Aus der Urologischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg
Leitender Arzt: Flottenarzt Dr. med. M. Hartmann

in Kooperation mit der
Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Huland

UNTERSUCHUNGEN DER TUMOR M2- PYRUVATKINASE ZUR KINETIK UND BEDEUTUNG ALS TUMORMARKER BEI MALIGNEN KEIMZELLTUMOREN DES HODENS

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Thomas Blum
aus Kiel

Hamburg, im Oktober 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
Der Universität Hamburg am: 11. Dezember 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg, den 11. Dezember 2001

Dekan: Prof. Dr. med. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. med. H. Huland

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Dezember 2001

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK		1
A.	Einleitung	1
B.	Ziel der Arbeit	4
C.	Etablierte Hodentumormarker und ihre Bedeutung in Diagnostik und Therapie	4
D.	Pyruvatkinase und deren Isoenzyme	8
1.	Struktur	8
2.	Biochemische Grundlagen	8
3.	Isoenzyme der Pyruvatkinase	10
4.	Rolle der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 als Tumormarker und im Tumorstoffwechsel	12
II.	**METHODISCHES VORGEHEN**	14
1.	Patientenauswahl	14
2.	Material und Methoden	14
3.	Untersuchte Parameter und Nachweisverfahren	16
4.	Testprinzip der quantitativen Bestimmung	17
5.	Statistische Testverfahren	21
III.	**ERGEBNISSE**	21
1.	Verdünnungsreihe	21
2.	Konzentration von Tu-M2-PK im peripheren Venenblut und im Hodenvenenblut	22
3.	Regressionsanalysen	23
a.	Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (alle Tumoren)	23
b.	Testicularvenenblut/Cubitalvenenblut (klin. Stad. I)	23
c.	Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (Seminome)	23
d.	Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (Nichtseminome)	23
4.	M2-PK-Verlauf	24

a. Betrachtung von Trendlinien (Stadium I) 25
b. Tumoren Stadium II C und III 25
c. Vergleichende Betrachtung der Referenzmarker 25
d. Trendlinien der etablierten Marker (alle Stadien) 26
e. Häufigkeit der Positivität der Marker 26

IV. DISKUSSION 26
V. ZUSAMMENFASSUNG 36
VI. LITERATURVERZEICHNIS 38
VII. TABELLEN UND DIAGRAMME 49
VIII. NICHTPARAMETRISCHE TESTS 63
IX. ANHANG 67
(Danksagung, Erklärung, Lebenslauf)

Meinen Eltern, meiner Frau Stefanie und
meinem Sohn Clemens in Dankbarkeit gewidmet.

I. Einführung in die Thematik

A. Einleitung

In Deutschland erkranken derzeit 6,5/ 100 000, weltweit 0,5 – 9,9/ 100 000 Männer an einem malignen Keimzelltumor der Hoden [115,131]. Die Inzidenz in den Industrieländern ist hoch und weiter ansteigend, jedoch niedrig in der farbigen Bevölkerung [12,106]. Ungefähr 2600 Neuerkrankungen werden jährlich in Deutschland erfaßt. Lediglich 1-2% aller Malignome bei Männern sind Hodentumoren, sie repräsentieren jedoch mit 23% den häufigsten bösartigen soliden Tumor in der Altersgruppe der 15-45-jährigen Männer. 90-95% der testikulären Raumforderungen sind maligne Keimzelltumoren, die übrigen 5-10% werden von benignen und malignen Tumoren des gonadalen Stromas (Leydigzell, Sertolizell und Granulosazelltumoren), Dermoidzysten, Lymphomen oder durch Metastasen anderer Primärtumoren eingenommen [45,121]. Hierbei sind Hodenmetastasen eines andernorts lokalisierten Primarius` selten: *Pienkos et al.* berichteten 1972 über 15 Fälle einer testikulären Metastasierung bei 24000 durchgeführten Autopsien. Dies entspricht einer Inzidenz von 0,06% [96]. Der Altersmedian liegt bei Nichtseminomen bei 27, bei Seminomen bei 36 Jahren. 70% der Patienten sind 20-40 Jahre alt, 20% älter als 40 Jahre [109]. Etwa 2% der Hodentumoren betreffen Kinder [38]. Nachgewiesene Risikofaktoren für das Auftreten eines Hodentumors sind der Maldescensus testis und die kindliche Leistenhernie sowie der kontralaterale Hoden bei Hodentumoren, wahrscheinliche die Hodenatrophie sowie die Mumpsorchitis und die Infertilität [9,131]. Bei manifestem Hodentumor findet sich in 5% der Fälle eine sog. TIN (Testikuläre intratubuläre Neoplasie) der Gegenseite [21,81]. Hierbei handelt es sich um eine 1972 von *Skakkebaek et al.* erstbeschriebene intratubuläre Präneoplasie, bestehend aus atypischen Keimzellen, die aus fetalen Gonozyten hervorgehen und die Vorstufe nahezu aller Keimzelltumoren des Hodens, nicht jedoch des spermatozytären Seminoms, darstellen [108,131]. Die hierzulande anerkannte ungezielte kontralaterale Hodenbiopsie zum Nachweis einer TIN wird allerdings international nicht von allen Zentren als Standard angesehen [48]. Die Diagnostik von Seminomen und Nichtseminomen unterscheidet sich im Grundsatz nicht, die klinische Stadieneinteilung ist ebenfalls für beide histologischen Gruppierungen gleich, Mischformen sind häufig.

Verwendet wird hierfür im klinischen Alltag wie auch in dieser Arbeit die UICC-Klassifikation von 1997 [120], welche die auch noch gebräuchliche vereinfachte Stadieneinteilung des Internationalen Workshops of staging and treatment of testicular cancer, Lugano 1979 [15] ergänzt hat.
Für die Festlegung der pT- Kategorie der UICC ist die Beziehung des Tumors zu Tunica albuginea, Tunica vaginalis, Rete testis, Nebenhoden, Samenstrang und Skrotum erforderlich. Ein Grading ist bei germinalen Keimstrang- Stromatumoren des Hodens nicht vorgesehen.
Mehr noch als bei anderen Tumorerkrankungen spielen beim Hodentumor die labortechnisch erfassbaren Tumormarker eine herausragende Rolle.

Der Nutzen von Tumormarkern ist fünffach objektiviert:

1. Es ergeben sich Hinweise auf die Diagnose aus der differenzierten Betrachtung von Serummarkern. So ist das Vorliegen eines reinen Seminoms bei erhöhtem AFP- Wert ausgeschlossen. Andererseits können hohe AFP- oder HCG-level bei einem retroperitonealen Tumor des jungen Mannes auch ohne histologische Sicherung einen Keimzelltumor mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen lassen. Tumormarker helfen somit bei der Diagnosesicherung.

2. Die absoluten Werte bestimmter Marker können Hinweise auf die Prognose des betroffenen Patienten erbringen [119]. Während früher die INDIANA- Klassifikation die Patienten nach der vorhandenen Tumorlast einteilte (minimal, moderate, advanced disease[6]), wird jetzt der Krankheitsprognose durch die Klassifikationen der 5. Auflage der UICC 1997 (Union internationalis contra cancrum) und der IGCCCG 1997 (International Germ Cell Cancer Collaborative Group) grössere prognostische Bedeutung beigemessen [78,120]. Die UICC hat dabei exakt die IGCCCG- Einteilung übernommen. Dabei geht die Markersituation in alle Stadien ein, die in einer neuen sogenannten S-Klassifikation berücksichtigt werden.

Die IGCCCG schreibt beispielsweise einer bei Diagnosestellung allein bestehenden, definiert hohen Markerbeladung bereits eine „poor prognosis“ mit einer progressionsfreien 3- jahres Überlebensrate von 45-50 % zu [78].

3. Die Beobachtung der Marker- und Halbwertszeitkinetik zu definierten Zeitpunkten kann die Effektivität der Therapie überwachen. In der UICC- Klassifikation wird die Höhe der Marker am tiefsten Messpunkt nach der Primäroperation bewertet. Diese Halbwertszeiten betragen für das β-HCG 24 bis 36 Stunden, für das AFP 3 bis 5 Tage und für die alkalische Plazentaphosphatase und LDH jeweils einen Tag [131]. Daher fällt die Bewertung des tiefsten Punktes bei hohen Ausgangswerten erst auf einen Zeitpunkt, der Wochen nach der Primäroperation liegen kann. Aus diesem Grund hat sich die Berechnung der Halbwertszeiten bewährt, die eine Tendenz schon nach kürzeren Meßintervallen zulässt [97,105].

   Es gilt, daß bei alleiniger chirurgischer Therapie die Marker innerhalb dieser Halbwertszeiten abfallen sollten, unter Chemotherapie lässt sich schon ein Ansprechen werten.

4. Darüber hinaus können Markeruntersuchungen -gerade im klinischen Stadium I- wertvolle Hinweise auf okkulte Metastasierungen ergeben [96,104], sie sind mithin auch ein Indikator für aktive Residualtumoren.

5. Der Markerverlauf ist auch in der Nachsorge der Patienten unabdingbar wichtig. Er zeigt frühzeitig durch entsprechende Markersynthese das Rezidiv - oftmals vor den bildgebenden Verfahren.

Die genannten Vorgaben können bei Hodentumorpatienten allerdings nur dann gelten, wenn das Serum des Patienten primär markerpositiv ist. Diese Konstellation trifft nur bei 60-70 % der Hodentumorpatienten zu. Primär markernegative Tumoren im klinischen Stadium I können ausschließlich durch die bildgebende Diagnostik klassifiziert werden.

Es bietet sich daher an, die für β-HCG, AFP, PLAP und LDH eingeführte Systematik auch auf mögliche andere Tumormarker anzuwenden und auf diese Weise das Fenster der markernegativen Tumoren weiter zu schliessen. Eine isomere Form der Pyruvatkinase, einem Hauptenzym der Glykolyse, wird als solcher Tumormarker diskutiert.

Dieses Isoenzym, genannt Tumor M2PK, erscheint bei einer Reihe von Tumorerkrankungen im Serum erhöht aufgrund eines tumorspezifisch veränderten Glukosemetabolismus.

M2-PK soll in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Anwendbarkeit als diagnostisch-prognostischer Hodentumormarker untersucht werden.

B. Ziel der Arbeit

Von der Firma ScheBo-Tech wurde der M2-PK-Test aufgrund der Ergebnisse von *Petri* [95] als Hodentumormarker angeboten. Die Literaturlage war wenig ergiebig und eher empirisch.
In der vorliegenden Arbeit soll daher M2-PK nach verschiedenen Kriterien untersucht werden. Als Arbeitshypothesen für einen unabhängigen Hodentumor gelten:

- Die Konzentration des Markers ist im Hodenvenenblut deutlich höher als im Blut der Vena cubitalis.
- Zwischen den beiden Werten besteht eine lineare Korrelation.
- Der Marker fällt nach effektiver Therapie in den Normalbereich ab.
- Im klinischen oder pathologischen Stadium I fällt der Marker nach Ablatio testis, einer Halbwertszeitkinetik folgend, ab.
- In metastasierten Stadien fällt der Marker erst nach stadiengerechter Therapie ab, wobei unter Chemotherapie gelegentlich eine zwischenzeitliche Erhöhung durch Tumorzelluntergang beobachtet wird (release Phänomen).
- Die Werte für den Verdachtsmarker sind nicht abhängig von den mit zu untersuchenden bekannten Markern und Hormonen. Es muss Patienten geben, die für die eingeführten Marker β-HCG, AFP, LDH und PLAP negativ, aber für den neuen Marker positiv sind.

C. Etablierte Hodentumormarker und ihre Bedeutung in der Diagnostik und Therapie

α_1-Fetoprotein (AFP):
die Halbwertszeit beträgt 5 Tage, der Marker ist bei Seminomen nicht nachzuweisen [65]. Das Glykoprotein, welches in der Embryonalphase im Dottersack und im Gastrointestinaltrakt gebildet wird, korreliert ausschliesslich mit nichtseminomatösen Keimzelltumoren des Hodens.
Konstante oder vorübergehende AFP-Erhöhungen werden beobachtet bei metastasierten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, benignen Lebererkrankungen, aber auch bei nutritiv- toxischen Leberschäden wie Hepatitiden und beim primären Leberzellkarzinom. Der Marker ist bei 65-70% aller Nicht- Seminome erhöht.

humanes β-Choriongonadotropin (HCG):

Ist ebenfalls ein Glykoprotein mit einer Halbwertszeit von 24-36 Stunden. Das Hormon wird vor allem von Tumoren mit trophoblastären Strukturen, aber auch in 5-33% von Seminomen sezerniert [72,129], wobei die Rate der positiven Fälle in höheren, metastasierten Stadien überwiegt [4].

β-HCG ist ein Hormon mit einer Alpha- und einer Beta- Untereinheit. Insbesondere das Seminom kann sowohl das gesamte Molekül als auch die reine Beta- Kette sezernieren.

Es sollen daher nur Kits zur Anwendung kommen, die das gesamte HCG-Molekül und die freie Betakette messen.

Das Auftreten bei Nicht- Seminomen liegt zwischen 50 und 65%. Beta HCG und AFP sind in 90-95% der Fälle mit metastasierter Erkrankung (advanced disease) erhöht [8].

Bassetto hat die Rolle von AFP, ß- HCG und LDH vorwiegend als prognostisches Kriterium für die Wirksamkeit der Chemotherapie von metastasierten Keimzelltumoren beschrieben [5]. Nach dessen Ergebnissen betrugen die physiologischen Halbwertszeiten des AFP 6 Tage und des HCG 40 Stunden bei radikaler Chirurgie durch die Tumorentfernung.

Laktatdehydogenase (LDH-1):

Es handelt sich um einen unspezifischen Marker, der bei grossvolumiger Metastasierung auftritt. Lediglich 60 % der an Hodentumor erkrankten Patienten exprimieren LDH.

Nach *v. Eyben et al* hat auch dieser Marker ein hohes prognostisches Potential -von ähnlicher Bedeutung wie das AFP und das ß- HCG [29].

Humane alkalische Plazentaphosphatase (PLAP):

Die Halbwertszeit liegt bei 24 Stunden, nach *Koshida* und *Wahren* 1990 sowie *Nielsen* et al. 1990 bei 50–65 % der Hodentumorpatienten positiv [62,87]. Die PLAP erwies sich beim Nichtraucher als klinisch relevanter Marker für Seminome und TIN- Zellen [61].

Östradiol:

Erhöht beim Leydig- Zelltumor. Östradiol ist jedoch kein unabhängiger Tumormarker: So führt zum Beispiel bei β-HCG produzierenden Tumoren die Strukturanalogie zum LH zu einer – sich nach Ablatio des kranken Hodens wieder normalisierenden – Suppression des Östradiols [7].

Grundsätzlich gelten besondere Charakteristika für Hodentumoren. Im Hodenvenenblut sind die Marker- zumindest bei Abwesenheit von Metastasen –deutlich höher zu messen als im peripheren Serum [7,43,68].

Weiterhin fallen sie im Therapieverlauf einer individuellen Kinetik folgend ab. Ein Anstieg des Markerverlaufs korreliert mit einer Zunahme der Tumormasse, es kann aber auch unter Chemotherapie aufgrund des Einschmelzens von Tumorzellen zu einem release- Phänomen kommen, wodurch ein falscher Markeranstieg vorgespiegelt wird.

Für das therapeutische Vorgehen bei Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens entscheidend sind neben der Primärhistologie die Untersuchungen zur Evaluation des Tumorstadiums. Dabei kommt neben den bildgebenden Verfahren den Messungen der Tumormarker eine besondere Bedeutung zu.

Die etablierten Tumormarker finden sich jedoch im peripheren Serum der betroffenen Patienten zu einem Anteil, der keine generalisierte Aussage über den weiteren Verlauf der Erkrankung zuläßt. Als Beispiel für die Problematik eines optimalen Managements soll hier das klinische Stadium I nach LUGANO bei nichtseminomatösen Keimzelltumoren (NSKZT) angesprochen werden: im klinischen Stadium I der NSKZT, in dem es um die Entscheidung geht, ob der Patient mit einer Operation, einer Chemotherapie oder einer Surveillance-Strategie belastet werden muß, liegt der positive prädiktive Wert aller Kriterien derzeit bei 70%.

Das bedeutet, daß eine relativ grosse Zahl von Patienten mit invasiven Maßnahmen belastet wird, die primär gar keine Metastasierung aufweisen, beispielsweise ist die retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) für diese 70% lediglich eine Stagingmaßnahme ohne therapeutischen Nutzen.

Die Identifikation klinisch nutzbarer prognostischer Risikofakatoren für Patienten mit NSKZT im klinischen Stadium I stellt daher eines der wichtigsten klinischen Ziele dar, um die Patienten abhängig von ihrem individuellen Risikoprofil bezüglich einer Metastasierung der bestmöglichen Therapieoption zuzuführen [82]. Hierbei sei insbesondere auch auf die Bedeutung des Embryonalzellkarzinomanteils im Primärtumor (%EC) wie auch auf die Gefäßinvasion hingewiesen, welche mittlerweile einen etablierten und akzeptierten Risikofaktor für eine okkulte Metastasierung beim Nichtseminom. darstellen [47,51,83]. Dabei muß sicher ausgeschlossen werden, daß es sich um eine artefizielle Tumorzellverschleppung bei der histologischen Aufarbeitung handelt. Im Zweifelsfall sollte eine immunhistologische Färbung mit dem Endothelmarker CD-31 erfolgen. Beim Seminom scheint die Tumorpropagation in das Rete testis eine prognostische Rolle zu spielen [20].

Auf weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Expression verschiedener Proliferationsmarker, Proteasen und Zelladhäsionsmolekülen im Hinblick auf ihren prognostischen Wert für die Beurteilung des Lymphknotenstatus im Stadium I durch *Heidenreich et al.* wird verwiesen [46]. Eine weitere sinnvolle Ergänzung zu den etablierten Stagingmethoden scheint durch den Nachweis zirkulierender Tumorzellen mit Reverse-Transcriptase PCR gegeben zu sein, welche sich derzeit in Erprobung befindet.

In den Konzepten mit reiner Surveillance unter Verzicht auf die Bestimmung von Prognosefaktoren zeigt sich, daß etwa 30% der Patienten von Relapsen oder Progressen bedroht werden und mithin einer mindestens 3 Kurse umfassenden Chemotherapie bedürfen, die in Einzelfällen auch zum Tode führen kann, besonders da manche Relapse erst spät bei großer Tumorbeladung erkannt werden [7,43,30,67,98,132] .
Weiterhin sind die diagnostischen Methoden unscharf, wenn es um die Beurteilung der malignen Potenz von Resttumoren nach stattgehabter Polychemotherapie in den metastasierten Stadien geht.
Auch hier ist die Diagnostik wesentlich für die Indikation zu weiteren belastenden chirurgischen Maßnahmen- wie zum Beispiel die retroperitoneale oder pulmonale Resttumorbergung- (auch: Salvage- RLA [1,22,39,48,80]). Insgesamt sind 30-40 % der Keimzelltumoren des Hodens markernegativ.
Es gilt also weiterhin, „Labormarker“ für eine okkulte – oder restliche – Metastasierung zu finden, die eine rechtzeitige Einordnung in die vielfältigen primär kurativen therapeutischen Optionen zulassen und somit das diagnostische Fenster verkleinern helfen.
Hierbei ist es insbesondere von Wichtigkeit, die typische Verlaufskinetik zu beachten und ebenso die Unabhängigkeit vom endokrinologischen Regelkreis, welcher beim Hodentumor bekanntermaßen gestört ist, zu fordern [7,43]. Die inaktive Form der Pyruvatkinase vom Typ M2 (M2PK) ist als Tumormarker für verschiedene Tumore untersucht worden und wurde von *Petri et al.* als neuer möglicher Hodentumormarker postuliert [95].

D. Pyruvatkinase und deren Isoenzyme

1. Struktur

Die Struktur der Pyruvatkinase ist polypeptidisch. Sie besteht aus 529 Aminosäuren und ist aus 4 Monomeren Ketten zu einem Tetramer verbunden.

Die 4 Untereinheiten setzen sich aus sogenannten L und L` -Monomeren zusammen, die ihrerseits durch vier unterschiedliche messenger RNA`s codiert werden und sich zu gewebsspezifischen Isoenzymen formieren [60,71]. Das Molekulargewicht einer L-Untereinheit beträgt 58000 Dalton, das einer L`-Untereinheit liegt geringfügig höher bei 63000 Dalton [57].

Das Pyruvatkinase–Tetramer weist demzufolge, je nach vorliegendem Isoenzym, ein Molekulargwicht von 232-252 kiloDalton auf [55].

Tani und *Yoshida* konnten die Codierungssequenz der humanen M2-PK cDNA isolieren. Der Genort für M2-PK ist lokalisiert auf dem Band q 22 des Chromosomes Nr.15 [117], der für den L- Typus auf Chromosom Nr. 1 [17].

2. Biochemische Grundlagen

Pyruvate sind die Salze der Acetylameisensäure (früher: Brenztraubensäure), der einfachsten Ketosäure, die chemische Formel lautet auf CH_3-CO-COOH. Sie treten als Zwischenprodukte im aeroben und anaeroben Stoffwechsel auf und nehmen dort eine zentrale Stellung ein.

Die Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40), eine von Metall-Ionen abhängige Phosphotransferase, katalysiert die durch Mg^{2+} - Kationen als Cofaktor vermittelte Reaktionsfolge des letzten Schritts der anaeroben Glykolyse: die Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat, eines Enolesters mit einer energiereichen Bindung, bei deren Hydrolyse 50,24 kJ/Mol freiwerden [19,64].

Unter der Katalyse der Pyruvatkinase wird die freie Energie zur Übertragung der Phosphatgruppe auf ADP unter Bildung von ATP verwendet [13].

