Aus der Universitäts-Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung I
Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie, Onkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger
Leiter: Professor Dr. M.B. Ranke

Untersuchung der Insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II, deren Bindeproteine IGFBP-2, IGFBP-3 und der Säurelabilen-Untereinheit ALS bei Kindern mit soliden Tumoren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
KATRIN MARTIN
aus Böblingen
2007

Dekan:	Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. M. Elmlinger
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Wahl

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 3

1.1 Solide Tumoren bei Kindern 3

1.2 IGF-System 4

1.3 Veränderungen des IGF-Systems bei malignen Erkrankungen 6

1.4 Fragestellung 7

2 Material und Methoden 9

2.1 Patienten 9

2.2 Methodisches Vorgehen bei der Auswertung 12

2.2.1 Gruppeneinteilungen der Patienten und ihrer Messwerte nach verschiedenen Kriterien 12

2.2.2 Referenzwerte 14

2.2.3 Berechnung der verwendeten Parameter 14

2.2.4 Statistische Analysen 16

2.3 Radioimmunoassay zur Messung von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 17

2.4 ELISA zur Messung von ALS 20

3 Ergebnisse 22

3.1 Serumspiegel von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS im Vergleich zu Referenzwerten gesunder Kinder 22

3.2 Verhältnis von IGF-I und IGFBP-3 im Serum erkrankter und gesunder Kinder 38

3.3 Korrelation der gemessenen Parameter im Serum untereinander 40

3.4 Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit vom Tumorstatus 43

3.5 Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit von der Therapiedauer 45

3.6 Einzelverläufe der Serumkonzentrationen bei Patienten mit eRMS und PNET 52

4 Diskussion 58

4.1 Abweichungen der gemessenen Parameter von den Referenzwerten gesunder Kinder 58

4.2 Gegenseitige Abhängigkeit der Parameter des IGF-Systems 63

4.3 Biologische Verfügbarkeit von IGF-I 64

4.4 Abhängigkeit der Serumspiegel des IGF-Systems von der Tumormasse 65

4.5 Zusammenhang der Serumspiegel des IGF-Systems mit dem Krankheitsverlauf 66

4.6 Einzelverläufe pädiatrischer Tumorpatienten 70

5 Schlussfolgerungen 74

6 Zusammenfassung 77

7 Anhang 79

7.1 Puffer, Lösungen und Antikörper 79

7.2 Geräte 81

7.3 Verwendete Abkürzungen 81

8 Literaturnachweise 83

1 Einleitung

1.1 Solide Tumoren bei Kindern

Maligne Erkrankungen kommen im Kindesalter insgesamt selten vor. Die altersstandardisierte Inzidenz lag in Deutschland zwischen 1980 und 2001 bei 13,9 Neuerkrankungen pro 100000 unter 15-jährigen Kindern pro Jahr. In der relativen Häufigkeit der Malignome bestehen bei Kindern und Erwachsenen grundlegende Unterschiede. Sarkome des Weichteilgewebes und des Knochens machen bei Kindern 6,5% und 4,6% der Neuerkrankungen aus, Nierentumoren und Tumoren des sympathischen Nervensystems kommen mit einer relativen Häufigkeit von 6,1% und von 8,6% vor. Sie treten damit bei Kindern viel häufiger auf als bei Erwachsenen, bei denen die Karzinome über 90% der malignen Neuerkrankungen ausmachen [27].

Weichteiltumoren gehen von Muskeln, Sehnen, Bindegewebe, Fettgewebe, Blutgefäßen, Nerven oder Synovialgewebe aus. Zu den Weichteiltumoren zählen Rhabdomyosarkome, Synovialsarkome, Tumoren der Ewing Familie und Fibrosarkome. Rhabdomyosarkome (RMS), machen mit 65% den größten Anteil der Gruppe der Weichteilsarkome aus. Rhabdomyosarkome werden in embryonale und alveoläre RMS unterteilt. Aufgrund ihres unterschiedlichen biologischen Verhaltens haben eRMS eine günstigere Prognose als aRMS. Die Familie der Ewing Tumoren umfasst typische und atypische Ewingsarkome und periphere neuroektodermale Tumoren (PNET). PNET und Ewing-Tumoren treten in den Weichgeweben oder als Knochentumoren auf und weisen eine spezifische genetische Veränderung auf Chromosom 22 auf [36]. Die am häufigsten auftretende genetische Veränderung ist t(11;22)(q24;q12) und t(11;22)(q24;q12) [31]. Zur Gruppe der Knochentumoren gehört auch das Osteosarkom. Embryonale Tumoren sind meist schon vorgeburtlich angelegt. Hierzu gehören unter anderen das Neuroblastom und das Nephroblastom.

