fache höher. Frauen vorwiegend um das 35. Lebensjahr herum sind betroffen [29, 81].

Bei der Pathogenese kommt den Humanen Papilloma Viren (HPV) eine entscheidende Bedeutung zu [109]. Weltweit durchgeführte epidemiologische Studien zeigten, dass de facto alle Zervixkarzinome mit bestimmten Typen der HPV, den „High-risk-HPV“, assoziiert sind. Zu den kanzerogenen Humanen Papilloma Viren gehören die Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82. Die „Low-risk-HPV“-Typen 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 und CP6108 sind dagegen für die Entstehung des Zervixkarzinoms nicht von Bedeutung [59].

Experimentelle Arbeiten zeigten, dass zwei bestimmte Gene der High-risk-HP-Viren, die E6 und E7 genannt werden, in Zervixkarzinomzellen exprimiert werden. Diese viralen Onkoproteine können menschliche Keratinozyten transformieren und sind für das neoplastische Wachstum von epithelialen Stammzellen an der Transformationszone der Cervix uteri erforderlich.

Bei Aktivierung dieser Gene in der proliferierenden Basal- und Parabasalzellschicht kommt es durch Beeinträchtigung der Zellzyklusregulation, des mitotischen Spindelapparates und der Zentrosomenfunktionen zu Störungen der Chromosomenstruktur und -verteilung während der Mitose. Das wiederum führt zu chromosomaler Instabilität und möglicher Karzinogenese. Als Folge der zunehmenden chromosomalen Instabilität kommt es bei Reparaturvorgängen auch zur Integration des HPV-Genoms bzw. von Genomfragmenten dieser Genome in chromosomale DNA, welche stets die beiden Gene E6 und E7 aufweisen. Durch die Integration des viralen

Genoms wird das neoplastische Transformationspotenzial weiter verstärkt. 80-100% der invasiven Karzinome beinhalten Anschnitte viraler DNA, während bei CIN III-Läsionen nur in ca. 20% ins zelluläre Genom integrierte Abschnitte nachweisbar sind. Daher ist der Nachweis integrierter HPV-Genome auch als starker Progressionsmarker von präneoplastischen zu neoplastischen Läsionen zu werten (Abb.1) [99]. Des Weiteren binden sowohl E6 als auch E7 an zahlreiche zelluläre Proteine und beeinflussen deren Funktion nachhaltig [58].

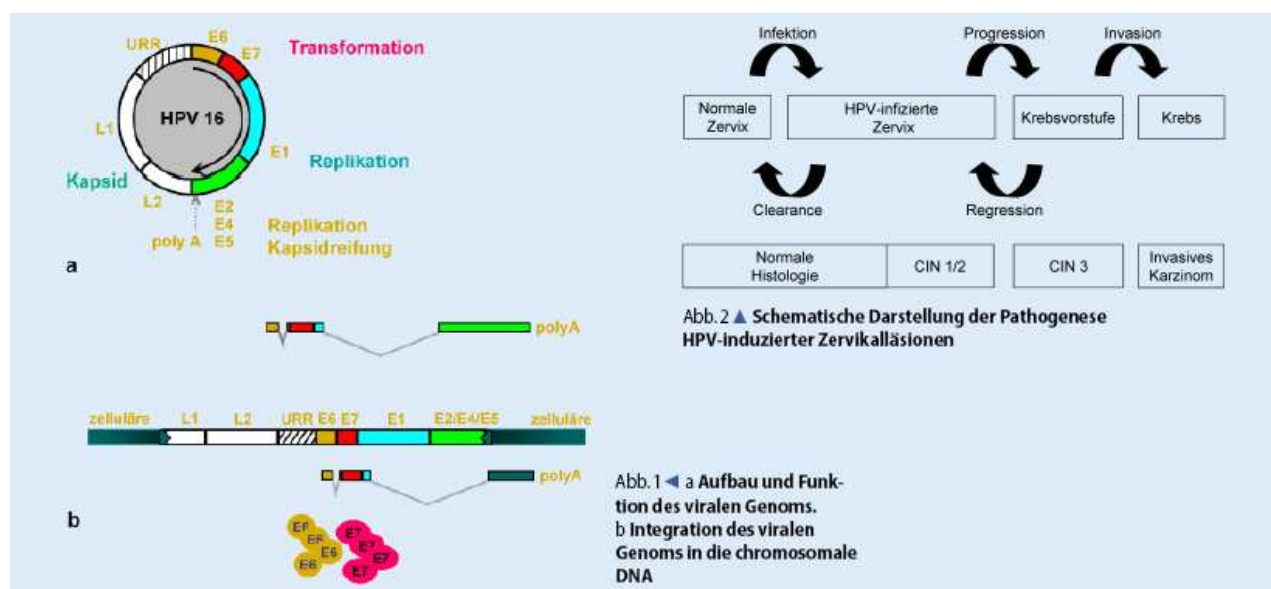


Abb.1: Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen (aus Trunk et al. 2005 [99]).

Die HPV-Infektion wird durch sexuelle Kontakte übertragen und heilt in der Mehrzahl der Fälle innerhalb eines Jahres von selbst aus. Nur ein relativ geringer Teil geht in eine persistierende Infektion über (Abb.1) [30].

Doch auch verschiedene endogene (z.B. HLA-I/II-Status, genetische Polymorphismen, erworbene Immunschwäche) und exogene Kofaktoren (z.B. Langzeiteinnahme oraler Kontrazeptiva, Zahl der Geburten, Chlamydieninfektion, Ernährung) sind an der Entstehung beteiligt. „Rauchen“ beispielsweise erhöht das Risiko für die Entwicklung einer CIN III um den Faktor 3 sowie für die Entstehung eines Zervixkarzinoms um den Faktor 2 [56,92].

1.1.3 Klassifikation

Unter den invasiven Zervixkarzinomen ist das Plattenepithelkarzinom mit 80-85% der häufigste Karzinomtyp. Der Anteil der Adenokarzinome wird mit 15-20% angegeben. Adenosquamöse Karzinome machen etwa 2-3% der Zervixkarzinome aus. Seröse, klarzellige, kleinzellige, muzine und endometroide Zervixkarzinome sind insgesamt sehr seltene histologische Formen [22,92].

Die Stadieneinteilung des invasiven Zervixkarzinoms erfolgt nach den Richtlinien der „Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)“ [68]. Klinisch-diagnostische (körperliche Untersuchung, Spekulumuntersuchung, bimanuelle gynäkologische Untersuchung, bildgebende Diagnostik) und histopathologische Kriterien (TNM-System) werden dabei berücksichtigt (Tab.1) [5].

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Primärtumor
Tis	0	Carcinoma in situ, keine Stromainvasion
T1	I	Begrenzt auf Uterus
T1a	IA	Mikroskopische Diagnose
T1a1	IA1	Tiefe ≤ 3mm, horizontale Ausbreitung ≤ 7mm
T1a2	IA2	Tiefe > 3-5mm, horizontale Ausbreitung ≤ 7mm
T1b	IB	Klinisch sichtbar / oder nur mikroskopisch diagnostiziert und >T1a2
T1b1	IB1	≤ 4cm
T1b2	IB2	> 4cm
T2	II	Ausdehnung jenseits des Uterus, aber nicht zur Beckenwand und nicht zum unteren Vaginaldrittel
T2a	IIA	Parametrien frei
T2b	IIB	Parametrien befallen
T3	III	Ausdehnung zu unterem Vaginaldrittel / Beckenwand / oder Hydronephrose
T3a	IIIA	Unteres Vaginaldrittel
T3b	IIIB	Beckenwand / Hydronephrose
T4	IV	Schleimhautinfiltration von Harnblase oder Rektum und/oder Tumor jenseits des kleinen Beckens
T4	IVA	Angrenzende Organe des kleinen Beckens
T4 (M)	IVB	Fernmetastasen

1.1.4 Klassische Prognosefaktoren

Das FIGO-Stadium (Tumorgröße, Tumordinvasionstiefe, Fernmetastasen (M)) erlaubt zwar eine prognostisch relevante Trennung der Primärtumore, nach wie vor stellt aber der Lymphknotenstatus (N) den wichtigsten prognostischen Parameter dar. Als unabhängiger Prognosefaktor gilt auch der histologische Typ. Patientinnen mit Adenokarzinom haben demnach eine insgesamt schlechtere Gesamtprognose im Vergleich zu Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom. Ein prognostisch relevanter Unterschied in Abhängigkeit vom histologischen Grading (G1-3) zeigte sich nur bei den Adenokarzinomen, so dass insgesamt betrachtet dem Grading beim Zervixkarzinom keine allzu große Bedeutung zukommt [22]. Lymph- und Hämangiosis (L und V) sind weitere prognostische Faktoren, deren Beurteilung in den Interdisziplinären S2-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms gefordert sind.

Die Prognose blieb mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 64% während der letzten Jahrzehnte beinahe unverändert [3].

1.1.5 Grundlagen der Therapie des Zervixkarzinoms

Die Entscheidung über die adäquate Therapiemodalität wird interdisziplinär gefällt. Stadium der Erkrankung und Risikofaktoren sind dabei wegweisend. Ebenso werden Allgemeinzustand und Lebenssituation der Patientin mit berücksichtigt.

Die operative Entfernung des Zervixkarzinoms ist in frühen Stadien und insbesondere bei prämenopausalen Patientinnen die Therapie der Wahl. Patientinnen mit zusätzlichen Risikofaktoren im Stadium IB2-IIA (positive pelvine Lymphknoten, R1-Resektion, mikroskopischer Parametrienbefall) profitieren nach radikaler Operation eher von einer adjuvanten Radiochemotherapie als von einer Radiotherapie allein [69].

Die Indikation zur primären simultanen Radiochemotherapie wird im Stadium III gestellt. Im Stadium IV der Erkrankung wird das weitere Vorgehen durch die Tumorausdehnung im kleinen Becken bestimmt. Mittels Radiotherapie sind oft noch gute palliative, seltener kurative Erfolge möglich. Auch die primäre Exenteration wird in Einzelfällen in Erwägung gezogen [5].

1.2 Tumormarker

1.2.1 Begriffsbestimmung „Tumormarker“

Den Tumormarkern (TM) werden heute alle nachweisbaren bzw. messbaren Substanzen zugeordnet, die auf einen Tumor hinweisen oder aber einen wichtigen Beitrag zur Tumor-Charakterisierung, Messung seiner Ausbreitung und Kontrolle seines Therapie-Ansprechens leisten können. Zu ihnen zählen neben den zirkulierenden Tumormarkern die immunhistologischen Marker gering differenzierter Tumore (Keimzelltumore, Sarkome, etc.), die Oberflächenmarker hämatologischer Malignome und biologische Marker genetischer Anomalien (Onkogene, Tumorsuppressorgene, etc.).

Die zirkulierenden humoralen Tumormarker besitzen Protein-, Lipid-, Glykolipid- oder Kohlenhydrat-Charakter. Sie werden in oder auf Tumorzellen bzw. in ihrer Umgebung gebildet und gelangen als zirkulierende Antigene in Körperflüssigkeiten wie Serum, Pleuraexsudat oder Aszites. Da ihre Konzentration in hohem Maße mit der Entstehung, dem Wachstum und der Therapie-bedingten Verkleinerung eines Tumors korreliert, haben sie Bedeutung als Tumormarker erlangt. Nach Lamerz *und* Stieber können diese Tumor-assoziierten Antigene in Vorstufen physiologischer Antigene (CA 19-9), in ektopisch gebildete physiologische Antigene (z.B. Hormone: Calcitonin), in Enzyme (PSA), in ontogenetisch alte reaktivierte Antigene (CEA, AFP), in hybridom-definierte Muzin-Substanzen (CA 125), in Zytokeratine (CYFRA 21-1) u.a. (SCC) eingeteilt werden [42].

1.2.2 Testmethoden von Tumormarkern

Die Bestimmung der Tumormarker ist heute durch hochempfindliche, kommerziell verfügbare, gut standardisierte und reproduzierbare Testverfahren (Radioimmunoassay, immunoradiometrisches Assay, Enzymimmunoassay, Fluoreszenz- und Lumineszenzimmunoassay) unter Verwendung poly- wie monoklonaler Antikörper gewährleistet.

Da aufgrund von Standardisierungsproblemen TM-Tests von verschiedenen Herstellern unterschiedliche Ergebnisse liefern können, sind die Angabe von Test und Hersteller und die Verwendung eines einheitlichen Testverfahrens (gleiches Testsystem, gleicher Hersteller, gleiches Labor) bei Verlaufsbestimmungen unbedingt erforderlich [42].

1.2.3 Evaluierung von Tumormarkern

Zur richtigen Befundinterpretation sind Kenntnisse über Referenzbereich des Tumormarkers, seine Kinetik sowie über seine biologischen und statistischen Kriterien unerlässlich.

Der Referenzbereich ist der Wertebereich, in dem Testergebnisse eines gesunden Probandenkollektivs bestehend aus beiderlei Geschlecht und verschiedener Altersgruppen auftreten können. Dabei ist die obere Referenzgrenze, die der 95. Perzentile entspricht, die wichtigste Grenze und wird als Schwellenwert bzw. cut-off bezeichnet. Der cut-off Wert ist somit der Wert, der eine Unterscheidung zwischen TM-Konzentrationen von gesunden Probanden und Probanden mit einer malignen Erkrankung möglich macht.

Die Unterscheidung zwischen „gesund“ und „maligne“ wird durch die Kenngrößen Sensitivität (Rate richtig-positiver Testbefunde bei den Tumorpatienten), Spezifität (Rate der richtig-negativen Testbefunde bei den Gesunden/Nicht-Tumorkranken), sowie positiver und negativer prädiktiver Wert (Rate Test-positiver Tumorpatienten bei allen Test-positiven bzw. Rate Test-negativer Gesunder/Nicht-Tumorkranker bei allen Testnegativen) ausgedrückt [42].

Sollen TM-Verläufe beurteilt werden, sind den TM-Leitlinien zufolge, auch Eliminationshalbwertszeit, analytische und biologische Varianz zu berücksichtigen [107]. Die Gesamtvarianz (z.B. 30-50%) des TM-Wertes eines Patienten setzt sich aus der individuellen biologischen Varianz (ca.15-20%) und der analytischen Varianz (Intra-/Inter-Assay-Präzision) des Testverfahrens (ca. 10%) zusammen. Ein signifikanter Anstieg des Tumormarkers im Vergleich zum Vorwert kann somit erst bei Überschreiten dieser Gesamtvarianz angenommen werden [42]. Abweichungen vom Vorwert um $< 30\%$ gelten als Graubereich und eine zusätzliche Verlaufskontrolle bei entsprechender Klinik wird empfohlen [107].

1.2.4 Einflussgrößen und Störfaktoren

Die gemessene TM-Konzentration ergibt sich aus der Summe von Expression, Synthese und Freisetzung aus dem Tumor, dem im Organismus ablaufenden TM-Katabolismus sowie der Exkretion. Sie spiegelt die Masse und Ausbreitung des Tumors wieder und ist vor allem von der Tumor-Blutversorgung abhängig.

Änderungen der TM-Konzentration ohne Korrelation zur Tumormasse können sich daher durch Störung des Katabolismus (Leberinsuffizienz) bzw. der Exkretion (Niereninsuffizienz) ergeben. Des Weiteren können Tumormarker unmittelbar nach Tumoresektion, Chemo- oder Radiotherapie aufgrund Freisetzung aus zerfallenem Tumorgewebe akut ansteigen. Dagegen verursachen intraoperative Blutverluste sowie Bluttransfusionen einen Abfall des TM-Wertes.

Zu den verfahrensspezifischen Störfaktoren zählen neben Hämolyse (NSE) und Verunreinigungen mit Speichel oder Schweiß (SCC), auch Beeinflussungen der Konzentration durch Antikörperinterferenzen (heterophile Antikörper (HAMA) nach Trockenzellextrakt-Therapie; Applikation monoklonaler Antikörper im Rahmen einer Radioimmunszintigraphie), Nikotinabusus (CEA) u.a. [42].

1.2.5 Indikationen zur Bestimmung von Tumormarkern

Zu den potenziellen Indikationen eines Tumormarkers gehören Screening, Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle des Tumorgeschehens.

Aufgrund zu geringer Sensitivität und Spezifität sowie zu geringer Prävalenz in der Gesamtbevölkerung eignet sich mit Ausnahme des PSA (Prostata-spezifisches Antigen) beim Prostatakarzinom bislang fast kein Tumormarker zur Früherkennung (Screening) eines Tumors. Da die meisten Tumormarker mangelnde Organspezifität aufweisen, ist der Einsatz zur Tumorlokalisierung und Diagnosestellung ebenfalls begrenzt.

Zur Einschätzung des erkrankungsfreien Intervalls nach erfolgter Primärtherapie (Prognose) erlangt der Tumormarker indessen zunehmend an Bedeutung. Für einige Tumormarker konnte ein Zusammenhang zwischen prätherapeutischem Ausgangswert und dem Rezidivrisiko nachgewiesen werden (z.B. CA 15-3 und CEA beim Mammakarzinom [18]).

Haupteinsatzgebiet ist jedoch nach wie vor die Therapie- und Verlaufskontrolle nach Operation, Strahlen-, Chemo- oder Hormontherapie. Ein um mehr als 50% fallender TM-Spiegel kann als Ansprechen auf die Behandlung gewertet werden. Ein TM-Anstieg um mehr als 25% kann auf eine Progression oder Metastasierung hinweisend sein. Persistierende bzw. sich nur leicht verändernde Werte (<25%) im pathologischen Bereich stehen für eine durch Residualtumor oder Therapieresistenz verursachte „stabile“ Erkrankung. Steigen die TM-Spiegel nach erfolgreicher kurativer Therapie erneut an, sollte unbedingt an ein Rezidiv gedacht werden. In bis zu 50% der Fälle zeigt der Tumormarker eine Änderung des Tumorverhaltens 1-6 Monate (Lead-Time) früher an als andere diagnostische Verfahren. Da die Wahrscheinlichkeit auf eine noch kurative Resektion jedoch mit zunehmender Latenzzeit zwischen erstem TM-Anstieg und Diagnosesicherung (Computertomographie, Röntgen) sinkt, sollte rechtzeitig eine, wenn vorhanden, effektive Behandlung induziert werden [42].

Eine Bestimmung des Tumormarkers ist daher nur dann sinnvoll, wenn sich aus dem Ergebnis auch Konsequenzen für eine weitere Therapie und das Überleben des Patienten ergeben.

1.2.6 Tumormarker beim Zervixkarzinom

Beim Zervixkarzinom hat sich bislang vorwiegend das SCC-Antigen (squamous cell carcinoma antigen) etabliert [24]. SCC ist ein Plattenepithelkarzinom-Antigen und eine Subfraktion des Tumorentigens TA-4, welches erstmals 1977 von Kato *und* Torigoe beim Zervixkarzinom isoliert wurde [37].

Rückblickend konnten erhöhte TM-Spiegel bei 27-87.7% der Patientinnen mit Karzinom der Zervix uteri gefunden werden (Cut-off-Werte zwischen 1.9 und 2.8 µg/l) [24]. Konzentrationen dieses Markers korrelieren mit Tumorstadium [15,16], Nodalstatus [10,17,97], Histologie [57], Differenzierung [15] und Überleben [94]. Mehrere Studien haben gezeigt, welchen potentiellen Wert dieser Marker bezüglich Monitoring des Therapieansprechens und Detektion eines Tumorrezidivs besitzt [13].

Da sich SCC in frühen Krankheitsstadien durch eine eher geringe Sensitivität auszeichnet, erlangte es keine Bedeutung als Früherkennungs- und Screening-Marker [16]. Des Weiteren fand man Spiegel erhöhungen auch bei benignen Erkrankungen und Gesunden. Erhöhungen um 6-10% wurden bei Leberzirrhose, Pankreatitis sowie benignen Hals-Nasen-Ohren-, Lungen- und gynäkologischen Erkrankungen beobachtet. Um bis zu 60% sind ein Anstieg des Spiegels aufgrund von Nieren- (Niereninsuffizienz, Nierenversagen) und Haut-Erkrankungen (Psoriasis, Ekzem, Pemphigus) möglich [43].

Als Tumormarker des Plattenepithelkarzinoms ist auch CYFRA 21-1, Serumfragment des Cytokeratin 19, ins Blickfeld gerückt. CYFRA 21-1 korreliert mit der Tumorlast des Zervixkarzinoms, zeigt aber eine im Vergleich mit SCC geringere Sensitivität und prognostische Relevanz [72].

CA 125, CA 19.9 und CEA sind weitere Tumor-assoziierte Antigene, die sowohl zur Beurteilung des Therapieverlaufs als auch zur Ermittlung einer Progression oder Metastasierung herangezogen werden können. Alle drei Marker haben gezeigt, dass sie ganz besonders beim Adenokarzinom der Cervix uteri von Nutzen sind [11,24,95].

Aufgrund mangelnder Organspezifität und unzureichender Sensitivität hat sich keiner der o.g. Marker in der Primärdiagnostik (Screening) des Zervixkarzinoms bewährt. Da auch die Bestimmung der Tumormarker SCC und CYFRA 21-1 beim Plattenepithelkarzinom sowie CA-125, CA 19.9 und CEA beim Adenokarzinom der Cervix uteri bislang keinen therapieentscheidenden Stellenwert hat, wird sie daher nicht als Routinemaßnahme empfohlen [24,74].

1.3 Tumor M2-Pyruvatkinase

1.3.1 Besonderheiten des Stoffwechsels in Tumorzellen

Im Vergleich zu normal proliferierenden Zellen müssen Tumorzellen in einer Umwelt überleben, in der das Angebot an Sauerstoff und Nahrung, je nach Entfernung zu den Blutgefäßen, stark variieren kann. Somit werden besondere Anforderungen an den Tumorstoffwechsel gestellt.

Eine der ersten Beobachtungen war, dass Tumorzellen vermehrt Laktat bilden, obwohl Sauerstoff vorhanden ist [103]. In Gegenwart von Sauerstoff wird in gesunden Geweben dagegen die Glukose nicht zu Laktat, sondern zu Pyruvat umgesetzt und anschließend in der mitochondrialen Atmung zu CO_2 , H_2O und Energie umgewandelt. Durch die mitochondriale Atmung können 38 Mol ATP pro Mol Glukose gewonnen werden.

Die in Tumorgewebe stattfindende Umwandlung von Glukose zu Laktat trotz Vorhandensein von Sauerstoff wird als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet. Dabei werden pro Mol Glukose 2 Mol Laktat gebildet und in der Endbilanz 2 Mol ATP gewonnen. Normale Zellen verwenden diesen uneffizienten Weg der Energiegewinnung nur unter Sauerstoffmangelbedingungen (anaerobe Glykolyse) [41].

Weitere Untersuchungen ergaben, dass das in Tumorzellen produzierte Laktat nicht allein von dem enzymatischen Abbau der Glukose stammt. Die Umsetzung der Aminosäure Glutamin zu Laktat (Glutaminolyse) ist ein weiterer Weg der Energiegewinnung in Tumorzellen. Die „Glutaminolyse“ ist im Gegensatz zur Glykolyse sauerstoffabhängig [34]. Unter Sauerstoffmangelbedingungen kommt es daher zu einer Umstellung im Energiestoffwechsel der Tumorzelle. Die Glutaminolyse wird abgeschaltet und der gesamte Energiebedarf wird über die Glykolyse gedeckt. Dies ermöglicht das Überleben des Tumors unabhängig von der Sauerstoffversorgung [20].

Als Ursache der erhöhten „aeroben Glykolyse“ in Tumorzellen wird eine Veränderung des Isoenzymmusters von Glykolyse-Enzymen sowie eine Zunahme deren Aktivität angenommen [4,21].

1.3.2 Die Isoenzyme der Pyruvatkinase

Ein Schlüsselenzym der Glykolyse, welches steten Veränderungen während der Tumorentstehung unterliegt, ist die Pyruvatkinase. Sie ist verantwortlich für die Sauerstoff-unabhängige Bildung von ATP durch Katalyse von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat.

Ausdifferenzierte normale Gewebe enthalten entsprechend ihren metabolischen Anforderungen unterschiedliche Formen der Pyruvatkinase. Die Pyruvatkinase vom Typ L ist das charakteristische Isoenzym von Geweben mit Glukoneogenese, wie Leber und Niere. Erythrozyten exprimieren das Isoenzym Typ R. Das Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M1 ist typischerweise in Geweben vorhanden, in denen große Mengen Energie schnell zur Verfügung stehen müssen (Muskulatur, Gehirn). Und schließlich die Pyruvatkinase vom Typ M2 (M2-PK), die sowohl in der Lunge als auch in Zellen mit ausgeprägter Nukleinsäuresynthese wie embryonale Zellen, adulten Stammzellen und Tumorzellen vorkommt [20,75].

Die Pyruvatkinase vom Typ L und R werden von demselben Gen kodiert und entstehen durch unterschiedliches Splicing der mRNA. Gleiches gilt für die Pyruvatkinase Typ M1 und M2, welche sich nur in 23 von 532 Aminosäuren voneinander unterscheiden [60].

1.3.3 Die M2-PK im Tumorstoffwechsel

Während der Tumorentstehung kommt es zu einer Veränderung des Isoenzymmusters der Pyruvatkinase. Gewebe-spezifische Isoenzyme wie L-PK in der Leber und M1-PK im Gehirn gehen verloren und werden durch die M2-PK ersetzt [20,50,101].

Auch wenn genetisch kein Unterschied zwischen der Pyruvatkinase Typ M2 aus Lunge und Tumorzelle gefunden werden konnte, ergaben sich in immunhistochemischen Untersuchungen Abweichungen bezüglich des strukturellen Aufbaus des Enzyms [21,84]. Die M2-PK in differenzierten Zellen ist von tetramerer Struktur (4 Untereinheiten), wohingegen die M2-PK aus Tumorzellen hauptsächlich von dimerer Struktur (2 Untereinheiten) ist. Die *dimere* Form der M2-Pyruvatkinase wird daher *Tumor* M2-Pyruvatkinase (Tu M2-PK) genannt (Abb.2).

Durch die Anzahl der Untereinheiten wird die Aktivität des Enzyms festgelegt. Die tetramere Form zeichnet sich durch eine hohe Enzymaktivität und Affinität zum Substrat Phosphoenolpyruvat aus und ist Bestandteil des glykolytischen Enzymkomplexes, welcher an der Energiegewinnung durch Umsatz von Pyruvat zu Laktat beteiligt ist.