Dies erfolgt im Rahmen des Intermediärstoffwechsels des Menschen, der Glykolyse:

[Embden- Meyerhof Reaktion : ADP + Phosphoenolpyruvat ATP + Pyruvat]. Der allosterische[1] Aktivator dieses Enzyms ist hierbei das Fructose-1,6- Bisphosphat.

Dieses Zwischenprodukt der Glykolyse induziert gleichzeitig die Reassoziation der monomeren zur dimeren und tetrameren Form von M2-PK in Abhängigkeit der intrazellulären Glucosekonzentration.

Bei hoher intrazellulärer Glucosekonzentration liegt die Pyruvatkinase als Tetramer vor [2,3,56,63,122,129,136]. Pyruvatkinase ist somit das Schlüsselenzym der Glykolyse und das Bindeglied zwischen Glucosestoffwechsel und Citratzyklus.

Das Enzym erfüllt während des Stoffwechselgeschehens zwei Funktionen: zum einen dient die Pyruvatkinase der Bereitstellung von Energie unter Sauerstoffmangelbedingungen, wie sie zum Beispiel in der Muskulatur bei hoher Belastung auftreten.

Zum anderen ist sie von hoher Bedeutung für die Umwandlung der Glucose in Syntheseprodukte, wie zum Beispiel Speicherfette, bestimmte Aminosäuren oder Nucleinsäuren. Der autosomal rezessiv vererbte Mangel an Pyruvatkinase in Erythrozyten ist klinisch bedeutsam und führt zum Krankheitsbild der hämolytischen Anämie mit Kernikterus und Splenomegalie [101,104,135]. Schon 1923 wurde durch Otto *Warburg* entdeckt, daß Tumorzellen Glucose als Energieträger gesteigert verstoffwechseln [100].

Weiterhin ist seit über sechzig Jahren bekannt, daß ungehemmt proliferierende Zellen im Rahmen der sog. „aeroben Glykolyse“ in Anwesenheit von Sauerstoff Lactat abgeben.

Auch bei ausreichendem Sauerstoffangebot verstoffwechseln Tumorzellen Glucose also nur bis zum Lactat, da Tumorzellen Glucose-6- Phosphatase nicht aktivieren können. Eine Reduktion dieses Enzyms hat weitreichende Rückwirkung auf Morphe und Funktion der Zelle. So wurde durch *Hermann et al*. beim klarzelligen Nierenzellkarzinom, welches sich durch eine Glykogenspeicherung als histomorphologisches Merkmal auszeichnet, eine deutliche Reduktion der Glucose-6-Phosphataseaktivität nachgewiesen [49].

Die Lactatazidose wird dadurch zusätzlich verstärkt. Differenzierte Gewebe, wie Muskel und Gehirnzellen, produzieren Lactat nur in Abwesenheit von Sauerstoff unter Katalyse der Laktatdehydrogenase aus Pyruvat: dies ist physiologisch und wird als *anaerobe* Glykolyse bezeichnet [124]. Eine weitere Art der Energiegewinnung durch die Tumorzelle ist die Umwandlung von Glutamin in Lactat durch die Glutaminolyse [15].

Gesunde Zellen gehen diesen ineffizienten Weg der Energiegewinnung nur bei Sauerstoffmangel, da hier pro Mol Glucose nur 2 Mol ATP gebildet werden können. Bei der mitochondrialen Atmung hingegen sind dies 38 Mol ATP pro Mol Glucose.

Die Tumorzelle unterscheidet sich mithin in ihrem Intermediärstoffwechsel signifikant von allen anderen schnell proliferierenden Zellen [27].

---

[1] Allosterie: Bei Proteinen mit Quartärstruktur (z.B. Enzyme) die Änderung der Konformation dieser Eiweisskörper unter dem Einfluss sich anlagernder niedermolekularer Verbindungen (Effektoren). Ändert bei Enzymen die Bindungsneigung zum Substrat. Aus: Roche Lexikon Medizin, 4. Aufl. 1998, S 45-46

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß der gesteigerte Glukoseumsatz von Tumoren auf einer durch Onkogene induzierten Vermehrung und Aktivierung von Glukosetransportproteinen, die zu einer forcierten intrazellulären Glukoseaufnahme führt, beruht. Weiterhin ist die Aktivität der Hexokinase in Tumorzellen erhöht, die der Glukose-6-Phosphatase in Tumorzellen erniedrigt [34].

Eigenbrodt et al. haben Isoenzyme der Pyruvatkinase zellkulturell, serologisch sowie deren Aktivität mit optischen Tests auf charakteristische Veränderungen der Glykolyse und Glutaminolyse bei der Tumorentstehung untersucht [76].

Die aktive (tetramere) Form der Pyruvatkinase mit einer hohen PEP- Affinität lässt die Umwandlung zum Pyruvat zu, das Vorliegen der inaktiven Form mit einer niedrigen PEP Affinität (Mono oder Dimere Form) führt zu einer fehlenden Umwandlung vom PEP zum Pyruvat mit konsekutivem Phosphometabolitenstau, wie auch für verschiedene Tumorentitäten beschrieben wurde [18,26,27,75,110] .

Experimentell besteht ein nachweisbarer Zusammenhang zwischen Glykolyserate und der Proliferationsrate eines Tumors, die nicht umgesetzten Phosphometaboliten sind als integraler Teil der Membranphospholipide und des Phosphoinositolsystems für die Zellhomöostase und die Zellintegrität verantwortlich und somit für den Aufbau von Zellbausteinen unabdingbar [18,35,110]. Dabei entstehen Synthesezwischenprodukte, die ihrerseits die Zellteilung stimulieren, wie NADH, Serin und Dihydrosphingosin aus der Gruppe der Phospholipide.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Hauptfolge der „aeroben“ Glykolyse die Expansion von Phosphometaboliten ist.

3. Isoenzyme der Pyruvat Kinase

Die Pyruvat Kinase ist in jeder Zelle in Form verschiedener Isoenzyme vorhanden. Der Nachweis unterschiedlicher Pyruvatkinasen wurde erstmals 1976 durch *Etiemble* mittels Gel-Elektrophorese geführt [28].

Das Enzym weist 2 Gene pro haploidem Chromosomensatz auf, wobei jedes dieser Gene zwei Isoenzyme codiert.

Marie und *Levin* konnten dabei nachweisen, daß die M1 und M2 Isoenzyme durch ein und dasselbe Strukturgen codiert werden [66,73]. Das M-Gen generiert die M1 und M2 Typen durch „RNA- Splicing“, das L/R-Gen produziert die L und R- Isoenzyme [58, 88].

Die Genexpression wiederum steht unter hormoneller Kontrolle [134]. Die Organspezifität dieser Isoenzyme in ausdifferenzierten Geweben ist unterschiedlich.

Die Pyruvatkinase vom Typ L ist das spezifische Enzym der Leber (Liver type) und der proximalen Nierentubuli. Der Typ R erscheint in Erythrozyten, wobei reife Erythrozyten lediglich die R-PK enthalten, unreife Formen auch coexpressiv für R-PK und M2-PK sind [74]. Die Pyruvatkinase R1-PK ist prädominant in Erythroblasten und besteht aus 4 identischen L` Untereinheiten.

Die L- type Pyruvat Kinase setzt sich aus 4 identischen L -Subgruppen zusammen (L4), wohingegen die Hauptform des in Erythrozyten enthaltenen Enzymes (R-PK) als ein Heterotetramer mit jeweils zwei unterschiedlichen Subentitäten (L2L2`) figuriert [57]. In der Lunge kommt überwiegend die tetramere Form der M2-Pyruvatkinase vor [15,127,128].

Weiterhin wird während der embryonalen Entwicklung sowie auch in proliferativ aktiven Geweben des erwachsenen Organismus, zum Beispiel Darm und Hautepithel, die Pyruvatkinase Typ M2 (M2-PK) exprimiert [75]. 1986 gelang *Kechemir et al.* der Nachweis von M2-PK in menschlichen Leucozyten [59].

Eine bis zu 600- fache Erhöhung der Pyruvatkinase konnte in neutrophilen Leucozyten regelhaft bei polytraumatisierten Patienten im Zuge des entgleisten intrazellulären Glucosestoffwechsels unter Stressbedingungen beobachtet werden [90].

Netzker et al. wiesen die zellzyklusspezifische Expression von M2-PK in proliferierenden Thymozyten von Ratten nach [86]. Die Pyruvatkinase Typ M1 wird vorzugsweise in Geweben exprimiert, in der hauptsächlich die Glucose der Bereitstellung von Energie dient, vornehmlich also in Muskel und Gehirnzellen, insbesondere im Herzmuskel vorkommend [94]. Nach der Entwicklung von selektiven monoklonalen Antikörpern gegen die Tumor-M2-PK ohne Kreuzreaktivität zu anderen Isoenzymen oder der tetrameren Form der Pyruvatkinase wurde die Wertigkeit der Tumor-M2-PK in der Diagnostik und Verlaufsbeobachtung einer Reihe von Tumoren untersucht. Bereits 1993 wurden diesbezüglich erste Studien publiziert [77], jedoch ist der kommerzielle Einsatz dieses Markers erst seit 1998 möglich.Grund dafür ist die wechselhafte Stabilität der M2-PK im Serum, insbesondere bei Versand von Vollblut. Dies ist einerseits auf eine Freisetzung der Pyruvatkinase aus Erythrozyten und Leucozyten zurückzuführen, andererseits kommt es temperaturabhängig zu einem proteolytischen Abbau mit signifikant abnehmender Konzentration im Verlauf weniger Tage. Diese Störgrössen werden bei Verwendung von EDTA-Plasma weitgehend vermieden (s.Diagramm II, S.61). Es steht nun ein spezifischer Enzymimmunoassay zur Verfügung , mit dem die Tumor M2-PK nun auch im EDTA- Plasma quantifiziert werden kann.

4. Rolle der Pyruvatkinase Typ Tumor M2 als Tumormarker und im Tumorstoffwechsel

Der Metabolismus von Tumorzellen ist charakterisiert durch ein hohes Aktivitätspotenzial der sogenannten „aeroben“ Glykolyse. Tumorzellen weisen gemeinsam mit normal proliferierenden Zellen in der G1- Phase des Zellzyklus kontinuierlich hohe Konzentrationen von Glykolysemetaboliten auf, z.B. das Glucose-6-Phosphat und das Phosphoenolpyruvat.

Die M2-PK ist physiologischerweise nur in der Lunge zu finden, hier jedoch nur in der tetrameren Struktur [15,127,128].

In normal proliferierenden Zellen besteht die M2-PK aus 4 gleich grossen tetramerisch angeordneten Untereinheiten. 1983 wurden erstmals durch *Eigenbrod et al.* die strukturellen und biochemischen Untergruppen der Pyruvatkinase näher untersucht [25].

Bei der *Tumor*-M2-PK handelt es sich um die dimere Form des Isoenzyms M2 der Pyruvatkinase, welches in Tumorzellen überexprimiert wird und daher in Blut und Blutprodukten aufgrund von Tumorzellzerfall und konsekutivem erhöhten Zellumsatz messbar wird. Dieses Isoenzym unterliegt einer komplexen Regulation durch Aminosäuren, Fructose- 1,6- Bisphosphat sowie durch hormonell induzierte und auch onkogen programmierte Phosphorylierung durch die PP60v-src-Tyrosinkinase.

Die Inaktivierung der in Tumorzellen überexprimierten Isoform M2-PK erfolgt durch eben dieses Enzym durch Phosphorylierung der Aminosäuren Tyrosin und Serin des Tetrameren, welcher dadurch in überwiegend monomere und dimere Isoenzymformen zerfällt.

Die dimere Form zeichnet sich mit einer geringen Affinität zum Substrat Phosphoenolpyruvat aus. Die partielle Inaktivierung der Pyruvatkinase und Pyruvatenolase auf der einen Seite und eine Überaktivierung der Hexokinase und Phosphofructokinase auf der anderen führt zu einer Expansion der Phosphometaboliten, die ihrerseits im Rahmen der Tumorentwicklung als Zellbausteine zur Verfügung stehen. Gleichzeitig sind die intrazellulär anflutenden Phosphometaboliten wie Fructose 1,6–bisphosphat, Ribose 5-P, UDP- Glucose, UTP, NAD, P-Ribose-PP diagnostisch hilfreich in der 31-P-spezifizierten Magnet-Resonanz-Tomographie hinsichtlich der Detektion von soliden Tumoren [18,27]. Auch aus der bereits beschriebenen erhöhten Glykolyserate von Tumorzellen lässt sich diagnostischer Nutzen gewinnen.

Die Positronenemissionstomographie (PET) stellt eine derzeit in weltweit laufenden Studien befindliche nuklearmedizinische Funktionsdiagnostik dar, welche die regionalen Stoffwechselvorgänge mit Hilfe des Glucoseanalogons und Radiopharmakons ^{18}Fluor-2-Fluor-2-Deoxy-D-Glucose (FDG) untersucht, so daß auch der Begriff des „metabolic imaging“ geprägt wurde [3]. Die nach Positronenemission entstehende Vernichtungsstrahlung wird in anreicherndem Gewebe registriert und computerunterstützt dargestellt [42]. Die PET hat sich für den Nachweis und das Staging von Tumoren sowie der posttherapeutischen Differenzierung einer Narbe bzw. einer Nekrose von einem Tumorrezidiv beim Bronchialkarzinom und bei kolorektalen Tumoren bereits bewährt [3,34].

Für urologische Tumoren liegen jedoch bisher erst kleine Studien zur Bedeutung der FDG-PET vor [52], sie scheint allerdings beim Seminom hilfreich zu sein, weil sie zwischen aktivem Tumor sowie Nekrose oder Fibrose unterscheiden kann [84].

In allen bisher untersuchten Tumorzellen kommt es zur Überexpression der Pyruvatkinase mit einem „shift“ zum Isoenzym M2-PK. Liegt dieses inaktiv in monomerer, dimerer oder trimerer Form vor, wird es als Tumor M2-PK bezeichnet. In Tumorzellen findet sich hauptsächlich die dimere Form, welche für deren Stoffwechselfunktionen grosser Bedeutung ist. Sie führt aufgrund ihrer speziellen kinetischen Eigenschaften dazu, daß Kohlenhydrate nicht mehr zur Synthese von Fetten verwendet oder der Energiegewinnung zugeführt werden, sondern vorrangig in die Nucleinsäuresynthesewege (DNS/RNS) eingeschleust werden [77,92,116]. Ausreichende Mengen von DNS und RNS sind aber die Voraussetzung für unbegrenzte Zellteilungen [75].

Die inaktive Form der Pyruvatkinase vom Typ M2 wurde in den vergangenen Jahren für verschiedene Tumorentitäten als möglicher verwertbarer Marker näher untersucht.

II. Methodisches Vorgehen

Tumor M2-PK wurde in Serumproben mittels eines kommerziellen ELISA-Kit (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay) quantifiziert.

1. Patientenauswahl:

Die Serumproben stammen von insgesamt 35 Patienten, die von Mai 1999- März 2000 in der Urologischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg aufgrund eines Hodentumors der Stadien I-III nach UICC behandelt wurden.
Hier werden seit 1980 pro Jahr im Mittel 70 Neuerkrankungen an Keimzelltumoren registriert. Die relevanten Daten dieser Patienten werden in einer Datenbank gespeichert und sind somit langfristig zugänglich.
Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verschickung und weiteren Untersuchung von Körpermaterial zu wissenschaftlichen Zwecken.
Eine möglicherweise ethisch bedenkliche Erweiterung der diagnostischen respektive therapeutischen Maßnahmen entstand aus den Untersuchungen nicht.

2. Material und Methoden

Von den 35 konsekutiven Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens wurden – sofern intraoperativ möglich- Proben aus dem Blut der Vena testicularis und regelhaft aus der Vena cubitalis untersucht, die während des Standardeingriffes beim malignen Hodentumor- der hohen inguinalen Semikastratio [131]- gewonnen wurden.

Das Blut der Vena testicularis wurde intraoperativ während der Hodenfreilegung durch Präparation einer kräftigen Vene des Samenstranges gewonnen, in die durch eine Venotomie eine Teflon-Kanüle in testiculärer Richtung appliziert wurde, danach erfolgte die Aspiration von bis zu 10 ml Hodenvenenblut für verschiedene Markeruntersuchungen. Diese Blutgewinnung geschah vor der Mobilisation des Hodens aus dem Skrotum, um keine artifizielle Verschleppung von Tumor oder Tumorsubstraten zu provozieren oder systematische Fehler bei den zu messenden Substraten zu erzeugen.
Die Proben aus dem Blut der Vena cubitalis wurden unmittelbar präoperativ, am 1. sowie am 5. Tag postoperativ und danach einmal wöchentlich abgenommen.

Gelegentlich gestaltete sich die Gewinnung des Hodenvenenblutes schwierig, da nur dünne Venen vorliegen, welche unter der Aspiration leicht kollabieren. Es konnten daher bisweilen nur geringe Mengen von Hodenvenenblut asserviert werden.

Um einen Einfluss der EDTA auf die unterschiedlichen Blutvolumina auszuschliessen, wurde von einem Patienten mit hoher Tumorbeladung und zu erwartender hoher M2PK-Serumkonzentration eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der verschiedene Volumina des gewonnenen Hodenvenenblutes in die standardisierten EDTA Röhrchen verbracht wurden (s.a. S. 21 III.1).

Im Blut der Vena testicularis und der Vena cubitalis werden in unserem Hause routinemäßig und im Zusammenhang mit laufenden Studienprotokollen folgende Parameter bestimmt:

AFP, β-HCG, LDH und PLAP als Tumormarker, Östradiol, Testosteron und Inhibin-B als testiculäre Sexualhormone sowie LH und FSH als Repräsentanten der hypophysär gonadalen Achse. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit noch das CRP (C- reaktives Protein) mit untersucht.

Bei den 35 untersuchten Patienten lag das mittlere Alter bei 29 Jahren, der Altersrange betrug 20-45 Jahre, dies entspricht einem repräsentativen Querschnitt aus der Grundgesamtheit (s. Abb. 1, S.49).

Von den 35 Patienten hatten 21 ein Nicht-Seminom und 12 ein Seminom. 1 Patient wies eine testiculäre intraepitheliale Neoplasie (TIN) auf und 1 Patient hatte einen LEYDIG-Zell-Tumor (s. Abb. 2, S.49), auch diese Verteilung ist repräsentativ.

Von den Patienten mit Keimzelltumoren waren 18 in den Stadien I, 7 in den Stadien II A/B/C und 8 im Stadium III (s. Abb. 3, S.50). Das intraoperativ gewonnene Blut aus den Hodenvenen wurde sofort in EDTA-Monovetten verbracht.

Das Blut der Vv. cubitales wurde direkt mit Kalium- EDTA- Monovetten (Firma Sarstedt, Nürnbrecht) abgenommen. Nach Zentrifugation und Dekantierung wurden diese Plasmen auf – 20° C eingefroren. Der Probentransport ins Labor erfolgte ebenfalls tiefgekühlt. Die Proben wurden in zwei Serien in Doppelbestimmung gemessen.

Alle Proben wurden nur einmal eingefroren und einmal zur Messung aufgetaut.

Die M2-PK -Testungen erfolgten in einem geeigneten Labor (Praxisgemeinschaft Dr. Fenner, Hamburg).

3. Untersuchte Parameter und Nachweisverfahren

Ausser der Tumor M2-PK wurden aus den Serumproben die Tumormarker AFP, PLAP, β-HCG und LDH bestimmt, darüber hinaus die Steroide Testosteron und Östradiol sowie die Gonadotropine FSH und LH ermittelt. Letztgenannte besaßen keine Relevanz in den durchgeführten Untersuchungen.

AFP (Alpha – 1 – Fetoprotein)

ECLIA der Firma *Roche*

Meßbereich [U/ml]: 0,500- 1000

Referenzbereich: - 5,8

Sensitivität: >0,50

Spezifität: keine Angaben

β- HCG (humanes Beta- Choriongonadotropin)

Mikropartikel – Enzymimmunaassay (MEIA) der Firma *Abbott*

Meßbereich [U/l]: keine Angaben

Referenzbereich: 0-7,0

Sensitivität: >2,0

Spezifität: < 0,08 % Kreuzreaktivität mit LH, FSH und TSH

hPLAP (humane plazentare alkalische Phosphatase

ELISA der Firma *Innogenetics*

Meßbereich [U/l]: keine Angabe

Referenzbereich: - 100

Sensitivität: < 30

Spezifität: < 0,01 % Kreuzreaktivität mit anderen alkalischen Phosphatasen

LDH (Lactatdehydrogenase)

Extinktionstest für COBAS Integra der Firma *Roche*

Meßbereich [U/l]: keine Angabe

Referenzbereich: 135-225

Sensitivität/Spezifität: keine Angaben

CRP (C- reaktives Protein [Latex])

Partikelverstärkte immunoturbidimetrische Bestimmung der Firma *Roche*

Messbereich [mg/l]:	0- 160 ohne Verdünnung
Referenzbereich:	< 5 mg/l
Spezifität/ Sensitivität:	keine Angaben

Tumor M2-PK

Enzymimmunoassay (ELISA) der Firma *ScheBo®- Biotech, Giessen*.

Messbereich [Units/ml]: 5-100 . Werte unterhalb des niedrigsten Standards werden als <5 U/ml angegeben, Werte oberhalb des höchsten Standards sollten als > 100 U/ml angegeben werden.

Referenzbereich:	vorläufiger Normalbereich: < 22,5 U Tumor M2-PK /ml im EDTA Plasma, Graubereich 15-25 U/ml
Spezifität:	>90% für die dimere, aktive Form

4. Testprinzip der quantitativen Bestimmung

Bei dem Tumor M2-PK-Assay (Firma ScheBo®-Tech, Giessen) handelt es sich um einen Sandwich-Enzym-Immuno-Assay im 96-well-Mikrotiterplattenformat mit zwei monoklonalen Antikörpern , welche hochspezifisch sind für die Tumor-M2-PK und keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Isoenzymen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und M2) aufweisen, insbesondere nicht mit der tetrameren Form der M2-PK.