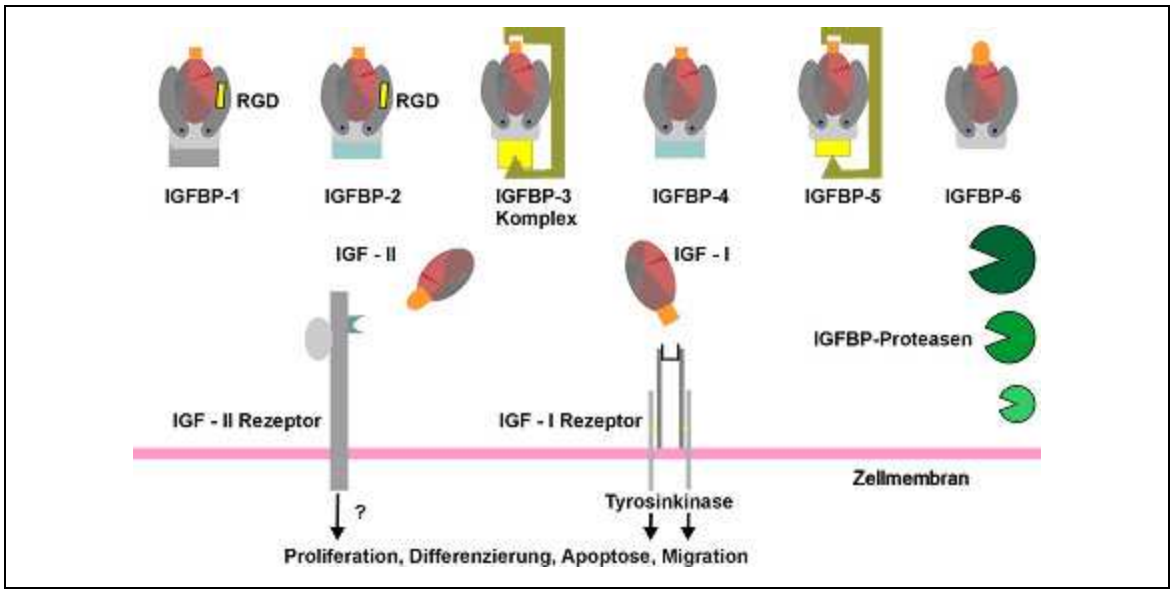
In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Weichteiltumoren, Knochentumoren und embryonalen Tumoren in Abhängigkeit von der Art und dem Ausmaß der Erkrankung auf ihre Serumspiegel von Insulin-ähnlichen Wachstums-

faktoren und deren Bindeproteinen untersucht, denen nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen eine biologische Rolle im Tumorwachstum nachgesagt wird [6] [25].

1.2 IGF-System

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II bilden gemeinsam mit ihren Bindeproteinen IGFBP-1 bis –6, ihren Rezeptoren und ihren spezifischen Proteasen ein komplexes Netzwerk, das eine Schlüsselrolle bei essentiellen Zellfunktionen wie der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis, Migration und programmiertem Zelltod spielt. Veränderungen im Gleichgewicht dieses Systems können einerseits schwere Folgen für die Entwicklung und das Wachstum haben und andererseits die Entstehung von Krebs fördern [13] [8] [60]. Die mitogene Wirkung der IGFs wird über den IGF-Typ1-Rezeptor (IGF-I-R) vermittelt und ihre biologische Aktivität wird im Serum über Komplexbildung mit den Bindeproteinen IGFBP-1 bis 6 und der Säurelabilen Untereinheit (ALS) reguliert. Die Rolle des IGF-II Rezeptors besteht vermutlich in der Regulierung der IGF-II Wirksamkeit durch dessen Internalisierung und anschließendem lysosomalen Abbau. Eine Signaltransduktion über Phosphorylierungskaskaden ist jedoch nur für den IGF-I Rezeptor nachgewiesen [30]. Gebunden im ternären Komplex mit IGFBP-3 und ALS können IGFs die Blutbahn nicht verlassen und haben eine vielfach höhere Halbwertszeit als ungebundene IGFs [53]. Spezifische Proteasen spalten die ternären Komplexe jedoch und setzen damit IGF bei erhöhtem Bedarf, z.B. während der Schwangerschaft frei [5] [41].