Geringe Aktivität und Affinität zeigt indessen die dimere Form der Pyruvatkinase. Es scheint paradox, dass Tumorzellen mit einer hohen Umsatzrate von Pyruvat zu Laktat eine Pyruvatkinase besitzen, die beinahe inaktiv ist. Der Vorteil darin besteht in einer möglichen Akkumulation von vorangehenden Phosphometaboliten (z.B.: Fruktose 1,6-diphosphat, Glycerat 3-phosphat, Phosphoenolpyruvat), welche dann Stoffwechselprozessen wie Nukleinsäure-, Aminosäure- und Phospholipidsynthese zur Verfügung stehen (Abb.2) [50]. Entsprechende Stoffwechselprodukte bilden die Grundbausteine einer Zelle und sind somit notwendige

Vorraussetzung für Zellproliferation und Tumorwachstum. Das könnte die Erklärung dafür sein, dass gerade in metastasierenden Geweben eine besonders hohe Konzentration an Tu M2-PK gemessen worden ist [9]. Energie für die Tumorzelle wird unter diesen Gegebenheiten dann aus der Aminosäure Glutamin geliefert („Glutaminolyse“) (Abb. 2).

In Tumorzellen findet man etwa einhundertmal mehr Phosphometabolite als in normalen Zellen. Zu erwähnen ist, dass sich dies bereits in der Diagnostik von soliden Tumoren zu nutze gemacht wird. Anreicherungen mit Phosphometaboliten können mit der ^{31}P NMR-Spektroskopie sichtbar gemacht werden.

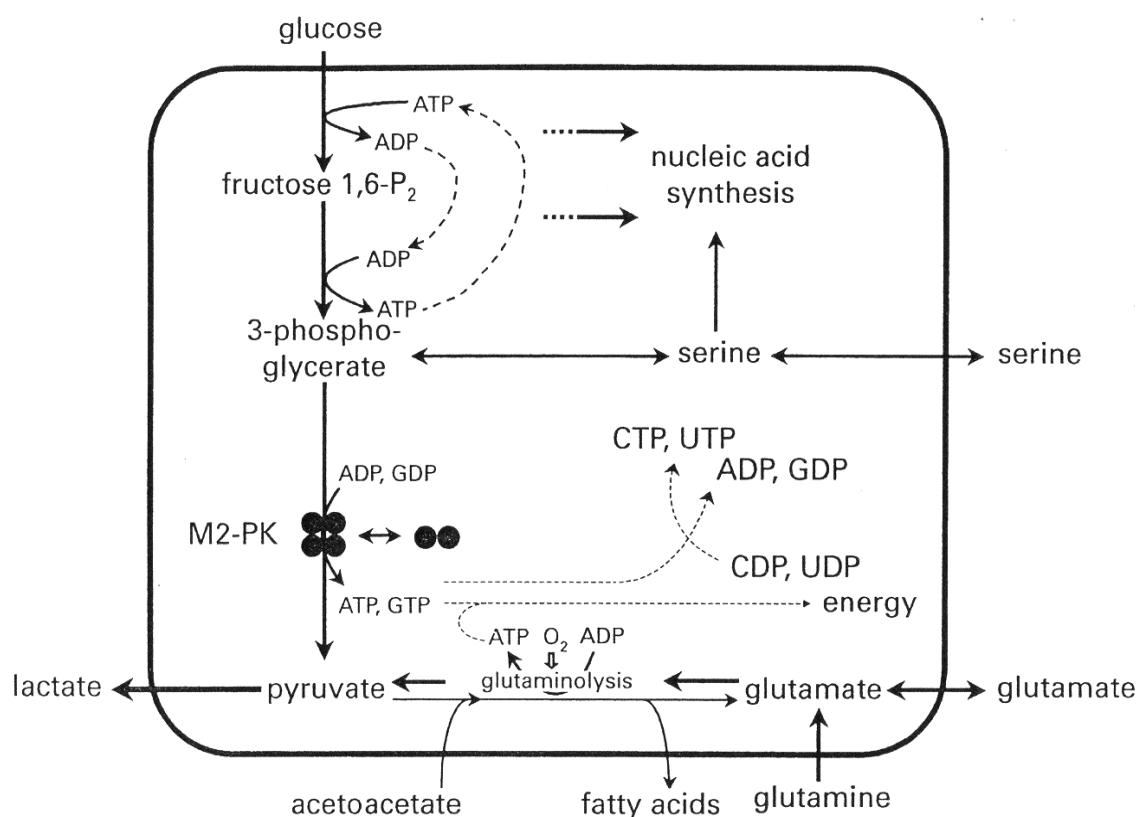


Abb.2: Regulatorische Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase (●●) im Stoffwechsel der Tumorzelle: Metabolisches Schema des Zusammenspiels von Glykolyse, Glutaminolyse, Phospholipid- und Nucleinsäurestoffwechsel (aus Mazurek 2002 [51]).*

*Ergänzung: Metabolische Schritte des Abbaus von 3-Phospho-Glycerat zu Pyruvat im Einzelnen:

3-phospho-glycerate → 2-phospho-glycerate → phosphoenolpyruvate → pyruvate.

Die inaktive dimere Form der Pyruvatkinase kann in kürzester Zeit in die aktive tetramere Form überführt werden und umgekehrt. Die Oszillation zwischen den beiden Zustandsformen wird durch den Zwischenmetabolit der Glykolyse, Fruktose 1,6-diphosphat, reguliert [52].

Bei inaktiver Pyruvatkinase kommt es zu einer Akkumulation von Fruktose 1,6-diphosphat in der Tumorzelle. Bei Erreichen eines gewissen Signalwertes wird die dimere Form in ihre aktive tetramere Form überführt. Die Glukose kann nun wieder energieliefernd zu Laktat umgesetzt werden. Als Folge wird das angestaute Fruktose 1,6-diphosphat abgebaut. Sinkt der Fruktose 1,6-diphosphat-Spiegel wieder ab, wird die Pyruvatkinase in ihren inaktiven Zustand zurückversetzt und der Kreislauf beginnt von neuem [50].

Des Weiteren haben Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien gezeigt, dass auch verschiedene Onkoproteine an der Dissoziation der tetrameren in die dimere Form der M2-PK beteiligt sind.

Die pp60^{v-src} Kinase ist verantwortlich für die onkogenen Eigenschaften des Rous Sarcoma Virus (RSV). In Experimenten an RSV-transformierten Hühner-Embryonalzellen konnte man nachweisen, dass diese Tyrosinkinase die M2-PK phosphoryliert, was zu einer Dimerisierung des Enzyms führt [73].

Das E7-Onkoprotein des Humanen Papilloma Virus (HPV) Typ 16 bindet dagegen direkt an die M2-PK und führt so zu einer Umwandlung der tetrameren in die dimere Form, was an *ras*-exprimierenden NRK (normal rat kidney) Zellen gesehen werden konnte. HPV Typ 16 gehört zu den High-risk-Typen des Humanen Papilloma Virus und ist wesentlich an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt. Nach E7-Bindung sind deutlich höhere Fruktose 1,6-diphosphat-Spiegel notwendig um eine Rückführung in die tetramere Form der M2-PK zu induzieren. Die Tu M2-PK wird somit stabilisiert, größere Mengen an Phosphometaboliten können akkumulieren, die dann als Grundbausteine biosynthetischen Prozessen im Rahmen einer gesteigerten Tumorgenese zur Verfügung stehen [53,54,110].

1.3.4 Tu M2-PK als neuer Marker bei proliferierenden Erkrankungen

Es konnten monoklonale Antikörper isoliert werden, welche nicht auf die tetramere Form der M2-PK ansprechen, sondern selektiv die dimere Form erkennen.

Verschiedene primäre Tumorentitäten zeigten in immunhistologischen Untersuchungen unterschiedliche Expressionsmuster. Ihre dazugehörigen Metastasen wiesen indes eine homogene Verteilung der Tu M2-PK auf [50].

Weitere Arbeiten an menschlichen Tumoren ergaben, dass Tumorzellen die dimere Form der Pyruvatkinase nicht nur überexprimieren, sondern auch ins Blut abgeben. Des Weiteren stellte man fest, dass gastrointestinale Tumore dieses Enzym zusätzlich in den Stuhl freisetzen [23,25,27]. Ein sensitives Immunoassay zur quantitativen Determinierung der Tu M2-PK wurde entwickelt.

In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Resultaten ergab sich ein Konzentrationsanstieg der Tu M2-PK im Blut bei Patienten mit einem Magen- oder kolorektalen Karzinom [19,26,39,49,82,88,90,108], einem Pankreaskarzinom [14,61,102], einem Nierenzell- [28,66,67,76-78,104-106] oder Lungenkarzinom [79,83,84,89], einem malignen Melanom [100], sowie aus dem gynäkologischen Formenkreis bei Patientinnen mit einem Ovarial- [1], Mamma- [31,47,48,91,98] oder Zervixkarzinom [38]. Bei Korrelationen der Pyruvatkinase mit Tumorgroße und Tumorstadium folgten weitere Untersuchungen zum Nutzen als Verlaufsparemeter während der Tumorthapie bzw. zu Korrelationen mit etablierten Tumormarkern [1,31,49,84-87,89,98,100].

Beim Schilddrüsenkarzinom [6], den neuroendokrinen Tumoren [70] und hämatologischen Tumorerkrankungen [64,93], dem Hodenkarzinom [71], sowie dem Blasen- und Prostatakarzinom [28,78] stellte sich die Tu M2-PK dagegen nur von geringer Wertigkeit dar.

1.3.5 Tu M2-PK und das Zervixkarzinom

Bislang liegen nur sehr limitierte Daten zur Bedeutung der Tu M2-PK beim Zervixkarzinom vor. Um den Stellenwert des Enzyms näher zu untersuchen, bestimmte bislang als einzige die indische Arbeitsgruppe um Kaura mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (Firma ScheBo®•Biotech AG, Germany) bei 50 Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Zervixkarzinom, bei 10 Patientinnen mit chronischer Zervizitis sowie bei 10 gesunden Frauen die Konzentration der Tu M2-PK im EDTA-Blut [38].

41 von den 50 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom zeigten über den cut-off von 17 U/ml erhöhte Werte. Bei Frauen mit chronischer Zervizitis zeigte die Hälfte einen Konzentrationsanstieg, bei den gesunden Frauen waren es 3 von 10. Das ergab eine Sensitivität der Tu M2-PK von 82% für das Zervixkarzinom, bei einer Spezifität von 60%. Der Unterschied zwischen den 3 Gruppen wird als statistisch signifikant ($p=0.002$) angegeben. Subgruppenanalysen wurden aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht durchgeführt.

2. Problemstellung

Tu M2-PK ist ein organ-unspezifischer Marker, der die metabolische Aktivität eines Tumors widerspiegelt. Das Enzym wird von Tumorzellen in das Blut abgegeben. Bei Patienten mit malignen Tumoren lassen sich erhöhte Konzentrationen nachweisen, die mit Tumorgröße und Tumorstadium korrelieren. Des Weiteren zeigte sich auch in Follow-up Studien die Einsatzfähigkeit als Marker, der Erfolg oder Misserfolg einer Therapie anzuzeigen vermag.

Die guten Ergebnisse bei einigen Tumoren sowie das Fehlen eines optimalen Tumormarkers beim Zervixkarzinom haben uns veranlasst, die Tu M2-PK bei nichtmalignen und malignen Läsionen der Cervix uteri zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit soll weiterhin ein Vergleich der Tu M2-PK mit dem derzeit am häufigsten in der Anwendung befindlichen Tumormarkers bei Zervixkarzinom, dem SCC-Antigen (squamous cell carcinoma antigen), erfolgen. Auch eine erste Evaluierung bezüglich der prädiktiven und prognostischen Wertigkeit des Markers beim Zervixkarzinom ist geplant.

Folgende Fragen sollen im Rahmen der vorliegenden Studie zur Evaluierung der Tu M2-PK als möglicher Tumormarker beim Zervixkarzinom beantwortet werden:

- Spielt Tu M2-PK im Metabolismus der zervikalen Tumorzelle eine Rolle? Ist anhand des Markers eine Unterscheidung zwischen prämaligen und malignen Erkrankungen der Zervix uteri möglich?
- Zeigt der Marker eine Korrelation mit der Tumorlast und folglich auch mit den Tumorstadien?
- Nimmt die Konzentration der Tu M2-PK mit zunehmender Tumorausbreitung und Metastasierung zu?
- Haben Histologie und Grad der Differenzierung einen Einfluss auf Tu M2-PK?
- Korreliert die Konzentration der Tu M2-PK mit dem Grad der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN I-III)?

- Sind bei Patienten mit einer Präkanzerose höhere Markerspiegel bei HPV high-risk positiven Befund zu verzeichnen als bei Patienten ohne nachweisbare HPV-Infektion?
- Wie fällt der Vergleich mit dem etablierten Tumormarker SCC hinsichtlich Tumorlast, Tumorausbreitung und Morphologie aus? Zeigt Tu M2-PK eine Korrelation mit SCC?
- Kann die diagnostische Effizienz durch Kombination von Tu M2-PK und SCC erhöht werden?
- Ist Tu M2-PK als Marker einsetzbar, um den Erfolg oder Misserfolg einer Tumorthherapie zu überwachen?
- Können anhand der Markerkonzentration Aussagen über das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben getroffen werden?

3. Patientenkollektiv

3.1 Einschlusskriterien

Insgesamt nahmen 125 Frauen, die zwischen September 2002 und Juni 2005 in der Frauenklinik der Charité Berlin, Campus Mitte, behandelt wurden, an den Untersuchungen teil. Die Aufnahme in die Studie erfolgte nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung durch die Patienten.

Wichtiges Einschlusskriterium war, dass sich die Patientinnen zu diesem Zeitpunkt noch keiner ihrer jeweiligen Diagnose entsprechenden Therapie unterzogen hatten.

3.1.1 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Die histologischen Untersuchungen der in der Frauenklinik der Charité entnommenen Biopsien und OP-Präparate erfolgten durch das Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel).

Bei Diagnose einer Dysplasie war dem histologischen Befund der Grad der zellulären Atypie des Plattenepithels zu entnehmen: CIN Grad I, II oder III. In der überwiegenden Anzahl der Fälle lagen auch Angaben zum HPV-Status vor. Dem Pathologen zur Verfügung stehende Präparate waren Probeentnahmen/Biopsien (CIN I/II) und Konisate (CIN II/III).

Bei Manifestation eines invasiven Zervixkarzinoms gab der Befundbericht nur dann vollständig Auskunft, wenn der Pathologie ein Präparat nach radikaler Hysterektomie mit pelvinen bzw. paraaortalen Lymphknoten vorlag. Neben Tumorgröße und Staging (basierend auf der pTNM- und FIGO-Klassifikation), sowie histologischen Typ und Grading (G - nach WHO-Klassifikation zur Tumortypisierung), ist auch zu der Lymphgefäß (L)- bzw. Blutgefäßinvasion (V) Stellung bezogen worden (FIGO-Stadium I/II).

Patientinnen im FIGO-Stadium III/IV wurden „state-of-the-art“ vorwiegend mit einer primären Radiochemotherapie behandelt. In diesen Fällen erfolgte eine patho-morphologische Begutachtung des Tumors anhand einer Biopsie und beinhaltete in der Regel Angaben zur Histologie und Differenzierung des Tumors.

Patienten mit einem erneuten Auftreten ihres Tumorleidens (Rezidiv) wurden in der Regel nicht neu einem kompletten Tumorstaging zugeführt. Bei lokalem Rezidiv sicherte eine Biopsie die Diagnose.

3.2 Patientencharakteristika

3.2.1 Krankheitsstadien

Von den 125 in die Studie aufgenommenen Frauen waren 50 (40%) an einer Präkanzerose (CIN) erkrankt. Darunter waren 7 Patientinnen mit einer leichten Dysplasie (CIN I), 8 mit einer mäßigen Dysplasie (CIN II) und 35 mit einer schweren Dysplasie (CIN III) des zervikalen Epithels.

Bei insgesamt 51 Frauen (40,8%) wurde erstmalig ein invasives Zervixkarzinom diagnostiziert. Von diesen waren 22 an einem Tumor des FIGO-Stadium I erkrankt. FIGO-Stadium II und III zeigte sich bei je 13 Patientinnen. Ein Tumor im Stadium IV wurde bei 3 Frauen festgestellt. 24 Frauen (19,2%) wurden mit einem Rezidiv eines invasiven Zervixkarzinoms vorstellig. Bei 4 Frauen handelte es sich bereits um das 2. Rezidiv (Tab.2).

Tabelle 2: Patientenverteilung in den klinisch-pathologischen Subgruppen.

Subgruppen	Anzahl der Patienten (n)	Prozentuale Verteilung innerhalb der gesamten Patientenpopulation (%)	Prozentuale Verteilung innerhalb der Subgruppen (%)
Alle Patienten	125	100	
CIN	50	40,0	
CIN I	7	5,6	14,0
CIN II	8	6,4	16,0
CIN III	35	28,0	70,0
Invasives Karzinom	51	40,8	
FIGO I	22	17,6	43,1
FIGO II	13	10,4	25,5
FIGO III	13	10,4	25,5
FIGO IV	3	2,4	5,9
Rezidiv	24	19,2	

3.2.2 Altersverteilung

Das mittlere Alter im Patientenkollektiv betrug 43 Jahre. Die jüngste Patientin war 19 Jahre, die Älteste 92 Jahre alt.

Unter den Frauen mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) konnte der Altersmittelwert mit 36 (Bereich: 20-75) Jahren angegeben werden. Über 10 Jahre älter waren die Patientinnen, die an einem invasiven Zervixkarzinom erkrankt waren. In dieser Subgruppe lag das mittlere Erkrankungsalter bei 47 (Bereich: 19-92) Jahren. Zwischen der Gruppe „Erstdiagnose eines Zervixkarzinoms“ und „Rezidiv eines Zervixkarzinoms“ gab es hinsichtlich des durchschnittlichen Alters keinen Unterschied. Bei den Patientinnen mit einem Rezidiv lag das mittlere Alter ebenfalls bei 47 (Bereich: 33-69) Jahren (Tab.3).

Tabelle 3: Altersverteilung in den klinisch-pathologischen Subgruppen.

Subgruppen	Anzahl der Patienten (n)	Alter Mittelwert (in Jahren)	Bereich (in Jahren)
Alle Patienten	125	43	
CIN	50	36	20-75
CIN I	7	38	
CIN II	8	34	
CIN III	35	36	
Invasives Karzinom	51	47	19-92
FIGO I	22	46	
FIGO II	13	44	
FIGO III	13	48	
FIGO IV	3	65	
Rezidiv	24	47	33-69

3.2.3 Histologische Befunde

Bei Fragen zur Tumorausbreitung, die mit dem patho-morphologischen Befund nicht zu beantworten waren, kamen weitere diagnostische Methoden zum Einsatz. Bildgebende Verfahren wie Röntgen, Sonographie, Computertomographie und Kernspintomographie lieferten

fehlende Informationen zum regionären Lymphknotenstatus (N) und gaben Hinweis auf das Vorliegen von Fernmetastasen (M).

In Tabelle 4 ist die Verteilung der klinischen Kenngrößen des Zervixkarzinoms in unserem Patientenkollektiv dargestellt.

Tabelle 4: Charakteristika der Patientinnen mit invasiven Zervixkarzinom* (n=75).

	Anzahl der Patienten (n)	Prozentuale Verteilung innerhalb der Subgruppen (%)
Histologie		
Plattenepithelkarzinom	58	77,3
Adenokarzinom	8	10,7
Adenosquamöses Karzinom	5	6,7
Andere Karzinome	2	2,7
Ohne Angaben	2	2,7
Grading		
G1	2	2,7
G2	38	50,7
G3	31	41,3
Ohne Angaben	4	5,3
Nodalstatus (nur Ca)		
N0	23	30,7
N1	29	38,7
Nx (ohne Angaben)	23	30,7
Fernmetastasen		
M0	56	74,7
M1	17	22,7
Mx (ohne Angaben)	2	2,6
Lymphgefäßinvasion		
L0	19	25,3
L1	20	26,7
Lx (ohne Angaben)	36	48,0
Veneninvasion		
V0	24	32,0
V1	8	10,7
Vx (ohne Angaben)	43	57,3

* Retrospektive Datenerhebung

3.2.4 HPV-Status

Die Befundberichte der diagnostischen Biopsien bzw. Konisate bei präkanzerösen Läsionen (CIN I-III) nahmen zu 78% (n=39) auch zu einer eventuell vorliegenden HPV-Infektion (Humanes Papilloma Virus) Stellung. Der Nachweis von HPV-DNA mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren (PCR- Polymerase-Kettenreaktion) konnte in dieser Subgruppe bei 21 Patientinnen geführt werden. 20 von ihnen waren mit einem HPV-Typ der Hochrisikogruppe (High-risk-HPV), eine Patientin mit einem Typ der Niedrigrisikogruppe (Low-risk-HPV) infiziert. In 18 Fällen lautete der Befund HPV-negativ (Tab.5).

Tabelle 5: HPV-Status in der Gruppe der intraepithelialen Neoplasien (CIN)* (n=50).

Subgruppen	Anzahl der Patienten (n)	Prozentuale Verteilung innerhalb der Subgruppen (%)
HPV		
negativ	18	36,0
Low risk positiv	1	2,0
High risk positiv	20	40,0
Ohne Angaben	11	22,0
HPV negativ		
CIN I	4	22,2
CIN II	3	16,7
CIN III	11	61,1
HPV High-risk-positiv		
CIN I	1	5,0
CIN II	3	15,0
CIN III	16	80,0

* Retrospektive Datenerhebung

3.2.5 Menopausenstatus

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung CIN, invasives Karzinom oder Rezidiv waren von den 125 untersuchten Patientinnen 88 (70,4%) prä-, 2 (1,6%) peri- und 35 Patientinnen (28%) postmenopausal.

3.2.6 Raucheranamnese

Ein Risikofaktor, der im Zusammenhang mit einer multifaktoriellen Genese des Zervixkarzinoms diskutiert wird, ist das Rauchen. 36% (n=45) der Frauen aus der Patientenpopulation waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Raucher. 37,6% (n=47) der Patientinnen gaben an, Nichtraucher zu sein. Bei 26,4% (n=33) lagen keine Angaben zum Rauchverhalten vor.

3.3 Follow-up in der Gruppe „Rezidiv“

Innerhalb des Krankheitsstadiums „Rezidiv“ ist das Follow-up aufgrund des Versterbens der Patientinnen an ihrer Erkrankung weitestgehend abgeschlossen.

Von den 24 Frauen, die mit einem Rezidiv bzw. Zweit-Rezidiv in die Studie aufgenommen worden sind, kann in 3 Fällen ein Überleben berichtet werden (Gesamtüberleben: 14/29/183 Monate). Bei einer Patientin ist es wegen eines Wechsels des Hausarztes und des behandelnden Gynäkologen nicht möglich, Informationen zu ihrem aktuellen Gesundheitszustand zu erheben.

Die Zeit zwischen der Erstdiagnose eines Zervixkarzinoms und dem Auftreten eines Rezidivs hat in der Literatur verschiedene Namen bekommen. So wird diese Zeit oft mit krankheitsfreies (DFS: Disease Free Survival) bzw. progressionsfreies Überleben (PFS: Progression Free Survival) beschrieben. Auch die Darstellung in Form der Time To Progression (TTP), der Zeit bis zur Progression, ist hin und wieder in Publikationen zu finden. Die mediane Time To Progression der hier zugrunde liegenden Patientenpopulation betrug 12 Monate (Bereich: 0-96 Monate).

Die Zeitspanne zwischen dem Auftreten eines Rezidivs (Erstrezidiv) und dem Versterben der Patientin wurde als „Überleben mit der Diagnose Rezidiv“ angegeben. Bei den drei lebenden Patientinnen diente der Zeitpunkt des zuletzt erhobenen Follow-up als den diesen Zeitraum begrenzenden Wert. Somit lässt sich eine mediane Überlebenszeit mit einem Rezidiv von 9 Monaten (Bereich: 1-119 Monate) ermitteln.

Das Gesamtüberleben, das sogenannte Overall Survival (OS), ergibt sich unter anderem aus der Summe von TTP und Überleben mit der Diagnose Rezidiv. Die mediane Zeit zwischen der Erstdiagnose „invasives Zervixkarzinom“ und dem Todeszeitpunkt bzw. dem Zeitpunkt des letztes Follow-up beträgt in der o.g. Subgruppe bis dato 24 Monate (Bereich: 8-183 Monate) (Tab.6).

Tabelle 6: Follow-up in der Gruppe der Patientinnen mit einem Rezidiv (n=24).

Patient	Alter bei Erstdiagnose "invasives Ca" (in Jahren)	Überlebend	Time to Progression (in Monaten)	Überlebenszeit mit Diagnose "Rezidiv" (in Monaten)	Gesamt- überlebenszeit (in Monaten)	
1	49	nein	12	6	18	
2	50	nein	6	8	14	
3	38	nein	16	8	24	
4	32	nein	20	7	27	
5	37	nein	0	2	9	
6	35	nein	9	7	16	
7	35	nein	19	28	47	
8	59	nein	96	54	150	2.Rez ²
9	33	nein	13	10	23	
10	35	nein	0	10	10	
11	45	nein	7	28	35	
12	35	nein	19	19	38	
13	49	nein	12	14	26	
14	53	nein	10	9	19	
15	57	nein	38	6	44	
16	47	nein	45	52	97	2.Rez ²
17	35	nein	7	1	8	
18	60	nein	12	5	17	
19	57	nein	19	15	34	2.Rez ²
20	37	nein	7	17	24	
21	43	ja	64	119	183	2.Rez ²
22	50	ja	6	23	29	
23	47	ja	6	8	14	
24	60	k.A. ¹	28	k.A. ¹	k.A. ¹	

¹ k.A. – keine Angaben² 2.Rez – zweites Rezidiv

4. Materialgewinnung und Methodik

4.1 Materialgewinnung

4.1.1 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten stationär im Rahmen der Routinediagnostik. Über die zusätzliche Entnahme von Material zu wissenschaftlichen Zwecken wurden die Patienten ausführlich aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis. Gleichzeitig stimmten sie einer späteren Verlaufsbeobachtung zu. Eingang in die Untersuchungen fanden nur solche Patientinnen, die bis zu diesem Tag noch keinerlei Behandlung ihrer jetzigen Erkrankung erfahren hatten.