Die ELISA Platte ist mit einem monoklonalen Antikörper, der nur das Isoenzym der humanen Pyruvatkinase Typ Tumor M2 (Tumor M2- PK) erkennt, beschichtet.

An diesen bindet sich im ersten Inkubationsschritt die Tumor M2-PK aus dem Patienten-EDTA-Plasma, Tumor M2- PK wird durch Bindung am Antikörper immobilisiert. In einem zweiten Inkubationsschritt bindet dann ein biotinylierter zweiter monoklonaler Antikörper.

Der Komplex reagiert anschließend mit dem Konjugat von POD (Peroxidase) und Streptavidin. Die Peroxidase oxidiert anschließend das Substrat ATBS (2, 2`- Azino –*bis*–(3-ethylbenzathiazolin-6-sulfonsäure). Die Farbreaktion wird abgestoppt und abschließend die ATBS bei 405 nm mit Hilfe eines Mikroplattenreaders photometrisch gemessen. Die Referenzwellenlänge beträgt 492 nm

Standards, Kontrolle und Tumor M2-PK enthalten als Konservierungsmittel das Natriumsalz der Stickstoffwasserstoffsäure, das Natriumazid.

Detaillierte Beschreibung:

Alle Bestandteile des Testkits werden bis zu ihrer Verwendung bei 4-8° Celsius gelagert und müssen kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Patientenproben werden aufgetaut und gründlich gemischt.

Es wird nun der Proben/Waschpuffer hergestellt. Hierzu werden 100 ml Proben /Waschpuffer mit 400 ml Aqua bidestillata vermischt.

Danach wird die eingeschweisste ELISA- Platte vorbereitet. Diese enthält 12 ELISA-Teststreifen , die mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Tumormarker Tumor M2-PK geschichtet sind (insgesamt 96 Vertiefungen). Vor dem Öffnen muß die Platte Raumtemperatur erreicht haben.

- Verdünnungen der zu untersuchenden EDTA- Plasmen:
- 1:100 = 10 µl EDTA Plasma + 1000 µl Proben/ Waschpuffer nach guter Durchmischung.
- Danach Herstellung der anti Tumor M2-PK bio in 1:100 Verdünnung (z.B. Ansatz für 12 Teststreifen = 1 Platte = 60 µl anti Tumor M2- PK bio werden pipettiert und mit 6,0 ml Proben/ Waschpufferlösung versetzt) .

Die Standards sind gebrauchsfertig und werden in Reihe 1 und 2 der ELISA- Platte als Doppelwerte in die entsprechenden Vertiefungen mit jeweils 50 µl pipettiert.

<u>Hierbei entsprechen</u>:

Standard 1 = 5 U/ml
Standard 2 = 15 U/ml
Standard 3 = 40 U/ml
Standard 4 = 100 U/ml

Die Kontrolle ist ebenfalls gebrauchsfertig und wird mit jeweils 50 µl in 2 willkürlich gewählte Vertiefungen pipettiert. Dabei hat die Kontrolle einen Wert von 20 U/ml ± 10%.

Von den verdünnten EDTA- Plasma Proben werden jeweils 50 µl nebeneinander als Doppelwerte in die weiteren Vertiefungen pipettiert.

Nun werden Mikrofugenröhrchen (1,5 ml) mit B1 und B2 für „Blanks“, S1 bis S4 für Standards und P1 bis P42 für die zu untersuchenden Proben beschriftet. S1 bis S4 werden wie oben angegeben befüllt und in die Vertiefungen B1 bis E2 verbracht.
Die beiden Blanks werden jeweils mit 50 µl Proben/ Waschpuffer befüllt und besetzen die Vertiefungen A1 und A2. Die Kontrolle kommt in die Vertiefung F1 und F2. Dann wird die Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgt nun der Waschvorgang: der Inhalt der Vertiefungen wird verworfen.
Die Vertiefungen der Platte werden dreimal mit Proben/Waschpuffer (8- Kanalpipette) ausgewaschen (250 µl/ Vertiefung), die Waschlösung wirkt bei jedem Waschschritt mindestens 1-2 Minuten ein. Flüssigkeitsreste werden durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernt.

Konjugat und Substratinkubation

Es wird jetzt der biotinylierte zweite monoklonale Antikörper zugegeben, jeweils 50 µl pro Vertiefung, wie oben beschrieben auf 1: 100 verdünnt.
Danach erfolgt die erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Der Inhalt der Vertiefungen wird verworfen, die Vertiefungen selbst dreimal mit je 250 µl Proben/ Waschpuffer ausgewaschen.

Inkubation mit POD- Streptavidin

Zugabe von 50 µl gebrauchsfertiger POD- Streptavidin Lösung pro Vertiefung. Danach erneute Inkubation unter lichtgeschützten Bedingungen für 30 Minuten.
Wieder Verwerfen des Inhaltes der Vertiefungen und erneutes 3- maliges Auswaschen mit 250 µl Proben/ Waschpuffer.

Farbreaktion

Zugabe von 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung in jede Kavität, danach erneute lichtgeschützte Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
Dann Einbringen von 100 µl Stoplösung zum Unterbrechen der Farbreaktion und anschliessendes Schütteln auf dem Kreiselmischer.

Messung

Die OD (**O**ptical **D**ensity)- Messung erfolgt bei 405 nm zwischen 5 und 30 Minuten nach Zugabe der Stoplösung.
Vor der Messung muß die ELISA Platte sorgfältig geschüttelt werden. Wird gegen eine Referenzwellenlänge gemessen, so sollte diese 492 nm betragen**.**

Quantitative Auswertung

a. Manuelle Auswertung

Nach Subtraktion des Blank Mittelwertes wird der Mittelwert der Absorption der Doppelwerte berechnet. Die Konzentration des Standards (Abszisse) wird gegen Ihre Absorption (Ordinate) aufgetragen (doppeltlogarithmische Darstellung der Standardkurve). Für die Patientenproben werden die Werte direkt an der Standardkurve abgelesen.
Proben mit einer Tumor- M2- PK – Konzentration von > 100 U/ml wurden am selben Tag in einer 1.5 bis 1:10 Verdünnung nachuntersucht. Messergebnisse aus dem Bereich 15-20 U/ml sind fraglich (Graubereich) und wurden mit einer neuen Probe wiederholt.

b. Auswertung mittels ELISA – Software

Die Plattenbelegung wird bezüglich der Blanks, Standards und Proben definiert. Als Methode wird die lineare Regression mit log-log Skalierung gewählt.Nach Informationen des Herstellers liegt der mittlere Intraassay-Variationskoeffizient bei 3,5 % (2,4 bis 7,0 %), der Interassay-Variationskoeffizient bei 5,3 % (3,3 bis 7,5 %), ein nach Angaben des Herstellers sehr günstiger Wert. Der Referenzbereich dieser Methode reicht bis 22,5 U/ ml, die Spezifität liegt bei 90 bis 95 %.

5. Statistische Testverfahren

Die Daten wurden mit Hilfe von Excel- Tabellen katalogisiert, miteinander korreliert und teilweise mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 9.0 für Windows ausgewertet.

Hierbei konnten *Regressionsanalysen* und *Bestimmtheitsmaße* berechnet werden.

Die Regressionsanalyse betrachtet die Möglichkeit der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale, der Graph aller Datenpaare ist als Punktwolke dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß stellt einen Test zur Prüfung korrelativer Zusammenhänge dar.

Hierbei ist das Verhältnis des Anteils der Streuung der Punkte auf der Geraden zur Gesamtstreuung das Maß für die Schärfe, mit der die Gerade bestimmt wird. Als statistische Untersuchungen kamen nichtparametrische Testverfahren wie der Kruskal- Wallis- Test , Mediantest sowie der Jonckheere- Terpstra- Test bei mehreren Stichproben zur Anwendung (s.S.63-66).

So konnten die Unterschiede zwischen den M2-PK- Werten auf ihre Signifikanz hin überprüft werden. Das Signifikanzniveau für die Zurückweisung der Nullhypothese, also die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zu messende Gruppen in sich gleich sind, sollte unter einem alpha- Wert von 0,05 liegen.

III. Ergebnisse

1. Verdünnungsreihe

Zum Ausschluss eines Einflusses der EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) Konzentration in den Probenröhrchen auf die Meßwerte wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt.

Blut der Vena cubitalis eines Patienten mit einem Nichtseminom im klinischen Stadium III (UICC) und hoher M2PK Markerbeladung wurde in EDTA- Monovetten abgefüllt.

Eine Monovette wurde mit 1 ml, eine mit 1,5 ml, eine mit 2,0 ml und eine mit 2,5 und 3,0 ml befüllt.

Die gemessenen Konzentrationen von Tumor- M2PK betrugen in den Proben 126,143, 128, 157 und 137 U/ml. Der Median lag bei 137,0 U/ml, der Mittelwert bei 138,2 U/ml.

Die Standardabweichung um den Mittelwert entspricht dabei 4,54 % und liegt mithin innerhalb der vom Hersteller angegebenen Intra- Assay- Variationskoeffizienz.

Daher kann angenommen werden, daß die Konzentration des EDTA in der Probe keinen Einfluß auf die Meßwerte hat.

2. Konzentration von Tumor M2-PK im peripheren Venenblut und im Hodenvenenblut

Zunächst auffällig waren die relativ ähnlichen Messungsergebnisse der M2-PK im Hodenvenen wie auch im Cubitalvenenblut.

Dies widerspricht den eigenen Beobachtungen, daß die etablierten Tumormarker und Fertilitätsparameter regelhaft mit deutlich höherer Konzentration im Hodenvenenblut nachzuweisen sind. Zur Definition der im weiteren Textverlauf angegebenen Meßzeitpunkte:

Tag 0 : entspricht Abnahme 1 (= präoperativ)

Tag 1 : entspricht Abnahme 2 (= erster postoperativer Tag)

Tag 5 : entspricht Abnahme 3 (= fünfter postoperativer Tag)

Tag 8-13. : entspricht Abnahme 4

Tag 15-20: entspricht Abnahme 5

In der Auswertung sämtlich ermittelter M2-PK Werte kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Bei 23 Patienten konnte M2-PK im Blut der Vena testicularis zwischen 1,7 U/ml und 190 U/ml gemessen werden. Der Median lag bei 8,8 U/ml, der Mittelwert bei 21,7/ml bei einer Standardabweichung von 39,3 (s. Abb.4, S. 50).

Im Blut der V.cubitalis ergaben sich für die präoperativ am Operationstag abgenommenen M2-PK Parameter: Minimum 1,7 U/ml, Maximum 170 U/ml, Median und Mittelwert bei 7,3 resp. 19,9 U/ml bei einer Standardabweichung von 35,3 U/ml (s. Abb. 5, S. 50).

Das Verhältnis der Konzentrationen an M2-PK im Cubitalvenenblut zur Hodenvene beträgt somit **1: 1,1.**

Die Korrelationen zwischen Hoden und Cubitalvenenblut und der M2-PK Verlauf sollen nun im folgenden Gegenstand der Betrachtung sein.

3. Regressionsanalysen

a. Testicularvenenblut (VT)/ Cubitalvenenblut (VC)(alle Tumoren)

In der Regressionanalyse ergaben sich aus den am Operationstag entnommenen Werten aus der Vena cubitalis (M2PK-0 VC) und den aus der Vena testicularis (M2PK-0 VT) folgende Ergebnisse:

Die Regressionsgerade folgt der Formel M2PK(VT) = 0,2222 (M2PK{VC})+ 18,537, das Bestimmtheitsmaß lag bei 0,0024 und 0,0031 (s. Abbildung 6 , S. 51)

b. Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (klinisches Stadium I)

Auch bei diesen Patienten ergab sich keine signifikante Regression zwischen den Wertereihen, das Bestimmheitsmaß lag bei 0,0166, die Regressionsgerade folgte der Formel M2PK (VT) = 0,212(M2PK{VC}) +7,6902 (s. Abb. 7, S.51).

c. Korrelation Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (nur Seminome)

In der Regressionsanalyse VT/VC ausschliesslich bei Seminomen zeigt sich eine völlig uneinheitliche Punktwolke ohne Signifikanz, das Bestimmtheitsmaß ist R^2 = 0,1136, die Regressionsgerade folgt der Formel M2PK (VC) = 0,1211(M2PK{VT}) + 8,4261
(s. Abb. 8 , S. 52).

d. Korrelation Testicularvenenblut/ Cubitalvenenblut (nur Nicht- Seminome)

Auch hier finden wir eine uneinheitliche Punktwolke, R^2 weist den Wert 0,0001 auf, die Regressionsgerade folgt der Formel M2PK (VC)=0,0126(M2PK{VT}+ 11,788.
(s. Abb.9, S. 52).

4. M2-PK Verlauf

Im Verlauf der Hodentumorerkrankung zeigte sich bei allen Patienten für M2PK folgende Entwicklung:

Am Operationstag (präoperativ) lagen die Werte zwischen 1,7 und 170,00 U/ml bei einem Median von 7,3, einem Mittelwert von 19,8 U/ml und einer Standardabweichung von 35,3 (s. Abb 4, S.50 **).**

Am ersten Tag nach hoher Ablatio testis lagen die Werte für alle Patienten zwischen 3,30 U/ml und 106 U/ml. Der Median wurde mit 11,5 U/ml ermittelt, der Mittelwert betrug 20,9 U/ml, die Standardabweichung 23,6 (s. Abb. 10, S. 53).

Am 5. postoperativen Tag wurden die Minimal und Maximalwerte zwischen 7,9 und 181 U/ ml bestimmt. Der Median lag bei 19,3 U/ml, der Mittelwert bei 29,3 U/ml und die Standardabweichung bei 39,2 (s. Abb. 11, S. 53).

In der vierten Messung lagen die Werte zwischen 5,5 und 142,0 U/ml. Der Median betrug 18,8, der Mittelwert 31,4 U/ml. Die Standardabweichung wurde mit 37,1 U/ml ermittelt.

Schliesslich wurden in einer 5. Messung die Werte zwischen 4,4 und 68,8 U/ml bestimmt. Der Median lag bei 20 U/ml, der Mittelwert bei 28,3 U/ml und die Standardabweichung bei 30,0 U/ml.

Die Trendlinie über alle Meßzeitpunkte zeigt einen ansteigenden Verlauf, wobei das Bestimmtheitsmaß für die Mediane von 0,652 und für die Mittelwerte von 0,4229 signifikante Verteilungen um den mathematisch errechneten Verlauf annehmen lassen (s. Abb. 12, S. 53)

Zusätzlich wurden die M2-PK Werte hinsichtlich ihres Unterschiedes in den Lugano- Stadien (I-III) mit Hilfe von SPSS 9.0 für Windows nichtparametrischen Tests unterworfen. Im Kruskal- Wallis- Test zeigte sich ein Unterschied der Werte M2-PK zum Zeitpunkt 1 und M2-PK zum Zeitpunkt 2 gegenüber der Grundgesamtheit mit akzeptablen Signifikanzen mit einem p- Wert von 0,034 bzw. 0,032, wohingegen sich die Werte zwischen dem Zeitpunkt 0 und Zeitpunkt 3 nur mit einer schwachen Signifikanz bei einem p- Wert von 0,140 unterschieden. (s. nichtparametrische Tests/ deskriptive Statistiken S.63-66).

a. Stadienabhängige Betrachtung von Trendlinien der Mediane und Mittelwerte

alle Tumoren Stadium I

Die Werte am Operationstag lagen bei diesen Patienten zwischen 1,7 und 60,3 U/ml, der Median bei 6,0 U/ml, der Mittelwert betrug 10U/ml. Am 1 postoperativen Tag lagen die Werte für M2PK zwischen 3,3 U/ml und 50,2 U/ml, Median 9,0 U/ml, Mittelwert 14 U/ml.
Am 5 postoperativen Tag wurde die M2PK zwischen 8 und 44 U/ml gemessen, der Median lag bei 18, der Mittelwert bei 20 U/ml.
Bei weiteren Messungen zwischen dem 11 und dem 54 postoperativen Tag ergaben sich Werte zwischen 4,4 U/ml 39,4 U/ml, der Median betrug jetzt 20,0 U/ml, der Mittelwert 28,3 U/ml. Die Regression folgte der Formel M2PK(VT)=5,3977xM2PK(VC) +0,4365 und einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,9109 (s. Abb. 13, S.54)

b. alle Tumoren Stadium II C und III

In den metastasierten Stadien II C und III stiegen die Mittelwerte und Mediane für M2PK ebenfalls an. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) lag hier bei 0,9799 (s. Abb. 14, S. 54).
3 Patienten in dieser Gruppe wiesen eine primär hohe Metastasenbeladung auf, der M2PK Verlauf war wie folgt: (Patient 11: 90,9 U/ml → 73,2 U/ml; Patient 12: 170 U/ml→ 106 U/ml; Patient 29: 96 U/ml → 74 U/ml).
Betrachtet man M2PK hinsichtlich des Meßwertes zum Zeitpunkt der Diagnose, zeigen sich nur bei vier Patienten Werte deutlich oberhalb der Referenzgrenze von 22,5 U/ml. Bei drei Patienten waren aber auch schon andere Marker (AFP, beta HCG) hoch positiv.
Es kam nur ein Patient vor, bei dem eine isolierte Erhöhung der M2PK zum Zeitpunkt der Diagnose vorlag.

c: Vergleichende Betrachtung der Referenzmarker

Bei der in dieser Arbeit vorgenommenen, vergleichenden Verlaufsstatistik der etablierten Referenzmarker AFP, beta HCG und PLAP, ergibt sich für diese ein völlig anderes Bild.

Sie weisen im zeitlichen Verlauf *sämtlich* eine abfallende Tendenz auf, die Abfallkinetik ist bei all diesen Markern konkordant.

Die Mittelwerte des AFP folgen im Verlauf nach der Primäroperation im *Stadium I* einem linearen Abfall mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,882, die Mediane mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,798.

Ähnlich gute Bestimmtheitsmaße erreichen die Marker β- HCG (0,90 resp.0,92) und PLAP (0,96-0,90) (s. Abb. 15,16 und 17 S. 55/56).

Die Regressionsgeraden fallen also im Verlauf - im Gegensatz zur M2PK – ab. Gleiches gilt für die Stadien II A-C und III.

(Abb.18 –20 S.56)

d: Trendlinien der etablierten Marker (alle Stadien)

Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie für die isoliert ausgewerteten Stadium-I-Tumoren, die Trendlinien zeigen im Meßzeitraum einen stetigen Abfall. (s. Abb. 21-24, S. 57-58).

e: Häufigkeit der Positivität der Marker

Von Interesse ist hier die Frage, bei wievielen Patienten ein Marker allein positiv ist. Dies war für das HCG und das AFP und die M2PK für jeweils einen Patienten der Fall, für die PLAP bei 3 Patienten (s. Diagramm IV, S. 62).

IV. Diskussion

Beim Hodentumor liegen mit β-HCG, AFP, PLAP und LDH valide prognostisch-diagnostische Marker vor [4,5,7,8,29,37,69,70,87,113,129]. Da jedoch lediglich 60-70% aller Hodentumorpatienten einen oder mehrere dieser Marker aufweisen, werden weiterhin andere mögliche Substanzen hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Tumormarker untersucht, um diese diagnostische Lücke zu verkleinern. So wurde die neuronenspezifische Enolase 1992 von *Fossa et al.* als Serumtumormarker für Seminome vorgeschlagen [36], ohne allerdings in der Folge eine grössere Rolle als Hodentumormarker zu erlangen. Eigene Untersuchungen aus den vergangenen Jahren haben verschiedene potentielle neue Marker überprüft. Es liessen sich primär hohe Serumspiegel für das Hormon Östradiol nachweisen, welches auch im Hodenvenenblut deutlich erhöht war.

Es konnte jedoch dargestellt werden, daß Östradiol kein unabhängiger Marker ist, da eine Abhängigkeit vom gonadal-hypophysären Regelkreis vorliegt. Das β- HCG ist strukturanalog zum luteinisierenden Hormon (LH) und stimuliert die Leydig-Zellen.
In der Folge werden hohe Testosteronspiegel erzeugt, welche intratesticulär wiederum zum Östradiol aromatisiert werden. Der gleiche Effekt ließ sich beim Inhibin-B nachweisen. Auch hier wurden beim Hodentumor primär erhöhte Spiegel nachgewiesen, die aber in gleicher Weise von den β-HCG- Werten abhängig sind. In diesem Fall kommt es zu einer Stimulierung der Sertolizellen, die der Ernährung der reifenden Samenzellen dienen.
Der ideale Tumormarker zeigt eine 100%ige Sensitivität und Spezifität, sobald eine Tumorerkrankung vorliegt und gestattet darüber hinaus die verlässliche prätherapeutische Zuordnung eines Patienten in eine Risikogruppe. In der Realität existiert ein solcher Marker jedoch nicht. Mangels eines geeigneteren Tumormarkers wurde beispielsweise vor der Etablierung des prostataspezifischen Antigens (PSA) die durch *Gutman* 1938 erstmals als Marker für das fortgeschrittene Prostatakarzinom beschriebene saure Prostataphosphatase (PAP) trotz einer Sensitivität von lediglich 40% bei einer Spezifität zwischen 95 und 100% eingesetzt [40,99,108]. Erhöhungen der inaktiven, tumorspezifischen Form der Pyruvatkinase Typ M2-PK sind bei einer Reihe von Neoplasien beschrieben und mit den spezifischen Stoffwechselprozessen während der Tumorgenese korreliert worden [23,75,76,77,92,116].
Steinberg konnte in einem tierexperimentellen Ansatz zeigen, daß die Beigabe des hepatocarcinogenen Agens N-Nitrosomorpholine (NNM) in das Trinkwasser von Ratten eine deutliche Überexpression von M2-PK in Hepatozyten verursachte [112].
Es liegen Arbeiten für verschiedenste Tumorentitäten vor, so wurden das Colon, das Pancreaskarzinom wie auch das hepatozelluläre Karzinom immunhistologisch untersucht. [16,23,92,93,111] und im Fall des Pancreaskarzinoms auch mit etablierten Tumormarkern verglichen (s. Diagramm I,S.60). Es existieren auch Untersuchungen zur möglichen Wertigkeit der M2-PK als Screening Faktor bei Personen mit einem hohen Risiko für die Ausbildung eines Bronchialkarzinomes [116]. *Mellati et al.* wiesen deutlich erhöhte Konzentrationen von M2-PK in menschlichen Meningeomzellen nach [79]. Alle genannten Arbeiten zeigten signifikant erhöhte Tumor M2-PK Werte gegenüber einem Normalkollektiv. Die ausführlichsten Untersuchungen hinsichtlich der Tumor M2-PK liegen derzeit für das Nierenzellkarzinom vor [10,15,33,44,49,89,93,127], für das nach derzeitigem Erkenntnisstand keine sensitiven Tumormarker zur Verfügung stehen. Beim Nierenzellkarzinom und dessen Metastasen kommt es zur Überexpression der L-Pyruvatkinase mit einem „shift“ zum Isoenzym M2-PK im Sinne einer malignen Transformation [33].