Abbildung 1.2.1



Die Komponenten des IGF-Systems

[Elmlinger 2002]

Die wichtigsten Regulatoren des IGF-Systems sind das rhythmisch sekretierte Wachstumshormon (hGH) und die Nahrungsaufnahme [3]. Bei der Interpretation gemessener Serumspiegel muss unbedingt die Altersabhängigkeit der Serumspiegel der IGFs und ihrer Bindeproteine insbesondere in der Pubertät berücksichtigt werden. Behandlungsmethoden wie Chemotherapie oder Bestrahlung, die bei Tumorpatienten eine Rolle spielen, nehmen zudem Einfluss auf dieses komplexe System [2] [48] [45] z.B. über die hypophysäre WH-Produktion oder die Leber, bzw. die renale Ausscheidung. Hauptsyntheseort für IGF-I und IGFBP-3 ist die Leber, weshalb bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion geringere Serumspiegel dieser Faktoren gemessen werden [3]. IGF-II hingegen wird auch peripher, zum Beispiel in Zellen des Immunsystems und in der Niere gebildet.

1.3 Veränderungen des IGF-Systems bei malignen Erkrankungen

Es gibt zahlreiche klinische Hinweise, dass Störungen im IGF-System eine wesentliche Rolle in der Entstehung und im Fortschreiten von Neoplasien spielen. Diese werden durch die experimentelle Forschung am Zell- und Tiermodell bestätigt. Verschiedene Studien belegen, dass Tumorzellen IGFs oder IGFBPs in vitro und in vivo in veränderten Mustern exprimieren. Bei Neoplasien des Blutes, der Prostata, der Brust, des Colons und insbesondere bei Weichteiltumoren wurde z.B. eine erhöhte IGFBP-2 Expression und/oder erhöhte Serumspiegel für IGFBP-2 nachgewiesen [8] [14] [15] [23] [29] [39] [56] [60]. IGFBP-2 ist durch seinen Einfluss auf die Zellproliferation und Zelladhäsion in der Lage, ein Tumorwachstum zu beschleunigen [49] [17] [35]. Embryonale Tumoren wie das Nephroblastom und das Rhabdomyosarkom exprimieren große Mengen an IGF-II mRNA [51] [58] [10] [11] und erhöhte Mengen an IGF-Typ1-Rezeptor mRNA [10] [37]. Eine Relaxation der Prägung (loss of imprinting) des mütterlichen Allels des IGF-II Gens oder ein Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity) des väterlichen Allels des IGF-II Gens auf Chromosom 11p15.5, wie es bei Rhabdomyosarkomen und Nephroblastomen gefunden wird, kann zu einer Überexpression des IGF-II Gens führen [60] [54] [59]. Eine Deletion des WT1 oder des WT2 Gens auf Chromosom 11p13 und 11p15, wie sie beim Nephroblastom gefunden werden, können über eine Deregulierung der IGF-I Rezeptor mRNA die Proliferationsrate von Zellen stark erhöhen [36] [55]. Diese Störungen der Genbalance führen hier wahrscheinlich zur Entstehung von Krebs.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang solider maligner Tumorerkrankungen bei Kindern mit deren Serumspiegeln an Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I, IGF-II), deren Bindeproteinen (IGFBP-2, IGFBP-3) und der säurelabilen Untereinheit (ALS) untersucht werden. Die Ergebnisse wurden vor dem Hintergrund zuvor evaluierter altersabhängiger Referenzwertebereiche bei gesunden Kindern betrachtet und semiquantitativ ausgewertet.

Im Einzelnen wurden die Serumspiegel bei den Tumorpatienten unter folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Wie liegen die Serumspiegel der Tumorpatienten an IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS im Vergleich zu den altersentsprechenden Referenzwertbereichen des 5. bis 95. Perzentils?
2. Wie groß ist die Fraktion an theoretisch ungebundenem und damit mitogen wirksamem IGF-I, die anhand des Verhältnisses von IGF-I zu IGFBP-3 im Vergleich zu den altersentsprechenden Referenzwerten abgeschätzt wird?
3. Sind die Spiegel der im Serum gemessenen Parameter voneinander abhängig? Dazu werden Korrelationen der Parameter untereinander berechnet.
4. Sind die Serumspiegel eines Tumorpatienten von der Masse seines Tumors abhängig? Um dies beurteilen zu können, werden die Serumspiegel von Patienten, bei denen ein makroskopisch identifizierbarer Tumor vorliegt, mit den Serumspiegeln von Patienten, die eine komplette Remission erreicht haben, verglichen.
5. Sind die Serumspiegel der gemessenen Parameter von der Zeitspanne abhängig, die zwischen Probeentnahme und Diagnosestellung bzw. Therapiebeginn liegt? Und wie unterscheidet sich die Entwicklung der Serumspiegel über einen Beobachtungszeitraum von über einem Jahr für überlebende Patienten, die eine Remission erreichen von denen, die

keine Remission erreichen und weiterhin von den Patienten, die verstorben sind?