4.1.2 Probenaufarbeitung und Lagerung

10 ml Blut wurden über eine periphere Vene des Armes direkt in eine EDTA-Monovette (S-Monovette[®] mit Kalium-EDTA, Firma Sarstedt) abgenommen. Die erste Verarbeitung des Materials im Labor erfolgte frühestens nach 30 Minuten bei Raumtemperatur, in der Regel noch am selben Tag, in Ausnahmefällen nach maximal 24 Stunden. Eine Kühlung des Blutes bei +4°C während dieser Zeit war stets gegeben.

Im Labor ermöglichte eine Gefrierzentrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R) (10 min bei 3620 RPM) die Trennung des EDTA-Blutes in EDTA-Plasma und korpuskuläre Blutbestandteile. Das EDTA-Plasma wurde aliquotiert und bis zur Testung von Tu-M2-PK bei –85°C tiefgefroren.

4.2 Methodik

4.2.1 Theoretisches Prinzip des Enzymimmunoassays

Das Analysenprinzip eines Immunoassays beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Antigenen (AG) und Antikörpern (AK). Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip sind AK in der Lage, nur ganz bestimmte Moleküle, ihr Antigen, zu erkennen und mit ihnen einen stabilen AG-AK-Komplex zu bilden. Diese Selektivität der Antikörper für ihr Antigen wird in der Immunoassaytechnik ausgenutzt, um den gesuchten Analyten neben einer Vielzahl häufig sehr ähnlicher Substanzen gezielt bestimmen zu können.

Der ELISA (*engl.* = Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay) ist eine der gebräuchlichsten Assayvarianten und oft als Sandwichassay konzipiert. Bei dieser Methode liegen die spezifischen Antikörper an einer Trägersubstanz gebunden vor. An die nach Inkubation mit der zu untersuchenden Probe gebildeten AG-AK-Komplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt Enzym-markierte Antikörper an. Wie in einem Sandwich wird das Antigen nun von zwei Antikörpern eingeschlossen. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats können die gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Antigenkonzentration in der Probe wird durch photometrische Messung der Farbintensität im Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt.

4.2.2 Theoretisches Prinzip des Sandwich-ELISA zur quantitativen Bestimmung von Tu M2-PK

Die Quantifizierung der Tu M2-PK erfolgte im Plasma mittels eines Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) der Firma ScheBo®•Biotech AG (Gießen, Germany). Bei diesem Test kommen monoklonale Antikörper zum Einsatz, die hoch spezifisch für die Tumor M2-PK (dimere Form der M2-Pyruvatkinase) sind und nicht mit den anderen Isoformen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und tetramere Form der M2) reagieren.

Der Test wird mit Hilfe einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Diese Kunststoffplatten besitzen 96 Vertiefungen, sogenannte Wells, in welche die zu untersuchenden Proben pipettiert werden. Am Boden der Vertiefung befindet sich fest anhaftend, also immobilisiert, der monoklonale Antikörper, der nur das Isoenzym der humanen Pyruvatkinase Tu M2 erkennt (Abb.3a-e).

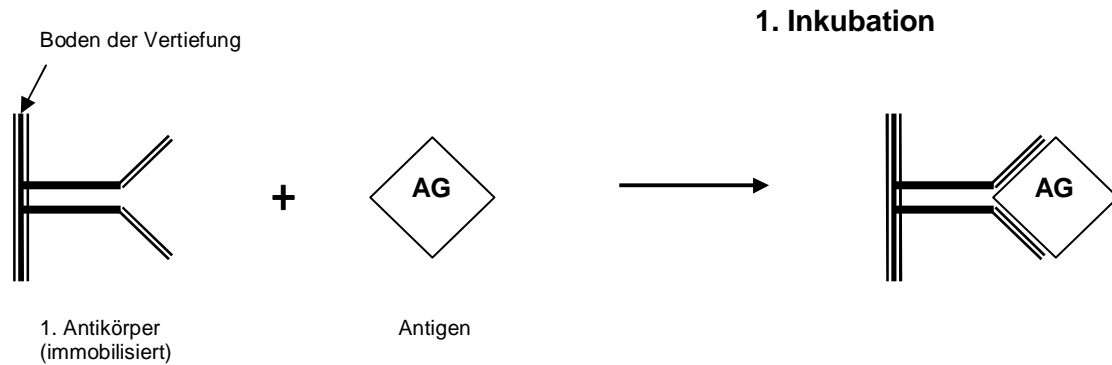


Abb.3a: Der immobilisierte Antikörper (AK) bindet in einem 1. Inkubationsschritt das Antigen (AG), die Tu M2-PK aus der EDTA-Plasma-Probe des Patienten, und bildet mit ihm einen stabilen AG-AK-Komplex.

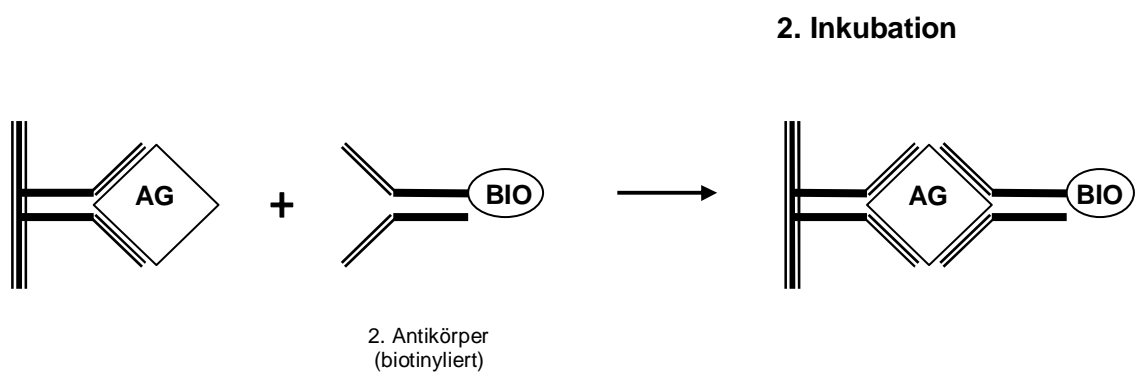


Abb.3b: Anschließend erfolgt der Zusatz eines biotinylierten monoklonalen Zweitantikörpers (BIO), der sich in einem nächsten Inkubationsschritt an das bereits gebundene Antigen, die Tu M2-PK, anlagert.

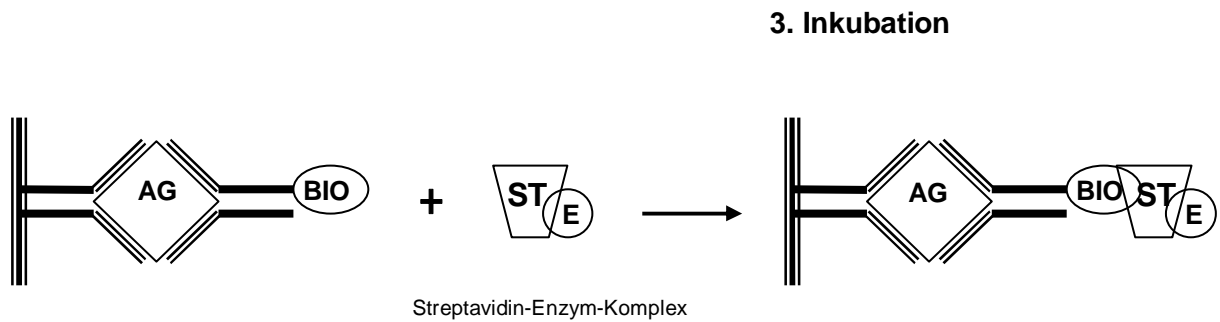


Abb.3c: Zugabe eines an Streptavidin (ST) gebundenen Enzyms (E), der Peroxidase, welches in einer 3. Inkubation mit dem Biotin-markierten Antikörper reagiert.

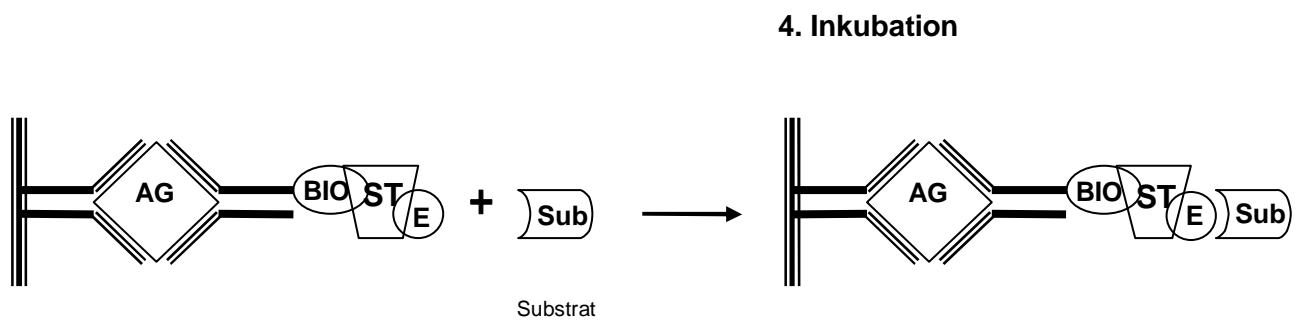


Abb.3d: Nach Zugabe eines chromogenen Substrates (Sub) wird während einer 4. Inkubation eine konzentrationsabhängige Farbreaktion ausgelöst. Das farbstoffbildende Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird dabei durch die Peroxidase oxidiert.

Enzymatische Farbreaktion

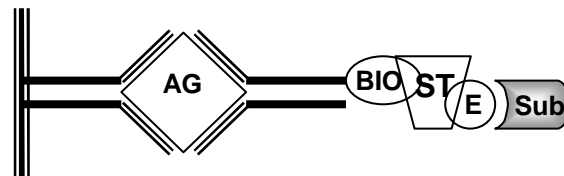


Abb.3e: Die Farbreaktion wird mittels einer wässrigen sauren Stopplösung beendet, um anschließend das der Konzentration an Tu M2-PK entsprechende oxidierte TMB im Vergleich zur Standardreihe photometrisch zu bestimmen.

Bei der quantitativen Bestimmung von Tu M2-PK im Plasma kommt somit ein Sandwichassay zum Einsatz, der über eine Biotin-Streptavidin-Kopplung zwischen dem zweiten, nicht-immobilisierten Anti-Tu-M2-PK-Antikörper und dem Enzym verfügt. Vorteil dieser Biotin-Streptavidin-Variante ist, dass sich das Streptavidin-gebundene Enzym an jeden biotinylierten Antikörper anlagern lässt, unabhängig vom Antigen, gegen das dieser gerichtet ist.

4.3 Testanleitung (Quelle: Testanleitung der Firma ScheBo®•Biotech AG)

Alle Bestandteile des Testkits werden bei 4-8°C gelagert und können bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

4.3.1 Vorbereitungen

Kurz vor Gebrauch sind alle Komponenten des Kits, inklusive der Mikrotiterplatte, auf Raumtemperatur zu bringen. Flüssige Testkit-Bestandteile sollten vor ihrer Verwendung gut gemischt werden. Die Patientenproben sind aufzutauen und werden ebenfalls gründlich gemischt.

1. Herstellung des Proben-/Waschpuffers (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Detergenz, pH 7,2):

100 ml Proben-/Waschpuffer + 400 ml H₂O (Aqua bidest)

2. Verdünnungen der zu untersuchenden EDTA-Plasmen: Gut mischen!!

1:100 = 10 µl EDTA-Plasma + 1000 µl Proben-/Waschpuffer

3. Verdünnung des anti Tu M2-PK bio (Bei Gebrauch der gesamten Mikrotiterplatte):

Die Verdünnung bis nach der 1. Inkubation bei 4-8°C lagern und kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!!

1:100 = 60 µl anti Tu M2-PK bio + 6,0 ml Proben-/Waschpuffer.

4. Die im Testkit enthaltenen Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig. Diese entsprechen hierbei folgenden Konzentrationen an Tu M2-PK:

Blank	= 0.0 U/ml (nur Proben/Waschpuffer)
Standard 1	= 5.0 U/ml
Standard 2	= 15.0 U/ml
Standard 3	= 40.0 U/ml
Standard 4	= 100.0 U/ml
Kontrolle	= 20.0 U/ml ± 10 %

4.3.2 Testdurchführung

1. Blank, Standards und Kontrolle werden wie oben angegeben nacheinander in Reihe 1 und 2 der Mikrotiterplatte als Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert: jeweils 50 μ l. Die verdünnten EDTA-Plasmaproben werden der Reihe nach in die verbleibenden Wells gegeben: ebenfalls 50 μ l.

→ 1. Inkubation: 60 min bei Raumtemperatur

Waschen: Dazu den Inhalt der Wells verwerfen und mit Hilfe einer 8-Kanalpipette die Vertiefungen dreimal mit je 250 μ l Proben-/Waschpuffer spülen. Bei jedem Waschschrift die Lösung mindestens 1-2 Minuten einwirken lassen. Platte durch Ausklopfen auf Fliestüchern trocknen, bis keine Flüssigkeitsreste mehr vorhanden sind!

2. Zugabe des biotinylierten zweiten Antikörpers: jeweils 50 μ l anti Tu M2-PK bio pro Vertiefung.

→ 2. Inkubation: 30 min bei Raumtemperatur

Waschen: siehe oben

3. Zugabe der gebrauchsfertigen Peroxidase-Streptavidin-Lösung: jeweils 50 μ l pro Vertiefung.

→ 3. Inkubation: 30 min abgedunkelt bei Raumtemperatur

Waschen: siehe oben

4. Zugabe der gebrauchsfertigen Substratlösung: jeweils 100 μ l pro Well.

→ 4. Inkubation: 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur

5. Beenden der Farbreaktion durch Zugabe der Stopplösung: jeweils 100 μ l pro Well.

Gut mischen!

6. Innerhalb 5–30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung Messung der Optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei 405 nm oder 405-492 nm.

4.3.3 Quantitative Auswertung

1. Zunächst wird der Blank-Mittelwert von allen photometrisch bestimmten Werten subtrahiert, bevor der Mittelwert der Absorption (= optische Dichte) von den Doppelwerten berechnet wird. Zur Ermittlung der TM-Konzentration müssen die gemessenen optischen Dichten der Standards (Ordinate) gegen die bekannten Konzentrationen der Standards (Abszisse) in einem Koordinatensystem aufgetragen werden (log-log-Skaleneinteilung). An der so entstandenen Standardkurve können jetzt die zur jeweiligen optischen Dichte gehörigen Konzentrationen an Tu M2-PK der Patienten abgelesen werden. Selbstverständlich ist auch eine Auswertung mittels ELISA-Software möglich, bei der als Methode die lineare Regression mit log-log-Skalierung zu wählen ist. Eine gebrauchsfertige Kontrolllösung mit $20 \text{ U/ml} \pm 10\%$ an Tu M2-PK wird zur Kontrolle der Interassay-Varianz jeweils mitgetestet. Bei Abweichungen sowohl der Kontrollen als auch der Standards um mehr als 10% von der angegebenen Konzentration, sollten die Analysen mit einem neuen Testkit wiederholt werden.

4.3.4 Präzision

Die Intraassay-Varianz wurde seitens der Firma ScheBo[®]•Biotech AG durch eine 20-fache Bestimmung von 6 Proben mit einer Konzentration von 10-88 U/ml ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient ist hierbei mit 3.5% (2.4-7.0%) angegeben. Durch Analyse dieser 6 Proben an 10 verschiedenen Tagen berechnete man für die Interassay-Varianz einen mittleren Variationskoeffizienten von 5.3% (3.3-7.5%).

4.3.5 Normwerte

Mittels des Testkit kann eine Bestimmung der Tu M2-PK im Messbereich von 5-100 U/ml erfolgen. Bei höheren Konzentrationen ist eine erneute Analyse des Wertes in einer höheren Verdünnung notwendig. Nach Angaben des Herstellers liegt der vorläufige Normalbereich bei $\leq 15.0 \text{ U/ml}$ im EDTA-Plasma. Diese Referenzkonzentration entspricht einer Spezifität von 90% (Kontrollgruppe: $n = 393$, Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen). Messergebnisse aus dem Bereich 15-20 U/ml sind fraglich (Graubereich) und sollten mit einer neuen Probe wiederholt werden.

4.4 Bestimmung von SCC

Die Bestimmung des SCC-Antigens im Serum ist durch das Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin vorgenommen worden (Direktor: Prof. Dr. med. E. Köttgen). Dabei kam das automatisierte Enzymimmunoassay-System ARCHITECT™ der Firma Abbott Diagnostics® (Hofheim-Wallau, Wiesbaden) zum Einsatz.

Als Referenzwert für SCC wird $<1.5 \mu\text{g/l}$ für die Altersgruppe ab 18 Jahren angegeben.

4.5 Statistik

4.5.1 Statistische Auswertung

Die klinischen Daten als auch die Ergebnisse der Blutanalysen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL von Microsoft® katalogisiert. Mit dem Statistikprogramm SPSS 13.0 für Windows erfolgte dann die statistische Auswertung.

Da eine Normalverteilung der betrachteten Stichproben nicht garantiert werden konnte, wurden nichtparametrische Tests zum Probenvergleich herangezogen. Die Stichproben sind wegen ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Individuen als unabhängig zu betrachten. Beim Zweistichprobenvergleich kam somit der U-Test nach Mann and Whitney zum Einsatz. Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, wählte man den Kruskal-Wallis-Test.

Um den Grad des Zusammenhangs zwischen 2 Parametern auszudrücken, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Aufgrund der angenommenen Abweichung von der Normalverteilung empfahl sich die Verwendung des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten r_s . Der Wertebereich des Korrelationskoeffizienten erstreckt sich über $-1 \leq r_s \leq 1$ und man bezeichnet den Zusammenhang zwischen 2 Parametern als positiv korreliert bzw. direkt proportional, wenn $r_s > 0$ und negativ korreliert bzw. indirekt proportional, wenn $r_s < 0$. Je stärker der Zusammenhang zwischen den betrachteten Werten, desto näher liegt r_s bei ± 1 . Ab einem Koeffizienten von $r_s \geq 0.75$ wird von einer Korrelation gesprochen. Ein Wert von 0.4-0.75 ist als Assoziation beschrieben.

Eine 4-Felder-Tafel diene zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des ELISA-Testverfahrens. Mittels einer logistischen Regressionsanalyse konnte die Wahrscheinlichkeit (Odds Ratio) berechnet werden, ob bei erhöhtem Blutspiegel von Tu M2-PK ein erhöhtes Risiko für ein invasives Zervixkarzinom vorliegt. Anschließend wurde eine ROC-Kurve (Receiver-Operating-Characteristics) geplottet, die einen Überblick über Sensitivität und Spezifität des Verfahrens geben soll und bei Bedarf die Ermittlung eines eigenen „optimalen“ Cut-Off-Wertes

ermöglicht. Die AUC (Area Under Curve) gilt als Maß für die Güte des Tests und kann Werte zwischen 0.5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt.

Zur Survivalanalyse der Patientinnen mit der Diagnose Rezidiv wurde eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, welche die TM-Konzentration als Einflussgröße auf die Überlebenszeit betrachtet. Die Odds Ratio (OR) spiegelt hierbei das Risiko für eine Verkürzung ($OR > 1$) bzw. Verlängerung ($OR < 1$) der Überlebenszeit eines Patienten mit erhöhtem Wert wieder. Bei einer Odds Ratio gleich 0 wird kein Zusammenhang angenommen.

Ergebnisse werden, wenn nicht anders angegeben, ab einem Signifikanzniveau von 5 % ($p \leq 0.05$) als signifikant angesehen.

4.5.2 Deskription der Ergebnisse

Um die erhobenen Daten in anschaulicher Weise zusammenzufassen und zu beschreiben, wurden Tabellen erstellt, die über Fallzahl, Median, Mittelwert, Standardabweichung und Bereich detailliert Auskunft geben.

Der arithmetische Mittelwert, im allgemeinen Sprachgebrauch als „Durchschnitt“ bezeichnet, ist definiert als die Summe aller beobachteten Werte geteilt durch die Gesamtzahl der Beobachtungen. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte um ihren Mittelwert.

Neben dem Mittelwert ist der Median ein häufig verwendetes Lagemaß für die statistische Beschreibung von quantitativen Merkmalen. Der Median ist derjenige Wert der *sortierten* Stichprobe, der genau in der Mitte liegt und somit die Stichprobe in zwei Hälften teilt. Bei geradem Stichprobenumfang ist der Median als der Durchschnittswert der zwei in der Mitte liegenden Werte definiert.

Median und Mittelwert besitzen unterschiedliche Eigenschaften. Der Median wird von extremen Werten (Ausreißern) praktisch kaum beeinflusst. Das bedeutet, dass der Median im Vergleich zum Mittelwert weniger von Ausreißern gestört wird. Bei schiefen, unsymmetrischen Verteilungen, wie sie für Laborparameter typisch sind, kann der Median daher besser interpretiert werden als der Mittelwert. Um dennoch auf die Extremwerte aufmerksam zu machen, wird zusätzlich der komplette Bereich der Werte mit angegeben.

Bei der Betrachtung von Überlebenszeiten (Zeit bis zum Eintreffen eines bestimmten Ereignisses, z.B. Tod), liegen meist nicht für alle Patienten diese Zeiten vor, sondern es ist nur bekannt, dass innerhalb eines bestimmten Zeitraumes das interessierende Ereignis nicht eingetreten ist. In einer solchen Situation wird die Erhebung des Mittelwertes als nicht sinnvoll

erachtet, während eine mediane Überlebenszeit spätestens nach Versterben der Hälfte der beobachteten Patienten angegeben werden kann [2,44].

Zur besseren Übersicht über die Verteilung der Werte einer Stichprobe und zum Vergleich mehrerer Gruppen miteinander, wurden die erhobenen Daten bei statistischer Signifikanz noch einmal in Boxplots graphisch dargestellt. Vorteil der Boxplots ist, dass sie auch Hinweise auf mögliche Ausreißer und unplausible Werte in einer Stichprobe liefern.

Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5-3fachen der Boxhöhe liegt. Der Abstand extremer Werte von dem 25%- oder 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe [12].

Auf eine Nennung *aller* in den Boxplots aufgetragenen Werte ist aufgrund der Übersichtlichkeit verzichtet worden.

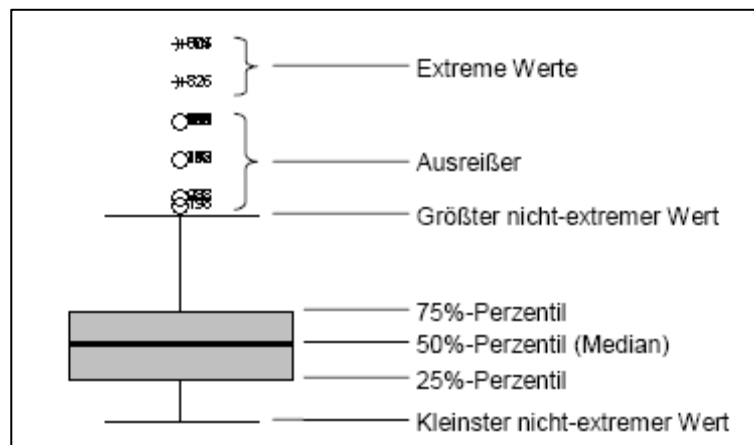


Abb.4: Bedeutung der Symbole in einem Boxplot (aus Brosius 1998 [12]).

5. Ergebnisse

5.1 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Krankheitsstadien

5.1.1 Korrelationen von Tu M2-PK mit den 3 klinisch-pathologischen Subgruppen CIN, invasives Karzinom und Rezidiv

Um die Basisfrage dieser Untersuchung beantworten zu können, nämlich ob anhand der Konzentration des im Plasma nachweisbaren Markers Tu M2-PK auch bei Pathologien der Cervix uteri eine Differenzierung zwischen einem nichtmalignen und einem malignen Geschehen möglich ist, wurden zunächst die unserem Patientenkollektiv zu Grunde liegenden 3 Diagnosegruppen Präkanzerose (CIN), invasives Karzinom (FIGO I-IV) und Rezidiv in ihrer Gesamtheit betrachtet.

Die mediane Tu M2-PK-Plasmakonzentration für die „benigne“ CIN-Subgruppe lag unter dem vom Hersteller empfohlenen cut-off-Wert von 15 U/ml. Demgegenüber konnte in den „malignen“ Gruppen für die FIGO-Stadien und die Rezidive eine über diesem Wert liegende Konzentration gemessen werden (Tab.7).

Tabelle 7: Tu M2-PK-Werte in den Gruppen CIN, FIGO und Rezidiv.

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
CIN	50	9,2	10,1	± 6,7	< 5,0 - 46,8
FIGO	51	16,4	24,9	± 33,1	< 5,0 - 205,0
Rezidiv	24	41,2	50,7	± 38,1	13,4 - 171,0

Der statistische Vergleich der Tu M2-PK-Werte stellte einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0.001$) zwischen den 3 Gruppen fest. Die weitere Analyse verdeutlichte, dass sich diese hohe Signifikanz sowohl zwischen CIN und FIGO-Stadien ($p < 0.001$) als auch zwischen CIN und Rezidiven ($p < 0.001$) nachweisen lässt. Der Vergleich invasives Karzinom in Erstdiagnose *versus* Rezidiv ergab ebenso eine deutliche Differenzierung ($p < 0.001$) (Abb.5).