Alle genannten Tumorentitäten zeigten eine gute immunhistochemische Anfärbung im Vergleich mit benignem Gewebe des gleichen Organs [23].

Petri et al. haben 1996 mit einer quantitativ- immunhistochemischen Bestimmung der Tumor-M2-PK im peripheren Venenblut in einer Serie von 22 Patienten mit lokal begrenzten und metastasierten Hodentumoren einen angeblich sehr sensitiven Marker für Hodentumoren postuliert [95].

Hierbei konnte in einer gesunden Vergleichsgruppe keine Erhöhung der M2-PK festgestellt werden. *Petri et al.* berichteten weiter über quantitative Untersuchungen der Tumor M2-PK in Seren einer Stichprobe von 34 Patienten mit verschiedenen nichtmaligen Erkrankungen der Testes und legten den „cut off“ -Wert für eine Erhöhung der M2PK- Konzentration auf >20 U/ml fest. In einem Vergleichskollektiv von 22 Patienten mit „aktivem lokalen Hodentumor und Metastasen“ konnten bei 82% erhöhte M2-PK Werte dokumentiert werden. Insgesamt dienten diese Ergebnisse als Bemessungsgrundlage für die Bewerbung des Tumor M2-PK Kits der Firma ScheBo Tech® beim Hodentumor. Eine Stadieneinteilung wurde nicht vorgenommen.

Eine Differenzierung des Patientenkollektivs in Seminom und Nicht- Seminompatienten erfolgte gleichfalls nicht. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, daß es sich jeweils um kleine Stichproben mit grosser Streuung gehandelt hat.

Weiterhin verglich *Petri* die M2-PK mit ß-HCG und AFP Messungen: die kombinierte Sensitivität dieser beiden Tumormarker lag in dieser Arbeit lediglich bei 32% (7/22). Dies steht zumindest partiell im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Bombardieri* und *Weissbach,* bei denen ß-HCG und AFP in 90-95% der Fälle mit ausschliesslich metastasierter Erkrankung erhöht aufgetreten waren [8,129]. Jene Patienten der *Petri*- Studie, die präoperativ hohe M2-PK Werte boten und sich offenbar im Stadium I befanden, wiesen nach der Ablatio zurückgehende M2-PK Werte auf, wohingegen Patienten mit „prominenten Filiae“ des Primärtumors auch nach der Ablatio erhöhte M2-PK level beibehielten. Zusätzlich zur Wertung der Tu M2-PK als „sehr sensitiver Hodentumormarker“ räumte *Petri* der Tumor M2-PK gleichzeitig den Status eines nicht organspezifischen Enzyms von „hohem Wert in der Diagnose verschiedenster Tumoren“ ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, diese Daten zu überprüfen und gegebenenfalls zu erhärten. Hierzu dienten der Vergleich der Konzentrationen von Tu-M2-PK im Hodenvenen und Cubitlavenenblut sowie die M2-PK Verlaufskinetik bei malignen Keimzelltumoren des Hodens.

Die Halbwertszeitkinetik im Vergleich mit den etablierten Tumormarkern AFP, β-HCG, PLAP und LDH und im Anschluss die mögliche Abhängigkeit vom unspezifischen Entzündungsprotein CRP wurden näher analysiert.

Über die Verlaufskinetik der M2-PK bei Hodentumoren waren bislang keine Untersuchungen durchgeführt worden, in der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationsänderungen der M2-PK im Hodenvenenblut dokumentiert. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

1.) *Das fehlende Konzentrationsgefälle von M2-PK in Hodenvenen zu Cubitalvenenblut läßt nicht auf eine Produktionsstelle im Hodengewebe schliessen. Die Ergebnisse zeigen weder eine Abhängigkeit vom Stadium, noch von der Tumorhistologie. (Abbildungen 4-9, S. 50-52)*

In den eigenen Untersuchungen wurde die TuM2-PK nach den eingangs aufgeführten Anforderungsprofilen für einen Hodentumormarker überprüft.

Die TuM2-PK Konzentration im Hodenvenenblut und Cubitalvenenblut am Operationstag ist bezüglich der Meßparameter Median (8,8/7,3 U/ml)- Mittelwert (21,7/19,9 U/ml)- minimaler (1,7 /1,7 U/ml)/ maximaler (190/170 U/ml) Wert wie auch der Standardabweichung(39,3/35,3 U/ml) annähernd identisch (Abb 4 u.5, S.50).

Dies widerspricht der Annahme, daß die Konzentration eines Markers im Hodenvenenblut deutlich höher als im Blut der Vena cubitalis sein soll, wenn er aus dem Hoden stammt. *Fiet et al.* berichteten 1983 erstmals über den Nachweis von β-HCG im Hodenvenenblut von 2 Patienten mit Seminom [31]. Derselbe Autor gab 1985 bei 5 von 13 Patienten gegenüber cubital erhöhte β-HCG- Werte im Hodenvenenblut an [32].

In weiteren Untersuchungen zum Verhältnis der Serum und Hodenvenenblutkonzentrationen konnten *Light et al.* 1988 eine deutlich höhere Konzentration von AFP und ß-HCG im Hodenvenenblut bei 8 Patienten nachweisen, allerdings ohne Angaben zu Histologie und Stadium zu machen [68]. In der Arbeit von *Mumperow et al.* von 1990 wurde bei 78% der untersuchten Patienten mit Seminom β-HCG in der Hodenvene erhöht gemessen, demgegenüber liess sich dies nur in 25% in der Cubitalvene feststellen, womit die grössere Sensitivität der Markerbestimmung im Hodenvenenblut bewiesen werden konnte [85].

Hartmann et al. kamen 1997 zu ähnlichen Ergebnissen und stellten dar, daß bei Seminomen zwar die Tumormasse und der Grad der Metastasierung mit der ß-HCG Erhöhung im Cubitalvenenblut korrelierten, konnten jedoch auch nachweisen, daß ß-HCG im Hodenvenenblut keine weiteren klinischen Informationen lieferte [43].

Vor allem für die Primäraggressivität des Tumors scheint ein erhöhtes β- HCG kein Indikator zu sein. Insgesamt unterscheiden sich allerdings die Ergebnisse hinsichtlich des prognostischen Wertes von AFP, β-HCG und LDH von Studie zu Studie [50,123].

Nach Ansicht einiger Autoren stellt die Tu-M2-PK einen nützlichen Marker in der Detektion und in der Verlaufskontrolle bei einem Nierenzellkarzinom dar [114,127].

Die Relation von M2-PK Konzentration im Venenblut des tumortragenden Organs zum peripheren Serum wurde ebenso beim Nierenzellkarzinom, allerdings nur mit sehr geringen Fallzahlen, untersucht.

Hegele et al. ermittelten durch Bestimmung der TuM2-PK bei 10 Patienten mit Nierenzellkarzinom –allerdings ohne weitere Spezifizierung des Tumorstadiums- keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Konzentration im Venenblut der tumortragenden Niere im Vergleich zur Cubitalvene [44].

Im Gegensatz zu *Hegele* wiesen *Wechsel et al.* eine erhöhte Tumor M2-PK Konzentration im Rahmen zeitgleicher Blutentnahmen aus der Vene einer Tumorniere und der V. basilica nach. Hier zeigten sich in der Nierenvene durchschnittlich 30% höhere TuM2-PK-Werte im Vergleich zum peripheren Venenblut [127], allerdings wurde lediglich bei 5 Patienten dieser Vergleich vorgenommen. Trotz dieser niedrigen Fallzahl postulieren die Autoren, daß TuM2-PK zu einem wesentlichen Anteil aus den Tumoren selbst stammen soll.

Als Erklärung hierfür könnte die Tatsache dienen, daß klarzellige Nierenzellkarzinome sich durch eine zum Pyruvatkinasemetabolismus passende Glykogenspeicherung als histomorphologisches Merkmal auszeichnen und daher Tumor M2-PK aus Nekrosezonen in das Nierenvenenblut gelangt [49].

Im Gegensatz hierzu wurde in der eigenen Arbeit der Konzentrationsunterschied der M2-PK im Hodenvenenblut zu peripherem Blut jeweils vor Ablatio testis lediglich mit **1:1,1** ermittelt. Dies erscheint zu gering, um davon ausgehen zu können, daß Keimzelltumoren des Hodens M2-PK produzieren. Die Serumkonzentrationen von Cubitalvenen und Hodenvenenblut sind im eigenen Patientenkollektiv unabhängig vom Tumorstadium oder der Tumorhistologie (s. Abb. 8-9, S.52). Von besonderem Interesse war hierbei der Vergleich bei Tumoren im klinischen Stadium I, da hier keine extragonadale bzw. extratumorale Sekretion eines Markers zu erwarten ist [54,131].

Da extragonadale Metastasen Tumormarker exprimieren können, wurden die Patienten ohne einen klinischen Hinweis auf Metastasierung im klinischen Stadium I gesondert betrachtet.

Bei einer Produktion des Markers im Hoden müsste das Konzentrationsgefälle bei den für das Stadium I ermittelten Werten zwischen Vena testicularis und Vena cubitalis am deutlichsten in Erscheinung treten.
Wie in Abbildung Nr.7 dargestellt, liegt lediglich eine uneinheitliche Punktwolke vor. Es wird nur ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,0166 erreicht. Bei biologischen Untersuchungen sollte man allerdings Bestimmtheitsmaße erwarten, die über dem Wert von 0,5 liegen.
Eine lineare Korrelation zwischen Hodenvenen und Cubitalvenenblut konnte somit für das Stadium I nicht ermittelt werden. In der weiteren Differenzierung zwischen Seminomen und Nichtseminomen liessen sich ebenfalls nur schlechte Korrelationswerte nachweisen, wie in den Abb. 8 und 9 dargestellt (R^2= 0,1136 für Seminome, 0,0001 für Nichtseminome). In der Gesamtbetrachtung aller Tumoren (s.Abbildung 6, S.51) ergab sich ebenfalls ein schlechtes Bestimmtheitsmaß von 0,0024. Demgegenüber ergaben sich sehr gute Korrelationswerte bei den etablierten Markern AFP und β-HCG mit Bestimmtheitsmaßen nahe dem Wert 1 (s.Abb.26 und 27, S. 59,60). Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluß zu, daß Keimzelltumoren des Hodens keine M2-PK produzieren.

2.) Die Verlaufskinetik der Tu M2-PK zeigt -unabhängig vom Tumorstadium- keinen halbwertszeitgerechten Verlauf und korreliert nicht mit der Klinik (Abb. 13-17, Seiten 54-56)

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Petri*, der bei Tumoren im klinischen Stadium I einen Rückgang der M2-PK Konzentration nach Ablatio testis beobachtet hat, fanden sich diese Ergebnisse in den vorliegenden Beobachtungen nicht bestätigt (s. Abb. 13, S.54).
Im Gegenteil zeigten die Messungen einen postoperativen Anstieg der Tu-M2-PK, rechnerisch ergab sich ein hohes Bestimmtheitsmaß der Mittelwerte von R^2 mit 0,9109.
Im weiteren klinischen Verlauf konnten keine markeraktiven oder markerinaktiven Metastasen bei den Stadium I Patienten in dieser Untersuchung nachgewiesen werden, welche die fortschreitende Erhöhung der M2-PK hinlänglich hätten erklären können.
In den Vergleichsberechnungen für AFP und ß-HCG zeigen die mathematischen Darstellungen reziproke Verläufe zur Tu-M2-PK (s. Abb. 15,16,17, S. 55-56). Es konnte somit demonstriert werden, daß bei den nichtmetastasierten Tumoren ansteigende M2-PK Werte im Verlauf nach der Ablatio testis, die bei diesen Fällen als radikale Tumorentfernung anzusehen ist, auftraten. Dies widerspricht deutlich der in den verfügbaren Literaturstellen ermittelten Ergebnissen [95,126]. Der Verlauf korrelierte also nicht mit Reduktion der Tumormasse durch die therapeutischen Maßnahmen.

Für den seltenen Anstieg von ß-HCG und der AFP nach Ablatio bei nachgewiesenem Stadium I liegen zwar einzelne Kasuistiken vor, diese sind jedoch im Zusammenhang des Phänomens des falsch positiven Tumormarkers einzuordnen, das keinen Progreß eines Hodentumors als Ursache voraussetzt [14].

Lediglich bei den Patienten 11,12,28 und 31 wurde die M2-PK im Serum zum Zeitpunkt der Diagnose oberhalb des vom Hersteller definierten Referenzbereiches gemessen, und zwar mit den Werten 90,9, 170, 25,9 und 60,3 U/ml.

3 der 4 Patienten wiesen ein Stadium III mit großvolumig metastasierten Keimzelltumoren mit Absiedlungen in den Retroperitonealraum und die Lungen auf und erreichten nach Therapie eine Vollremission.

Da die Sensitivität von Hodentumormarkern auch vom Tumorvolumen abhängig ist [14], wäre in diesen Fällen ein Abfall der Tumormarker, allenfalls ein kurzfristiges Ansteigen im Sinne eines marker release Phänomen bei Tumorzellzerfall unter der eingeleiteten Chemotherapie zu erwarten gewesen. Auch hier konnte ein reziproker Verlauf in Gestalt eines Markeranstiegs im Vergleich zu den etablierten Markern aufgezeigt werden.

In den metastasierten Stadien II C und III zeigten die Mittelwerte und Mediane für M2PK einen stetigen, allerdings mathematisch unzureichend gesicherten Anstieg, nachdem es nach Ablatio zunächst zu einem leichten Absinken der Tu-M2-PK Konzentration gekommen war (s.Abb. 14). Die Werte der Referenzmarker stiegen bei diesen Patienten nur solange an, bis durch den ersten Zyklus Chemotherapie nach dem PEB- Schema nach *Einhorn* eine Tumormassenreduktion erfolgte [133]. Dieser Sachverhalt wird vor allem in den Kurven der Einzelwerte für AFP, ß-HCG und LDH in den Abbildungen Nr. 18, 19, 20 bei ebenfalls akzeptablen Bestimmheitsmaßen deutlich. Vergleichbare Markerverläufe sind in der Literatur beschrieben [54,130]. Auch in den metastasierten Stadien lag demnach eine Diskordanz des Tu-M2-PK Verlaufes im Vergleich zur Kinetik der etablierten Marker vor.

Nur gelegentlich zeigen sich erhöhte Marker nach Abschluß der onkologischen Therapie. Bevor AFP-Erhöhungen als Anzeichen von Tumoraktivität bewertet werden, sollten Leberfunktionsstörungen durch die stattgehabte Chemotherapie ausgeschlossen werden..

Einen der M2-PK ähnlichen Kurvenverlauf wies die Laktatdehydrogenase (LDH) auf. Dieser Marker zeigt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zur Tumor M2-PK.

Es existieren 5 verschiedene Isoenzyme, in der Tertiärstruktur liegt die LDH ebenfalls als Tetramer vor [29]. Weiterhin ist der biochemische Angriffsort der LDH dem der Pyruvatkinase unmittelbar benachbart. Die Laktatdehydrogenase ist hinsichtlich ihrer Wertigkeit als Tumormarker beim Hodentumor eingehend untersucht worden.

In der vorliegenden Literatur zeigten LDH -Erhöhungen stets eine enge Korrelation zu einer hohen Tumorbeladung [29,37,69,70,113]. Dies konnte in der eigenen Arbeit bestätigt werden. Von den oben beschriebenen 3 Patienten mit primär hoher Tu-M2-PK wiesen Patient Nr. 11 eine Erhöhung der LDH auf 318 U/l, Patient Nr. 12 245 U/l und Patient Nr.31 eine LDH von 285 U/l auf.

Vergleichbar zur TuM2-PK Kinetik zeigen die Trendlinien der Mediane der LDH für alle Patienten in der Zeitachse zunächst einen leicht ansteigenden Verlauf mit konsekutivem Absinken unter der Therapie mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,3274 (s. Abb. 21, weitere Marker s. Abb. 22-24, S.57-58). Bei der isolierten Betrachtung von Patienten im Stadium IIC und III kam es im Zeitverlauf bei der TuM2-PK ebenfalls zu einem Anstieg der Trendlinie über den gesamten Meßzeitraum (s. Abb.14), in der Einzelbetrachtung war lediglich beim Patienten 11 am 21. Postoperativen Tag eine rückläufige TuM2-PK zu verzeichnen (59,7->16,9 U/ml), korrespondierend zu einem weiterhin rückläufigen LDH Verlauf.

Die Ergebnisse lassen darauf schliessen, daß die TuM2-PK wie LDH bei hoher Tumorbeladung vermehrt im Serum nachzuweisen ist und möglicherweise erst zu einem, in dieser Arbeit nicht überprüften, viel späteren Zeitpunkt wieder abfällt, der dann allerdings auch für die notwendige aktuelle klinische Entscheidungsfindung irrelevant wäre.

Offen bleibt ebenfalls die Frage, wie die intrazelluläre Tu M2-PK in das Blut gelangt. Ein Vergleich der serologischen Ergebnisse mit der Tumorgrösse durch *Wechsel* zeigte beim Nierenzellkarzinom keine Signifikanz [127]. Es fand sich jedoch eine hochsignifikante Korrelation zu den Nekrosearealen des Nierentumors [126]. Diese Beobachtung scheint auch für großvolumig metastasierte Hodentumoren zuzutreffen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Spiegel der TuM2-PK im Serum möglicherweise durch therapieinduzierte Zelllyse erhöht werden. Damit scheint insbesondere für kleine, nur mit einer geringen Nekroserate behaftete Tumoren eine signifikante Erhöhung der Serum oder Plasmaspiegel unwahrscheinlich. Der in der eigenen Untersuchung beobachtete Anstieg im Verlauf beim Stadium I wird hierdurch allerdings nicht erkärt. Demgegenüber zeigen die Arbeiten von *Wechsel et al.* beim lokalisierten Nierenzellkarzinom, daß es nach Nephrektomie bei allen Patienten zu einer Normalisierung der Serumlaborparameter von Tumor M2-PK innerhalb von 11 Wochen kam. Im Rahmen einer längeren Nachbeobachtungszeit (6 Monate) ohne Rezidiv konnten *Hegele* et al. gleichfalls eine Normalisierung der TuM2-PK Werte aufzeigen. In metastasierten Stadien oder beim relapse persistierten allerdings postoperativ erhöhte Serummarkerlevel oder stiegen wieder an [125].

Eine initiale Unterscheidung zwischen lokal begrenzten und metastasiertem Nierenzellkarzinom ist nach Ansicht der Autoren nicht möglich.
In weiteren Arbeiten korrelierte die Tumor M2-PK Konzentration ebenfalls mit den nach *Robson*- Kriterien [102] festgelegen Tumorstadien [10,93].
Direkt vergeichbar sind aber der Markerverlauf beim Hodentumor und dem Nierenzellkarzinom nicht. Klassische Tumormarker mit definierter Halbwertszeitkinetik fehlen bei letztgenanntem Tumor.
In einer neueren Untersuchung durch *Roigas et al.* konnten präoperativ signifikante Erhöhungen der TUM2-PK bei Patienten mit nichtmetastasierten und metastasierten Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden ermittelt werden [15] (Diagr.III und V). Analog zu den eigenen Beobachtungen beim Hodentumor waren die Werte der Tumor M2-PK am höchsten bei den Patienten mit einem metastasierten Nierenzellkarzinom und können somit als Ausdruck einer ausgeprägteren Tumorlast interpretiert werden.
Die diesbezügliche Sensitivität lag bei 66,7%. Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch die Arbeit von *Oberneder et al.* [89].

3.) *Tumor M2-PK ist kein unspezifischer Entzündungsparameter und korreliert nicht mit dem Zeitverlauf des C-reaktiven Proteins*

Ob die Kinetik des Markers möglicherweise auf eine postoperative Entzündungsreaktion zurückzuführen ist, war Gegenstand weiterer Untersuchungen.
Unter dem Eindruck der reziprok zu den etablierten Markern verlaufenden Kinetik wurde die Korrelation der M2-PK zu dem unspezifischen Entzündungsparameter C- reaktives
Protein überprüft. Messungen erhöhter CRP- Konzentrationen als Hinweis für einen metastasierten Tumor sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.
Beim CRP handelt es sich um ein singuläres, einkettiges Polypeptid mit einer aus 187 Aminosäuren bestehenden Sequenz. Das Molekulargewicht liegt bei 20946 Dalton [91].
Die Synthese erfolgt hepatisch, in der Serumelektrophorese wandert es zwischen der beta und gamma- Globulinfraktion.
Es ist als klassisches Akutphaseprotein, dessen Auftreten in einer durch Zytokine vermittelten Reaktion bei Gewebsverletzungen und operativen Eingriffen, bakteriellen sowie nichtinfektiösen und nekrotischen Prozessen innerhalb von Stunden um den Faktor 1000 ansteigen kann, im klinischen Alltag gebräuchlich [118]. Es handelt sich um einen zwar empfindlichen, jedoch unspezifischen Indikator.