6. Bestätigen sich die zu den vorigen Fragestellungen ermittelten Ergebnisse bei vergleichender retrospektiver Betrachtung individueller Krankheitsentwicklungen? Hier wurde die Entwicklung der Serumspiegel an IGF-I und IGFBP-2 von jeweils zwei Patienten mit gleicher Diagnose aber unterschiedlichem Krankheitsverlauf betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In der Studie werden 64 Kinder, 32 Mädchen und 32 Jungen mit verschiedenen soliden Tumoren betrachtet, die diesbezüglich im Olgahospital in Stuttgart im Rahmen der kooperativen multizentrischen Therapieoptimierungsstudien der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH) in den Jahren 1995 bis 2001 behandelt wurden. Solche Therapiestudien machen präzise Vorschriften für Diagnostik und Therapie. Alle untersuchten Seren sind daher Restseren der im Rahmen der ärztlichen Betreuung abgenommenen Blutabnahmen.

Die Messungen im Restserum minderjähriger Patienten sind mit dem Einverständnis der Eltern durchgeführt und von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt worden. Durch wiederholte Blutabnahmen zur Diagnostik und Therapie der Patienten lagen innerhalb der Studie mehrere Blutseren pro Patient für die Messungen vor. In die Auswertung der Patientendaten gehen von einem Patienten bis zu fünf Messwerte je Parameter ein. Insgesamt wurden von den 64 Patienten 137 Werte für die Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 gemessen, für den Parameter ALS wurden 123 Werte von 58 Patienten, 30 Mädchen und 28 Jungen gemessen. Das Alter der Kinder und jungen Erwachsenen liegt zwischen 10 Monaten und 22 Jahren. Die Diagnosen der erkrankten Kinder wurden in den Jahren 1991 bis 1999 gestellt. Sie umfassen aRMS, eRMS, PNET, Ewing-Sarkom und atypisches Ewing Sarkom, Osteosarkom, Synovialsarkom, Nephroblastom und Neuroblastom. Hieraus ergibt sich ein heterogenes Patientenkollektiv mit unterschiedlichem Alter, unterschiedlicher Diagnose und unterschiedlicher Therapie. Von den 64 beobachteten Patienten haben bis zum Ende des Beobachtungszeitraums im März 2001, 24 Patienten eine komplette Remission erreicht, bei 40 Patienten trat ein Rezidiv auf oder es war die ganze Zeit über ein Tumor makroskopisch identifizierbar. Dies bedeutet, dass zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Tumormasse mit Hilfe bildgebender Diagnostik (Röntgen, CT, MRT, bei OP) festgestellt wer-

den konnte. Überlebt haben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes 47 Patienten, 17 Patienten sind verstorben. Die Daten der Patienten sind in Tabelle 2.1a aufgeführt.

Tabelle 2.1-a Übersicht Patientendaten, gemessene Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3

Diagnose	Patienten-zahl	Anzahl Messwerte	überlebend	verstorben	Patienten mit makros-kopisch sichtbarem Tumor	Patienten mit CR
aRMS	7	19	4	3	4	3
eRMS	11	29	8	3	6	5
PNET	10	22	6	4	6	4
ES	3	7	2	1	1	2
atyp ES	3	10	3	0	3	0
Nephro-blastom	6	7	6	0	5	1
Osteosar-kom	6	11	4	2	3	3
Synovial-sarkom	3	7	2	1	1	2
Neuro-blastom	15	25	12	3	11	4
Summe	64	137	47	17	40	24

Tabelle 2.1-b Übersicht Patientendaten, gemessener Parameter ALS

Diagnose	Patienten-zahl	Anzahl Messwerte	überlebend	verstorben	Patienten mit makros-kopisch sichtbarem Tumor	Patienten mit CR
aRMS	6	17	4	2	3	3
eRMS	11	29	8	3	6	5
PNET	8	17	6	2	4	4
ES	2	3	2	0	0	2
atyp ES	3	10	3	0	3	0
Nephro-blastom	5	6	5	0	4	1
Osteosar-kom	6	11	4	2	3	3
Synovial-sarkom	3	7	2	1	1	2
Neuro-blastom	14	23	12	2	9	4
Summe	58	123	41	15	34	24

2.2 Methodisches Vorgehen bei der Auswertung

2.2.1 Gruppeneinteilungen der Patienten und ihrer Messwerte nach verschiedenen Kriterien

Um die einzelnen Fragestellungen aus Kapitel 1.4 beantworten zu können, wurden die Patienten und ihre Messwerte nach verschiedenen Kriterien in für die einzelnen Fragestellungen sinnvolle Gruppen eingeteilt. Im Folgenden werden die verschiedenen Gruppeneinteilungen der Patienten und ihre Messwerte genauer dargestellt.