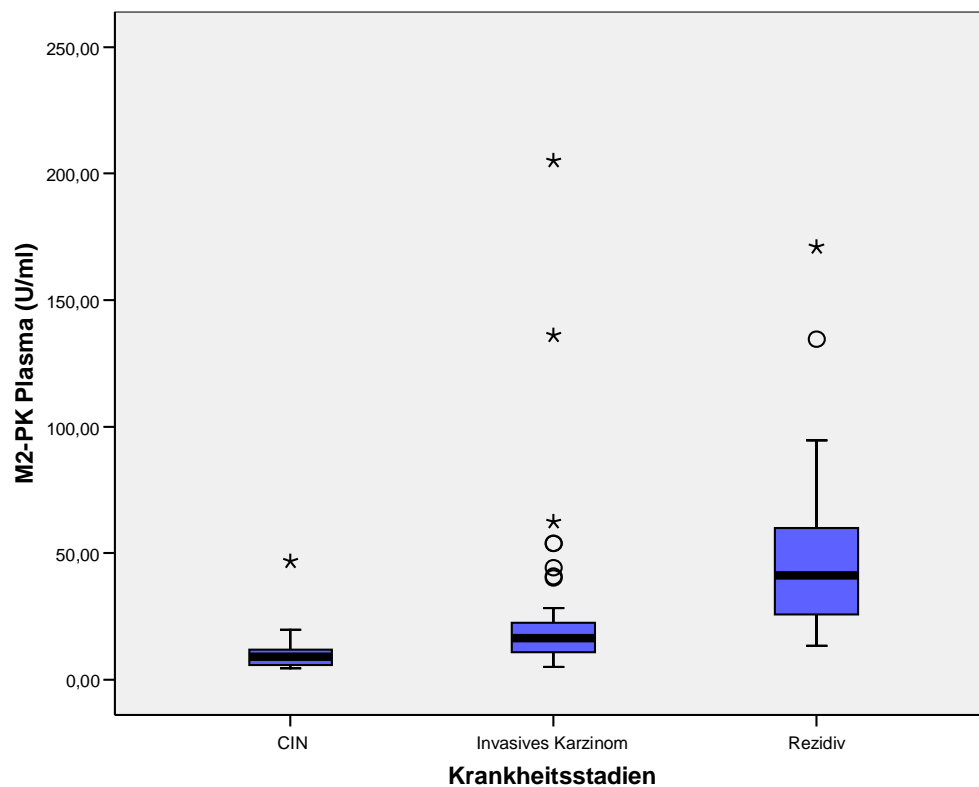


Abb.5: Tu M2-PK in Abhängigkeit vom den Krankheitsstadien.

5.1.2 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Grad der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN I-III)

Aufgrund der geringen Fallzahl sowohl in der Gruppe der CIN I als auch in der Gruppe der CIN II wurden beide zu einer Gruppe zusammengefasst. Beim Vergleich der so entstandenen zwei Ausprägungen, CIN I *plus* II (Median: 11.0 U/ml, Mittelwert: 9.8 U/ml, Standardabweichung: 3.6 U/ml, Bereich: <5.0 – 16.5 U/ml) und CIN III, kam dann der U-Test nach Mann and Whitney zum Einsatz. Dabei ergab sich mit $p=0.626$ kein signifikanter Werte-Unterschied zwischen den CIN-Stadien (Tab.8).

Tabelle 8: Tu M2-PK-Werte im Stadium CIN I, CIN II und CIN III.

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
CIN I	7	11,2	9,5	± 4,5	< 5,0 - 16,5
CIN II	8	10,3	10,0	± 2,8	6,9 - 15,0
CIN III	35	8,7	10,3	± 7,7	< 5,0 - 46,8

5.1.3 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Tumorstadien FIGO I-IV und Rezidiv

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Resultate in den einzelnen Tumorstadien. Stadium III und IV wurden aufgrund geringer Fallzahlen zusammengefasst. Die daraus resultierende Konzentration war somit 19.9 U/ml (Mittelwert: 40.0 U/ml, Standardabweichung: 54.3 U/ml, Bereich: <5.0 – 205.0 U/ml) für die Subgruppe FIGO III *plus* IV.

Tabelle 9: Tu M2-PK-Werte bei Patienten mit Zervixkarzinom im FIGO-Stadium I-IV.

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
FIGO I	22	12,5	17,0	± 13,0	< 5,0 - 53,9
FIGO II	13	15,2	19,5	± 12,1	7,1 - 53,9
FIGO III	13	18,8	21,7	± 15,4	< 5,0 - 62,4
FIGO IV	3	136,0	119,4	± 95,0	17,1 - 205,0

Wie in Abbildung 6 anhand von Box-Plots dargestellt, ist mit fortschreitendem Tumorstadium eine zunehmende Konzentration an Tu M2-PK zu beobachten. Karzinompatienten im Stadium III und IV hatten eine höhere Konzentration an Tu M2-PK im Plasma als Patienten im Stadium I, wenn auch das Signifikanzniveau von 5 % ($p=0.055$) nicht erreicht wurde. FIGO I verglichen

mit FIGO II ($p=0.246$) sowie FIGO II verglichen mit FIGO III *plus* IV ($p=0.380$) zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Zur weiteren Analyse wurden die Rezidivpatienten in die Berechnungen mit eingeschlossen (Tab.7). Beim Vergleich aller 4 Gruppen miteinander, d.h. FIGO I *versus* FIGO II *versus* FIGO III/IV *versus* Rezidiv, stellte sich ein hoch signifikanter Unterschied dar ($p<0.001$). Dieser bestätigte sich auch beim Zweistichprobenvergleich der Gruppe der Rezidive mit FIGO I ($p<0.001$), mit FIGO II ($p<0.001$) und FIGO III/IV ($p=0.014$). (Abb.6)

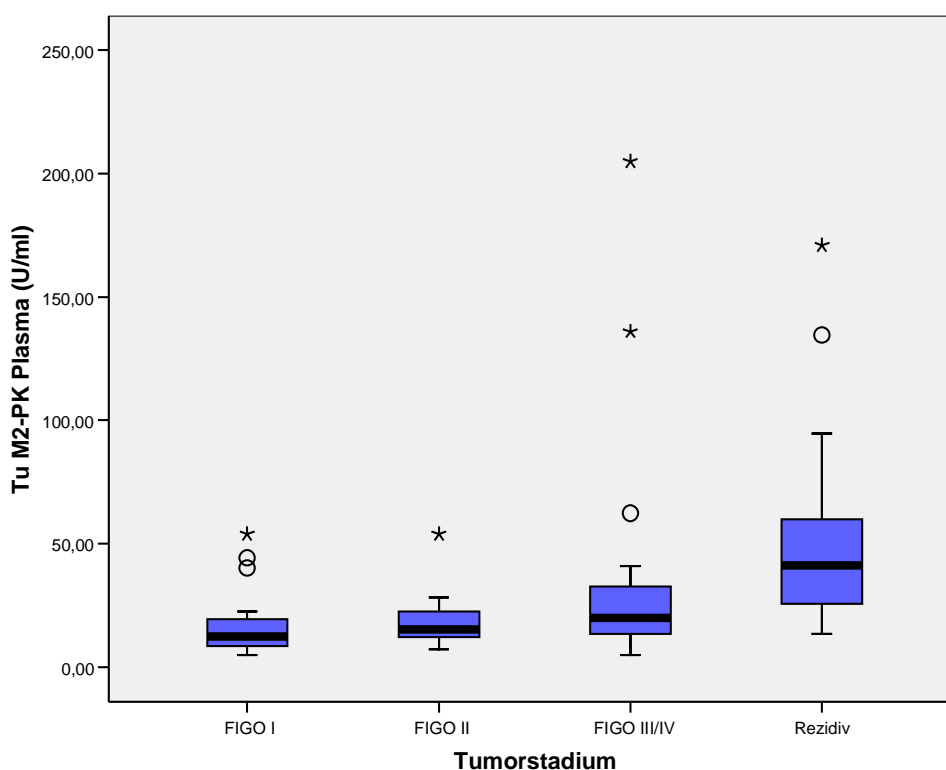


Abb.6: Tu M2-PK in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Zur Verdeutlichung des Zusammenhangs der Tu M2-PK-Konzentration mit dem Krankheitsstadium wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient berechnet. Mit $r_s=0.678$ ($p<0.001$) ergab sich nach unserer Definition eine strenge Assoziation, womit noch einmal bewiesen ist, dass sich die TM-Konzentration mit steigendem Krankheitsstadium erhöht.

5.1.4 Diagnostische Sensitivität und Spezifität der Tu M2-PK

Sensitivität ist definitionsgemäß der Anteil der Kranken, die mit dem Test richtig erkannt wurden (Zervixkarzinom). Spezifität hingegen beschreibt den Anteil der richtig erkannten Gesunden mit dem fraglichen Test (kein Zervixkarzinom = CIN).

In unserem Patientenkollektiv hatten 49 von insgesamt 75 Patientinnen mit Zervixkarzinom erhöhte Tu M2-PK-Werte. Demgegenüber standen 7 von insgesamt 50 Patientinnen mit einer Präkanzerose, die über die Norm erhöhte Werte hatten. Damit ergab sich für den vom Hersteller empfohlenen cut-off von 15.0 U/ml eine diagnostische Sensitivität von 65.3% und eine Spezifität von 86.0%

Zur Erstellung einer Receiver-Operating-Characteristics-Kurve (ROC), welche die Validitätsmaße Sensitivität und Spezifität der Tu M2-PK nicht nur für einen bestimmten cut-off-Wert, sondern über die ganze Werte-Bandbreite hinweg demonstriert, wurde zunächst eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Diese betrachtete den Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Tu M2-PK-Werte und der Erkrankung an einem Zervixkarzinom. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Konzentration an Tu M2-PK auch die Wahrscheinlichkeit an einem Zervixkarzinom zu erkranken, zunimmt. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit (odds ratio) liegt bei 1.170 mit einer Signifikanz von $p < 0.001$.

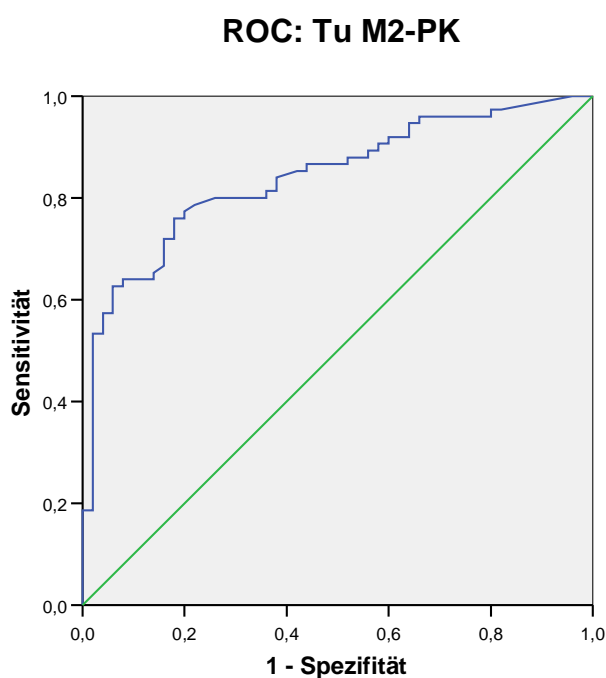


Abb.7: ROC-Kurve für Tu M2-PK zur Karzinomdiagnostik.

Anhand der in Abbildung 7 dargestellten ROC-Kurve kann ein Überblick über Sensitivität und Spezifität des Verfahrens gegeben werden. Somit ist es möglich, einen geeigneten cut-off Wert mit der gewünschten Sensitivität und Spezifität zu bestimmen.

Vom Hersteller wird bei einem cut-off von 15.0 U/ml eine Spezifität von 90% zur Unterscheidung eines malignen von einem nichtmalignen Prozess angegeben. Um bei der hier zugrundeliegenden Patientenpopulation eine Spezifität des Tests von 90.0% bieten zu können, müsste ein cut-off Wert von 16.0 U/ml gewählt werden. In diesem Fall läge die Sensitivität bei 64.0%.

Die Fläche unter der Kurve (AUC - Area under the curve), als Maß für die Güte des Tests, liegt bei der oben abgebildeten Grafik bei 0.842 (95%iges Konfidenzintervall: 0.774 – 0.911). Da sich die ROC-Kurve mit $p < 0.001$ signifikant von der Diagonalen unterscheidet, weist der diagnostische Test Trennschärfe auf.

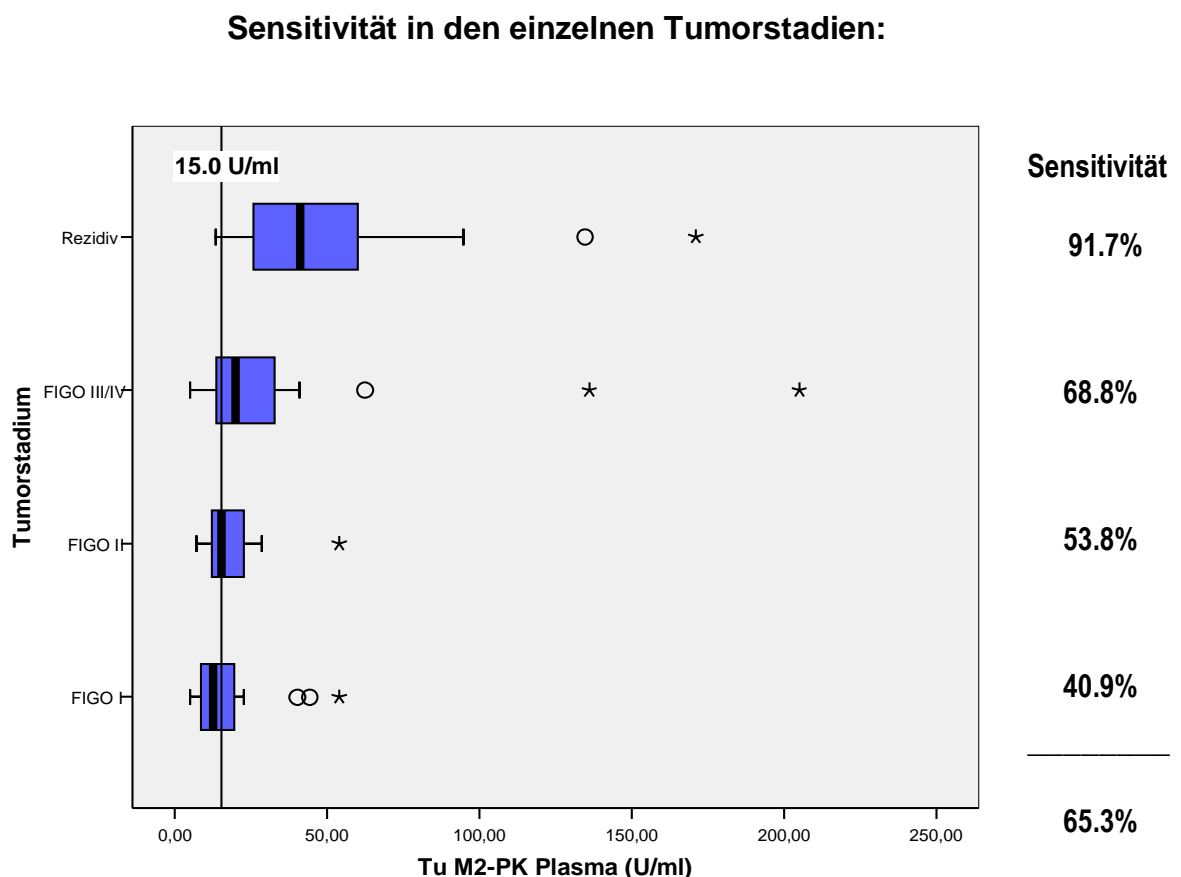


Abb.8: Sensitivität der Tu M2-PK in den Tumorstadien FIGO I-III/IV und Rezidiv.

5.2. Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Metastasierungsstatus

Um Tu M2-PK als neuen potentiellen Tumormarker für das Zervixkarzinom zu prüfen, wurde er mit konventionellen Prognosefaktoren verglichen und korreliert. In den nachfolgenden Analysen fanden daher nur Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Zervixkarzinom Beachtung (FIGO und Rezidiv).

5.2.1 Korrelation von Tu M2-PK mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen

Die Frage nach der Korrelation mit dem Lymphknotenstatus ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0.524$ ($p < 0.001$) als positiv zu bewerten. Die mediane Tu M2-PK-Konzentration war in der Gruppe der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten (N1) signifikant höher als in der Gruppe, in der keine, in lokoregionäre Lymphknoten metastasierte Tumorzellen (N0) nachgewiesen werden konnten ($p = 0.028$). (Tab.10 und Abb.9)

Tabelle 10: Tu M2-PK-Werte entsprechend dem Metastasierungsstatus (N/M).

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
Nodalstatus					
N0	23	15,0	20,6	± 16,6	< 5,0 - 62,4
N1	29	24,3	41,3	± 46,5	7,0 - 205,0
Fernmetastasen					
M0	56	16,7	24,4	± 23,2	< 5,0 - 136,0
M1	17	40,9	63,3	± 55,6	21,5 - 205,0

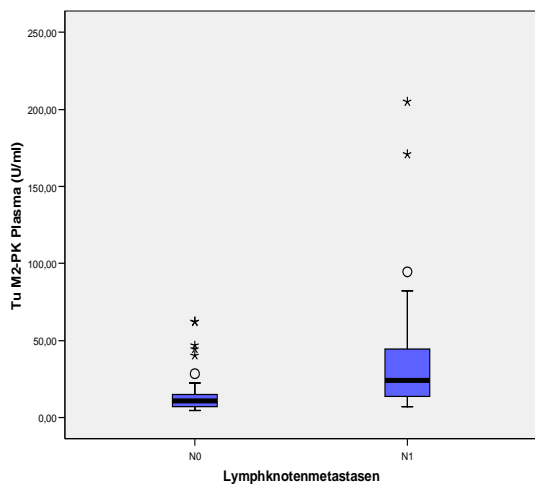


Abb.9: Tu M2-PK im Nodalstatus N0 und N1.

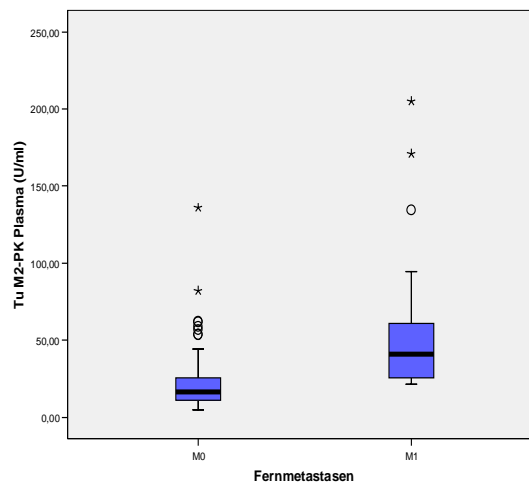


Abb.10: Tu M2-PK im Status M0 und M1.

5.2.2 Korrelation von Tu M2-PK mit der Fernmetastasierung

Ein hochsignifikanter Unterschied in den Tu M2-PK-Werten ($p < 0.001$) konnte bei Einteilung des Patientenkollektivs bezüglich der Fernmetastasierung beobachtet werden. Patientinnen mit Fernmetastasen (M1) zeigten deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu Patientinnen ohne Fernmetastasen (M0) (Tab.10 und Abb.10). Die Korrelationsanalyse bewies, dass metastasierte Karzinome mit erhöhten Tu M2-PK-Werten assoziiert sind ($r_s = 0.486$ mit $p < 0.001$).

5.2.3 Korrelation von Tu M2-PK mit N und M

Da eine Korrelation zwischen Tu M2-PK und dem Ausmaß der malignen Erkrankung (Metastasierung) gezeigt werden konnte, wurden die Karzinompatientinnen noch einmal in 3 Gruppen aufgeteilt: Gruppe I ohne Metastasen (N0/M0: $n = 23$), Gruppe II mit positiven Lymphknoten und ohne Fernmetastasen (N1/M0: $n = 18$) und Gruppe III mit Fernmetastasen (M1: $n = 17$). Die Mediane waren für Gruppe I: 15.0 U/ml (Mittelwert: 20.6 U/ml, Standardabweichung: ± 16.6 U/ml, Bereich: $< 5.0 - 62.4$ U/ml), für Gruppe II: 16.1 U/ml (Mittelwert: 23.6 U/ml, Standardabweichung: ± 20.4 U/ml, Bereich: $7.0 - 82.2$ U/ml) und für Gruppe III: 40.9 U/ml (Mittelwert: 63.3 U/ml, Standardabweichung: ± 55.6 U/ml, Bereich: $21.5 - 205.0$ U/ml). Mit $p < 0.001$ zeigte sich erneut ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, mit den höchsten Werten bei Vorliegen einer Fernmetastasierung.

Sensitivität in den einzelnen Stadien der Metastasierung

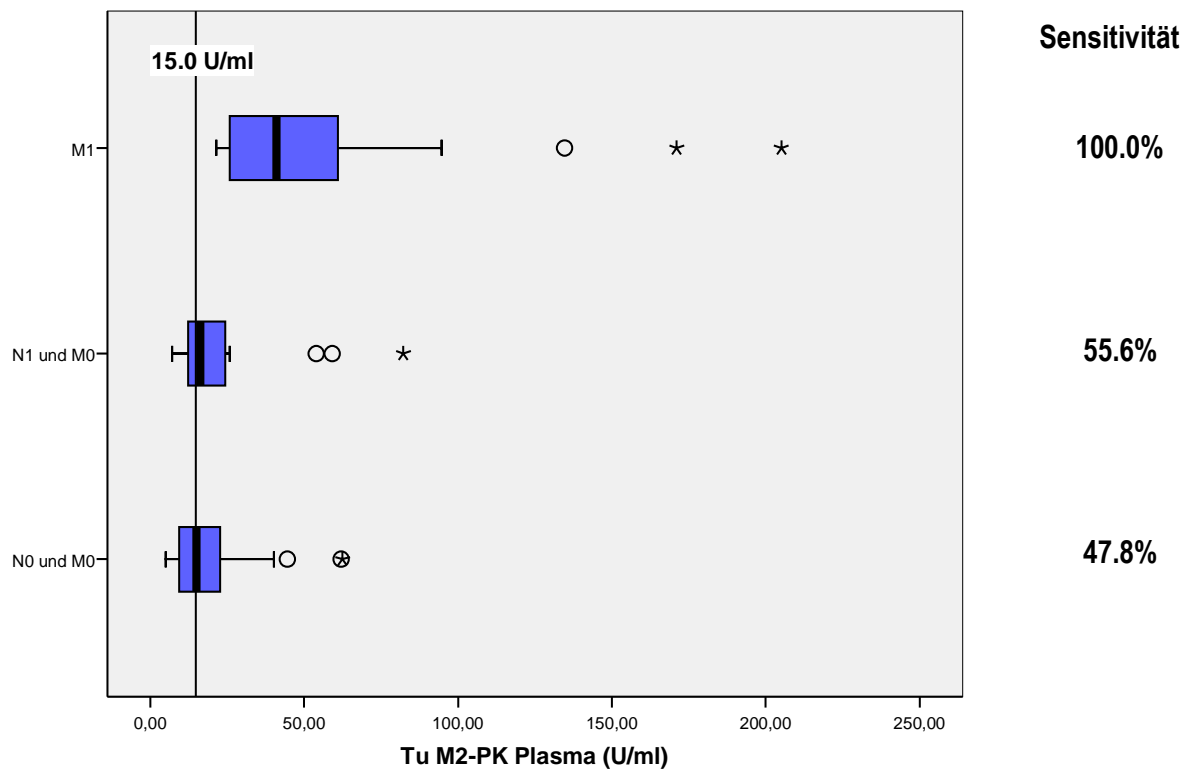


Abb.11: Sensitivität der Tu M2-PK in den verschiedenen Stadien der Tumorausbreitung.

5.2.4 Korrelation von Tu M2-PK mit der Lymphgefäßinvasion

Es wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede ($p=0.653$) zwischen negativer (L0: $n=19$; Median: 16.4 U/ml, Mittelwert: 29.5 U/ml, Standardabweichung: ± 38.0 U/ml, Bereich: 5.6–171.0 U/ml) und positiver (L1: $n=20$; Median: 13.2 U/ml, Mittelwert: 23.4 U/ml, Standardabweichung: ± 30.9 U/ml, Bereich: <5.0 –134.6 U/ml) Lymphgefäßinvasion detektiert.

5.2.5 Korrelation von Tu M2-PK mit der Veneninvasion

Auch die Analyse der Tu M2-PK-Konzentrationen bezüglich der Streuung von Tumorzellen in die Venolen des Haupttumors ergab keinen nennenswerten Unterschied ($p=0.931$) zwischen negativem (V0: $n=24$; Median: 15.8 U/ml, Mittelwert: 25.6 U/ml, Standardabweichung: ± 34.3 U/ml, Bereich: <5.0 –171.0 U/ml) und positivem (V1: $n=8$; Median: 14.3 U/ml, Mittelwert: 31.5 U/ml, Standardabweichung: ± 42.8 U/ml, Bereich: <5.0 –134.6 U/ml) Befund.

5.3 Korrelationen von Tu M2-PK mit der Tumorhistologie

Insgesamt wurden 71 Patientinnen in die Auswertung bezüglich der Histologie ihres Tumors eingeschlossen. Je eine Patientin mit einem klarzelligem Karzinom (Tu M2-PK: 43.8 U/ml) und einem kleinzelligem Zervixkarzinom (Tu M2-PK: 7.0 U/ml) fanden aufgrund der geringen Fallzahl keine Berücksichtigung in der statistischen Auswertung.

5.3.1 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Tumortyp

58 Frauen waren an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt (Median: 22.0 U/ml, Mittelwert: 36.8 U/ml, Standardabweichung: ± 40.3 U/ml, Bereich: $<5.0 - 205.0$ U/ml), 8 an einem Adenokarzinom (Median: 12.8 U/ml, Mittelwert: 14.4 U/ml, Standardabweichung: ± 8.0 U/ml, Bereich: $<5.0 - 28.4$ U/ml) und 5 an einem adenosquamösen Karzinom (Median: 22.7 U/ml, Mittelwert: 29,7 U/ml, Standardabweichung: ± 17.2 U/ml, Bereich: $10.9 - 53.9$ U/ml). Der Drei-Gruppen-Vergleich erbrachte zunächst keinen signifikanten Unterschied ($p=0.096$). Erst bei der genauen Analyse zwischen 2 Gruppen wurde deutlich, dass bei Plattenepithelkarzinomen gegenüber Adenokarzinomen signifikant höhere Konzentrationen ($p=0.035$) zu verzeichnen sind. Der Vergleich Adenokarzinome *versus* adenosquamöse Karzinome erreichte mit $p=0.107$ keine statistische Signifikanz, der Vergleich Plattenepithelkarzinome *versus* adenosquamöse Karzinome mit $p=0.839$ ebenfalls nicht (Abb.12).