Miteinander verglichen wurden die Mediane der CRP sowie der TuM2-PK zu den ausgewiesenen Meßzeitpunkten.
Die Trendlinien unterschieden sich hierbei deutlich. Während für TuM2-PK ein linear ansteigender Verlauf zu verzeichnen war, verliefen die CRP- Werte nicht linear, sondern fielen nach dem 5. postoperativen Tag ab.
Die Regressionsgerade folgte der Formel TuM2-PK (Messzeitpunkt 1-4): y= 4,7x + 2,65, das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei 0,9797. Die Analyse für den zeitlichen Verlauf der CRP folgte der Formel y= 0,57x + 4,65 mit einem Bestimmtheitsmaß von lediglich 0,0356. Ein zur Zeitachse konkordanter Verlauf zwischen CRP und TuM2-PK war nicht gegeben (s. Abb. 25, S. 59). TuM2-PK spiegelt somit keine postoperative Entzündungsreaktion wider.

4.) Tumor M2-PK ist für das Tumorscreening nur von sehr geringem Wert

Hinsichtlich der Eignung der TuM2-PK als Screening-Faktor stützen die eigenen und die zur Verfügung stehenden Literaturergebnisse folgende Schlussfolgerungen: ein screening für ein bestimmtes Karzinom ist bei fehlender Organspezifität grundsätzlich nicht möglich. Für Screeninguntersuchungen ist eine möglichst 100-prozentige Spezifität bei gleichzeitig hoher diagnostischer Sensitivität insbesondere in den Frühstadien einer Tumorerkrankung zu fordern. Frühe Karzinome scheinen mit Tu-M2-PK nicht detektierbar zu sein [125]. Sowohl für den Hodentumor wie auch für das Nierenzellkarzinom ist die Rate falsch negativer Befunde zu hoch [95,126].
Wenn durch M2-PK eine Steigerung der diagnostischen Sensitivität und der Tumorspezifität zu erreichen wäre, hätte es sich erweisen müssen, daß Hodentumoren, zumindest in einer gewissen Anzahl auch ausschliesslich positiv für M2-PK sind. Mit den etablierten Markern konnten *Weißbach et al.* beim Seminom eine Verbesserung der Sensitivität auf 84% durch Kombination von HCG, LDH und PLAP nachweisen [130].
Wechsel et al. berichten in einer bislang nicht publizierten Arbeit, daß TuM2-PK in Kombination mit AFP und β-HCG eine gesteigerte Sensitivität auf 67% gegenüber 41% von AFP und ß-HCG alleine ergab. Die Spezifität wurde auf 94% gegenüber 82% verbessert [126]. Diese Ergebnisse treffen in der vorliegenden Arbeit weder auf die Einzelwerte noch in der Kombination auf die Tu-M2-PK zu. Lediglich bei Patient 28 (Stadium I Seminom, adjuvante Radiotherapie) war zum Zeitpunkt der Diagnose die M2-PK *allein* mit 25,9 U/ml nur geringfügig gegenüber dem angegebenen Normwert von 22,5 U/ml erhöht. Eine Normalisierung war bereits zum Meßzeitpunkt 2 eingetreten.

In der eigenen Arbeit liess sich eine Verbesserung der Sensitivität durch Tu-M2-PK nicht nachweisen. 22,6 % der Patienten waren komplett markernegativ . 41,9 % der Patienten waren AFP und β-HCG negativ. In Kombination mit PLAP reduzierte sich der Anteil auf 12,9%. Die Kombination von AFP, β-HCG und Tu-M2-PK verschlechterte diesen Wert wieder auf 22,6% , TuM2-PK erbrachte somit keinen diagnostischen Zugewinn (s. Diagramm IV, S.62).

V. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Betrachtung der M2-PK Verlaufskinetik und die sich daraus ergebende Tauglichkeit als unabhängiger Hodentumormarker. Dazu wurden die Korrelationen zu anderen Tumormarkern bzw. die Verteilung im Hodenvenen und Testicularvenenblut betrachtet. Untersucht wurden 35 Patienten mit malignen Keimzelltumoren unterschiedlicher Stadien und Histologien, zu definierten Zeitpunkten wurden die etablierten Marker und Fertilitätsparameter sowie Tumor M2-PK bestimmt und mit einem ultrasensitiven ELISA gemessen, bei 23 Patienten konnte intraoperativ Hodenvenenblut gewonnen werden. Mit den hierbei erzielten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß TuM2-PK von den verschiedenen Keimzelltumoren des Hodens nicht exprimiert wird. Es gab keinen Abfall des Markers unter der histologie- und stadiengerechten Therapie.

TuM2-PK ist demzufolge kein klinisch relevanter Marker für Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens.

Die für die etablierten Marker bewiesenen Kriterien treffen auf die Tumor M2-PK nicht zu, es besteht allenfalls eine Ähnlichkeit zum LDH- Verlauf in metastasierten Stadien, wobei die Ausschwemmung wohl am ehesten aus Nekrosearealen mit Zelllyse stammt. Ein halbwertszeitgerechter Verlauf der TuM2-PK konnte jedoch in den definierten Zeiträumen nicht nachgewiesen werden. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß TuM2-PK weder als diagnostischer noch als prognostischer Hodentumormarker geeignet und nicht in der Lage ist, das diagnostische Fenster in der Markerdiagnostik von Hodentumoren zu erweitern. Auch konnte demonstriert werden, daß M2-PK kein unspezifischer Entzündungsparameter ist.

Störfaktoren und Schwächen des immunologischen Testsystems durch das Vorliegen heterophiler Antikörper sind bei anderen Tumormarkern beschrieben und spielen möglicherweise auch bei der Tu-M2-PK eine Rolle, dies bedarf weiterer Untersuchungen [14]. Insgesamt konnte aus unseren Ergebnissen die These, TuM2-PK sei „ein sehr sensitiver Marker für Hodentumoren“ nicht bestätigt werden. Eine Aussage zur Korrelation von TuM2-PK mit dem Stadium der Tumorerkrankung scheint aufgrund der derzeitigen Datenlage mit Einschränkungen nur auf das Nierenzellkarzinom anwendbar zu sein. Beim Hodentumor ist TuM2-PK für die Diagnostik, das Screening und als Verlaufsparameter kein Zugewinn.

VI. Literaturverzeichnis

1. *Aprikian* AG (1994) Resection of postchemotherapy residual masses and limited retroperitoneal lymph-adenektomy in patients with metastatic testicular nonsemitomatous germ cell tumours. Cancer 74: 1329-34
2. *Ashizawa* K; *Willingham* MC; *Liang* CM; *Cheng* SY (1991) In vivo regulation of monomer –tetramer conversion of pyruvate kinase by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate J Biol Chem 266 (25) p 16842-6
3. *Bachor* R; *Kocher* F; *Gropengiesser* F; *Reske* SN; *Hautmann* R (1995) Die Positronenemissionstomographie - Einführung eines neuen Verfahrens in die Diagnostik urologischer Tumoren und erste klinische Ergebnisse Urologe A 34: 146-150
4. *Bagshaw* KD, *Begent* RHJ (1983) Staging, markers and prognostic factors. Clin int. Oncol 2: 159-81
5. *Bassetto* MA, *Francheschi* T, *Lenotti* M, *Parise* G, *Pancheri* F, *Sabbioni* R, *Zaninelli* M, *Cetto* GL (1994) AFP and HCG in germ cell tumours. Int J Biol Markers,9:29-32
6. *Birch* R; *Williams* S; *Cone* A; *Einhorn* L; *Roark* P; *Turner* S; *Greco* FA(1986) Prognostic factors for favorable outcome in disseminated germ cell tumours J Clin Oncol 4: 400-407
7. *Böhmer* T, *Pottek* T, *Büttner* H, *Hartmann* M (1997) Endocrinological disturbances in germ cell tumour patients. Comparison of hormone levels and kinetics in peripheral and testicular vein blood.. Adv Exp Med Biol.; 424:75-6
8. *Bombardieri E, Pizzocaro G, Seregni* E, *Castellani* MR, *Cozzi* A, *Buraggi* GL (1989) I marcatori circolanti die tumori germinali del testicolo. In: Veronesi U, Milano: Casa Editrice Ambrosiana: 263-74
9. *Boyle* P; *Zaridze* D.G.(1993) Risk factors for prostate and testicular cancer Eur J Cancer, Vol 29A,1048-55.
10. *Brinck* U; *Eigenbrodt* E; *Oehmke* M; *Mazurek* S; *Fischer* G. (1999) L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carzinomas and their metastases, Anticancer research Jul-Aug; 19 (4A): 2599-601
11. *Brown* RS; *Wahl* RL (1993) Overexpression of Glut-1 Glucose transporter in human breast cancer. Cancer 72: 2979-2985

12. *Buetow* SA (1995) Epidemiology of testicular cancer. Epidemiological reviews Vol 17, No. 2, 433-449
13. *Burger* A; *Wachter* H (1998) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch 8. Auflage 1151-2
14. *Bussar- Maatz* R; *Weißbach* L*; Dahlmann* N; *Mann* K (1993). Der „falsch positive" Tumormarker beim malignen Hodentumor. Urologe A, 32: 177-182
15. *Cavalli* F; *Monfardini* S; *Pizzocaro* G (1980) Report on the international workshop on staging and treatment of testicular cancer. Eur J Cancer 16: 1367-1372
16. *Cerwenka* H; *Aigner* R; *Bacher* H; *Werkgartner* G; *el- Shabrawi* A; *Quehenberger* F; *Mischinger* HJ (1999) Pyruvat Kinase type tumor M2, CA 19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. Anticancer research 19(1B) 849-51.
17. *Chung* Hua; *Chung* Liu; *Liu* Tsa (1998) Further study on the value of plasma M2-type pyruvate kinase in the diagnosis of primary hepatocarzinoma J Biochem 333(part 1) 215-21
18. *Dabrowska* A, *Pietkiewicz* J, *Dabrowska* K, *Czapinska* E, *Danielewicz*, R (1998) Interaction of M1 and M2 isoenzymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids Biochimica et Biophysica Acta, 1383 (1) 123-9.
19. *Davidson* EA (1959) Specifity of pyruvate kinase Biochim. biophys .acta, Amst. 33 (1): 238-240
20. *Dearnalay* DP*; Huddart* RA; *Horwich* A (2001) Managing testicular cancer BMJ, Vol 322, 1583-8
21. *Dieckmann* KP; *Loy* V (1994) Management of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in Patients with testicular germ cell tumor. World J Urol 12: 131-135
22. *Donohue,* JP (1981) Complications of retroperitoneal lymph node dissection. J Urol 125: 338-340
23. *Eigenbrodt* E, *Basenau* D, *Holthusen* s, *Mazurek* S, *Fischer* G (1997) Quantification of tumor type M2 Pyruvate Kinase in human carcinomas. Anticancer research; 17, 3153- 3156
24. *Eigenbrodt* E; *Kallinowski* F; *Ott* M; *Mazurek* S; *Vaupel* P (1998) Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors Anticancer Res Sep-Oct; 18 (5a): 3267-74

25. *Eigenbrodt* E; *Leib* S; *Kramer* W*; Friis* RR; *Schoner* W (1983) Structural and kinetic differences between the M2 type pyruvate kinases from lung and various tumors. Biomed Biochim Acta; 42(11-12): S278-82

26. *Eigenbrod* E; *Mazurek* S; *Friis* RR (1998) Double role of pyruvate kinase M2 in the regulation of phosphometabolite pools. In: Cell growth and oncogenesis Birkhäuser Verlag Basel pp.15-30

27. *Eigenbrodt* E, *Reinacher* M*; Scheefers- Borchel* U (1992) Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolic pools found in tumor cells. Crit Rev Oncog 3 (1-2): 91- 115

28. *Etiemble* J; *Boivin* P (1976) Pyruvate kinase isoenzymes among human organs and blood cells. Enzyme 21(4): 296-303

29. *Von Eyben* F.E; *Blaabjerg* O (1992) Serum lactat dehydrogenase isoenzyme 1 and tumour volume are indicators of response to treatment and predictors of prognosis in metastatic germ cell tumours. Eur J Cancer 28 410-5

30. *Fernandez* EB (1994) Retroperitoneal imaging with third and fourth generation axial tomography in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumours. Urology 44:548-52

31. *Fiet* J; *Jardin* A, *Guechot* J; *Villette* JM (1983) Lancet II: 1195

32. *Fiet* J; *Jardin* A; *Gourmel* B; *Villette* JM; *Guechot* J; *Gueux* B (1985) Spermatic blood ß-HCG-levels in testicular tumors and in varicocele. Progr Clin Biol Res 203: 117

33. *Fischer* G; *Holzrichter* S; *Reinacher* M; *Heinrichs* M, *Dembowski* J; *Eigenbrodt* E (1989) Immunhistochemical demonstration of L- and M2 pyruvate kinase in primary renal cell carcinomas and their metastases Verh Dtsch Ges Pathol 73 p 422-7

34. *Flier* JS; *Mueckler* MM; *Usher* P; *Lodish* HF (1987) Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes Science 235: 1492-1495

35. *Fliser* D; *Ritz* E (1999) Störungen des Kalzium und Phosphathaushalts Urologe A 38 285-295

36. *Fossa* S.D; *Klepp* O*; Paus* E (1992) Neuron specific enolase– a serum marker in seminoma? Br J Cancer 65 297-99

37. *Fossa* S, *Fossa* SD (1989) Serum lactat dehydrogenase and human chorionic gonadotropin in seminoma Br J Urol 63, 408-415

38. *Göbel* U; *Calaminus* G; *Haas* HJ (1997) Keimzelltumoren. In: Creutzig U, Henze G (Hrsg) Diagnostische und therapeutische Standards in der pädiatrischen Urologie. In: Qualitätssicherung in der Onkologie 5.1 Zuckschwerdt Verl. München

39. *Gualdi* GF (1997) Non seminomatous tumors of the testis: problems of radiological staging before and after treatment. Clin Ther 148: 117-26

40. *Gutman* AB; *Gutman* EB (1938) „Acid“ phosphatase occuring in serum of patients with metastasising carcinoma of prostate gland. J Clin Invest 17: 473

41. *Hacker* HJ; *Steinberg* P; *Bannasch* P (1998) Pyruvate kinase isoenzyme shift from L-type to M2- type is a late event in hepatocarcinogenesis induced in rats by a choline-deficient /DL – ethionine supplemented diet. Carcinogenesis Jan; 19(1): 99-107

42. *Hatzinger* M; *Rassweiler* J; *Schier* C; *Rüther* U; *Eisenberger* U (2000) Stellenwert der 18- FDG Positronen Emissions Tomographie bei metastasierten Keimzelltumoren Urologe A, 39. Jahrgang, Suppl 1, S 51/V 7.2

43. *Hartmann* M, *Pottek* T, *Bussar- Maatz* R, *Weißbach* L (1997) Elevated human chorionic gonadotropin concentrations in the testicular vein and in peripheral venous blood in seminoma patients. An analysis of various parameters. Eur Urol.: 31 (4): 408-13

44. *Hegele* A; *Varga* Z*; Kosche* B; *Hofmann* R (2000) Ist Pyruvatkinase Typ Tumor M2 beim Nierenzellkarzinom ein sinnvoller Tumormarker? Urologe A, 39. Jahrgang, Suppl 1, S 22 P 1.2.

45. *Heidenreich* A; *Höltl* W; *Albrecht* W; *Pont* J; *Engelmann* UH (1997) Testis preserving surgery in bilateral testicular germ cell tumours. Br J Urol 79: 253-257

46. *Heidenreich* A; *Sesterhenn* IA; *Mostofi* FK; *Moul* JW; *Engelmann* UH (1999) Histopathological and biological prognostic risk factors in low stage testicular nonseminomatous germ cell tumors Urologe A 38: 168-178

47. *Heidenreich* A; *Sesterhenn* IA; *Moul* JW (1997) Prognostic risk factors in low stage testicular germ cell tumors Cancer 79: 1641-1645

48. *Herr* HW, *Sheinfeld* J; *Puc* HS; *Heelan* RM; *Bajorin* DF; *Mencel* P; *Bosl* GJ; *Motzer* RJ (1997) Surgery for a post chemotherapy residual mass in seminoma. J Urol 157: 860-2.

49. *Herrmann* T-RW; *Binder* L; *Kugler* A; *Gross* A; *Ringert* R-H(1999) Beim klarzelligen Nierenzellkarzinom imponiert eine deutliche Reduktion der Glucose-6-Phosphatase Urologe A, 39. Jahrgang, Suppl 1 S131 P10.7

50. *Hesketh* PJ*; Krane* RJ (1990) Prognostic assesment in nonsemitomatous testicular cancer: implications for therapy. J Urol 144, 1-9

51. *Hoeltl* W; *Kosak* D; *Pont* J; *Hawel* R; *Machachek* E; *Schempfer* M, *Honetz* N; *Marberger* M Testicular cancer: prognostic implications of vascular invasion. J Urol 137: 683-685

52. *Hoh* CK; *Seltzer* MA; *Franklin* J; *deKernion* JB; *Phelps* ME; *Belldegrun* A (1998) Positron emission tomography in urological oncology J Urol 159: 347-356

53. *Hugo* F, *Fischer*, G, *Eigenbrodt*, E (1999) Quantitative detection of tumor M2-PK in Serum and plasma. Anticancer research 19 2753-2758

54. *Javadpour* N (1992) Current status of tumour markers in testicular cancer. Eur Urol 21, suppl 34-6

55. *Jetten* MS., *Gubler* ME, *Lee* SH (1994) Structural and functional analysis of pyruvate kinase from Corynebacterium glutamicum. Appl Environ Microbiol 60 (7): 2501-7

56. *Jurica* MS; *Mesecar* A (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. Structure Feb 15; 6 (2): 195-210

57. *Kahn* A; *Marie* J; *Garreau* H.; *Sprengers*, E.D (1978) The genetic system of the L-type pyruvate kinase forms in man. Subunit structure, interrelation and kinetic characteristics of the pyruvate kinase enzymes from erythrocytes and liver. Biochem Biophys Acta 523 (1): 59-74

58. *Kanno* H (1995) Pyruvate kinase isoenzyme switching and genetic heterogenity of Pyruvat kinase deficiency Nippon Rinsho 53 (5): 1213-20

59. *Kechemir* D; *Max- Audit* I; *Calvin-Preval* MC, *Rosa* R (1986) Purification of human leucozyte pyruvate kinase (M2-PK). J Chromatogr 1383(1): 43-50

60. *Kiffmeyer* WR, *Farrar* WW (1991) Purification and properties of pig heart pyruvate kinase J Protein Chem 10 (6): 585-91

61. *Klebingat* KJ (1998) Wissenschaftliche Nachlese zum 50. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie Urologe A 2/99 : 214-217

62. *Koshida* K; *Wahren* B (1990), Placental- like alcaline phosphatase in seminoma. Urol Res 18: 87-92

63. *Krebs* HA; *Eggleston* LV (1965) The role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis Biochem J 94:3C-4C

64. *Krimsky* I (1959) Phosphorylation of pyruvate by the pyruvate kinase reaction and reversal of glycolysis in a reconstructed system. J Biol Chem 234(2): 232-6

65. *Lamerz* R (1992) Alpha Fetoprotein. In: Thomas L (HRSG) Labor und Diagnose. Med Verlagsges., Marburg, S 1153-1162

66. *Levin* MJ; *Daegelen* D; *Meienhofer* MC; *Dreyfus* JC; *Kahn* A (1982) Two different species of messenger RNAs specify synthesis of M1 und M2 pyruvate kinase subunits. Biochim Biophys Acta 699(2): 77-83

67. *Lien* HH (1987) Shape of retroperitoneal lymph- nodes at computed tomography does not correlate to metastatic disease in early stage non-seminomatous testicular tumours. Acta Radiol 18: 271-273

68. *Light* PA*; Tyrell* CJ (1987) Testicular tumour markers in spermatic vein blood Br J Urol 59, 74-75

69. *Lippert* M*; Papadopoulos* N*; Javadpour* N (1981) Role of Lactat dehydrogenase isoenzymes in testicular cancer. Urology 18, 50-53

70. *Liu* F*; Fritsche* HA*; Trujillo* JM (1982) Serum lactat dehydrogenase isoenzyme 1 in patients with advanced testicular germ cell cancer Am J Clin Pathol 78, 178-183

71. *Lonberg* N.; *Gilbert* W (1983) Primary structure of chicken muscle pyruvate kinase mRNA. Proc. Natl. Acad. Science , USA 80 (12): 3661-5

72. *Mann* K; *Siddle* K (1988) Evidence for free beta subunit secretion in so- called human chorionic gonadotropin – positive seminoma. Cancer 62: 2378- 2383

73. *Marie* J; *Levin* MJ; *Simon* MP; *Kahn* A (1983) Genetic and epigenetic control of the pyruvate kinase isoenzymes in mammals. Isoenzymes Curr Top Biol Med Res 7: 221-240.

74. *Max-Audit* I, *Kechemir* D, *Mitjavila* MT; *Vainchenker* W (1988) Pyruvate kinase synthesis and degradation by normal and pathologic cells during erythroid maturation. Blood 72 (3): 1039-44

75. *Mazurek* S; *Boschek* C.B.*; Eigenbrodt* E (1997) The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. J. Bioenerg 29: 315:350

76. *Mazurek* S, *Eigenbrodt*, E, *Failing*, K, *Steinberg*, P (1999) Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. J. Cell. Physiol.181 136-146

77. *Mazurek* S , *Scheefers- Borchel* U, *Scheefers* H, *Michel* A, *Basenau* D, *Fischer* G, *Dahlmann* N, *Laumen* R, *Eigenbrodt* E (1993) Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie, notabene medici 3: 97-104.