1. Einteilung der Patienten nach Diagnose

Die 64 Patienten sind anhand ihrer Diagnose in neun Gruppen eingeteilt worden (siehe Tabelle 2.1-a).

Patienten mit der Diagnose RMS wurden in die Gruppen alveoläres RMS und embryonales RMS aufgeteilt. Wobei sieben Patienten an einem aRMS und elf Patienten an einem eRMS erkrankt sind. Mit der Diagnose „peripherer neuroektodermaler Tumor“ (PNET) wurden zehn Patienten in die Studie aufgenommen, die Diagnose „Ewing-Sarkom“ (ES) und „atypisches Ewing Sarkom“ (atyp. ES) kommen je dreimal in der Studie vor. An einem Nephroblastom leiden sechs Patienten, an einem Osteosarkom ebenfalls sechs. An einem Synovialsarkom sind 3 Patienten erkrankt. Ein Neuroblastom wurde bei fünfzehn Patienten diagnostiziert.

So entstanden neun Diagnose-Gruppen, die unterschiedlich groß sind. Die Diagnose-Gruppen, die mehr als sechs Patienten beinhalten (aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom) werden in den entsprechenden Tabellen gesondert aufgeführt, die Gruppen ES, atypisches ES, Nephroblastom, Osteosarkom, Synovialsarkom werden in den Tabellen wegen der kleinen Gruppengröße als „andere Tumoren“ zusammengefasst.

2. Einteilung der Patienten nach Tumorstatus

Die Patienten wurden ferner nach ihrem Tumorstatus in drei Gruppen unterteilt. Patienten, die im Verlauf ihrer Krankheit bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes überlebt hatten und eine komplette Remission (kein Tumor mehr nachweisbar) erreicht hatten, bilden die erste Gruppe. Patienten, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums überlebt hatten, bei denen aber am Ende des Beobachtungszeitraumes ein Tumor mit bildgebenden Verfahren (Röntgen, CT, MRT, bei OP) makroskopisch identifizierbar war, bilden die zweite Gruppe. Auch Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung eine komplette Remission erreicht hatten, die aber im weiteren Verlauf ein Rezidiv erlitten, gehören in diese Gruppe. Die dritte Gruppe bilden Patienten, die im Verlauf des Beobachtungszeitraumes verstorben sind.

3. Einteilung der Messwerte der Patienten nach Tumorstatus

Um eine Aussage über die Höhe der Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit vom Tumorstatus zu treffen, wurden die Messwerte der Patienten in zwei Gruppen unterteilt.

Messwerte von Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Probeentnahme ein Tumor mit bildgebenden Verfahren (Röntgen, CT, MR oder auch bei OP) nachweisbar war, wurden in die Gruppe „makroskopisch identifizierbarer Tumor“ eingeteilt, Messwerte von Patienten, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme eine komplette Remission erreicht hatten, wurden in die Gruppe „komplette Remission“ eingeteilt.

Bei dieser Gruppeneinteilung wird also immer der Tumorstatus zu dem bestimmten Zeitpunkt der Probeentnahme betrachtet; es wird nicht die Gesamtentwicklung der Tumorerkrankung eines Patienten berücksichtigt.

4. Einteilung der Messwerte der Patienten nach Therapiedauer

Diagnosestellung und Therapiebeginn liegen bei den in die Studie aufgenommenen Patienten zeitlich sehr eng beieinander. Deshalb werden Diagnosestellung und Therapiebeginn gleichgesetzt. Um einen zeitlichen Verlauf der ge-

messenen Parameter beobachten zu können, wurden die Messwerte der Patienten nach der Zeitspanne, die zwischen Diagnosestellung und Probeentnahme liegt, in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Zeitgruppe enthält Messwerte von Patienten, bei denen die Probenentnahme innerhalb von drei Monaten nach Diagnosestellung stattgefunden hat. Die zweite Zeitgruppe schließt die Messwerte ein, die in Seren gemessen wurden, die zwischen drei und sechs Monaten nach Diagnosestellung abgenommen wurden. In der dritten Zeitgruppe finden sich Messwerte aus den Proben, die zwischen sechs und zwölf Monaten nach Diagnosestellung abgenommen wurden und die vierte Zeitgruppe setzt sich aus den Messwerten zusammen, die in Serumproben gemessen wurden, die erst zwölf Monate nach Diagnosestellung abgenommen wurden.