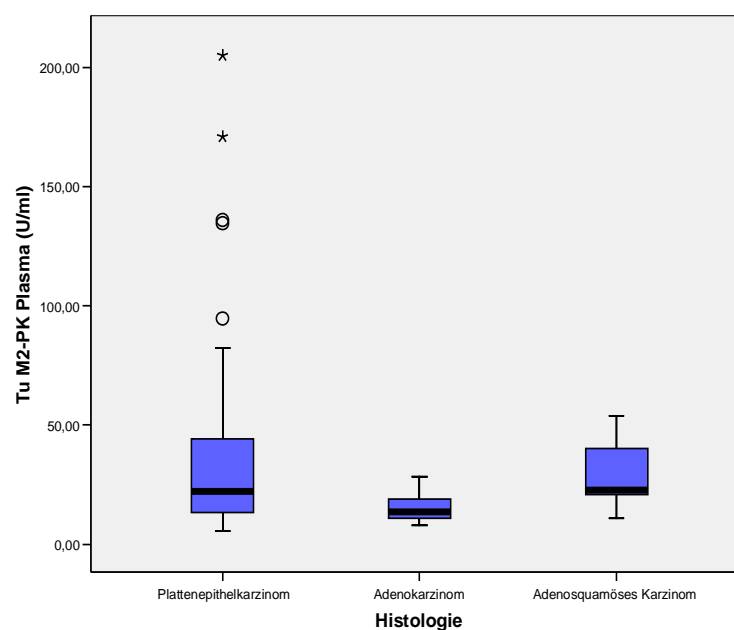


Abb.12: Tu M2-PK in Abhängigkeit von der histologischen Ausprägung.

5.3.2 Korrelation von Tu M2-PK mit dem Grad der Tumorzellendifferenzierung

Tabelle 11: Tu M2-PK-Werte entsprechend dem Differenzierungsstadium G1-G3.

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
G1	2	21,3	21,3	± 1,8	20,0 - 22,6
G2	38	19,6	29,8	± 41,5	< 5,0 - 205,0
G3	31	24,3	30,8	± 20,5	5,6 - 82,2

Die Verteilung der Tu M2-PK-Konzentrationen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0.349$) bezüglich der 3 Differenzierungsgrade des Zervixkarzinoms (Tab.11).

5.4 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem HPV-Status

Der Einfluss des HPV-Status auf den Tu M2-PK-Wert soll nur in der Gruppe der Präkanzerosen betrachtet werden. In dieser Gruppe lautete der Befund 18x HPV negativ sowie 20x HPV High-risk-positiv. Die Patientin mit der Diagnose HPV Low-risk-positiv wurde nicht in die Analyse aufgenommen.

Tabelle 12: Tu M2-PK-Werte entsprechend dem HPV-Status in der Gruppe der CIN.

Subgruppen	n	Median (U/ml)	Mittelwert (U/ml)	Standard abweichung (U/ml)	Bereich (U/ml)
HPV-Status					
Negativ	18	9,7	12,1	9,7	<5 - 46,8
High-risk-positiv	20	7,6	8,4	4,1	<5 - 16,2
HPV negativ					
CIN I <i>plus</i> II	7	11,3	11,2	4,1	<5 - 16,5
CIN III	11	8,7	12,7	12,1	<5 - 46,8
HPV high-risk-positiv					
CIN I <i>plus</i> II	4	9,0	8,4	3,6	<5 - 11,6
CIN III	16	7,0	8,4	4,4	<5 - 16,2

Es war kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den 18 Patientinnen mit HPV negativem Befund und den 20 Patientinnen mit HPV High-risk-positivem Befund zu erkennen ($p=0.207$). Zur Frage, ob diesbezüglich der Grad der Präkanzerose eine Rolle spielt, wurden innerhalb dieser Befundgruppen noch einmal CIN-Stadium I *plus* II dem CIN-Stadium III gegenübergestellt. Weder in der Gruppe der HPV negativen ($p=0.556$) noch in der Gruppe der HPV positiven Befunde ($p=0.924$) zeichneten sich signifikante Unterschiede ab (Tab.12).

5.5 Korrelationen von Tu M2-PK mit Alter bei Erstdiagnose und Rauchgewohnheiten

5.5.1 Korrelation von Tu M2-PK mit dem Alter bei Erstdiagnose „Karzinom“

Zur Untersuchung der Frage, ob das Alter der Frau einen Einfluss auf die Ausprägung des Tu M2-PK-Wertes hat, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Diese erbrachte mit einem Koeffizienten von $r_s=0.118$ keinerlei Hinweis auf einen Zusammenhang. Abbildung 13 stellt die vom Alter unabhängige Verteilung der Tu M2-PK-Konzentrationen anschaulich dar:

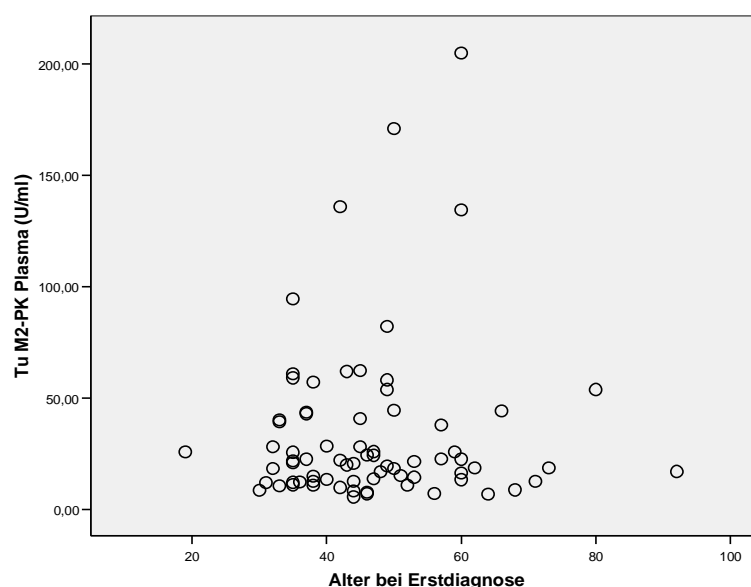


Abb.13: Tu M2-PK in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose „Zervixkarzinom“.

5.5.2 Korrelation von Tu M2-PK mit den Rauchgewohnheiten

Tu M2-PK zeigt keine Korrelation mit den Rauchgewohnheiten der Patientinnen. Obwohl Nichtraucherinnen mit einer medianen Markerkonzentration von 17,1 U/ml ($n=47$; Mittelwert: 23,3 U/ml, Standardabweichung: $\pm 24,3$ U/ml, Bereich: $<5,0 - 136,0$ U/ml) über der medianen Konzentration der Raucherinnen mit 12,7 U/ml ($n=45$; Mittelwert: 27,4 U/ml, Standardabweichung: $\pm 41,8$ U/ml, Bereich: $<5,0 - 205,0$ U/ml) lagen, erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant ($p=0.561$).

Tabelle 13: Zusammenfassung der erhobenen *p*-Werte der Tu M2-PK im Plasma (U/ml).

Analysen	<i>p</i> -Werte
<u>Krankheitsstadien</u>	
CIN vs. FIGO I-IV vs. Rezidiv ¹	< 0.001
CIN vs. FIGO I-IV ²	< 0.001
FIGO I-IV vs. Rezidiv ²	< 0.001
FIGO I vs. FIGO III/IV ²	0.055
FIGO I/II vs. Rezidiv ²	< 0.001
FIGO III/IV vs. Rezidiv ²	0.014
CIN I/II vs. CIN III ²	0.626
<u>Metastasierung</u>	
N0 vs. N1 ²	0.028
M0 vs. M1 ²	< 0.001
N0/M0 vs. N1/M0 vs. M1 ¹	< 0.001
L0 vs. L1 ²	0.653
V0 vs. V1 ²	0.931
<u>Histologie</u>	
PlattenepithelCa vs. AdenoCa ²	0.035
PlattenepithelCa vs. AdenosquamCa ²	0.839
AdenoCa vs. AdenosquamCa ²	0.107
G1 vs. G2 vs. G3 ¹	0.349
HPV neg. vs. HPV high-risk-pos. ²	0.207

¹Kruskal-Wallis-Test²Mann-Whitney-Test

5.6 Korrelationen von SCC mit klinischen, pathologischen und histologischen Faktoren

5.6.1 Korrelationen von SCC mit den Krankheitsstadien (FIGO I-IV / Rezidiv)

Die SCC-Konzentrationen konnten bei insgesamt 31 Frauen mit histologisch gesichertem Zervixkarzinom retrospektiv erhoben werden. Nach Aufteilung entsprechend den Krankheitsstadien, erfolgte der Vergleich von 4 Gruppen miteinander. Dieser ergab mit $p=0.015$ einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Stadien, mit den höchsten SCC-Werten bei den Rezidiven (Tab.14).

Tabelle 14: SCC-Werte bei Patientinnen mit Zervixkarzinom im FIGO-Stadium I-IV und Rezidiv.

Subgruppen	n	Median ($\mu\text{g/l}$)	Mittelwert ($\mu\text{g/l}$)	Standard abweichung ($\mu\text{g/l}$)	Bereich ($\mu\text{g/l}$)
FIGO I	6	0,9	5,2	10,2	0,5 - 25,9
FIGO II	6	3,6	4,5	4,7	0,5 - 13,0
FIGO III	5	14,2	18,2	21,4	0,3 - 53,2
Rezidiv	14	17,2	65,9	122,1	2,2 - 447,0

Der Zwei-Gruppen-Vergleich (Mann and Whitney Test) verdeutlichte, dass signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen dem FIGO-Stadium I und den Rezidiven ($p=0.006$) sowie zwischen FIGO-Stadium II und den Rezidiven ($p=0.011$) vorherrschen. Obwohl ein steter Anstieg der SCC-Konzentration beobachtet werden konnte, wurden beim Vergleich der Patientinnen im FIGO-Stadium I *versus* II ($p=0.520$), FIGO-Stadium I *versus* III ($p=0.313$), FIGO-Stadium II *versus* III ($p=0.361$) und FIGO-Stadium III *versus* Rezidiv ($p=0.355$) keine statistischen Signifikanzen erreicht (Abb.14). Die Korrelationsanalyse erbrachte mit $r_s=0.585$ ($p<0.001$) eine starke Assoziation des SCC-Wertes mit den Krankheitsstadien.

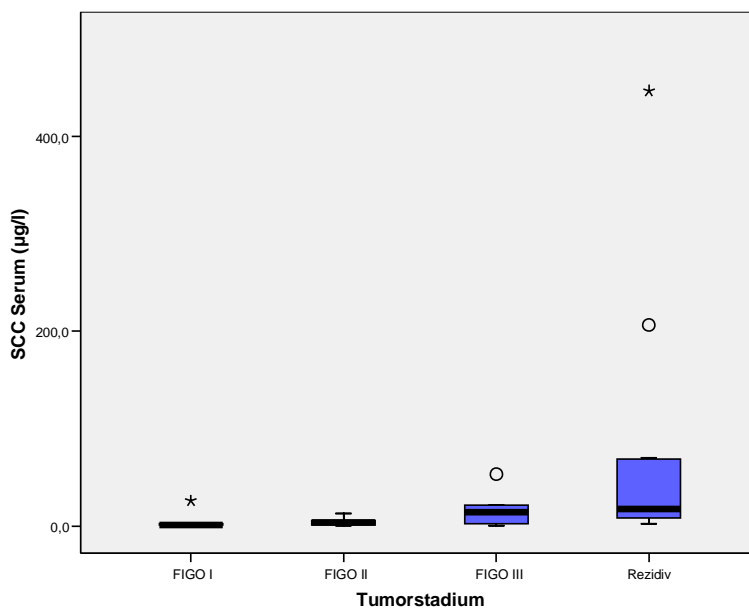


Abb.14: SCC in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

5.6.2 Korrelationen von SCC mit dem Metastasierungsstatus (N/M)

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, unterscheiden sich die medianen SCC-Werte der Patientinnen mit histologisch gesicherten positiven Lymphknoten von denen der Patientinnen ohne nachweisbare Lymphknotenmetastasen. N1-Patientinnen zeigten deutlich erhöhte Werte gegenüber den N0-Patientinnen ($p=0.007$) (Tab.15). Auch die Korrelationsanalyse bewies, dass erhöhte SCC-Werte mit positivem Lymphknotenstatus assoziiert sind ($r_s=0.365$ mit $p=0.044$).

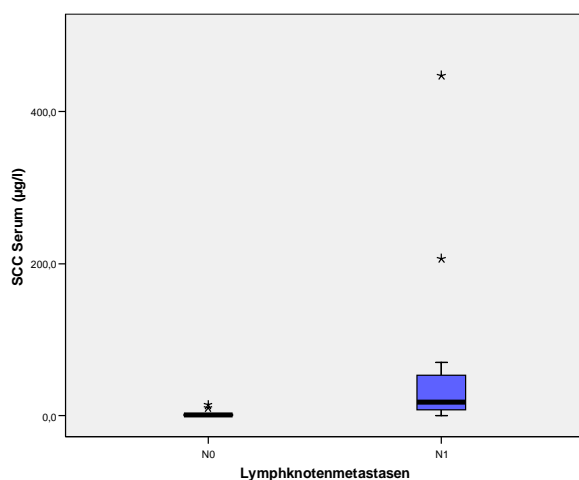


Abb.15: SCC im Nodalstatus N0 und N1.

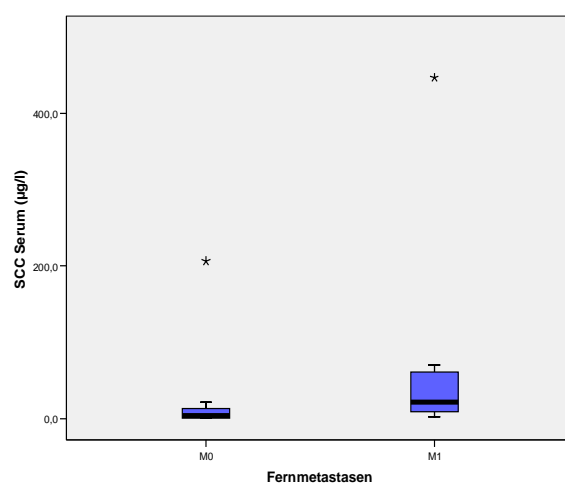


Abb.16: SCC im Status M0 und M1.

Tabelle 15: SCC-Werte entsprechend dem Metastasierungsstatus (N/M).

Subgruppen	n	Median (µg/l)	Mittelwert (µg/l)	Standard abweichung (µg/l)	Bereich (µg/l)
Nodalstatus					
N0	9	0,9	3,6	5,0	0,5 - 14,2
N1	13	17,6	67,7	126,6	0,3 - 447,0
Fernmetastasen					
M0	18	3,6	17,3	47,6	0,3 - 206,4
M1	12	21,8	63,2	123,2	2,2 - 447,0

Wie bereits beim Lymphknotenstatus gezeigt, konnte auch bei der Fernmetastasierung eine Assoziation von erhöhten SCC-Werten mit zunehmender Ausbreitung von Tumorzellen im Körper beobachtet werden ($r_s=0.409$ mit $p=0.022$). Patientinnen ohne Metastasen lagen bei einer medianen Konzentration von 3.6 µg/l SCC, metastasierten Patientinnen bei einer Konzentration von 21.8 µg/l SCC. Patienten mit Fernmetastasierung (M1) wiesen damit deutlich höhere Konzentrationen als M0-Patientinnen auf ($p=0.005$) (Tab.15 und Abb.16).

Auch bei der Analyse von SCC wurde das Patientenkollektiv bezüglich der Metastasierung noch einmal in 3 Gruppen aufgeteilt: Gruppe I ohne Metastasen (N0/M0: n=9; Median: 0.9 µg/l; Mittelwert: 3.6 µg/l; Standardabweichung: ±5.0 µg/l; Bereich: 0.5 – 14.2 µg/l), Gruppe II mit positiven Lymphknoten (N1/M0: n=6, Median: 10.5 µg/l; Mittelwert: 42.3 µg/l; Standardabweichung: ±80.7 µg/l; Bereich: 0.3 – 206.4 µg/l) und Gruppe III mit Fernmetastasen (M1: n=12; Median: 21.8 µg/l; Mittelwert: 63.2 µg/l; Standardabweichung: ±123.2 µg/l; Bereich: 2.2 – 447.0 µg/l). Mit zunehmender Ausbreitung des Tumors im Körper stieg die Konzentration an SCC kontinuierlich an. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den 3 Gruppen wurden als signifikant eingestuft ($p=0.006$).

Sensitivität in den einzelnen Stadien der Metastasierung

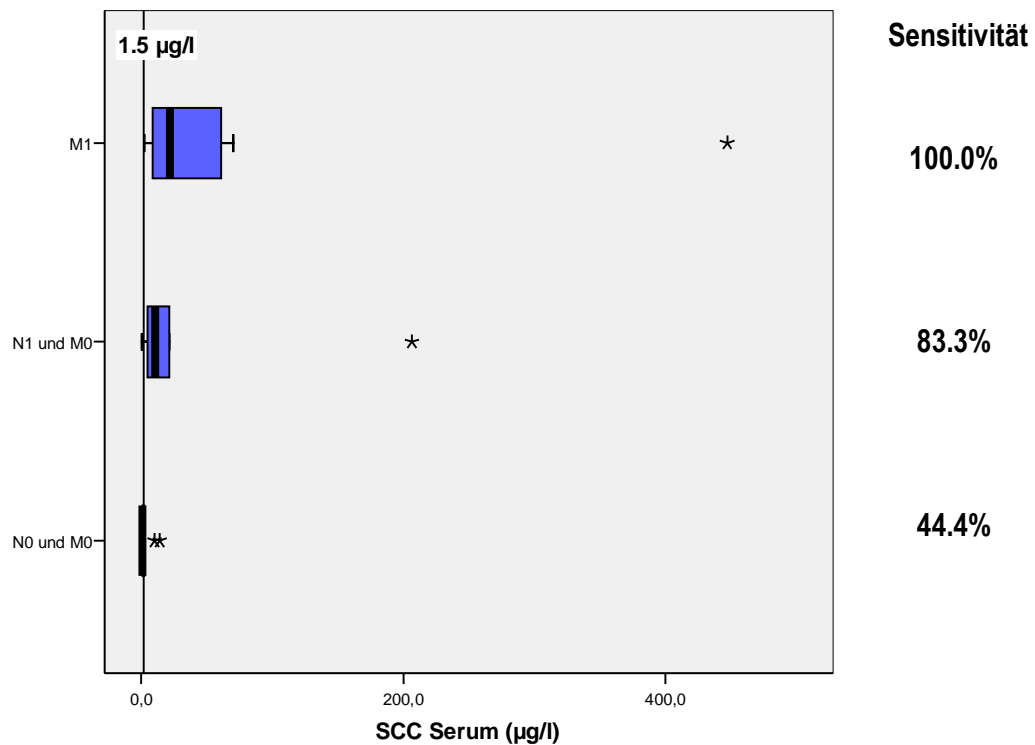


Abb.17: Sensitivität von SCC in den verschiedenen Stadien der Tumorausbreitung.

5.6.3 Korrelationen von SCC mit der Tumorhistologie

Die statistische Analyse der Daten erbrachte des Weiteren eine Signifikanz ($p=0.004$) bezüglich der Histologie des Tumors. Der mediane Wert für das Plattenepithelkarzinom war mit $13.6 \mu\text{g/l}$ SCC ($n=24$; Mittelwert: $44.3 \mu\text{g/l}$; Standardabweichung: $\pm 96.0 \mu\text{g/l}$; Bereich: $0.5 - 447.0 \mu\text{g/l}$) deutlich höher als für das Adenokarzinom/adenosquamöse Karzinom mit $0.7 \mu\text{g/l}$ SCC ($n=5$; Mittelwert: $1.6 \mu\text{g/l}$; Standardabweichung: $\pm 1.6 \mu\text{g/l}$; Bereich: $0.5 - 4.2 \mu\text{g/l}$).

5.7 Korrelation von Tu M2-PK mit SCC beim Zervixkarzinom

Die Werte der zwei Marker, Tu M2-PK und SCC, zeigten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s=0.587$ (Signifikanzniveau von $p=0.01$) eine deutliche Assoziation miteinander ($n=31$, $p=0.001$). Liegen erhöhte Werte der Tu M2-PK vor, so kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch SCC erhöht ist.

Die obere Normwertgrenze (cut-off), welche die Patientinnen mit Zervixkarzinom von denen ohne Karzinom unterscheiden soll, ist 15.0 U/ml für Tu M2-PK und 1.5 $\mu\text{g/l}$ für SCC. Tabelle 16 zeigt die Häufigkeit positiver Resultate (Sensitivität) beider Tumormarker in den einzelnen Krankheitsstadien. In dieser Darstellung wurden nur die Tu M2-PK-Werte berücksichtigt, bei denen ein korrespondierender SCC-Wert verfügbar war ($n=31$).

Tabelle 16: Sensitivität der Tumormarker in den einzelnen Krankheitsstadien (n=31).

Subgruppen	Tu M2-PK > 15 U/ml	Anzahl der Patienten (x/n*)	SCC > 1,5 $\mu\text{g/l}$	Anzahl der Patienten (x/n*)
FIGO I	50,0%	3/6	33.3%	2/6
FIGO II	66,7%	4/6	66,7%	4/6
FIGO III	60,0%	3/5	80,0%	4/5
Rezidiv	100,0%	14/14	100,0%	14/14

* x/n: Anzahl der Patienten (x) in dem einzelnen Krankheitsstadium mit über den angegebenen cut-off-Wert von 15.0 U/ml für Tu M2-PK oder 1.5 $\mu\text{g/l}$ für SCC erhöhten Werten im Verhältnis zu allen (n) in diese Gruppe eingeschlossenen Patienten. In dieser Darstellung fanden nur jene Patienten Berücksichtigung, für die sowohl ein Tu M2-PK als auch ein SCC-Wert verfügbar war ($n=31$).

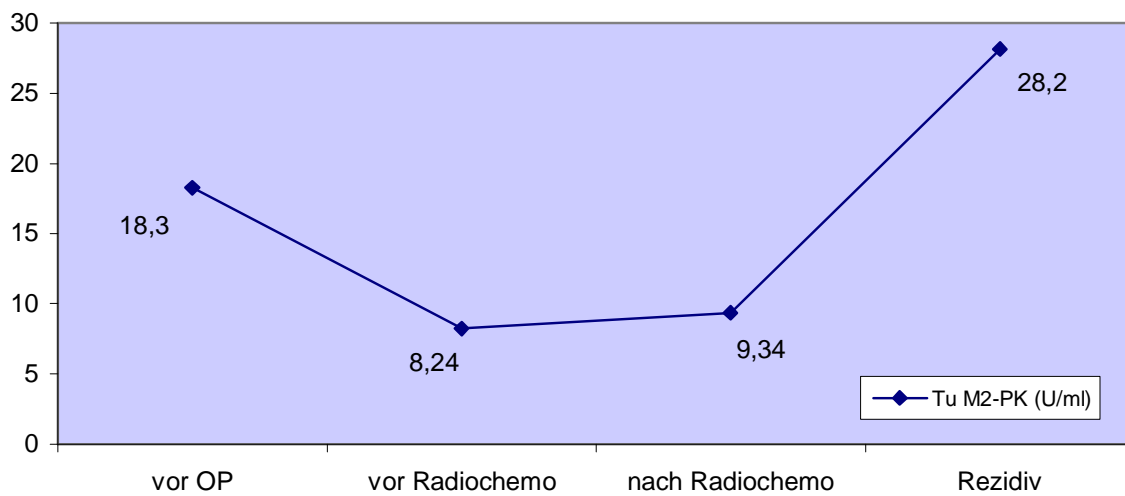
In der Gruppe der Patientinnen mit Stadium I der Erkrankung war Tu M2-PK in 50% der Fälle über dem cut-off, während SCC bei 33.3% erhöht war. Im Stadium II waren beide Marker zu 66.7% über der Norm. Im Stadium III hatten 60% Tu M2-PK-Level über normal, wohingegen 80% erhöhte SCC-Werte aufwiesen. Die Rezidivkrankung zeichnete sich in 100% der Fälle durch Erhöhung sowohl der Tu M2-PK als auch des SCC aus (Tab.16).

Diskrepanzen bezüglich positiver/negativer Resultate wurden in 10 von 31 (32,3%) Patientinnen beobachtet. 5 Patientinnen hatten erhöhte Tu M2-PK-Werte aber normale SCC-Werte, 5 Patientinnen besaßen erhöhte SCC-Werte und normale Tu M2-PK-Werte.

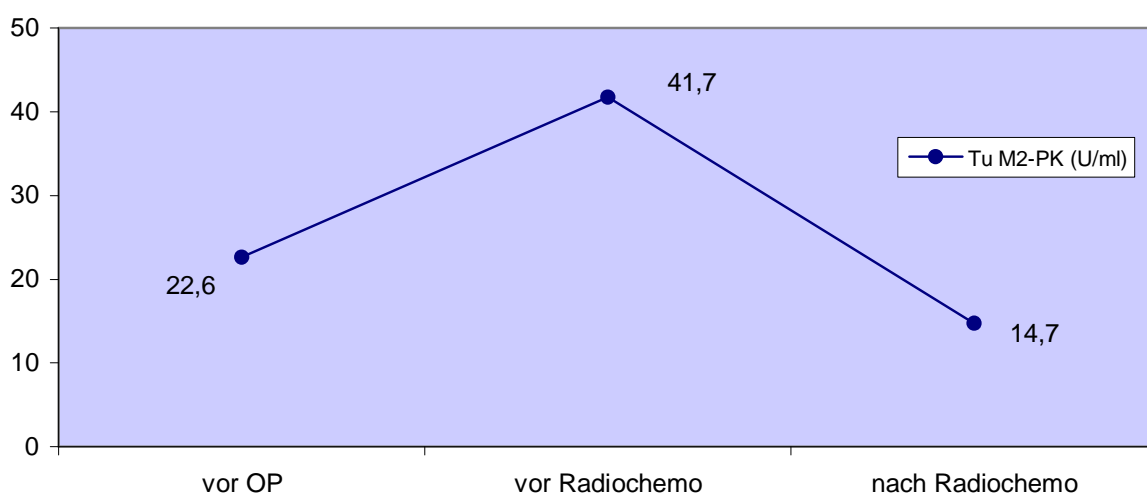
5.8 Tu M2-PK als prädiktiver Faktor beim Zervixkarzinom – Der Marker im Therapieverlauf

Zwei Patientinnen wurden im weiteren Verlauf in die randomisierte Phase III Studie der „Nord-Ostdeutschen Gesellschaft für Gynäkologische Onkologie“ (NOGGO) und der „Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie“ (AGO) zum Vergleich einer sequentiellen mit einer simultanen Radio-Chemotherapie in der adjuvanten Therapie von Patientinnen mit high-risk Zervixkarzinom FIGO IB-IIB eingeschlossen (http://www.noggo.de/html/arbeitsgruppe_zervix-ca.html). Als wissenschaftliches Begleitprogramm wird all diesen Patientinnen vor und nach Therapie sowie bei Rezidivkrankung Blut entnommen und unter anderem in o.g. Weise aufgearbeitet.