78. *Mead* GM On behalf of the IGCCCG (1997) International Germ Cell Consensus Classification A prognostic factor- based staging system for metastatic germ cell tumors. J Clin Oncol 15: 594-603

79. *Mellati* AA; *Yucel* M; *Altinors* N; *Gunduz* U (1993) Purification and characterization of human meningeoma M2-PK. Clin Biochem 26(5): 383-8

80. *Moeller* KH (1997) Mediastinal mature teratoma: imaging features. Am Journal Roentgenol 169: 985-990

81. *Mostofi* FK; *Sesterhenn* IA (1997) Histological typing for testis tumours. 2nd ed. WHO International Histological Classification of Tumours. Springer Verl Berlin

82. *Moul* JW; *Heidenreich* A (1996) Prognostic factors in low stage nonseminomatous testicular cancer. Oncology 10:1359-1378

83. *Moul* JW; *McCarthy* WF; *Fernandez* EB; *Sesterhenn* IA (1994) Percentage of embryonal carcinoma and of vascular invasion predicts pathological stage in clinical stage I nonseminomatous testicular cancer Cancer Res 54: 362-364

84. *Müller Mattheis* V; *Reinhardt* M; *Gerharz* CD; *Fürst* G; *Vosberg* H; *Müller Gärtner* HW; *Ackermann* R (1998) Positron emission tomography with [18F]-2-fluoro-2-doxy-d-glucose in diagnosis of retroperitoneal lymph node metastases of testicular tumors. Urologe A 37: 609-620

85. *Mumperow* E; *Kressel* K; *Hartmann* M (1990) Das β- HCG- positive Seminom-Häufigkeit unter besonderer Berücksichtigung der Markerkonzentration im Hodenvenenblut Urologe A 30: 114-117

86. *Netzker* R; *Greiner* E; *Eigenbrod* E; *Noguchi* T; *Tanaka* T; *Brand* K (1992) Cell cycle associated expression of M2- type isoenzyme of pyruvate kinase in proliferating rat thymocytes. J Biol Chem 267 6421-6424

87. *Nielsen* OS; *Munro* AJ, *Duncan* W (1990) Is placental alcaline phosphatase (PLAP) a useful marker for seminoma? Eur J Cancer 26: 1049-1056.

88. *Noguchi* T (1990) Regulation of pyruvate kinase gene expression and its clinical application. Rinsho Byori, Jap J of Clin Pathol, 38 (8) 868 –75

89. *Oberneder* R; *Mahnert* B; *Hoffmann* K; *Hasholzner* U; *Stieber* P (2000) Tumor M2-PK- Neuer Marker zur Erkennung eines Nierenzellkarzinoms? Urologe A, 39. Jahrgang, Suppl 1, S 22 P1.1.

90. *Oehler* N (2000) Polytrauma induces increased expression of pyruvate kinase in neutrophils Blood 95(3): 1086-92

91. *Oliveira* EB; *Gotschlich* C (1979) Primary structure of human C-reactive Proteine. J Biol Chem 254(2): 489-502)

92. *Oremek* G.M.; *Eigenbrod* E; *Rädle* J; *Zeuzem* S; *Seiffert* UB (1997) Value of the serum levels of the tumor marker M2-PK in Pancreatic Cancer, Anticancer research 17 3031-3034

93. *Oremek* GM, *Teigelkamp* S, *Kramer* W, *Eigenbrodt* E, *Usadel* KH (1999) The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. Anticancer Res 19 (4A): 2599-601

94. *Peters* J; *Andrews* SJ (1984) The Pk-3 Gene determines both the heart, M1, and the kidney, M2, pyruvate kinase isoenzymes in the mouse. Biochem Genet (11-12): 1047-639

95. *Petri* E; Feil G; *Wechsel* HW; *Bichler* KH (1996) Determination of pyruvate kinase type tumor M2 (TUM2PK) in human testicular tumors. Potential usage for diagnosis compared with AFP / β-HCG-measurement. J Urology; 155: (S5) 546A

96. *Pienkos* EJ; *Jablokow* VR (1972): Secondary testicular tumors. Cancer 30:481

97. *Pottek* T; *Büttner* H; *Hartmann* M (1995) Die Kinetik von AFP und HCG bei Hodentumoren. Berechnung und Bewertung individueller Halbwertszeiten (HWZ). Urologe A 34, [Suppl 1]: S.114

98. *Pottek* T, *Hartmann* M (1999) Nerverhaltende Operationstechniken am Beispiel der ejakulationsprotektiven nerve-sparing-RLA bei Hodentumoren. In: Schreiter F. (Hrsg): Plastisch-Rekonstruktive Chirurgie in der Urologie. Thieme, Stuttgart, New York 60-72

99. *Powell* CS; *Fielding* AM; *Rosser* K; *Ames* AC; *Vaughton* KC (1989) Prostate specific antigen- a screening test for prostatic cancer? Br J Urol 64: 504-506

100. *Reske* SN; *Bares* R; *Büll* U; *Guhlmann* A; *Moser* E; *Wannenmacher* MF (1996) Klinische Wertigkeit der Positronen- Emissions- Tomographie (PET) bei onkologischen Fragestellungen: Ergebnisse einer interdisziplinären Konsensuskonferenz. Nucl Med 35: 42-52

101. *Rijksen* G; *Veerman* AJ, *Schipper-Kester* GP; *Staal* GE (1990) Diagnosis of pyruvate kinase deficiency in a transfusion- dependent patient with severe hemolytic anemia Am J Hematol Nov; 35 (3): 187-93

102. *Robson* C.J.; *Churchill* B.M.; *Anderson* W (1969) The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. J Urol 101: 297

103. *Roigas* J, *Schulze* G, *Raytarowski* S, *Jung* K, *Schnorr* D, *Loening* S.A (2000) Tumor-M2 Pyruvatkinase beim Nierenzellkarzinom Urologe A 39: 554-556 Springer Verlag
104. *Rothman, JM* (1992) Case report: Pyruvate Kinase deficiency NJ Med 92(9); 587-8
105. *See* WA; *Cohen* MB; *Hoxie* LD (1993): Alpha- Fetoprotein half-life as a predictor of residual testicular tumor. Cancer 71: 2048 – 50.
106. *Senturia* YD The epidemiology of testicular cancer (1987) Brit J Urol 60: 285-291
107. *Shih* WJ; *Collins* J; *Mitchell* B; *Wierzbinski* B (1994) Serum PSA and PAP measurements discriminating patients with prostate carcinoma from patients with nodular hyperplasia. J Natl Med Assoc 86: 667-670
108. *Skakkebaek* NE (1972) Possible carcinoma in situ of the testis Lancet 2:516-17
109. *Sommerhoff* CH (1982) Altersverteilung bei Hodentumoren In: Weißbach L; Hildebrandt G (Hrsg) Register und Verbundstudie für Hodentumoren – Bonn. Ergebnisse einer prospektiven Untersuchung. Zuckschwerdt Verl , München, S. 209-214
110. *Speth* M (1994) Besonderheiten des Kohlenhydratstoffwechsels in Tumoren. Curriculum oncologicum 55-58
111. *Staal* GEJ, *Rijksen* G (1995) Pyruvate Kinase in selected human tumors. In: Pretlow II TG and Pretlow TP eds. Biochemical and molecular aspects of selected cancers. San Diego: Academic press, Inc, 313-337
112. *Steinberg* P; *Klingelhoffer* A; *Schafer* A; *Wust* G; *Weisse* G; *Oesch* F; *Eigenbrodt* E (1999) Expression of M2-PK in preneoplastic hepatic foci of N- Nitrosomorpholine-treated rats. Virchows Arch 434 (3): 213-220
113. *Sugawara* T*; Furuhata* T*; Ogawa* K*; Hosaka* M (1986) A clinical study of testicular tumors- usefulness of serum lactic dehydrogenase. Jap J Urol 77, 948-54
114. *Scheefers- Borchel U, Scheefers H, Michel A, Will H, Fischer G, Basenau D, Dahlmann N, Laumen R, Mazurek S, Eigenbrod E* (1995) Quantitatve Determination (ELISA) of pyruvate kinase type tumor M2 – a new tumor marker. In: Klapdor R (eds) Current tumor diagnosis: Appl. Clinical Relevance, Research- Trends 365-368
115. *Schnaidt* U; *Müller* U; *Stegmaier* Ch (1992) Epidemiologie germinaler Hodentumoren im Saarland. Pathologe 13 73-7
116. *Schneider* J; *Morr* H, *Velcovsky* HG, *Weisse* G, *Eigenbrodt* E (2000) Quantitative Detection of tumor M2- pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. Cancer Detect Prev 24(6): 531-5.

117. *Tani K; Yoshida MC; Satoh H; Mitamura K; Noguchi T; Tanaka T, Fujii H, Miwa S* (1988) Human M2-type pyruvate kinase: cDNA cloning, chromosomal assignment and expression in hepatoma :GENE 73 (2) 509-16

118. *Thompson* D; *Pepys* MB; *Wood* SP (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. Structure Fold Des 7(2): 169-177

119. *TNM* Classification of malignant tumors (1997) Fifth Edition, J. *Wiley* & Sons, New York

120. *UICC* (1997) TNM- Klassifikation maligner Tumoren, 5. Auflage (Wittekind Ch; Wagner G; Hrsg) Springer Verl Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

121. *Vahlensieck* W jr. (1990) Intraskrotale und nichtgerminale Raumforderungen. Fortschr. Med. 108 :572

122. *Valentini* G; *Chiarelli* L, *Fortin* R, *Speranza* ML, *Galizzi* A, *Mattevi* A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase JBiol Chem 275(24): 18145-52

123. *Vogelzang* NJ (1987) Prognostic factors in metastatic testicular cancer. Int J Androl 10: 225-237

124. *Warburg* O; *Gawehn* K; *Geissler* AW; *Kayser* D; *Lorenz* S (1965) Experimente zur Anaerobiose der Krebszellen Klin Wochenschr 43: 289-93

125. *Wechsel* HW; *Feil* G; *Lahme* S; *Loeser* W; *Bichler* KH (1999) Plasma inactive form of Pyruvate Kinase (pTuM2Pk) in Renal Cell Carcinoma (RCC): an acceptable marker? Akt Urol 30: 249-253

126. *Wechsel* H.W*; Feil* G*; Oremek* G.M*; Bichler* KH*; Gleichmann* R (2001) Die inaktive Form der Pyruvatkinase in der Tumordiagnostik: ein Überblick zum derzeitigen Forschungsstand. Akt Urol 32: 55-61

127. *Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G (1999)* Marker for renal cell carzinoma (RCC): The dimeric form of pyruvate kinase (TuM2-PK) Anticancer res (Greece) 19(4A) 2583-90

128. *Wechsel* HW*, Petri,* E*, Feil* G*, BichlerKH:* Tumorspecific Pyruvat- Kinase(TuM2PK),: A potential marker for renal cell carzinoma. J Urol 1997; 157 (suppl): 109

129. *Weißbach* L; *Bussar- Maatz* R (1993) HCG positive seminoma. In: *Jones* WG, *Harnden* P, *Appleyard* I (eds) Germ cell tumors III. Pergamon, Leeds, pp 449- 450

130. *Weißbach* L*; Bussar- Maatz* R*; Mann* K (1997) The value of tumor markers in testicular seminomas. Results of a prospective multicenter study. Eur Urol 32: 16-22

131. *Weißbach* L*; Bussar- Maatz* R *(*1996) Pathogenesis, diagnosis and therapy of testicular tumors. Urologe A 35 (2): 163-172

132. *Weißbach* L (1990) In: Ackermann R.(Hrsg) Therapie urologischer Tumoren. Karger, Basel 76-78

133. *Williams* SD; *Birch* R; *Einhorn* LH; *Irwin* L; *Greco* FA; *Loehrer* PJ (1987) Treatment of disseminated germ cell tumors with cisplatin, bleomycin and either vinblastine or etoposide. N Engl J Med 316: 1435-1439

134. *Yamada* K, *Noguchi* T (1999) Nutrient and hormonal regulation of the pyruvate kinase gen expression. Biochem J Jan 1; 337 (Pt1): 1-11

135. *Zanelli* A; *Bianchi* P (2000) Red cell pyruvate kinasedeficiency: from genetics to clinical manifestations. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol Mar: 13(1): 57-81

136. *Zwerschke* W; *Mazurek* S; *Massimi* P; *Banks* L; *Eigenbrodt* E; *Jansen– Duerr* (1999) Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Proceedings of the National Acad of Sciences of USA, 96 (4) 1291-6.

VII. Tabellen und Abbildungen:

Abbildung 1: Altersverteilung innerhalb der Population

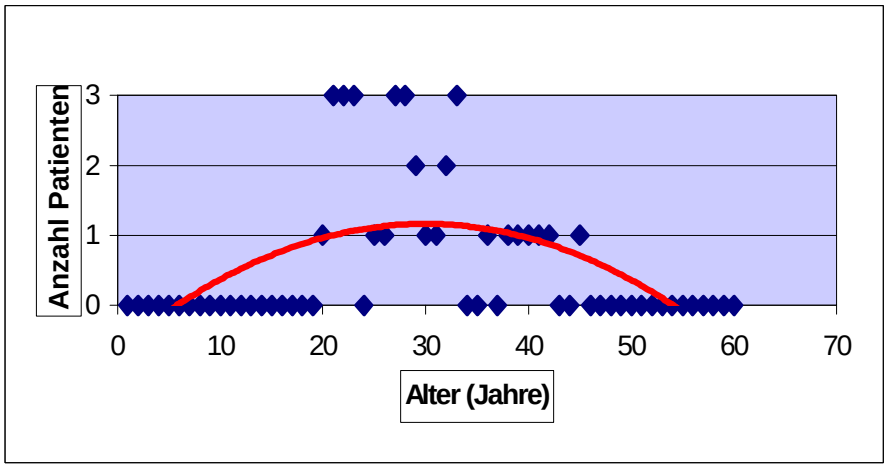


Abbildung 2: Verteilung Seminome- Nichtseminome

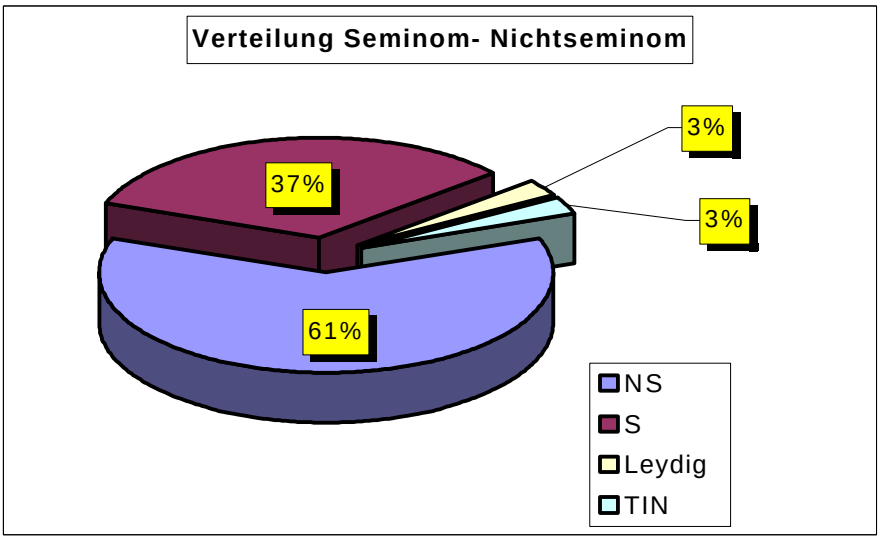


Abbildung 3: UICC-Stadien

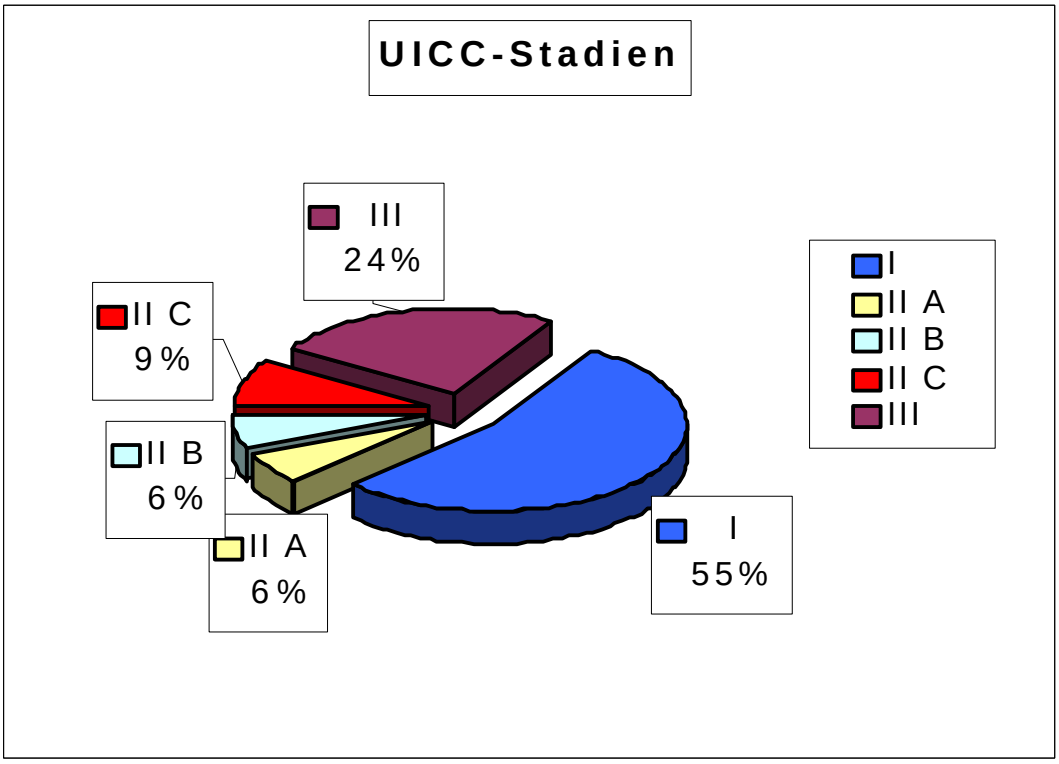
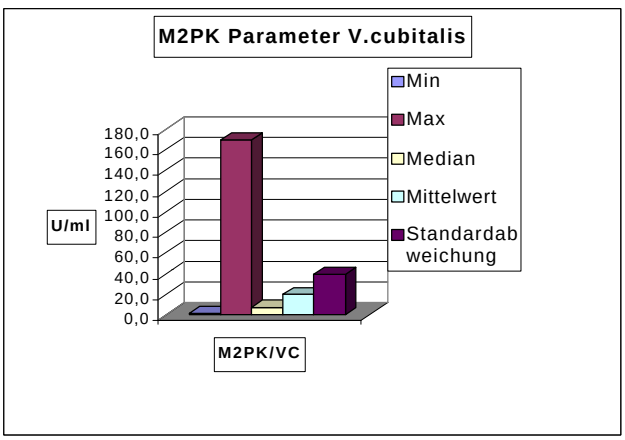


Abbildung 4 und 5: Parameter M2PK Cubitalvene/ Hodenvene(1.Messung-Operationstag)



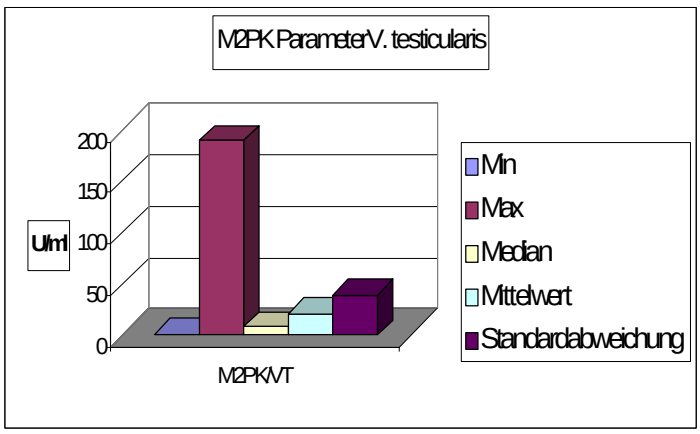
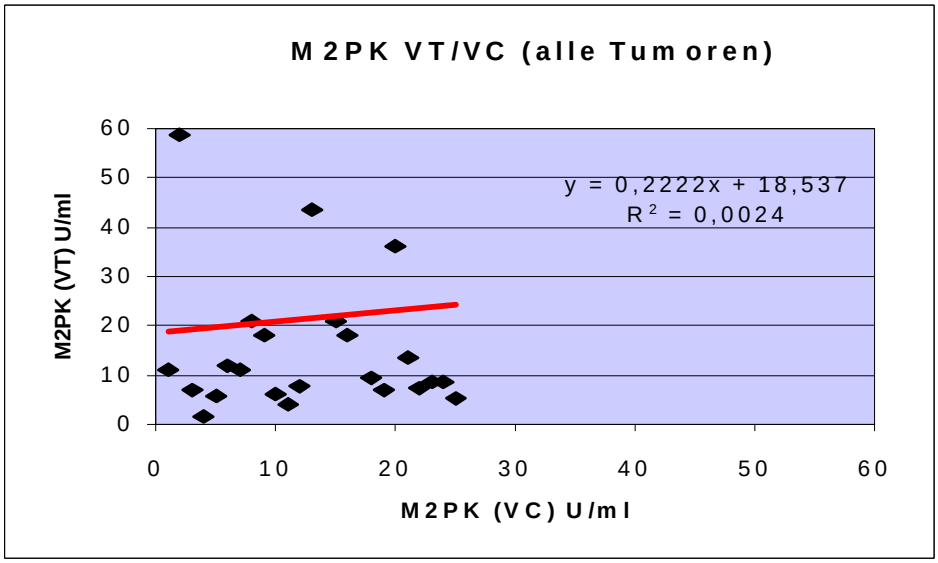


Abbildung 6: M2PK Vena testicularis/Vena cubitalis (alle Tumoren)