2.2.2 Referenzwerte

Zum Vergleich der im Patientenserum gemessenen Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS werden die altersentsprechenden Referenzwerte von Ranke und Mitarbeitern [44] herangezogen. Sie wurden mit den gleichen Radioimmunoassays gemessen, wie die in dieser Studie gemessenen Parameter.

Die Referenzwerte für die Säurelabile Untereinheit (ALS) bei Jungen und Mädchen stammen von Dr. Anders Juul aus Arhuus/Dänemark und beziehen sich somit auf ein anderes Referenzkollektiv von Probanden als die Referenzwerte für IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 [26].

2.2.3 Berechnung der verwendeten Parameter

Standard Deviation Score (SDS)

Zur Berechnung der standardisierten Normabweichung („Standard Deviation Score“, SDS) der gemessenen Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS wurden Referenzwerte nach Ranke und Elmlinger [44] und Juul verwendet [26]. Da in die Berechnung der SDS neben den Standardwerten auch die Altersabhängigkeit der Parameter einfließt, hat die Transformation der Absolutwerte in SD-Scores den Vorteil, dass Parameter von Patienten unterschiedlichen Alters miteinander verglichen werden können.

Zur Berechnung der SD-Scores wird der Mittelwert der Verteilung eines Parameters für das jeweilige Alter vom aktuellen Messwert subtrahiert und die sich daraus ergebende Differenz durch die Standardabweichung dividiert.
Für die SDS ergibt sich somit die Formel:

SDS = (X-Xm) / SD [SDS]

X = gemessener Serumspiegel eines Parameters
Xm = Mittelwert der Serumreferenzwerte in der entsprechenden Altersklasse
SD = Standardabweichung der Referenzwerte in der entsprechenden Altersklasse

SDS-Werte geben somit die Abweichung von dem gemessen Serumspiegel eines Patienten und dem zu erwartenden Serumspiegel eines Kindes oder Jugendlichen im entsprechenden Alter als Standardabweichungen an.
Ein Wert von ±2 SD entspricht ungefähr dem Bereich zwischen dem 97,5% Perzentil und dem 2,5% Perzentil (95% Bereich), ±1,65 SD entsprechen ungefähr dem Bereich zwischen dem 95% Perzentil und dem 5% Perzentil (90% Bereich). Ein Wert von SDS = 1,65 liegt auf dem 95% Perzentil, ein Wert von SDS = -1,65 liegt auf dem 5% Perzentil.

IGF/IGFBP-Ratio

Um das Verhältnis von zwei im Serum gemessenen Parametern zueinander zu bestimmen, wird die Ratio, also der Quotient aus den beiden betreffenden Parametern nach folgender Formel berechnet:

Ratio = Parameter A [ng/ml] / Parameter B [ng/ml]

Die Ratio ergibt einen einheitslosen Wert, der zahlenmäßig das Verhältnis zweier Parameter zueinander angibt.
In der vorliegenden Studie wird das Verhältnis des Serumspiegels von IGF-I eines Patienten zum Serumspiegel von IGFBP-3 der gleichen Serumprobe des

gleichen Patienten bestimmt. Hieraus lässt sich die theoretische Menge des ungebundenen und damit mitogen wirksamen IGF-I im Serum ermitteln. IGF-I liegt im Serum gesunder Kinder zu ca. 98% im Komplex mit IGFBP-3 und ALS gebunden vor, zu ca. 2% liegt es in freier Form vor. Es besteht ein Fliessgleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des IGF-I.

$$[98\%] \quad \Leftrightarrow \quad [2\%]$$

$$[\text{IGF-I/IGFBP-3/ALS}] \Leftrightarrow [\text{IGF-I}] + [\text{IGFBP-3}] + [\text{ALS}]$$

Schon bei geringer Abnahme des IGFBP-3 Spiegels verschiebt sich dieses Gleichgewicht stark zugunsten der freien Form von IGF-I, welches dann mitogen wirksam werden kann.
Um eine Aussage über die Abweichung der Ratio für IGF-I zu IGFBP-3 eines Tumor-Patienten zu der eines gesunden Kindes im entsprechenden Alter zu treffen, werden die errechneten Werte des Tumor-Patienten mit dem altersentsprechenden Referenzwert eines gesunden Kindes verglichen.

2.2.4 Statistische Analysen

Die statische Auswertung und die graphischen Darstellungen sind mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft® Excel, Version 2000, über Tabellenkalkulation erstellt worden.