Bei der ersten Patientin wurde im Alter von 32 Jahren die Erstdiagnose eines invasiven Zervixkarzinoms im Stadium IIB gestellt. Nach Wertheim-Meigs-Operation sine adnexe mit pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie erhielt sie eine adjuvante Radiochemotherapie mit 4 Zyklen Carboplatin/Paclitaxel (AUC 5/175mg/m²) im Abstand von 21 Tagen, gefolgt von einer Bestrahlung mit insgesamt 50,4 Gy. 20 Monate später kam es zum Rezidiv des Primärtumors im kleinen Becken, woraufhin die Patientin nach einer Gesamtüberlebenszeit von nur 27 Monaten verstarb.

Patientin 1:**Abb.18:** Tu M2-PK in Abhängigkeit vom Stadium der Therapie – 1.Fallbericht.

Nach Entfernung des Tumors sank der Wert deutlich unter den cut-off-Wert von 15 U/ml. Unter Radiochemotherapie zeigte sich der Wert im weiteren Verlauf relativ konstant. Bei Progression der Erkrankung stieg der Marker um das dreifache an (Abb.18).

Patientin 2:**Abb.19:** Tu M2-PK in Abhängigkeit vom Stadium der Therapie – 2.Fallbericht.

Die zweite Patientin erkrankte im Alter von 60 Jahren an einem Zervixkarzinom (Stadium IIB). Der Tumor wurde operativ durch eine Wertheim-Meigs-Operation cum adnexe sowie pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie entfernt. Adjuvant erfolgte auch bei ihr die o.g. sequentielle Radiochemotherapie. 22 Monate nach Erstdiagnose war die Patientin noch rezidivfrei.

Im Gegensatz zu dem ersten Fall stiegen die Tu M2-PK-Werte dieser Patientin nach Entfernung des Primärtumors um fast das doppelte an. Während der Radiochemotherapie kam es dann zu einem signifikanten Rückgang der Konzentration bis unterhalb des cut-off-Wertes (Abb.19).

5.9 Tu M2-PK als prognostischer Marker beim Zervixkarzinom – Survivalanalyse der Patientinnen mit Diagnose „Rezidiv“

Da das Follow-up innerhalb des Krankheitsstadiums „Rezidiv“ aufgrund des Versterbens der Patientinnen an ihrer Erkrankung weitestgehend abgeschlossen war, gestattete dies eine Untersuchung zu möglichen Korrelationen des bei Diagnosestellung gemessenen Plasmaspiegel an Tu M2-PK mit dem Gesamtüberleben, dem krankheitsfreien Intervall (TTP) und der Überlebenszeit mit einem Rezidiv. Zur Survivalanalyse wurde eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, welche Tu M2-PK als Einflussgröße auf die Zeit betrachtet. Um die Ergebnisse mit einem konventionellen Tumormarker vergleichen zu können, erfolgten diese Berechnungen ebenfalls für SCC (n=14).

5.9.1 Gesamtüberleben (OS)

Die univariate Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen Tu M2-PK und dem Gesamtüberleben gibt ($p=0.013$). Erhöhte Tu M2-PK-Werte sind mit einer Verkürzung der Gesamtüberlebenszeit assoziiert (n=23; Odds Ratio: 1.010).

Mit einer Signifikanz von $p=0.025$ ist auch für SCC diese gesteigerte Sterbewahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit über die Norm erhöhte Werte (n=14, Odds Ratio: 1.010) ermittelt worden.

5.9.2 Time to Progression (TTP)

Weder Tu M2-PK ($p=0.215$; $n=21$) noch SCC ($p=0.537$; $n=11$) waren signifikant mit der Dauer des krankheitsfreien Intervalls verbunden.

5.9.3 Überlebenszeit mit Diagnose Rezidiv

Obwohl die Tu M2-PK-Konzentrationen tendenziell höher waren bei Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit, konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden ($p=0.054$; $n=23$; Odds Ratio: 1.011).

Im Gegensatz dazu SCC, für welches ein Zusammenhang mit der Überlebenszeit nach Diagnose Rezidiv gefunden werden konnte. War die SCC-Konzentration erhöht, stieg auch die Sterbewahrscheinlichkeit signifikant an ($p=0.016$, $n=14$; odds ratio: 1.009).

6. Diskussion

6.1 Das Patientenkollektiv

Das invasive Zervixkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau. Bis zu einer halben Million Neuerkrankungen werden pro Jahr diagnostiziert, wobei die Mehrzahl der Frauen in niedriger entwickelten Ländern lebt [35]. Nach Schätzung der „Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister“ beläuft sich die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland auf ca. 6500 Fälle. Das sind 3.4% aller weiblichen Krebserkrankungen und Platz neun in der Rangfolge der Inzidenzen [3].

Typischerweise treten invasive Zervixkarzinome bei älteren Frauen auf. Doch werden derzeit etwa 20-25% der Tumore bei jungen Frauen bis zum 35. Lebensjahr beobachtet [7]. Nach Angaben des Tumorregisters München (TRM) erkranken 80% im Alter zwischen 35 und 79 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in dieser Region bei 54.1 Jahren [22].

In die Studie zur Evaluation der Tumor M2-Pyruvatkinase als prognostischer Marker beim Zervixkarzinom wurden zwischen 2002 und 2005 vorwiegend Frauen aus der Region Berlin-Brandenburg aufgenommen. Betrachtungen bezüglich der Altersverteilung ergaben einen Mittelwert von 47 Jahren bei Neuerkrankung. 82.4% der Frauen waren im Alter zwischen 35 und 79 Jahren. Jünger als 35 Jahre waren 13.7% (Tab.3).

Präkanzerose des Zervixkarzinoms ist die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN), aus der sich in einer Zeit von mindestens 10 Jahren der Tumor entwickeln kann [29]. Im Jahre 1970 belief sich die Rate der Neuerkrankungen an einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie im Ostteil der Stadt Berlin (ehemalige DDR) noch auf 0.04%. 10 Jahre später bereits auf 0.1%. Im Jahr des Mauerfalls 1989, dem Ende des Beobachtungszeitraumes, war dann eine Inzidenzrate von 0.39% zu verzeichnen. Von 0.016% auf 0.25% stieg sie allein für die CIN III über diesen Zeitraum [8]. Heute wird für die schwergradige Präkanzerose die Neuerkrankungsrate mit knapp 1.0% angegeben [29]. Der stete Anstieg der Inzidenz für zervikale Präkanzerosen lässt sich natürlich unter anderem auch durch die Einführung des Vorsorge-Screenings erklären.

Vorwiegend Frauen um das 35. Lebensjahr herum sind von einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie betroffen [81]. Auswertungen der Berliner Studie zufolge sank das durchschnittliche Alter einer CIN III-Patientin zwischen 1970 und 1989 von 39.5 auf 33 Jahre [8]. Untersuchungen an unserem Patientenkollektiv ergaben sowohl für die gesamte Subgruppe der

Präkanzerosen als auch für die CIN III-Patientinnen im Einzelnen einen mittleren Alterswert von 36 Jahren (Tab.3).

Die Stadieneinteilung des invasiven Zervixkarzinoms erfolgt nach den Richtlinien der „Fédération Internationale de Gynécologie et d`Obstétrique (FIGO)“ [68]. Von 1236 Frauen, die seit 1988 im Raum München an einem Karzinom der Cervix uteri erkrankt waren, wurden 52.2% im FIGO-Stadium I diagnostiziert. 26.1% der Patientinnen waren an einem Tumor im Stadium II, sowie 15.2% an einem Tumor im Stadium III erkrankt. 6.5% hatten bereits ein fortgeschrittenes Karzinom im Stadium IV [22]. Mit 43.2% der Patientinnen diagnostiziert im FIGO-Stadium I, 25.5% im Stadium II als auch III, sowie 5.9% im Stadium IV zeigte die Stadienverteilung im hier zugrunde liegenden Patientengut mit zunehmendem Tumorstadium einen vergleichbaren Rückgang der Häufigkeiten (Tab.2).

Unter den invasiven Zervixkarzinomen ist das Plattenepithelkarzinom mit 81.4% der häufigste Karzinomtyp. Am zweithäufigsten ist mit 15.4% das Adenokarzinom (inkl. adenosquamöses Karzinom), dessen Anteil in den letzten Jahren zugenommen hat. Andere Karzinomtypen sind mit 3.2% weitaus seltener [22]. An unserem Patientenkollektiv konnten beinahe identische Zahlen beobachtet werden. Das Plattenepithelkarzinom stand mit 77.3% an erster Stelle. Das Adenokarzinom und das adenosquamöse Karzinom kamen gemeinsam auf 17.4%. Das kleinzellige und das klarzellige Karzinom kamen unter der Rubrik „andere Karzinome“ auf 2.7% (Tab.4).

Bezüglich des Gradings, dem Differenzierungsstadium des Tumors, werden nach den Daten des Tumorregisters München 11.9% aller Zervixkarzinome einem hochdifferenzierten Karzinomstadium (G1) zugeordnet. 53.3% der Tumore sind mäßig differenziert (G2), 34.8% wenig differenziert (G3) [22]. Auch hier konnten wir ähnliche Zahlen feststellen. So fielen 2.7% in die Gruppe der G1-Tumore, 50.7% in die Gruppe der G2-Tumore und 41.3% der Tumore waren laut Definition der G3-Tumore ohne eindeutige Differenzierung (Tab.4).

Die Patientenkohorte des Tumorregisters München gibt den derzeit besten epidemiologischen Stand für das Karzinom der Cervix uteri an. Der Vergleich unseres Patientenkollektivs mit Auswertungen des TRM (n=1236) bezüglich Altersverteilung, Stadieneinteilung, Histologie und Grading hat gezeigt, dass unser Kollektiv bestehend aus 75 invasiven Zervixkarzinomen eine der Münchner Kohorte ähnelnde Struktur besitzt und damit trotz der relativ geringen Fallzahl als repräsentativ einzustufen ist.

6.2 Der Tumormarker

6.2.1 Etablierte Tumormarker beim Zervixkarzinom

Der ideale Tumormarker sollte eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzen, um Tumorpatienten von gesunden Personen oder Patienten mit benignen Erkrankungen eindeutig unterscheiden zu können. Er sollte in Konzentrationen proportional zur Tumorlast und Aktivität des Tumorwachstums ins Blut abgegeben werden.

Eine Anzahl Studien hat gezeigt, dass SCC, CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9 und CA 125 von Bedeutung für Prognose, Follow-up und Rezidivdetektion eines Tumors der Cervix uteri sein können [24]. In den TM-Leitlinien werden zur Therapieüberwachung und Rezidivfrüherkennung allein SCC und CEA beim Zervixkarzinom genannt. Diese beiden Marker werden dort zwar empfohlen, ihr klinischer Nutzen ist aber als fraglich deklariert. Auch eine effektive Anwendung zur Früherkennung des Karzinoms sei nicht gegeben [107].

6.2.2 Tu M2-PK als neuer Marker bei proliferierenden Erkrankungen

Untersuchungen bei menschlichen Tumoren ergaben, dass Tumorzellen die dimere Form des Isoenzym der Pyruvatkinase Typ M2 überexprimieren. Die Malignität des Tumors korreliert dabei mit dem Gehalt an Tu M2-PK [21]. Die Arbeitsgruppe von Eigenbrodt eliminierte monoklonale Antikörper, um ein sensitives Immunoassay zur quantitativen Determinierung der Tu M2-PK im Blut zu entwickeln. Eine erste größere Studie bei Patienten mit Lungenkarzinom zeigte, dass der Nachweis dieses Isoenzym nicht nur zur Therapiekontrolle, sondern auch zur Erkennung eines Tumors hilfreich sein kann. Bei anderen Tumoren, wie den Mamma-, Prostata-, Magen-, Kolon- und Rektumkarzinomen war ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Markerkonzentrationen messbar [80].

In den letzten Jahren wurden weitere Studien auch bei anderen Tumoren zur Eignung der Tu M2-PK als frühzeitige Nachweismethode durchgeführt. Bei vielversprechenden Ergebnissen folgten Untersuchungen zu Korrelationen mit etablierten Tumormarkern, zum Nutzen als prognostischer Marker bzw. als Verlaufsparemeter während der Tumorthapie.

Bislang liegen positive Resultate zum Zervixkarzinom [38], Ovarialkarzinom [1], Mammakarzinom [31,47,48,91,98], Lungenkarzinom [79,83-87,89], Nierenzellkarzinom [28,66,67,76-78,104-106], zum Pankreaskarzinom [14,61,102], Gastrointestinalen Karzinom [19,26,39,49,82,88,90,108] und zum Melanom [100] vor. Beim Schilddrüsenkarzinom [6], den neuroendokrinen Tumoren [70] und hämatologischen Tumorerkrankungen [64,93], dem

Hodenkarzinom [71], sowie dem Blasen- und Prostatakarzinom [28,78] zeigte die Tu M2-PK dagegen eine ungenügende Sensitivität in der Diskriminierung benignen und malignen Erkrankungen und ist somit für die Diagnostik dieser Tumore nur von geringer Wertigkeit.

Die guten Ergebnisse bei einigen Tumoren sowie das Fehlen eines optimalen Tumormarkers beim Zervixkarzinom haben uns veranlasst, die Tu M2-PK bei benignen und malignen Läsionen der Cervix uteri zu untersuchen. Wir haben Tu M2-PK mit dem etablierten Tumormarker SCC-Antigen verglichen und es auf eine prognostische Bedeutung hin evaluiert.

6.3 Evaluation der Tu M2-PK als Tumormarker beim Zervixkarzinom

Um Tu M2-Pk als Tumormarker im Blut bei Patientinnen mit Zervixkarzinom zu beurteilen, analysierten wir den Marker im Plasma bei Frauen mit einer Präkanzerose, einem Karzinom oder einem Rezidiv des Zervixkarzinoms. Dieses Vorgehen gab uns die Möglichkeit, Sensitivität und Spezifität zu bestimmen, sowie das Potential als Marker für Tumorstadium, Metastasierungsstatus, histologische Ausprägung und Prognose zu prüfen.

6.3.1 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Krankheitsstadien

In unserer Studie konnten wir eine Sensitivität der Tu M2-PK gegenüber dem Zervixkarzinom nachweisen. Wir beobachteten signifikant ($p < 0.001$) erhöhte Plasmalevel bei Patientinnen mit einem Karzinom gegenüber Patientinnen mit einer benignen Läsion, der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN). Innerhalb der Gruppe mit einem invasiven Karzinom konnte noch einmal ein signifikanter Anstieg ($p < 0.001$) bei Frauen mit einem Rezidiv gegenüber Ersterkrankung festgestellt werden (Tab.7). In der einzigen Publikation zur Tu M2-PK bei Erkrankungen des Gebärmutterhalses wurden 50 Frauen mit einem Tumor, 10 Frauen mit einer chronischen Zervizitis und 10 gesunde Frauen miteinander verglichen. Auch hier wird von einem statistisch signifikanten Werteunterschied zwischen Gesund/Benigne und Karzinom berichtet [38].

Der vorläufige cut-off-Wert, der vom Hersteller des Assays empfohlen wird, beträgt 15 U/ml (Spezifität 90%) mit 15-20 U/ml als Grauzone. Kaura *et al.* wählte für sein Patientenkollektiv einen cut-off von 17 U/ml, um maligne Läsionen von nicht-malignen Erkrankungen

unterscheiden zu können. Unter diesen Bedingungen belief sich die Sensitivität auf 82%, jedoch mit einer Spezifität von nur 60% [38]. In unserem Patientenkollektiv ergab sich für einen cut-off-Wert von 15 U/ml eine diagnostische Sensitivität von 65.3% und eine Spezifität von 86%. Um bei der hier zugrundeliegenden Population eine Spezifität des Tests von 90% bieten zu können, müsste ein cut-off-Wert von 16 U/ml gewählt werden. In diesem Fall läge die Sensitivität dann bei 64%.

Mit einer Spezifität um 90% wurden die besten Sensitivitäten von bis zu 70% bisher bei den gastrointestinalen Tumorerkrankungen ermittelt [26,39,90,108]. Demgegenüber stehen die hämatologischen Tumore mit einer Spezifität von 59% und einer Sensitivität von 51% bei einem cut-off von 15 U/ml [93].

Aus unseren Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass der Marker Tu M2-PK zur Differenzierung zwischen prämaligen und malignen Läsionen der Cervix uteri herangezogen werden kann.

6.3.2 Korrelationen von Tu M2-PK mit den Tumorstadien

Um die Frage zu klären, ob eine Korrelation des potentiellen Tumormarkers mit dem Tumorstadium und der lokalen Tumorausbreitung vorliegt, teilten wir die Patientinnen bezüglich ihres FIGO-Stadiums noch einmal auf drei Gruppen auf. Wie in Abbildung 6 anhand von Box-Plots dargestellt, ist mit fortschreitendem Tumorstadium eine zunehmende Konzentration an Tu M2-PK zu beobachten (Korrelationskoeffizient $r_s=0.678$). Patienten im Stadium III und IV haben einen höheren Wert als Patienten im Stadium I, wenn auch das Signifikanzniveau von 5 % ($p=0.055$) nicht erreicht wurde. Bei Kaura *et al.* wurde aufgrund zu geringer Fallzahlen im FIGO-Stadium I und IV keine Analyse bezüglich der Tumorstadien durchgeführt. Dennoch wird auch hier zumindest von einer Tendenz gesprochen, dass Patienten im Stadium III höhere Werte als in Stadium II besitzen [38].

Die Sensitivität des Tumormarkers stieg von 40.9% in FIGO-Stadium I über 53.8% und 68.8% in Stadium II und III/IV auf 91.7% bei Patienten mit Rezidiv eines Zervixkarzinoms an (Abb.8). Eine strenge Korrelation der Tu M2-PK mit dem Tumorstadium und Anstieg der Sensitivität des Markers von 60% im Robson-Stadium I&II auf 100% in Robson-Stadium IV konnte Wechsel *et al.* auch beim Nierenzellkarzinom beobachten [104]. Des weiteren fand Schneider *et al.* auch

beim Lungenkarzinom mit Progression der Tumorstadien zunehmende Markerkonzentrationen sowie ansteigende Sensitivitäten auf bis zu 67% in Stadium IV [89].

Die Tu M2-PK Konzentration im Plasma von Patientinnen mit Zervixkarzinom ist streng mit dem Tumorstadium assoziiert.

6.3.3 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Metastasierungsstatus

Ein weiteres Ziel dieser Studie war, die Korrelation der Tu M2-PK mit der Ausdehnung der malignen Erkrankung (Lymphknotenmetastasierung (N) und Fernmetastasierung (M) des Zervixkarzinoms) zu untersuchen.

Bezogen auf den Nodalstatus (N), so war die Tu M2-PK-Konzentration in der Gruppe der Patientinnen mit positiven Lymphknoten (N1) signifikant höher ($p=0.028$) als in der Gruppe mit negativen Lymphknoten (N0) (Tab.10). Eine signifikante Korrelation zwischen hohen Tu M2-PK Werten und positiven Lymphknoten wurde bisher nur beim Mammakarzinom beschrieben [98].

Ein hochsignifikanter Unterschied ($p<0.001$) konnte auch bei Einteilung des Patientenkollektivs bezüglich der Fernmetastasierung beobachtet werden. Die Tu M2-PK-Werte waren deutlich erhöht in der Gruppe der metastasierten Zervixkarzinom-Patientinnen (M1) im Vergleich zu nicht-metastasierten Patientinnen (M0) (Tab.10). Selbiges konnte auch beim Nierenzellkarzinom [77], Mammakarzinom [91] sowie den gastrointestinalen Tumoren [39,90,108] festgestellt werden. Untersuchungen beim Hodenkarzinom ergaben dagegen keinen Unterschied zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumorstadien [71].

Um die Korrelation zwischen Tu M2-PK und dem Ausmaß der malignen Erkrankung noch genauer zu untersuchen, wurden die Karzinompatientinnen in drei Gruppen mit zunehmender Tumorausdehnung aufgeteilt: N0/M0; N1/M0 und N1/M1. Auch wenn eine statistische Signifikanz mit $p=0.52$ knapp verfehlt wurde, zeigten Nodal-positive, nicht-fernmetastasierte Frauen höhere Konzentrationen an Tu M2-PK als Nodal- und Fernmetastasen-negative Frauen. Deutlich signifikant ($p<0.001$) dagegen war der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen und Nodal-positiven Patientinnen mit Fernmetastasierung. Eine vergleichbare Korrelation zwischen Tu M2-PK und diesen drei Stadien der Tumorausdehnung im Körper stellten Cerwenka *et al.* und Ventrucci *et al.* auch beim Pankreaskarzinom fest [14,102].

Mit zunehmender Metastasierung des Zervixkarzinoms kam es somit nicht nur zu einem Anstieg des Tumormarkers sondern auch zu einem Anstieg seiner Sensitivität. Von 47.8% im N0/M0-Status über 55.6% im N1/M0-Status stieg die Sensitivität der Tu M2-PK auf 100% im M1-Status (Abb.11). Roigas *et al.* beobachtete beim Nierenzellkarzinom einem Unterschied in der Sensitivität um rund 40% zwischen M0- und M1-Patienten [77]. Mit nur 3-8% fiel der Unterschied bei den gastrointestinalen Tumoren dagegen nur sehr gering aus [90].

Des Weiteren scheinen zervikale Lymphgefäß- und Veneninvasion (L/V) keinen Einfluss auf die Höhe der Tu M2-PK-Spiegel bei Patientinnen mit Gebärmutterhalskrebs zu haben.

Die Konzentration der Tu M2-PK steigt mit zunehmender Ausdehnung und Metastasierung des Zervixkarzinoms an.

6.3.4 Korrelationen von Tu M2-PK mit der Tumorhistologie

Die Analyse bezüglich der histopathologischen Ausprägung der zervikalen Tumore zeigte, dass bei Plattenepithelkarzinomen gegenüber Adenokarzinomen im Mittel höhere Konzentrationen ($p=0.035$) zu verzeichnen sind (Abb.12). Im Gegenteil dazu die Lungenkarzinome, bei denen Schneider *et al.* höhere Plasmaspiegel unter den Adenokarzinomen im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen bestimmt hat [89]. Nach einer weiteren Studie kam er jedoch zu dem Entschluss, dass eher kein Einfluss des histologischen Tumortyps auf die Tu M2-PK-Konzentration im Plasma anzunehmen ist [83]. Bei Karzinomen der Niere [76,104] und des Hodens [71] konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den histopathologischen Subtypen gefunden werden. Der Vergleich Adenokarzinome *versus* adenosquamöse Karzinome sowie Plattenepithelkarzinome *versus* adenosquamöse Karzinome blieb auch in unserem Patientenkollektiv ohne signifikantes Ergebnis.

Auch wenn beim Nierenzellkarzinom kein Einfluss des histologischen Typs beobachtet werden konnte, wird doch von einer negativen Korrelation zwischen Tu M2-PK und der Differenzierung des Tumors gesprochen. Roigas *et al.* fand in G3-Neoplasmen signifikant höhere Werte als in G2-Neoplasmen [76]. Dies bestätigte Wechsel *et al.*, indem er von einem Anstieg der Sensitivität von 50% bei den G1-Tumoren, auf 70% bei den G2-Tumoren und weiter bis auf 86% bei G3-Tumoren berichtet [104]. Des weiteren zeigten auch Patientinnen mit einem invasiven Ovarialkarzinom signifikant erhöhte Tu M2-PK-Konzentrationen in späten Tumorstadien mit gering differenzierten Tumoren im Vergleich zu frühen Tumorstadien mit gut differenzierten

Tumoren [1]. Zwischen den Differenzierungsstadien des Zervixkarzinoms kam es zu keinem nennenswerten Unterschied (Tab.11).

Die Konzentration der Tu M2-PK ist mehr oder weniger unabhängig vom histologischen Tumortyp, zeigt dafür aber eine Korrelation mit dem Tumorstadium. Das lässt vermuten, dass die Konzentration im Plasma eher die Größe und das Wachstum des Tumors reflektiert als dessen morphologische Differenzierung. Diese Hypothese veranlasste Schneider *et al.*, Tu M2-PK im Therapie-Monitoring und Follow-up von Lungentumoren einzusetzen und zu untersuchen [83,85].

Plattenepithelkarzinome der Cervix uteri haben höhere Markerspiegel als Adenokarzinome. Die Differenzierung der Tumore scheint ohne Einfluss zu sein.

6.3.5 Korrelationen von Tu M2-PK mit dem Grad der Präkanzerose und dem HPV-Status

Der Austausch gewebe-spezifischer Isoenzyme durch die M2-Pyruvatkinase stellt einen der ersten Schritte in der Karzinogenese dar [20,101]. Im weiteren Verlauf nimmt die Expression der M2-PK weiter zu. Um den Anforderungen des Tumorstoffwechsels gerecht zu werden, schaltet sie in ihrer Struktur zwischen der tetrameren und dimeren Form hin und her.

Die tetramere Form zeichnet sich durch eine hohe Enzymaktivität und Affinität zum Substrat Phosphoenolpyruvat aus und ist Bestandteil des glykolytischen Enzymkomplexes, welcher an der Energiegewinnung durch Umsatz von Pyruvat zu Laktat beteiligt ist. Geringe Aktivität und Affinität zeigt indessen die dimere Form der Pyruvatkinase (Tu M2-PK), aus der eine Zunahme des Phosphometabolitpools resultiert. Phosphometabolite wie z.B. Fruktose 1,6-diphosphat, Glycerat 3-phosphat und Phosphoenolpyruvat stehen dann der verstärkten Biosynthese schnell proliferierender Tumorzellen zur Verfügung (Abb.2) [50].