Rot: Trendlinie der Regression

Abbildung 7: Regression VT/VC klinisches Stadium I

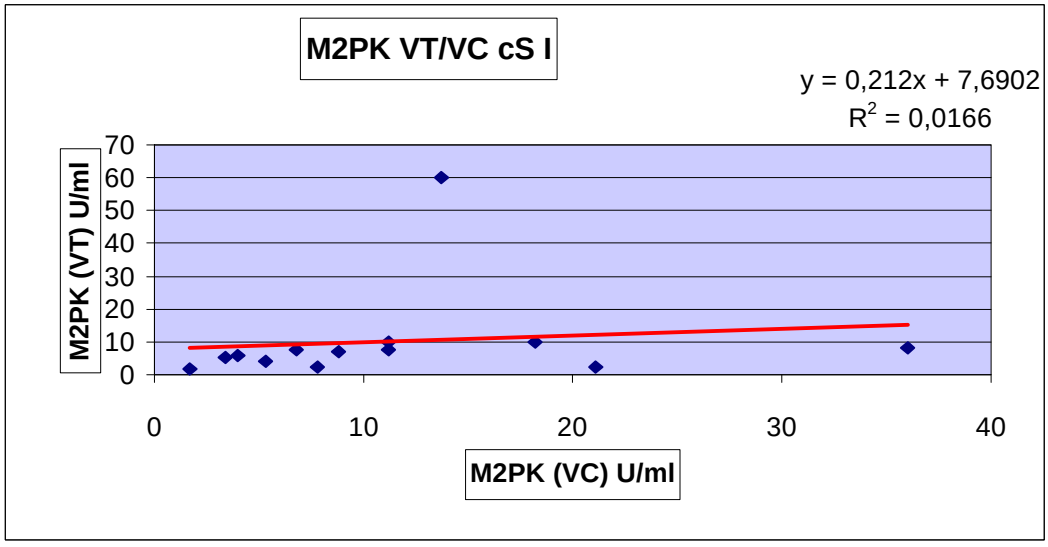


Abbildung 8 Korrelation VT/VC (nur Seminome)
Trendlinie: schwarz

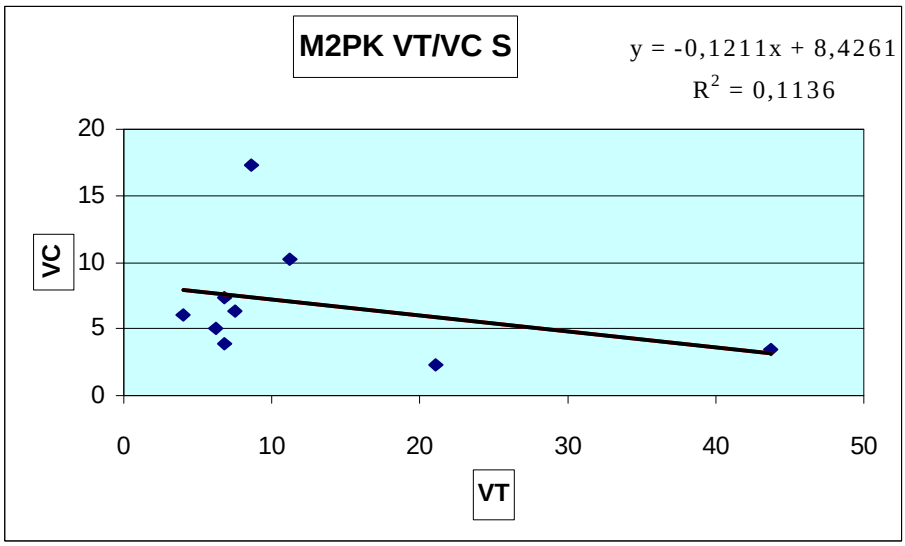


Abbildung 9: Korrelation VT/VC (nur Nichtseminome)

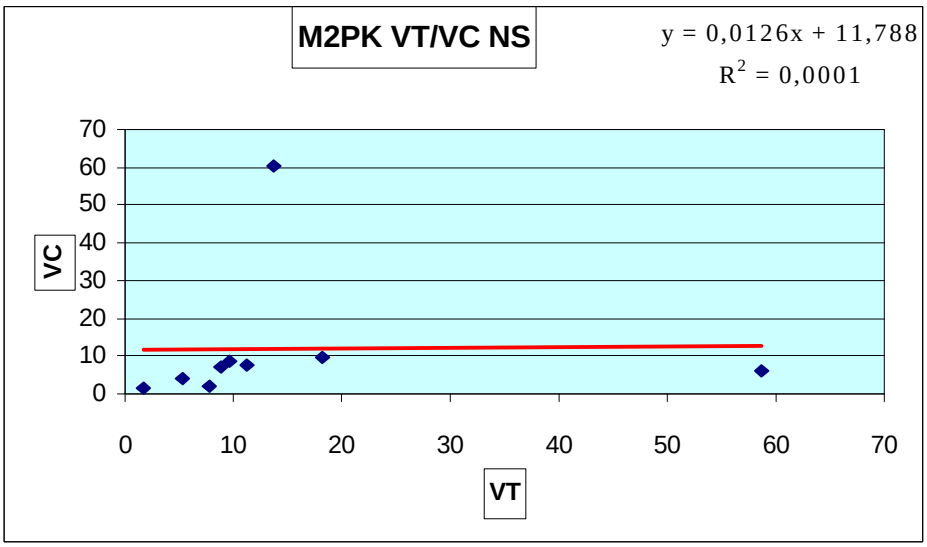
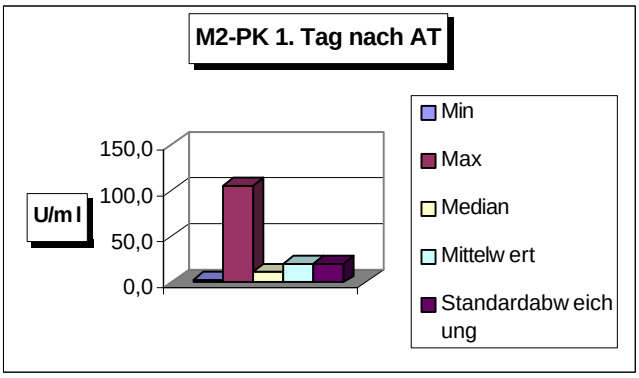


Abbildung 10 und 11: M2PK am 1und 5 postoperativen Tag



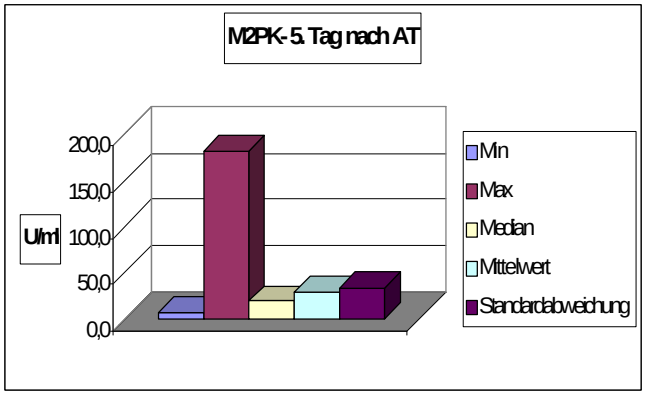


Abbildung 12: Trendlinien der Mediane (rot) und Mittelwerte (blau) über alle Meßzeitpunkte

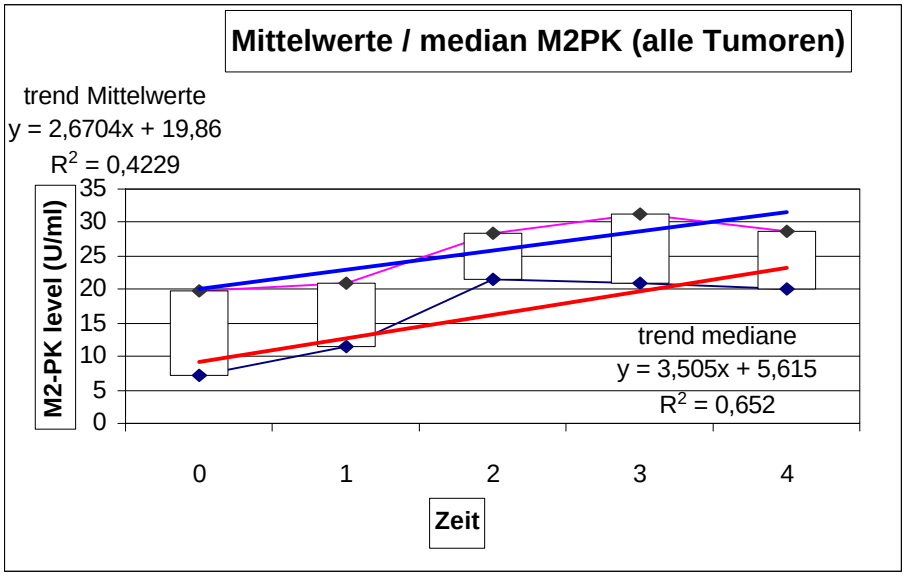


Abbildung 13: Trendlinien der Mediane (rot) und Mittelwerte(blau) M2PK Stadium I

Violett und blau: Kurven der Einzelwerte

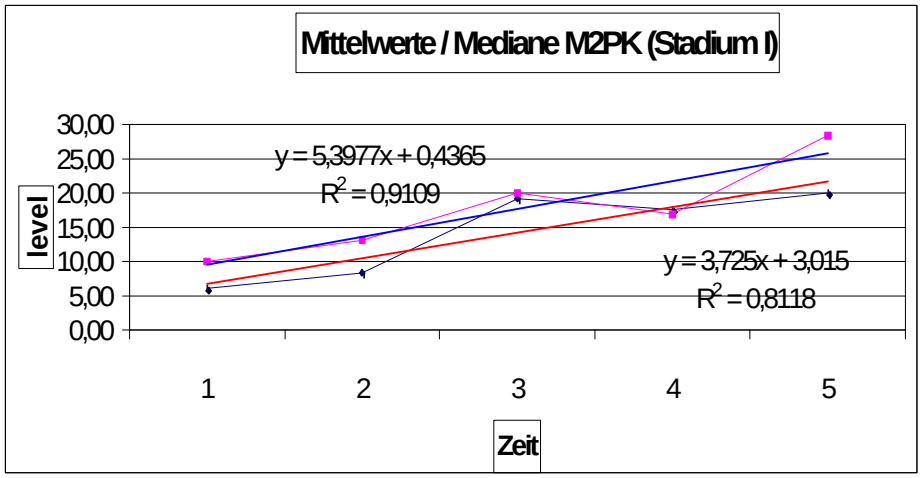


Abbildung 14. Trendlinien / Bestimmtheitsmaße M2PK Std. II und III

Rot: Mediantrendlinie, blau: Mittelwerttrendlinie

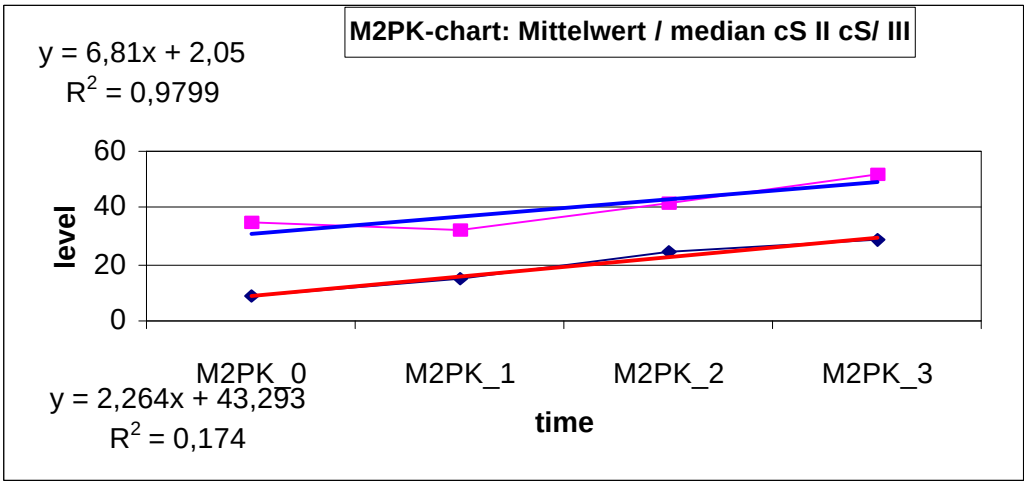


Abbildung 15: Trendlinien/ Bestimmtheitsmaße AFP Std.I

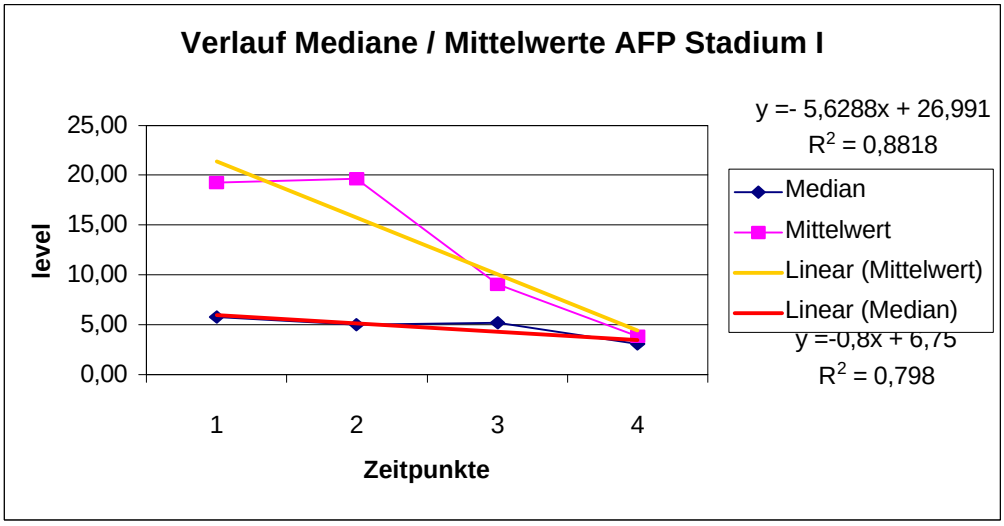
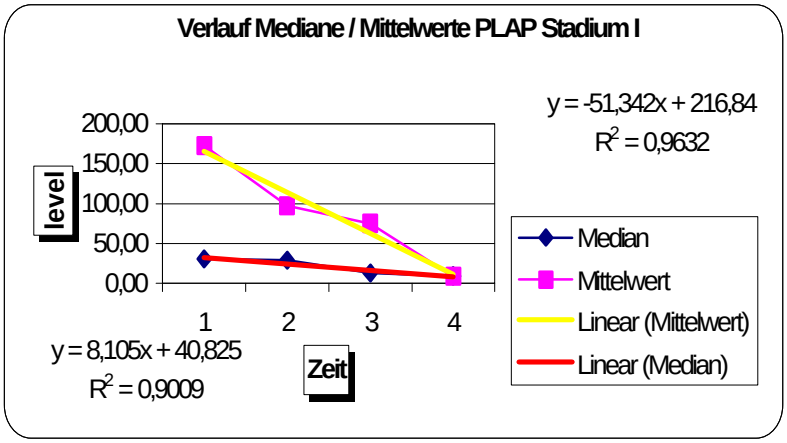


Abbildung 16: Trendlinien- hPLAP Stadium I



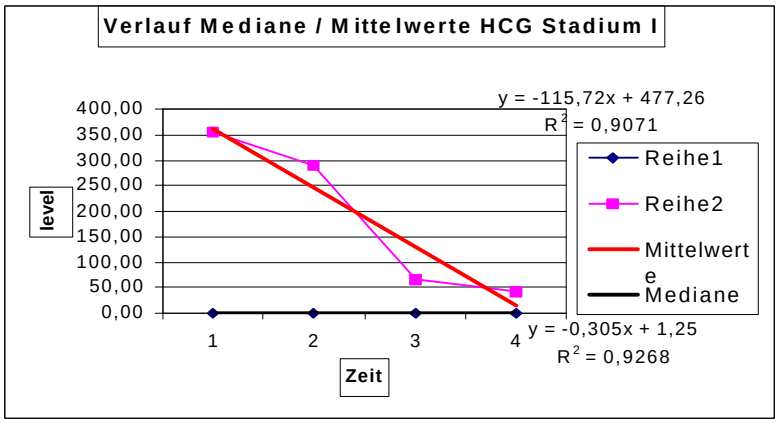
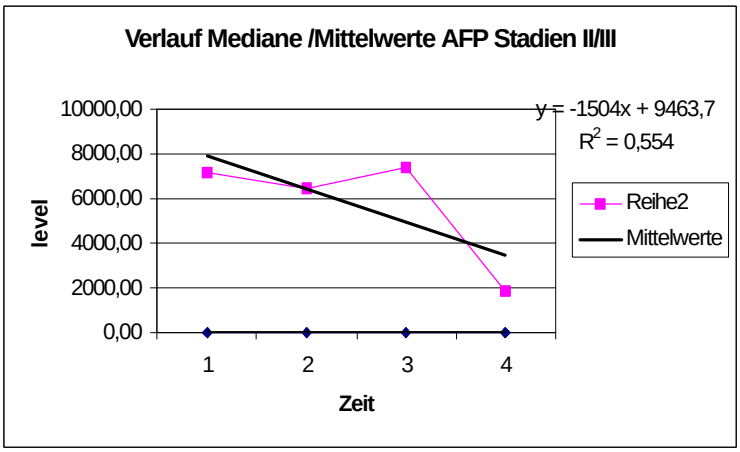
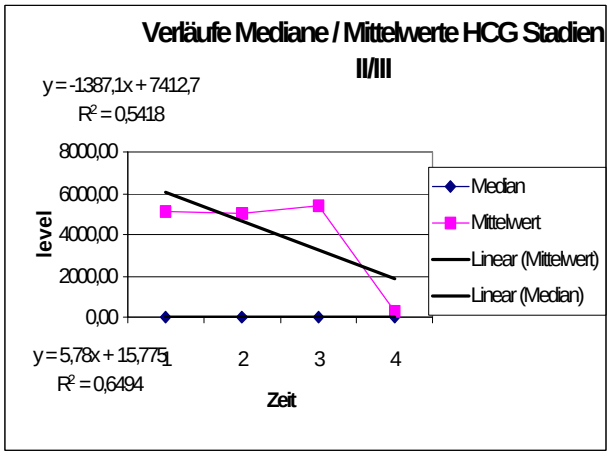
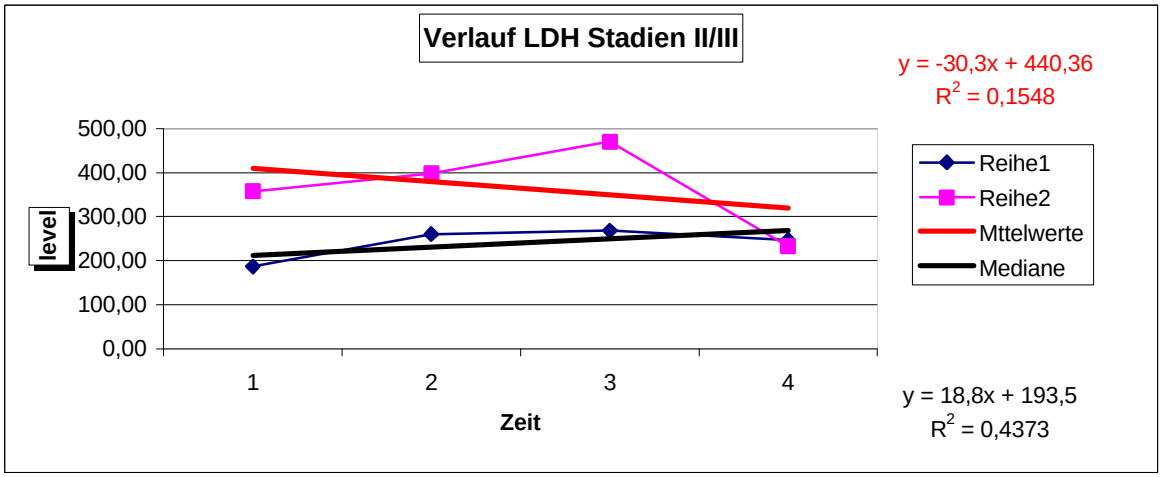


Abbildung 18-20: Trendlinien- Mittelwerte AFP-β-HCG- LDH Std. II und III







.