Korrelation

Mit Hilfe der Regressionsanalyse, die in Microsoft® Excel zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten „r“ und des Bestimmtheitsmaßes „R“ kann untersucht werden, ob sich zwei Messreihen gleich entwickeln, d. h. ob hohe Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (positive Korrelation), ob niedrige Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (negative Korrelation) oder ob zwischen den Werten der beiden Datensätze kein Zusammenhang besteht [16]. Der Korrelationskoeffizient macht also eine Aussage darüber, wie eng der lineare statistische Zusammenhang zwischen zwei Größen ist [21]. Der Korrelationskoeffizient „r“

kann nur Werte zwischen +1 und –1 annehmen und wird als genauer Zahlenwert angegeben.
Wenn man den Korrelationskoeffizienten quadriert erhält man das Bestimmtheitsmaß „R“, das Werte zwischen Null und Eins annehmen kann [21].
Das Bestimmtheitsmaß „R“ wird in den entsprechenden Tabellen und Abbildungen zusammen mit dem Korrelationskoeffizienten „r“ als genauer Zahlenwert angeben.

Signifikanz

Die Signifikanz gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein beobachteter Effekt größer ist als die zufallsbedingte Streuung der Messwerte [21]. Die als Signifikanzniveau bezeichnete Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ ist mit der Funktion der Regressionsanalyse, die in Microsoft® Excel zur Verfügung steht, ermittelt worden. Die Funktion liefert neben dem Zahlenwert des Korrelationskoeffizienten „r“ und dem Zahlenwert des Bestimmtheitsmaßes „R“ den Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit „p“. Ein Unterschied gilt definitionsgemäß dann als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ nicht größer als $p = 0.05$ ist. Als sehr signifikant gilt ein Unterschied wenn $p < 0.01$ ist, als hochsignifikant gilt der Unterschied, wenn $p < 0.001$ ist. Die Signifikanz wird als $p < 0,01$ oder $p < 0,001$ angegeben.

2.3 Radioimmunoassay zur Messung von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3

Mit Radioimmunoassays (RIA) können Proteine wie IGFs und IGFBPs mit hoher Sensitivität und Spezifität quantitativ nachgewiesen werden. Grundlage dieser Methode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der eine unbekannte Menge Antigen mit einer bekannten Menge radioaktiv markierten Antigens um die Bindungsstelle am Antikörper konkurriert (kompetetiver Radioimmunoassay, RIA). Anhand der gemessenen Radioaktivität lässt sich reziprok auf die gesuchte Proteinmenge zurückrechnen. Für die Messung von IGF-I, IGF-II IGFBP-2 und IGFBP-3 wurden kommerzielle Radioimmunoassays von der Firma Mediagnost Reutlingen verwendet.

Die Impräzision aller Assays betrug <9% CV. Die minimale Konzentration der Proteine (Nachweisgrenze), die durch die hier genutzten Assays bestimmt werden konnte, beträgt für IGF-I 0,1 ng/ml, für IGF-II und IGFBP-1 0,3 ng/ml, für IGFBP-2 ng/ml und für IGFBP-3 0,5 ng/ml.

Im gebrauchsfertigen Analysen-Kit sind enthalten:

- Assaypuffer, 2-fach Konzentrat
- Testpuffer
- Antikörper (anti-hIGFBP-2, anti-hIGFBP-2, bzw. anti-hIGF-I, oder anti-hIG-II)
- Tracer (^{125}I-IGFBP-3, bzw ^{125}I-IGFBP-2, ^{125}I-IGF-I, oder ^{125}I-IGF-II) (<1,30 µCi oder <50 kBq)
- Kaninchen-Immunglobulin für die Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB – non specific binding)
- Peptid-Standards
- Kontrollseren (humanes Serum)
- Antikörper (anti-Kaninchen-Immunglobulin)
- Präzipitationsreagenz

Probenvorbereitung:

Assayspezifische Verdünnung der Proben mit Assaypuffer:

IGF-I:	1:100
IGF-II:	1:100
IGFBP-2:	1:50
IGFBP-3	1:600

Testdurchführung:

Für IGF-I wurden die Puffer A und B verwendet, bei IGFBP-2 und IGFBP-3 wurde der Assaypuffer verwendet.