Das E7-Onkoprotein des Humanen Papilloma Virus Typ 16 bindet direkt an die M2-PK und führt somit zu einer Umwandlung der tetrameren in die dimere Form. Die Expression von E7 nimmt auf diese Weise maßgeblich Einfluss auf die enzymatische Aktivität der M2-PK und den Konzentrationsanstieg intrazellulärer, für biosynthetische Prozesse essentielle, Phosphometabolite.

Erhöhte Fruktose 1,6-diphosphat-Spiegel führen zu einer Re-Dissoziation der dimeren in die tetramere Form der Pyruvatkinase. In E7-exprimierenden Zellen ist dagegen ein mehr als

zweifacher Konzentrationsanstieg des Fruktose 1,6-diphosphates notwendig, um diesen Schritt zu initiieren. Dies stützt die These, dass das E7-Onkogen des HP-Virus für die Stabilisierung der Tu M2-PK verantwortlich ist [50,110].

Wenn Onkogene der „High-risk“- HP-Viren zur Bildung als auch Stabilisierung der dimeren M2-PK führen, lässt dies eine höhere Tu M2-PK-Konzentration bei HPV High-risk-positiven Patienten im Vergleich zu HPV negativen Patienten vermuten. Innerhalb unseres Patientenkollektivs mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.207$). Die Subgruppenanalysen zum Grad der Präkanzerose zeigten ebenfalls keine nennenswerten Konzentrationsunterschiede zwischen CIN I/II und III, weder bei HPV positivem noch bei HPV negativem Befund (Tab.12).

Dass erhöhte Tu M2-PK-Konzentrationen zu stärkerer Akkumulation von Phosphometaboliten und daraufhin zu höhergradiger Proliferation von Tumorzellen führen, konnte somit auf dem Niveau der zervikalen intraepithelialen Neoplasien nicht gezeigt werden. Kritisch anzumerken sind hierbei die kleinen Fallzahlen, die eine aussagekräftige Statistik kaum zulassen.

Die Konzentration der Tu M2-PK nimmt scheinbar nicht mit dem Grad der zervikalen intraepithelialen Neoplasie zu. Es sind keine höheren Tu M2-PK-Konzentration bei HPV High-risk-positiven Befund nachweisbar.

6.4 Tu M2-PK und SCC in der Diagnostik des Zervixkarzinoms

6.4.1 SCC als etablierter Tumormarker beim Zervixkarzinom

SCC ist eine Untereinheit des TA-4-Antigens, welche bei Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden konnte [37]. Erhöhte Antigen-Konzentrationen konnten in 27-87.7% der Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri gefunden werden. Die große Spannweite ist auf die unterschiedlich gewählten cut-off-Werte für SCC (Bereich: 1.9-2.8 $\mu\text{g/l}$) in den Untersuchungen zurückzuführen. Auch wenn der klinische Nutzen als fraglich bezeichnet wird, ist es momentan der am häufigsten verwendete Tumormarker beim Zervixkarzinom [24].

Schon in frühen Studien wurde gezeigt, dass der SCC-Spiegel im Serum signifikant mit dem Tumorstadium und der Ausdehnung der Erkrankung assoziiert ist [15,16,36]. Bruijn *et al.* fand bei einem gewählten cut-off-Wert von $\leq 1.9 \mu\text{g/l}$ eine Sensitivität für das Zervixkarzinom von

55%. Die Sensitivität stieg von 37.8% im FIGO-Stadium IB auf 83.3% im FIGO-Stadium IV an [13].

Eine stete Zunahme der Konzentration mit dem Tumorstadium konnten wir auch in unserer Analyse von 31 Frauen beobachten (Tab.14). So besaßen 33% der Patientinnen im Stadium I über den cut-off-Wert von $\leq 1.5 \mu\text{g/l}$ erhöhte Werte. Der Anteil stieg auf bis zu 80% im Stadium III und erreichte sogar 100% bei den Patientinnen mit einem Rezidiv (Tab.16).

Des Weiteren ist ein Zusammenhang auch zwischen SCC und dem Lymphknotenstatus beschrieben. Der Lymphknotenstatus ist einer der wichtigsten Parameter in frühen Tumorstadien des Zervixkarzinoms bezüglich Therapie und Prognose. Erhöhte SCC-Werte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind mit positiven Lymphknoten assoziiert ($p < 0.001$) [10,17,45,96,97].

Einige Autoren schlagen einen höheren cut-off-Wert vor, um Patienten mit einer Lymphknotenmetastasierung oder einem bestehenden Risiko sicherer identifizieren zu können. Takeshima *et al.* berichtete bei einem cut-off von $4 \mu\text{g/l}$ eine Sensitivität von 59.1% und eine Spezifität von 93.9%. 65% der Patienten mit einem SCC-Wert $> 4 \mu\text{g/l}$ hatten einen positiven Nodalstatus. Bei einem Wert von $> 4 \mu\text{g/l}$ war damit das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung um den Faktor 8 erhöht [97]. Bolger *et al.* fand bei einem Grenzwert von $8.6 \mu\text{g/l}$ sogar einen positiven prädiktiven Wert von 100%, allerdings bei einer Sensitivität von nur 23% in diesem Bereich [10]. Laut einer weiteren Studie an 653 Frauen kann SCC auch als Vorhersageparameter einer nodalen Metastasierung dienen und somit helfen, Patienten mit schlechter Prognose frühzeitig zu entdecken und einer gezielten Therapie zuzuführen [17].

Unter Berücksichtigung der niedrigen Fallzahlen in unserer Studie, konnten wir mit zunehmender Ausbreitung des Tumors dennoch eine signifikante Zunahme der medianen SCC-Konzentrationen beobachten (Tab.15). 44% der nicht-metastasierten Patientinnen hatten über $1.5 \mu\text{g/l}$ erhöhte Werte. Dieser Anteil stieg auf 83.3% unter den Frauen mit N1/M0-Status und erreichte sogar 100% bei Fernmetastasierung (Abb.17).

SCC zeigt ferner eine Relation zu Histologie und Morphologie des Tumors. Die Plattenepithelkarzinome besitzen höhere Level als andere histologische Formen ($p < 0.001$) [46,57]. Mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Plattenepithelkarzinomen und den Adenokarzinomen/adenosquamösen Karzinomen konnten wir dieses Ergebnis bestätigen.

Bezüglich der Differenzierung, so werden höhere SCC-Konzentrationen eher bei hochdifferenzierten Tumoren im Vergleich zu den weniger oder kaum differenzierten Tumoren gesehen [15,40].

6.4.2 Vergleich von Tu M2-PK und SCC in der Diagnostik des Zervixkarzinoms

In Studien zur Evaluation der Tu M2-PK wurde sich oft die Frage gestellt, ob ein Vorteil des neuen Tumormarkers gegenüber etablierten Tumormarkern besteht.

Schneider *et al.* beobachtete beim Vergleich der Sensitivitäten zur Detektion des Lungenkarzinoms, dass Tu M2-PK mit einer Sensitivität von 58% gegenüber CYFRA 21-1 (Sensitivität 48%), CEA (Sensitivität 39%) und SCC (Sensitivität 27%) die größte Effizienz besitzt. Während Tu M2-PK höhere Konzentrationen im Stadium III und IV gegenüber Stadium I aufwies, zeigte SCC keine gute Korrelation mit dem Tumorstadium [89].

Eine im Durchschnitt höhere diagnostische Sensitivität als CEA, CA 19-9 und CA 72-4 fand auch Schulze bei der Analyse verschiedener gastrointestinaler Tumorentitäten [90]. Den Wert des Thyreoglobulins in der Diagnostik des Schilddrüsenkarzinoms konnte Tu M2-PK dagegen nicht überbieten [6]. Ähnlich bei den neuroendokrinen Tumoren, bei denen Tu M2-PK zwar eine dem Chromogranin A vergleichbare Sensitivität, bei jedoch signifikant niedrigerer Spezifität zeigte [70].

Bei den Untersuchungen zum Zervixkarzinom stiegen mit zunehmendem Tumorstadium sowohl mediane Konzentration als auch diagnostische Sensitivität beider Marker an. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s=0.678$ ($p<0.001$) bewies Tu M2-PK eine bessere Assoziation mit den Krankheitsstadien als SCC mit $r_s=0.585$ ($p<0.001$). Während 33.3% der Patientinnen in Stadium I erhöhte SCC-Werte aufwiesen, waren es bei Tu M2-PK 40.9%. In den fortgeschrittenen Tumorstadien waren dagegen bei 80% der Patientinnen die SCC-Werte erhöht, im Vergleich zu 68.7% mit erhöhten Tu M2-PK-Werten. Unter den Rezidiven besaß das SCC in unserem Patientenkollektiv eine Sensitivität von 100%. Die Pyruvatkinase kam auf etwas geringere 91.7%. Die Korrelationsanalyse von Tu M2-PK und SCC bestätigte noch einmal, dass eine strenge Assoziation der beiden Marker miteinander vorliegt ($r_s=0.587$ mit $p<0.001$) (Abb.20).

Diagnostische Sensitivität von SCC und Tu M2-PK in Abhängigkeit vom Tumorstadium

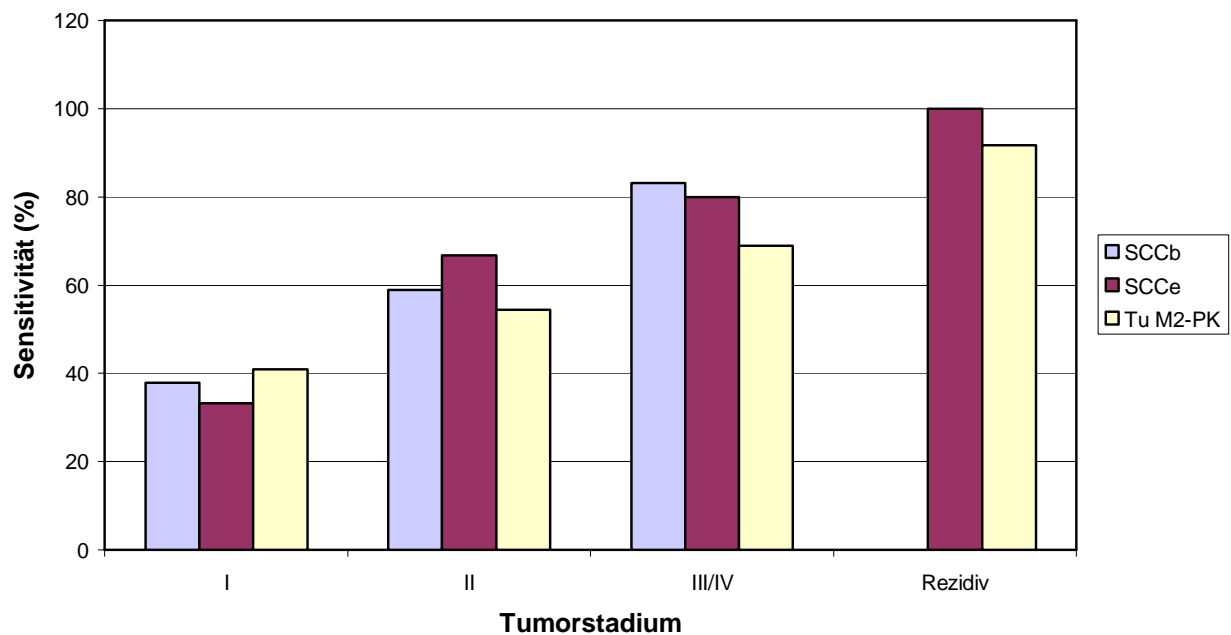


Abb.20: Die Abbildung gibt einen Überblick über die diagnostischen Sensitivitäten in den einzelnen Tumorstadien. Mit ansteigendem Tumorstadium nimmt die diagnostische Sensitivität von SCC und Tu M2-PK zu. Da uns eigene SCC-Werte von nur 31 Patientinnen zu Verfügung standen (SCCe), haben wir die Ergebnisse der Studie von Bruijn *et al.* mit 538 Patientinnen vergleichend dazugenommen (SCCb: aus Bruijn 1998 [13]). Erstaunlich sind die nahezu identischen Zahlen bezüglich SCC, die unserem Patientenkollektiv Repräsentativität zugestehen lassen.

Auch wenn die Gesamt-Sensitivität von 65.3% im Vergleich zu SCC mit 77.4% geringer ist, zeigt Tu M2-PK eine bessere Sensitivität in frühen Tumorstadien. Eine Sensitivität von 40.9% bei 90%iger Spezifität ist allerdings nicht ausreichend, um Tu M2-PK als neuen Screeningparameter beim Zervixkarzinom ins Gespräch zu bringen.

SCC ist ein Marker des Plattenepithelkarzinoms [46,57]. Wie mehrere Studien ergeben haben, scheint Tu M2-PK dagegen keinen histopathologischen Subtypen zugeordnet werden zu können [71,76,83,104]. Dies dürfte der zugrundeliegende biologische Mechanismus des Isoenzym-Shifts in Tumorzellen erklären, der sich in allen Tumorzellen gleich vollziehen könnte. Dennoch haben wir korrespondierend zu SCC höhere Werte bei den Plattenepithelkarzinomen gefunden ($p=0.035$). Da es bislang die einzigen Ergebnisse dieser Art sind, bleibt abzuwarten, ob Tu M2-PK eine Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp zeigt.

Sowohl Tu M2-PK als auch SCC zeigten mit zunehmender Metastasierung des Tumors einen Konzentrationsanstieg. Die Sensitivität stieg für beide Marker auf bis zu 100% in der Diagnostik von Fernmetastasen. In der Diagnostik von Lymphknotenmetastasen war SCC mit einer Sensitivität von 83.3% der Tu M2-PK mit 55.5% deutlich überlegen. Dennoch ergab die Korrelationsanalyse eine tendenziell höhere Assoziation der Tu M2-PK mit Lymphknoten- und Fernmetastasierung (N: $r_s=0.524$, M: $r_s=0.486$) im Vergleich zu SCC (N: $r_s=0.365$, M: $r_s=0.409$).

Mit zunehmendem Tumorstadium steigen sowohl mediane Konzentration als auch diagnostische Sensitivität von Tu M2-PK und SCC an. Korrespondierend zu SCC zeigt auch Tu M2-PK höhere Werte bei den Plattenepithelkarzinomen. Beide Marker sind streng miteinander assoziiert.

6.4.3 Kombination von Tu M2-PK und SCC

Kann man Tumormarker nicht auch kombinieren, um deren diagnostische Effizienz zu erhöhen? Die Antwort lautet „Ja“. Bei den gastrointestinalen Tumorentitäten ließ sich die Sensitivität des Tumormarkers Ca 72-4 beim Magenkarzinom (Sensitivität von 61%) durch Kombination mit Tu M2-PK auf 81% erhöhen [82]. Auch beim Pankreaskarzinom zeigte sich ein bemerkenswerter Anstieg auf 96% bei Kombination gegenüber Ca 19-9 (85%) allein [90].

Schneider plädiert für die Bestimmung von 5 Tumormarkern inklusive Tu M2-PK bei Lungenkarzinom-Patienten. Anhand einer mathematischen Evaluation dieser Marker mit der „fuzzy-logic“-Methode konnte er u.a. zeigen, dass sich bei den Plattenepithelkarzinomen durch Kombination von SCC (Sensitivität 65%) und Tu M2-PK (Sensitivität 59%) eine Gesamtsensitivität von 81% zur Detektion eines Rezidivs erreichen lässt [87].

Ein Drittel der Frauen mit einem Zervixkarzinom hatten nur einen der beiden Marker erhöht. Die Kombination der Tumormarker SCC und Tu M2-PK lässt daher auch hier eine Erhöhung der Sensitivität erwarten. Weitere vergleichende Studien an einem größeren Patientenkollektiv müssten folgen, um diese Kombination auch auf „Screening-Tauglichkeit“ hin zu überprüfen.

Die Kombination der Tumormarker SCC und Tu M2-PK lässt eine Erhöhung der diagnostischen Sensitivität erwarten.

6.5 Tu M2-PK als prädiktiver Faktor beim Zervixkarzinom – Der Marker im Therapieverlauf

Tu M2-PK ist ein Marker der eher Größe und Wachstum eines malignen Tumors reflektiert als dessen morphologische Ausprägung. Somit bietet es sich an, die Pyruvatkinase auch auf ihren Nutzen als Indikator für Erfolg/Misserfolg einer Tumorthherapie hin zu untersuchen.

Initiale Follow-up-Studien beim Lungenkarzinom zeigten, unabhängig vom histologischen Typ des Tumors, eine gute Korrelation der Tu M2-PK mit der Wirkung der systemischen Chemotherapie. Eine Progression des Tumors unter Chemotherapie war dabei durch ein Ansteigen gekennzeichnet, eine Regression erwartungsgemäß durch ein Abfallen des Tumormarkers [84,89].

Auch wir konnten erste Untersuchungen zum Markerverlauf bei Therapie des Zervixkarzinoms durchführen. Die erste Patientin erkrankte im Alter von 32 Jahren. Bei Erstdiagnose fand sich ein Tu M2-PK-Wert deutlich über dem cut-off von 15 U/ml. Nach operativer Entfernung des Tumors im FIGO-Stadium IIB sank der Wert auf 8.24 U/ml und blieb auch während adjuvanter Radiochemotherapie um diesen Wert herum konstant. 20 Monate später kam es zum Rezidiv des Primärtumors im kleinen Becken und zum erneuten Anstieg des Marker auf über 28 U/ml (Abb.18). Die Patientin verstarb 7 Monate später.

Nach erfolgreicher Tumorentfernung und adjuvanter Radiochemotherapie normalisierte sich die Tu M2-PK und stieg erst bei erneuter Progression wieder über den cut-off von 15 U/ml an. Es scheint somit, dass die Pyruvatkinase auch im Monitoring während adjuvanter Therapie des Zervixkarzinoms genutzt werden könnte. Einem Bericht zu Folge, zeigte sich die Pyruvatkinase sogar bereits 2 Monate früher erhöht, als die Metastasierung eines Nierenzellkarzinoms im Computertomogramm festgestellt werden konnte [104].

Anders dagegen die zweite Patientin, bei der erst im Alter von 60 Jahren ein Zervixkarzinom im FIGO-Stadium IIB diagnostiziert wurde. Der ebenfalls erhöhte Ausgangswert stieg nach operativer Entfernung des Primärtumors noch einmal um fast das Doppelte auf über 40 U/ml an, um dann während Radiochemotherapie auf unter 15 U/ml abzufallen (Abb.19). Zweiundzwanzig Monate nach Erstdiagnose war die Patientin noch rezidivfrei.

Der postoperative Anstieg der Tu M2-PK wird einerseits durch die zunehmende Proliferation der Zellen bei Wundheilung erklärt. Daher empfiehlt man, mit dem Follow-up frühestens zwölf Wochen nach Operation zu beginnen [104]. Andererseits kann es auch durch Manipulation am Tumor während operativer Entfernung zur erhöhten Freisetzung und Abgabe von Tu M2-PK-Molekülen in die Blutbahn kommen.

Vom klinischen Standpunkt aus betrachtet, ist ein zuverlässiger Tumormarker ein Marker, der sowohl die Ausbreitung des Tumors im Körper, als auch das Ansprechen auf eine Therapie reflektiert. Untersuchungen beim kolorektalen Karzinom zeigten bereits 4 Wochen nach Beginn einer Chemotherapie ein Absinken der Tu M2-PK-Konzentration im Plasma um bis zu 58% bei Patienten, die von einer systemischen Therapie profitierten [49]. Beim Lungenkarzinom konnte in 89% der Fälle ein Rückgang der Markerkonzentration bei erfolgreicher Therapie beobachtet werden. Kam es zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung trotz Therapie, spiegelte sich dies bei 80% der Patienten durch ein weiteres Ansteigen der Pyruvatkinase wieder. Nach Therapieabschluss hätte das Rezidiv bei 65% anhand eines erhöhten Tumormarkers diagnostiziert werden können [85]. Beim metastasierten Mammakarzinom fand man in 63 % der Fälle eine positive Korrelation des Tu M2-PK-Wertes mit dem klinischen Outcome [31]. Niedrige Ausgangswerte waren dort hinweisend auf eine komplette Remission nach primärer Chemotherapie [98].

Die Bestimmung der Tumor M2-Pyruvatkinase im EDTA-Plasma während der Tumorthherapie scheint ein mögliches Instrument zu sein, jedem Patienten eine individuelle und erfolgreiche Behandlung zukommen zu lassen. Korrelationen des Tumormarkers mit dem Krankheitsverlauf von 60-70% reichen da noch nicht aus, um diesen Marker in die klinische Routine mit aufzunehmen. Ob die Tu M2-PK beim invasiven Zervixkarzinom als prädiktiver Marker für den Benefit von einer systemischen Therapie in Frage kommt, bleibt abzuwarten.

Es scheint, dass die Pyruvatkinase im Monitoring der Therapie des Zervixkarzinoms genutzt werden könnte.

6.6 Tu M2-PK als prognostischer Marker beim Zervixkarzinom

Eine präoperativ erhöhte Konzentration an SCC kann u.a. hinweisend auf Patienten mit hohem Risiko für eine nodale Metastasierung sein [13,17,39,45,96].

Da das Follow-up innerhalb des Krankheitsstadiums „Rezidiv“ aufgrund des Versterbens der Patientinnen weitestgehend abgeschlossen war, gestattete dies eine erste Analyse zur prognostischen Wertigkeit der Tu M2-PK beim Zervixkarzinom.

Dabei zeigte sich, dass Tu M2-PK einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben scheint ($p=0.013$). Erhöhte Markerkonzentrationen waren hier mit einem verkürzten Überleben assoziiert.

Derzeit liegen nur sehr limitierte Daten zur Bedeutung der Pyruvatkinase als Prognoseparameter bei Tumorerkrankung vor. Einzig und allein beim metastasierten malignen Melanom gibt es Ergebnisse, die belegen, dass Patienten mit hohen Plasmawerten über eine verkürzte rezidivfreie Zeit und ein reduziertes Gesamtüberleben verfügen [100].

Nach den bisherigen Ergebnissen könnte somit die Bestimmung der Tu M2-PK helfen, Hoch-Risiko-Patientinnen des Zervixkarzinoms frühzeitig herauszufiltern. Da es sich hier nur um erste Hinweise auf eine mögliche prognostische Bedeutung handelt, sind weitere, prospektiv angelegte Untersuchungen notwendig.

Erste Hinweise liegen vor, das die Tu M2-PK eine prognostische Bedeutung beim Zervixkarzinom haben könnte.

6.7 Die Methode

Zur Quantifizierung der Tumor M2-Pyruvatkinase wurde ein Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) der Firma ScheBo®•Biotech AG (Gießen, Germany) verwendet. Bei diesem Test kommen monoklonale Antikörper zum Einsatz, die hoch spezifisch für die Tu M2-PK (dimere Form der M2-Pyruvatkinase) sind und nicht mit anderen Isoformen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und tetramere Form der M2) interagieren.

Ein Enzymimmunoassay ist ein einfaches, zeitsparendes Verfahren und wird in der Routine seit Jahren erfolgreich eingesetzt. Um auch den Einsatz des „ScheBo®•Tumor M2-PK ELISA“ unter klinischen Routinebedingungen zu prüfen, haben Hugo *et al.* die Stabilität des Markers im Serum, in EDTA-, Citrat- und Heparin-antikoaguliertem Blut untersucht [32].

Schütteln oder Lagerung der Proben für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur ohne vorheriges Zentrifugieren führten zu einem 2-3fachen Anstieg der Konzentration in Serum und Heparinplasma. Bei EDTA- und Citratblut hingegen blieben die Konzentration an Tu M2-PK weitestgehend konstant.

Grund für die wechselhafte Stabilität der Tu M2-PK im Serum ist einerseits der temperaturabhängig proteolytische Abbau von Pyruvat durch serumeigene Enzyme. Andererseits konnten Lymphozyten als die peripheren Blutzellen identifiziert werden, welche Tu M2-PK in kleinen Mengen enthalten [32].

Es folgten weitere Untersuchungen zur Stabilität der Tu M2-PK in EDTA-Blut und abzentrifugiertem EDTA-Plasma bei 4°C, 21°C und 37°C über einen Zeitraum von 7 Tagen. Hierbei zeigte sich, dass eine zuverlässige Bestimmung auch nach einer Woche noch durchführbar ist, wenn EDTA-Plasma bei Kühlschranktemperatur gelagert wird [33]. Bei Tiefkühlung von EDTA-Plasma um -20°C ist nach Angabe der Firma ScheBo® eine Probenhaltbarkeit von einem Jahr möglich.

Hugo *et al.* konnte anhand seiner Studien beweisen, dass bei Verwendung von EDTA-Plasma reproduzierbare Resultate mit dem Tu M2-PK-Immunoassay unter klinischen Bedingungen erzielt werden können [32,33]. Da der Tumorzellstoffwechsel und somit Tu M2-PK keinem zirkadianen Rhythmus unterliegt, ist der Entnahmezeitpunkt ohne Bedeutung [104].

Um die nach derzeitigem Kenntnisstand optimale Probenverarbeitung zu gewährleisten, trennten wir spätestens nach 24 Stunden und Kühlung der Blutprobe bei + 4°C das EDTA-Plasma von

den korpuskulären Blutbestandteilen durch Zentrifugieren ab. Das EDTA-Plasma wurde dann bis zur Durchführung des Testes bei -85°C tiefgefroren.

Nicht nur das richtige Medium, sondern auch dessen Qualität haben Einfluss auf die Konzentration der Tu M2-PK. So ist festgestellt worden, dass hämolytisches, lipämischeres und ikterisches Material nicht geeignet ist und verworfen werden sollte, da es zu falsch-positiven Resultaten führen kann [62].

Auch die Tatsache, dass bei schweren Inflammationen [83,93], rheumatischen Erkrankungen [63], chronischer Herzinsuffizienz [55] und diabetischer Nephropathie [65] erhöhte Konzentrationen zu beobachten sind, sollte bei Einsatz der Tu M2-PK als Tumormarker berücksichtigt werden.

Bezüglich der Frage, ob Alter oder Geschlecht in der Ausprägung der TM-Konzentration eine Rolle spielen, so kann dies anhand von drei Publikationen verneint werden [76,100,106]. Eigene Ergebnisse wiesen ebenfalls eine alters-unabhängige Verteilung der Werte auf (Abb.13). Auch die Rauchgewohnheiten der Patientinnen blieben ohne Einfluss auf die Konzentration der Tumor M2-Pyruvatkinase.

7. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Pyruvatkinase ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, welche steten Veränderungen während der Tumorentstehung unterliegt. Das M2 Isoenzym der Pyruvatkinase schaltet zwischen einer aktiven tetrameren Form und einer inaktiven dimeren Form hin und her, um den Tumorstoffwechsel an das variierende Angebot an Sauerstoff und Nahrung anzupassen. Die vorwiegend in Tumorzellen gefundene *dimere* Form wird auch *Tumor M2-Pyruvatkinase* (Tu M2-PK) genannt. Das E7-Onkoprotein des Humanen Papilloma Virus Typ 16, dem in der Pathogenese des Zervixkarzinoms eine entscheidende Bedeutung zukommt, bindet direkt an die M2-Pyruvatkinase und kann ebenfalls zu einer Umwandlung der tetrameren in die dimere Form führen.

Ziel: Tu M2-PK ist ein organ-unspezifischer Marker, der von den Tumorzellen in das Blut abgegeben wird. Die guten Ergebnisse bei einigen Tumorentitäten haben uns veranlasst, die diagnostische Wertigkeit der Tu M2-PK auch bei Patientinnen mit Zervixkarzinom und Vorstufen der Erkrankung (CIN I-III) zu untersuchen. Neben einer Korrelationsanalyse mit dem derzeit am häufigsten in der Anwendung befindlichen Tumormarker, dem SCC-Antigen (squamous cell carcinoma antigen), führten wir eine erste Evaluierung bezüglich der prädiktiven und prognostischen Bedeutung des Markers beim Zervixkarzinom durch.

Material und Methoden: Insgesamt wurde von 125 Frauen die Konzentration der Tu M2-PK im Plasma mittels eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay der Firma ScheBo[®]•Biotech AG Gießen vor Therapie bestimmt: Gruppe 1: CIN I-III n=50; Gruppe 2: Zervixkarzinom FIGO I-IV n=51; Gruppe 3: Rezidiv n=24. Zwei Kasuistiken geben den Markerverlauf während Therapie des Zervixkarzinoms im FIGO-Stadium IIB wieder. Eine mediane Überlebenszeit von 9 Monaten (Bereich 1-119 Monate) nach Diagnose Rezidiv ermöglichte Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung als prognostischer Marker.

Ergebnisse: Die Differenzierung zwischen den 3 Gruppen, in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium, ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit den höchsten Werten bei Patientinnen mit Zervixkarzinomrezidiv ($p < 0.001$) (Median: CIN I-III: 9.2 U/ml, FIGO I-IV: 16.4 U/ml, Rezidiv: 41.2 U/ml). Ebenso konnte eine deutliche Differenzierung mit ansteigenden Werten entsprechend den FIGO-Stadien nachgewiesen werden ($p < 0.001$). Die Receiver-Operating-Characteristics(ROC)-Analyse ergab mit einer AUC von 0.842 für Tu M2-PK als Marker für die Erstdiagnose eines Zervixkarzinoms, eine Spezifität von 90% und eine Sensitivität von 64% bei einem optimalen cut-off von 16.0 U/ml.

Hingegen zeigten sich bei der Differenzierung der Krankheitsvorstufen (CIN I-III) keine signifikanten Unterschiede ($p=0.626$). Ein Einfluss des HPV-Status auf die Konzentration der Tu M2-PK konnte in dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden.

In der Korrelation der Prognosefaktoren des Zervixkarzinoms (Lymphknotenstatus: N0/N1; Fernmetastasierung M0/M1; Lymphangioinvasion L0/L1; Angioinvasion V0/V1; Grading G1-3) zeigten sich signifikant höhere Werte bei Patientinnen mit positiven Lymphknoten (N1) ($p=0.028$) sowie positiven Fernmetastasen (M1) ($p<0.001$). Bei der Analyse verschiedener Tumorsubtypen wurde deutlich, dass bei Plattenepithelkarzinomen gegenüber Adenokarzinomen höhere Konzentrationen zu verzeichnen sind ($p=0.035$).

Auch wenn die Gesamt-Sensitivität von 65.3% im Vergleich zu SCC mit 77.4% geringer ist, weist Tu M2-PK eine bessere Sensitivität in frühen Tumorstadien auf. Ein Drittel der Frauen mit einem Zervixkarzinom hatten nur einen der beiden Marker erhöht, was eine Erhöhung der Sensitivität durch Kombination der beiden Tumormarker erwarten lässt.

Markerabfall nach Tumorentfernung und Radiochemotherapie als auch ein Wiederanstieg bei Rezidivkrankung zeugen für einen möglichen Nutzen im Monitoring der Therapie des Zervixkarzinoms. Die univariate Cox-Regressionsanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Pyruvatkinase und dem Gesamtüberleben ($p=0.013$). Erhöhte Werte waren mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert ($n=23$; Odds Ratio: 1.010). Bei Diagnose Rezidiv waren die Tu M2-PK-Konzentrationen tendenziell höher bei Patientinnen mit einer kürzeren Überlebenszeit ($p=0.054$; $n=23$; Odds Ratio: 1.011).

Schlussfolgerung: Die vorliegenden Daten zeigen auf, dass die Tumor M2-Pyruvatkinase als Marker zur Unterscheidung zwischen prämaligen und malignen Läsionen der Cervix uteri genutzt werden kann. Darüber hinaus nimmt die Konzentration mit zunehmender Ausdehnung und Metastasierung des Zervixkarzinoms zu. Erste Hinweise liegen vor, dass die Tu M2-PK auch als prognostischer und prädiktiver Marker eine Bedeutung hat.

Literatur

- 1 Ahmed AS, Dew T, Lawton FG, et al. Tumour M2-PK as a predictor of surgical outcome in ovarian cancer, a prospective cohort study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28:103-108.
- 2 Altman DG, Bland JM. Quartiles, quintiles, centiles, and other quantiles. *BMJ* 1994; 309:996.
- 3 Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut. *Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends*. 3.erweiterte, aktualisierte Auflage 2002; www.rki.de/Krebs.
- 4 Arora KK, Fanciulli M, Pedersen PL. Glucose phosphorylation in tumor cells. Cloning, sequencing, and overexpression in active form of a full-length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J Biol Chem* 1990; 265:6481-6488.
- 5 Beckmann M.W. (Hrsg): *Interdisziplinäre S2-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms*. W.Zuckschwerdt Verlag München 2004.
- 6 Bena-Boupda NF, Rezai SS, Klett R, Eigenbrodt E, Bauer R. Value of tumor M2-PK in thyroid carcinoma: a pilot study. *Anticancer Res* 2003; 23:5237-5240.
- 7 Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the cervix uteri. *J Epidemiol Biostat* 2001; 6:7-43.
- 8 Blohmer JU, Schmalisch G, Klette I, et al. Increased incidence of cervical intraepithelial neoplasia in young women in the Mitte district, Berlin, Germany. *Acta Cytol* 1999; 43:195-200.
- 9 Board M, Humm S, Newsholme EA. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J* 1990; 265:503-509.
- 10 Bolger BS, Dabbas M, Lopes A, Monaghan JM. Prognostic value of preoperative squamous cell carcinoma antigen level in patients surgically treated for cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 65:309-313.
- 11 Borrás G, Molina R, Xercavins J, Ballesta A, Iglesias J. Tumor antigens CA 19.9, CA 125, and CEA in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1995; 57:205-211.
- 12 Brosius F, Kapitel 34: Boxplots und Fehlerbalken. In: *SPSS 8 - Professionelle Statistik unter Windows*. 1. Aufl., Mitp-Verlag, Bonn, 1998.
- 13 Bruijn HW de, Duk JM, Zee AG van der, et al. The clinical value of squamous cell carcinoma antigen in cancer of the uterine cervix. *Tumour Biol* 1998; 19:505-516.

- 14 Cerwenka H, Aigner R, Bacher H, et al. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. *Anticancer Res* 1999; 19:849-851.
- 15 Crombach G, Scharl A, Vierbuchen M, Würz H, Bolte A. Detection of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous epithelia and in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989; 63:1337-1342.
- 16 Duk JM, Bruijn HW de, Groenier KH, et al. Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations. *Gynecol Oncol* 1990; 39:186-194.
- 17 Duk JM, Groenier KH, Bruijn HW de, et al. Pretreatment serum squamous cell carcinoma antigen: a newly identified prognostic factor in early-stage cervical carcinoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:111-118.
- 18 Ebeling FG, Stieber P, Untch M, et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 86:1217-1222.
- 19 Eigenbrodt E, Basenau D, Holthausen S, Mazurek S, Fischer G. Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas. *Anticancer Res* 1997; 17:3153-3156.
- 20 Eigenbrodt E, Fister P, Reinacher M. New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Breitner R (Hrsg): *Regulation of carbohydrate Metabolism. Vol.II.* CRC Press, Boca Raton 1985; FL: 141-179.
- 21 Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev Oncog* 1992; 3:91-115.
- 22 Engel J, Schubert-Fritschle G: Epidemiologie des Zervixkarzinoms. In: Hillemanns P (Hrsg.): *Manual Zervixkarzinom Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* 3. Auflage, W.Zuckschwerdt Verlag München 2004; 1-14.
- 23 Ewald N, Toepler M, Akinci A, Kloer HU, Bretzel RG, Hardt PD. Pyruvate kinase M2 (tumor M2-PK) as a screening tool for colorectal cancer (CRC). A review of current published data. *Z Gastroenterol* 2005; 43:1313-1317.
- 24 Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:24-38.
- 25 Hardt PD, Mazurek S, Toepler M, et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91:980-984.
- 26 Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:4965-4968.

- 27 Hardt PD, Toepler M, Ngoumou B, Rupp J, Kloer HU. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls. *Anticancer Res* 2003; 23:851-853.
- 28 Hegele A, Varga Z, Kosche B, Stief T, Heidenreich A, Hofmann R. Pyruvate kinase type tumor M2 in urological malignancies. *Urol Int* 2003; 70:55-58.
- 29 Hillemanns P, Dannecker C: Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie. In: Hillemanns P (Hrsg.): *Manual Zervixkarzinom Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 3. Auflage, W.Zuckschwerdt Verlag München 2004; 15-21.
- 30 Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338:423-428.
- 31 Hoopmann M, Warm M, Mallmann P, Thomas A, Göhring UJ, Schöndorf T. Tumor M2 pyruvate kinase - determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy. *Cancer Lett* 2002; 187:223-228.
- 32 Hugo F, Fischer G, Eigenbrodt E. Quantitative detection of tumor M2-PK in serum and plasma. *Anticancer Res* 1999; 19:2753-2757.
- 33 Hugo F, Mazurek S, Hardt PD, Eigenbrodt E. Quantitative Detection of Tumor M2-PK: Evaluation of Blood and Stool Specimen Stability. Poster from the 16th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2005; Glasgow, UK.
- 34 Hugo F, Mazurek S, Zander U, Eigenbrodt E. In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation. *J Cell Physiol* 1992; 153:539-549.
- 35 International Agency for Research on Cancer. Cancer statistics: www-dep.iarc.fr/ GLOBOCAN Database 2002
- 36 Kato H, Morioka H, Tsutsui H, Aramaki S, Torigoe T. Value of tumor-antigen (TA-4) of squamous cell carcinoma in predicting the extent of cervical cancer. *Cancer* 1982; 50:1294-1296.
- 37 Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977; 40:1621-1628.
- 38 Kaura B, Bagga R, Patel FD. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30:193-196.
- 39 Kim CW, Kim JI, Park SH, et al. Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42:387-393.
- 40 Kornafel J, Wawrzekiewicz M. Evaluation of diagnostic usefulness of CEA, hCG and SCC antigens in cervical cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 1989; 10:319-322.

- 41 Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972; 8:1-34.
- 42 Lamerz R, Stieber P. Tumormarker. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129:2722–2728.
- 43 Lamerz R, Stieber P, Borlinghaus P, Schmid L. Tumormarker. In: Heiss MM (Hrsg): *Manual Gastrointestinale Tumoren*. W.Zuckschwerdt Verlag München 2001; 43-49.
- 44 Lange St, Bender R. Median oder Mittelwert? *Dtsch Med Wschr* 2001; 126:T25-T26.
- 45 Lin H, ChangChien CC, Huang EY, Tseng CW, Eng HL, Huang CC. The role of pretreatment squamous cell carcinoma antigen in predicting nodal metastasis in early stage cervical cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:140-144.
- 46 Lozza L, Merola M, Fontanelli R, et al. Cancer of the uterine cervix: clinical value of squamous cell carcinoma antigen (SCC) measurements. *Anticancer Res* 1997; 17:525-529.
- 47 Lüftner D, Mazurek S, Henschke P, et al. Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine-phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. *Anticancer Res* 2003; 23:991-997.
- 48 Lüftner D, Mesterharm J, Akrivakis C, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:5077-5082.
- 49 Lüftner D, Schweigert M, Geppert R, Possinger K. Tumor Type M2 Pyruvate Kinase in Colorectal Cancer: A Predictive Activity Marker versus Classical Mass Tumor Markers. Abstract of the 3rd International Conference – Perspectives in Colorectal Cancer 2001; Dublin, Ireland.
- 50 Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005; 15:300-308.
- 51 Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1:S23-29.
- 52 Mazurek S, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, et al. Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie. *Notabene Med* 1993; 3:97-103.
- 53 Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J* 2001a; 356:247-256.
- 54 Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* 2001b; 20:6891-6898.
- 55 McDowell G, Gupta S, Dellerba M, Coppinger T, Levy RD, Keevil BG. Plasma concentrations of tumour dimeric pyruvate kinase are increased in patients with chronic cardiac failure. *Ann Clin Biochem* 2004; 41:491-493.

- 56 McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM; ALTS Group. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1165-1170.
- 57 Molina R, Filella X, Augé JM, et al. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. *Anticancer Res* 2005; 25:1765-1771.
- 58 Münger K, Basile JR, Duensing S, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20:7888-7898.
- 59 Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.
- 60 Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 1986; 261:13807-13812.
- 61 Oremek GM, Eigenbrodt E, Rädle J, Zeuzem S, Seiffert UB. Value of the serum levels of the tumor marker TUM2-PK in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:3031-3033.
- 62 Oremek GM, Gerstmeier F, Sauer-Eppel H, Sapoutzis N, Wechsel HW. Pre-analytical problems in the measurement of tumor type pyruvate kinase (tumor M2-PK). *Anticancer Res* 2003; 23:1127-1130.
- 63 Oremek GM, Müller R, Sapoutzis N, Wigand R. Pyruvate kinase type tumor M2 plasma levels in patients afflicted with rheumatic diseases. *Anticancer Res* 2003; 23:1131-1134.
- 64 Oremek GM, Rox S, Mitrou P, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. Tumor M2-PK levels in haematological malignancies. *Anticancer Res* 2003; 23:1135-1138.
- 65 Oremek GM, Rutner F, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. Tumor marker pyruvate kinase type tumor M2 in patients suffering from diabetic nephropathy. *Anticancer Res* 2003; 23:1155-1158.
- 66 Oremek GM, Sapoutzis N, Kramer W, Bickeböller R, Jonas D. Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20:5095-5098.
- 67 Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W, Eigenbrodt E, Usadel KH. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19:2599-2601.
- 68 Pecorelli S (ed). FIGO Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer. 23rd ed. *J Epidemiol Biostat* 2001; 3:1-168.
- 69 Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18:1606-1613.

- 70 Pezzilli R, Migliori M, Morselli-Labate AM, et al. Diagnostic value of tumor M2-pyruvate kinase in neuroendocrine tumors. A comparative study with chromogranin A. *Anticancer Res* 2003; 23:2969-2972.
- 71 Pottek T, Müller M, Blum T, Hartmann M. Tu-M2-PK in the blood of testicular and cubital veins in men with testicular cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:5029-5033.
- 72 Pras E, Willemse PH, Canrinus AA, et al. Serum squamous cell carcinoma antigen and CYFRA 21-1 in cervical cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52:23-32.
- 73 Presek P, Reinacher M, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus. *FEBS Lett* 1988; 242:194-198.
- 74 Reesink-Peters N, Velden J van der, Ten Hoor KA, et al. Preoperative serum squamous cell carcinoma antigen levels in clinical decision making for patients with early-stage cervical cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:1455-1462.
- 75 Reinacher M, Eigenbrodt E. Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-Pk) in tumors of chicken and rat. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981; 37:79-88.
- 76 Roigas J, Deger S, Schroeder J, et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in metastatic renal cell carcinoma. *Urol Res* 2003; 31:358-362.
- 77 Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Tumor-M2-Pyruvatkinase beim Nierenzellkarzinom. Untersuchungen im Plasma von Patienten. *Urologe* 2000; 39:554-556.
- 78 Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Tumor M2 pyruvate kinase in plasma of patients with urological tumors. *Tumour Biol* 2001; 22:282-285.
- 79 Sapoutzis N, Oremek GM. Evaluation of Tumor M2 Pyruvatekinase Values in Patients with Lung Diseases. In: Pirker R (ed): 8th Central European Lung Cancer Conference 2002; Vienna, Austria. Monduzzi Editore S.p.A. – Medimond Inc 2002; 75-80.
- 80 Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Michel A, et al. Quantitative determination (ELISA) of pyruvate kinase type tumor M2 – A new tumor marker. In: Klapdor R (ed): *Current Tumor Diagnosis: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. Cancer of the Lung – State and Trends in Diagnosis and Therapy.* W. Zuckschwerdt Verlag München 1994; 365-368.
- 81 Schneider A, Hoyer H, Lotz B, et al. Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 2000; 89:529-534.
- 82 Schneider J, Bitterlich N, Schulze G. Improved sensitivity in the diagnosis of gastrointestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles including the tumor M2-PK. *Anticancer Res* 2005; 25:1507-1515.

- 83 Schneider J, Morr H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer Detect Prev* 2000; 24:531-535.
- 84 Schneider J, Neu K, Grimm H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E. Tumor M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring. *Anticancer Res* 2002; 22:311-318.
- 85 Schneider J, Neu K, Velcovsky HG, Morr H, Eigenbrodt E. Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study. *Cancer Lett* 2003; 193:91-98.
- 86 Schneider J, Peltri G, Bitterlich N, et al. Fuzzy logic-based tumor marker profiles improved sensitivity of the detection of progression in small-cell lung cancer patients. *Clin Exp Med* 2003a; 2:185-191.
- 87 Schneider J, Peltri G, Bitterlich N, et al. Fuzzy logic-based tumor marker profiles including a new marker tumor M2-PK improved sensitivity to the detection of progression in lung cancer patients. *Anticancer Res* 2003b; 23:899-906.
- 88 Schneider J, Schulze G. Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2003; 23:5089-5093.
- 89 Schneider J, Velcovsky HG, Morr H, Katz N, Neu K, Eigenbrodt E. Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:5053-5058.
- 90 Schulze G. The tumor marker tumor M2-PK: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:4961-4964.
- 91 Schulze G. HER-2/neu gene product in serum - an oncoprotein in the diagnosis and therapy of breast carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23:1007-1010.
- 92 Sehoul J, Lichtenegger W. Aktuelles Management des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe* 2006; 39:379-394.
- 93 Staib P, Hoffmann M, Schinköthe T. Plasma levels of tumor M2-pyruvate kinase should not be used as a tumor marker for hematological malignancies and solid tumors. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:28-31.
- 94 Strauss HG, Laban C, Lautenschläger C, Buchmann J, Schneider I, Koelbl H. SCC antigen in the serum as an independent prognostic factor in operable squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer* 2002; 38:1987-1991.
- 95 Tabata T, Takeshima N, Tanaka N, Hirai Y, Hasumi K. Clinical value of tumor markers for early detection of recurrence in patients with cervical adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. *Tumour Biol* 2000; 21:375-380.

- 96 Takeda M, Sakuragi N, Okamoto K, et al. Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:451-457.
- 97 Takeshima N, Hirai Y, Katase K, Yano K, Yamauchi K, Hasumi K. The value of squamous cell carcinoma antigen as a predictor of nodal metastasis in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1998; 68:263-266.
- 98 Thomas A, Fischer T, Winzer H, et al. Tumor M2-Pk as predictive factor in primary systemic chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005; ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II, 2005: 891.
- 99 Trunk MJ, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen. *Pathologie* 2005; 26:283-290.
- 100 Ugurel S, Bell N, Sucker A, Zimpfer A, Rittgen W, Schadendorf D. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. *Int J Cancer* 2005; 117:825-830.
- 101 Veelen CW van, Verbiest H, Zülch KJ, et al. L-alpha-alanine inhibition of pyruvate kinase from tumors of the human central nervous system. *Cancer Res* 1979; 39:4263-4269.
- 102 Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C, Casadei R, Simoni P, Gullo L. Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1149-1155.
- 103 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123:309-314.
- 104 Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G. Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* 1999; 19:2583-2590.
- 105 Wechsel HW, Petri E, Feil G, Nelde H, Bichler K. Nierenzellkarzinom - Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der inaktiven Form der Pyruvatkinase. *Urologe A* 1999; 38:583-5.
- 106 Weinberger R, Appel B, Stein A, Metz Y, Neheman A, Barak M. The pyruvate kinase isoenzyme M2 (Tu M2-PK) as a tumour marker for renal cell carcinoma. *Eur J Cancer Care* 2007; 16:333-337.
- 107 Wolter C, Lupp P, Breul J, et al. Humorale Tumormarker: Praxisorientierte Vorschläge für ihren effizienten Einsatz. *Dt Ärztebl* 1996; 93:A3346-3352.
- 108 Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1643-1646.
- 109 Zur Hausen H. 1991 *Virology* 184, 9-13.

- 110 Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Dürr P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1291-1296.

Zuvor öffentlich präsentierte Teilergebnisse dieser Arbeit

S. Kuemmel, S. Jeschke, S. Landt, S. Kurlach, P. Schmid, J. Sehouli, J. Blohmer, K. Ulm, W. Lichtenegger, A. Thomas:

Tumor-specific correlation of tumor-type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in patients with cervical carcinoma.

Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: Abstract No: 5044.

Schmid-Petruschkat S., Kümmel S., Jeschke S., Kurlach S., Sehouli J., Lichtenegger W., Thomas A.:

Tumor-spezifische Korrelation von Tumor M2-Pyruvatkinase (PK) beim Zervixkarzinom. *Geburtsh Frauenheilk* 2006; 67: S96.

Publikationen als Co-Autor

Kümmel S, Elling D, Jeschke S, Schmid P, Thomas A. Chemotherapy treatment options for elderly women with breast cancer. *Anticancer Res* 2006; 26:1673-1676.

Kümmel S, Thomas A, Jeschke S, Hauschild M, Sehouli J, Lichtenegger W, Blohmer JU. Postoperative therapy modalities for cervical carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26:1707-1713.

Kümmel S, Eggemann H, Lüftner D, Thomas A, Jeschke S, Zerfel N, Heilmann V, Emons G, Zeiser T, Ulm K, Kobl M, Kurlach S, Schmid P, Sehouli J, Elling D, Blohmer JU. Changes in the circulating plasma levels of VEGF and VEGF-D after adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer and 1 to 3 positive lymph nodes. *Anticancer Res* 2006; 26:1719-1726.

Erklärung

„Ich, Sophia Jeschke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Evaluierung der Tumor-M2-Pyruvatkinase (Tu M2-PK) als Tumormarker beim Zervixkarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen ganz herzlich danken, die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Werner Lichtenegger, dem Direktor der Frauenklinik der Charité Berlin, an dessen Klinik ich erstmals die Möglichkeit hatte, die Frauenheilkunde im Rahmen eines Forschungspraktikums auch von ihrer wissenschaftlichen Seite her zu erfahren. Ich möchte Ihm danken für die Möglichkeit der Promotion sowie für alles was ich in dieser Zeit erlernen konnte.

Ganz außerordentlich möchte ich Dr. med. Sherko Kümmel für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bearbeitung dieses Themas danken. Unter seiner wissenschaftlichen Leitung und Betreuung konnte ich wertvolle Einblicke in die Arbeit der AG „Onkologische Gynäkologie“ erhalten. Dank seiner ausgesprochenen Fähigkeit zur Motivation, seiner Unterstützung und Geduld war es möglich, diese Arbeit fertig zu stellen.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Frau Susanne Korlach, medizinisch-technische Laborassistentin der Frauenklinik der Charité Berlin. Ohne Ihre langjährige Erfahrung und Hilfe hätte ich die Organisation der Labortätigkeiten nicht bewältigen können. Sie stand mir jederzeit in einer überaus liebenswerten Art und Weise beratend zur Seite. Ihrer tatkräftigen Hilfe bei der Aufbereitung des Patientenmaterials, bei der Durchführung der Versuche, beim Aufbau der Datenbank und der Korrektur der Arbeit ist es zu verdanken, dass die Arbeit in der vorliegenden Form zustande gekommen ist.

Der Firma ScheBo[®]•Biotech AG Gießen möchte ich für die Bereitstellung des ELISA-Testkits zur Quantifizierung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Blut danken, sowie für die aktive Unterstützung bei den Laboranalysen.

Großer Dank gebührt auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgemeinschaft „Onkologische Gynäkologie“, insbesondere Frau Dr. med. Anke Thomas für die Themenfindung und tatkräftige Hilfe bei der Rekrutierung der Patientinnen.

Frau Monika Kriner vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, Abteilung Medizinische Biometrie, danke ich vielmals für die Unterstützung und geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Frau Dr. med. Angela Königer von der Universitätsklinik Essen sei herzlich für die Korrektur und konstruktiven Vorschläge zur endgültigen Fertigstellung der Arbeit gedankt.

Ganz besonders möchte ich mich natürlich auch bei allen Patientinnen bedanken, ohne deren Einverständnis zur Blutentnahme diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Mein wohl wichtigster Dank gebührt meinen Eltern, die mir bei allen Hochs und Tiefs in der Zeit der Promotion immer mit Ihrer ganzen Liebe, Ihrer vollen Unterstützung sowie mit unzähligen Worten der Ermutigung zur Seite gestanden haben.

Meinem Bruder Christian und seiner bezaubernden Tochter Lara, meinen Freunden Anne, Claudi, Sabine, Julia, Anja, Susanne, Doreen, Uli, Nora, Petra, Daniel und Jörg danke ich für die Fülle an nicht immer erwünschten, dennoch wunderbaren Ablenkungen von der Arbeit, die oft eine motivierte Rückkehr mit neuen Energien und Ideen ermöglicht hat.

* * *

Lebenslauf

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