Abbildung 21-22 Trendlinien der Referenzmarker HCG und AFP (alle Tumoren)

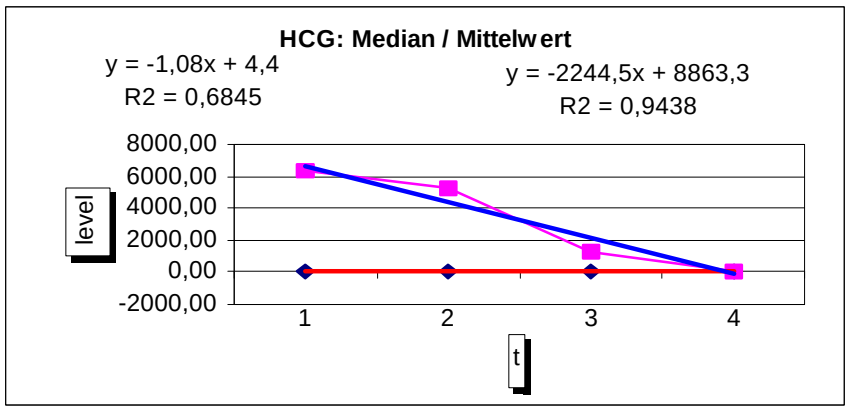


Abb.22

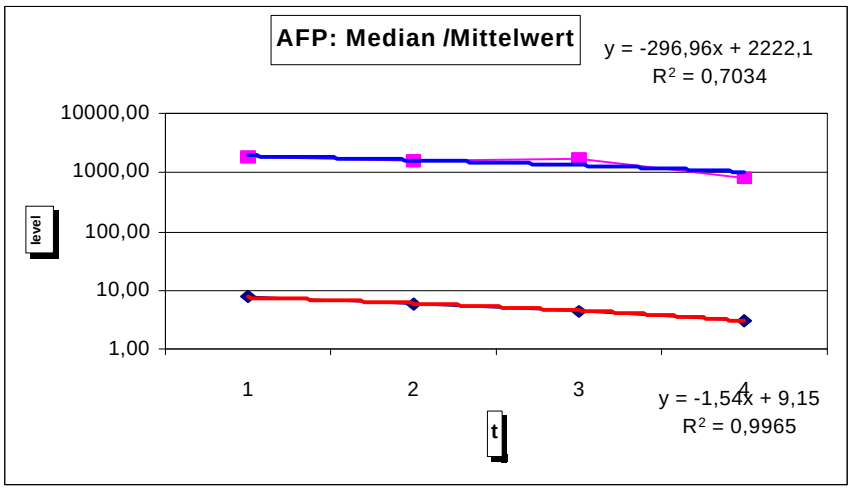
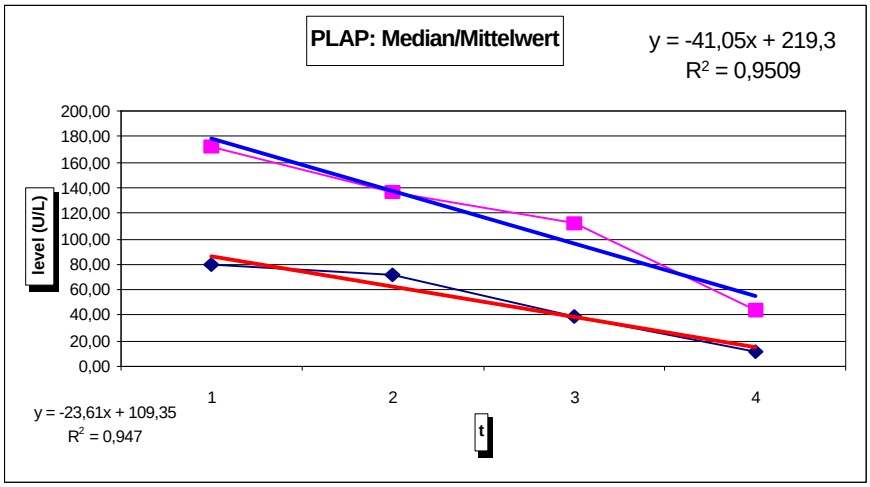


Abbildung 23 und 24.: Trendlinien der Referenzmarker PLAP und LDH (alle Tumoren)



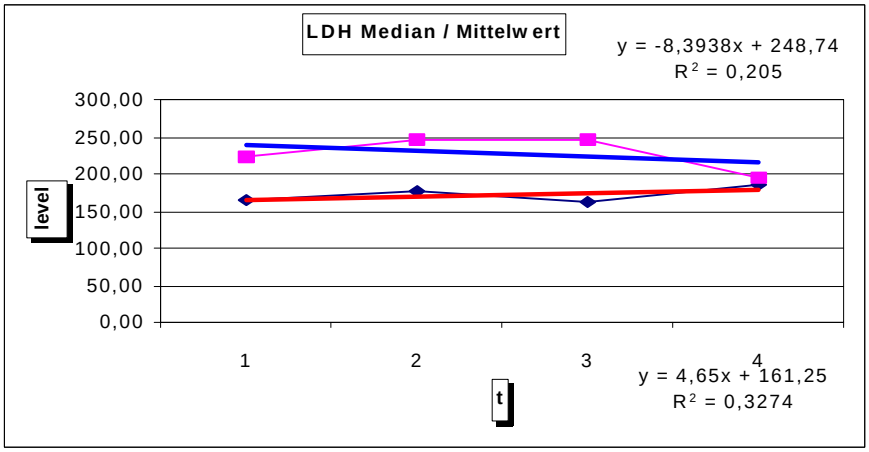


Abbildung 25. Trendlinien der Mediane: Messung 1-4 von CRP (rot) und Tu- M2-PK (schwarz)

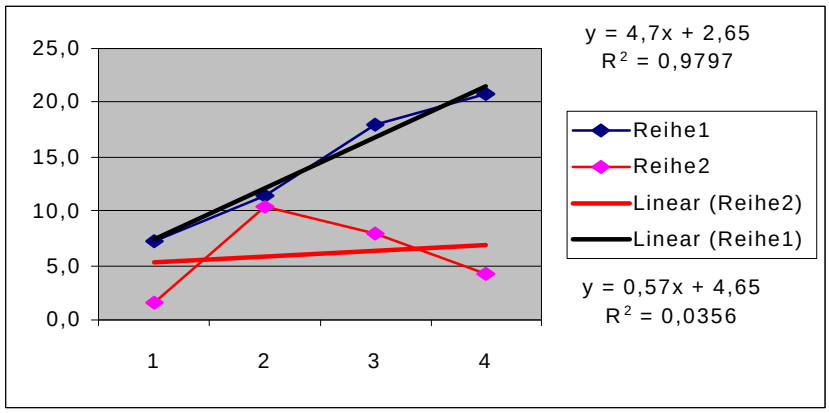


Abbildung 26: β- HCG Vena testicularis/ Vena cubitalis (alle Tumoren)

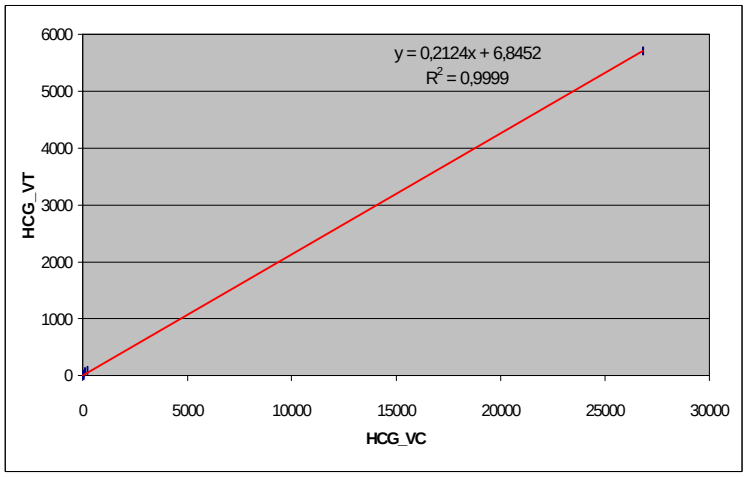


Abbildung 27: AFP Vena testicularis/ Vena cubitalis (alle Tumoren)
Rot: Trendlinie

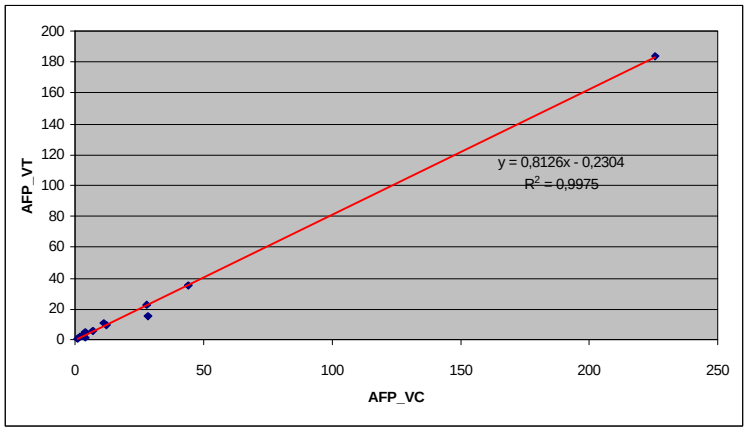


Diagramm I:: Tu M2-PK als Marker beim Pancreas Ca im Vergleich [92]

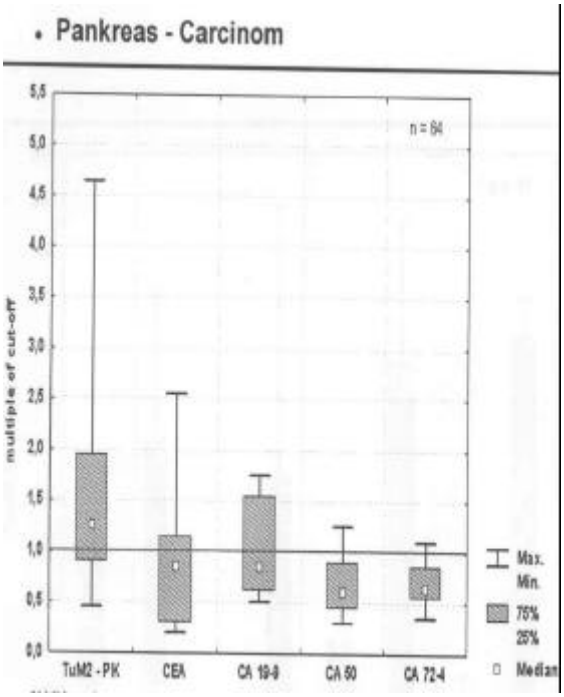


Diagramm II: Unterschiedliche M2-PK Streuungen in Abhängigkeit des Transportmediums

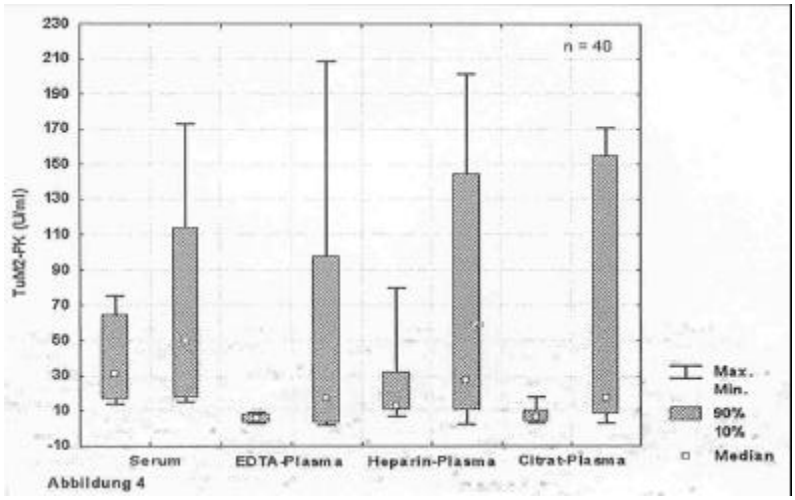


Abbildung 4

Diagramm III : Konzentrationen der TUM2-PK im Heparinplasma bei Kontrollpersonen mit nichtmetastasierten und metastasiertem Nierenzellkarzinom [103]

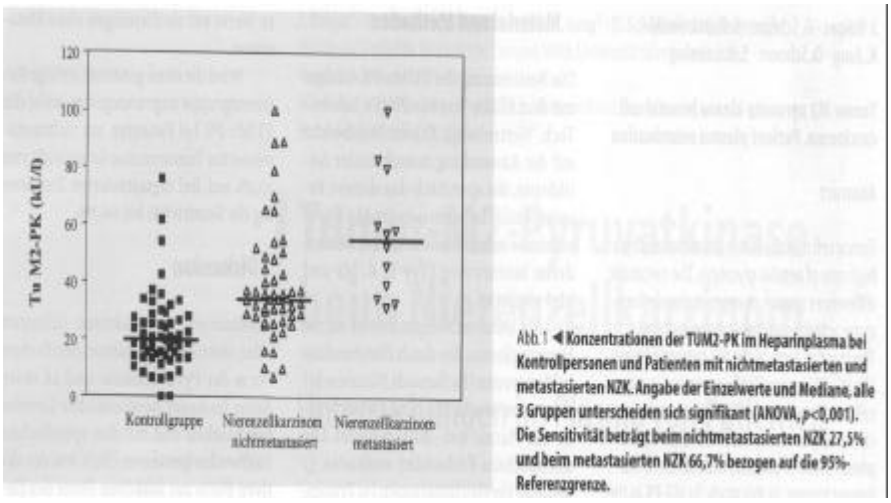


Abb. 1 ◀ Konzentrationen der TUM2-PK im Heparinplasma bei Kontrollpersonen und Patienten mit nichtmetastasierten und metastasierten NZK. Angabe der Einzelwerte und Mediane, alle 3 Gruppen unterscheiden sich signifikant (ANOVA, $p<0,001$). Die Sensitivität beträgt beim nichtmetastasierten NZK 27,5% und beim metastasierten NZK 66,7% bezogen auf die 95%-Referenzgrenze.

Diagramm IV: Positivität der Marker		
Marker	**Anzahl**	**Prozent**
AFP (+)	14	45,2%
HCG (+)	13	41,9%
LDH (+)	6	19,4%
M2PK (+)	4	11,7%
PLAP (+)	12	38,7%
Nur AFP (+)	1	3,2%
Nur HCG (+)	1	3,2%
Nur LDH (+)	0	0%
Nur PLAP (+)	3	9,7%
Nur M2PK (+)	1	3,2
AFP und HCG (-)	13	41,9%
AFPund HCG und PLAP (-)	4	12,9%
AFP und HCG und Tu-M2PK(-)	7	22,6%

Diagramm V: M2-PK Konzentrationen in Abhängigkeit vom Tumorstadium bei NZK [102]

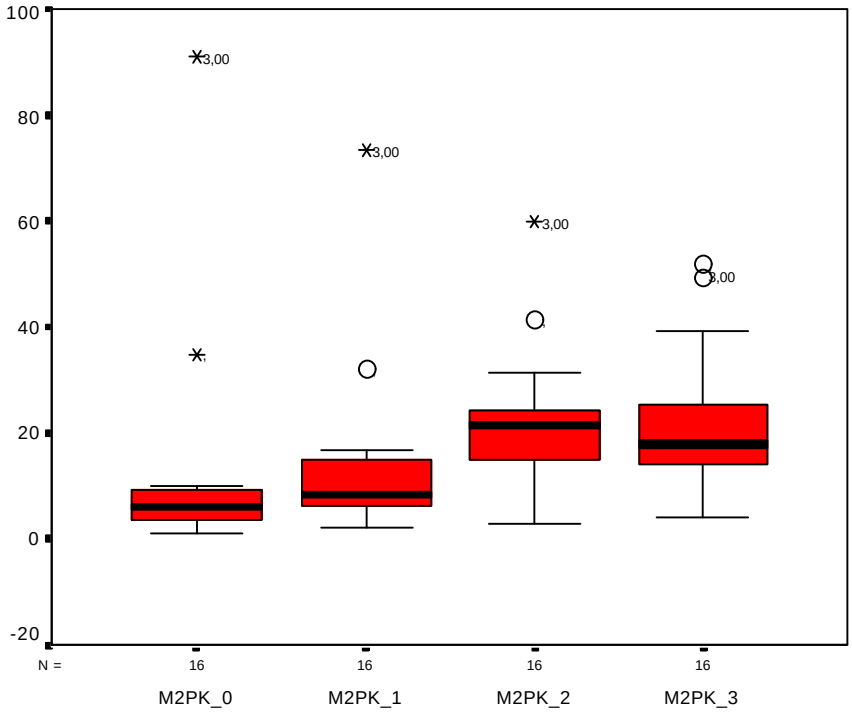
Patient/ Staging	Anzahl	Mittelwert	Standard-Abweichung	Median	Range
Normalkollektiv	103	7,5	7,9	5,5	0,5-54,3 cut off: 15,0
Nephritis	10	5,0	0,2	11,1	<0,5-15,1
Robson I	1				17,6
Robson II	34	57,1	20,7	59,1	21,5-110,4
Robson III	25	104,0	66,6	98,2	17,8-262,5
Robson IV	4				110,3-376,3

VIII. Nichtparametrische Tests

Explorative Datenanalyse

Verarbeitete Fälle

	Fälle				
	Gültig		Fehlend		Gesamt
	N	Prozent	N	Prozent	N
M2PK_0	16	38,1	26	61,9	42
M2PK_1	16	38,1	26	61,9	42
M2PK_3	16	38,1	26	61,9	42
M2PK_4	16	38,1	26	61,9	42



Nichtparametrische Tests

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
M2PK_0	35	18,9485	33,7110	1,00	170,00
M2PK_1	35	20,2058	22,7158	2,00	106,00
M2PK_2	35	28,5547	31,6384	3,00	181,00
M2PK_3	18	28,5503	31,4046	4,00	142,00
UICC	33	1,7088	0,8586	1,00	3,00

Kruskal-Wallis-Test

UICC		N	Mittlerer Rang
M2PK_0	1,00	19	13,84
	2,00	6	16,42
	3,00	7	23,79
	Gesamt	32	
M2PK_1	1,00	19	13,79
	2,00	7	17,86
	3,00	7	24,86
	Gesamt	33	
M2PK_2	1,00	17	14,15
	2,00	7	12,64
	3,00	7	23,86
	Gesamt	31	
M2-PK_3	1,00	8	5,31
	2,00	1	10,00
	3,00	4	9,63
	Gesamt	13	

Statistik für Test [a,b]

	M2PK_0	M2-PK_1	M2-PK_2	M2_PK_3
Chi- Quadrat	5,754	6,778	6,892	3,934
df	2	2	2	2
Asymptotische Signifikanz	0,056	0,034	0,032	0,140

a: Kruskal- Wallis- Test

b: Gruppenvariable UICC

Mediantest

Häufigkeiten

	UICC		
	1,00	2,00	3,00
M2-PK_0 > Median	9	2	11
<=Median	10	4	2
M2-PK_1 > Median	6	5	5
<=Median	13	2	2
M2-PK_2 > Median	7	2	6
<=Median	10	5	1
M2-PK_3 >Median	2	1	3
<=Median	6	0	1

Statistik für Test[d]

	M2-PK_0	M2-PK_1	M2-PK_2	M2-PK_3
N	32	33	31	13
Median	6,7500	11,9000	19,5000	18,2000
Chi- Quadrat	2,005[a]	5,125[b]	5,360[b]	3,946[c]
Asymptotische Signifikanz	0,367	0,077	0,069	0,139

a. Bei 4 Zellen (,0%)werden weniger als 5 Häufigkeiten erwartet. Die kleinste erwartete Zellenhäufigkeit ist 3,0.

b. Bei 4 Zellen (,0%)werden weniger als 5 Häufigkeiten erwartet. Die kleinste erwartete Zellenhäufigkeit ist 3,4

c. Beoi 6 Zellen (100%) werden weniger als 5 Häufigkeiten erwartet. Die kleinste erwartete Zellenhäufigkeit ist ,5

d. Gruppenvariable: UICC

Jonckheere- Terpstra- Test[a]

Gruppenvariable: UICC

	M2-PK_0	M2-PK_1	M2-PK_2	M2_PK_3
Anzahl der Stufen in UICC	3	3	3	3
N	32	33	31	13
Beobachtete J-T-Statistik	206,00	230,00	191,500	35,500
Mittelwert der J-T- Statistik	144,500	157,500	143,500	22,000
Standardabweichung der J-T- Statistik	26,970	28,531	26,371	6,956
Standardisierte J-T- Statistik	2,280	2,541	1,820	1,941
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,023	0,011	0,069	0,052

IX. Anhang

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

Danksagung

Herrn Flottenarzt Dr. med. M. Hartmann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas aus der Urologischen Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Hamburg, seine fördernden Anregungen bei der Durchsicht und endgültigen Fertigstellung der Arbeit sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein ausgesprochener Dank gilt Herrn Oberstabsarzt T. Pottek, der diese Arbeit initiiert hat und ohne dessen Unterstützung sie nicht hätte entstehen können. Insbesondere bei der statistischen Auswertung stand er mir mit wertvollem Rat zur Seite.

Für Supervision und endgültige Beurteilung der Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. H. Huland.

Gedankt sei auch der Laborabteilung I im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, zu nennen Herr Schmieder, für die problemlose Kooperation bei den notwendigen Laboruntersuchungen.

Dies gilt ebenso für Herrn Dr. Michael Müller und Frau Bahlo von der Laborgemeinschaft Drs. Fenner et al. für die rasche Einarbeitung in den Umgang mit den Labormethoden. Dank gebührt nicht zuletzt Herrn Henry Osenger für die Bereitstellung der Hardware zur endgültigen Fertigstellung aller Datenträger vor Drucklegung der Promotion.

Diese Arbeit ist aufgrund eines Sonderforschungsauftrages des BMVg (Nr. 02K2-S-149901 Pottek/Hartmann) möglich geworden.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt , daß die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe von mir verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quelleninformationen nicht benutzt wurden und ich die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Thomas Blum

Curriculum vitae

Name:	Thomas- Erich Blum	
Geburtsdatum:	2.September 1959	
Geburtsort:	Kiel	
Eltern:	Uwe Blum, * 11.10.1933, Kaufmann	
	Gisela Blum, geb. Thun, * 5.6.1936; kaufm. Angestellte	
Wohnort:	24111 Kiel, Frohnauweg 44	
Schulbildung:	1966-1969	Goethe Grundschule Kiel
	1969-1979	Städt. Humboldt- Gymnasium Kiel
Schulabschluss:	19.06.1979	Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst:	03.01.1980-31.12.1982	Soldat auf Zeit 7. Sanitätsbataillon 6 Itzehoe
Studium:	10/1983- 11/1991	Christian-Albrechts-Universität Kiel -Humanmedizin-
	9/1986	Ärztliche Vorprüfung
	9/1987	1. Staatsexamen
	10/1990	2. Staatsexamen
	10/1990-10/1991	Praktisches Jahr Diakonissenanstalt Flensburg, Wahlfach: Urologie
	19.11.1991	3. Staatsexamen
Beruf:	15.2.92- 17.8.93	Arzt im Praktikum, Abteilung Urologie Kreiskrankenhaus Itzehoe
	1.10.1993	Wiedereintritt in die Bundeswehr Schiffsarzt 3. Schnellbootgeschwader
	16.05.1997	Weiterbildungsassistent Chirurgie im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
	seit 20.05.1998	Weiterbildungsassistent Urologie im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

Kiel, 21.10.2001