Die Proben werden nach folgendem Schema pipettiert:

Messwert	A µl	Probe µl	B µl	C µl	D µl	E µl
Total	200				100	
NSB	100		100		100	500
B0	100			100	100	500
Standards		100		100	100	500
Kontrolle 1		100		100	100	500
Kontrolle 2		100		100	100	500
Probe verdünnt		100		100	100	500

A = Assaypuffer

B = Kaninchen IgG gelöst in A

C = 1. Antikörper (Kaninchen-anti-IGFBP-3, -anti-IGFBP-2, -anti-IGF-I, -anti-IGF-II)

D = 125 I-IGFBP-3, bzw. Tracer für IGFBP-2, IGF-I, IGF-II

E = 2. AK = Schaf-anti-Kaninchen-IgG-Serum 1:350 in kaltem 4% PEG verdünnt

Total = maximale Bindung

NSB = unspezifische Bindung

B0 = Menge, die vom 1. Antikörper maximal gebunden werden kann.

(Zusammensetzung der Puffer siehe Anhang, Seite 79.)

Die Proben und Standards werden als Doppelwerte pipettiert. Zwei Teströhrchen enthalten nur Tracer und 200 ml Assaypuffer, diese Röhrchen werden bis zur Messung beiseite gestellt. Alle Proben werden nun mit dem Vortex-Mixer geschüttelt und über mindestens 24 h, aber maximal 48 h bei 4℃ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird Lösung E dazu pipettiert und erneut mit dem Vortex-Mixer geschüttelt. Der 2. AK, gelöst in 4% PEG führt während einer weiteren Stunde Inkubation bei 4℃ zur Bildung von Immun komplexen. Anschließend werden die Proben für 15 Minuten bei ca. 3100 x g zentrifugiert, wobei die gebildeten Immunkomplexe präzipitieren. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 1ml kaltem Wasser und erneute Zentrifugation bei ca. 3100 x g für 5 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wird die Radioaktivität des Pellets im Gammacounter 1 Minute lang gezählt. Es wird eine Standardkurve ermittelt, anhand welcher die Bestimmung der Probenkonzentrationen erfolgt.

2.4 ELISA zur Messung von ALS

Testprinzip:

Die Proben, Standards und Kontrollen werden in vorgefertigte Mikrotiterplatten pipettiert, die mit ALS-Antikörper beschichtet sind. Nach Inkubation bilden sich Immunkomplexe, an die sich ein nun zugefügter enzymmarkierter zweiter ALS-Antikörper anlagern kann. Das Zufügen eines Substrates, welches sich an das Enzym bindet, ergibt einen Farbstoff, der genau photometrisch quantifizierbar ist. Der hier verwendete ACTIVE^{TM} Total ALS-ELISA-Kit stammt von der Firma Diagnostic Systems Labaratories (DSL, Sinsheim). Alle Reagenzien sind im Analysen-Kit enthalten.

Die Sensitivität des ELISAs liegt bei 0,07 µg/ml, der Intraassaykoeffizient beträgt 3,8% CV, der Interassaykoeffizient beträgt 8,9% CV.

Probenvorbereitung:

Zur Verdünnung der Proben auf 1:101 werden je 10µl Probe auf den Boden eines Polypropylenröhrchens pipettiert und 1 ml Assaypuffer zugegeben. Diese Mischung wird gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Standards und Kontrollen werden nicht verdünnt.

Testdurchführung:

Alle Proben werden als Doppelwerte pipettiert. Zwanzig µl Standard, Kontrolle oder verdünnte Probe werden nach Pipetierschema in die entsprechende Vertiefung pipettiert, dann 100 µl ALS-Assaypuffer mit einem halbautomatischen Dispenser (Hamilton) in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte auf einem Horizontalschüttler bei 500-700 rpm für 1 Stunde bei 22-28℃ inkubiert. Danach wird die Lösung in den Vertiefungen abgesaugt und insgesamt 5x im Mikrotiterplatten-Wascher mit der Waschlösung gewaschen. Anschließend werden die Mikrotiterplatten auf Fließpapier trockengeklopft.

Als nächstes wird das Antikörper-Enzym-Konjugat frisch hergestellt. Dazu wird ein Teil Antikörper-Enzym-Konjugat mit 50 Teilen Assaypuffer verdünnt. Von diesem Konjugat werden nun mit dem halbautomatischen Dispenser 100 µl in jede Vertiefung gegeben und wieder bei Schütteln mit 500-700 rpm für 1 Stunde bei 22-28℃ inkubiert, wobei sich Immunkomplexe bilden. Die Lösung in den Vertiefungen wird erneut abgesaugt und insgesamt 5x im Mikrotiterplatten-Wascher mit der Waschlösung gewaschen und anschließend auf Fließpapier trockengeklopft.

Jetzt wird, wieder mit halbautomatischem Dispenser, je 100 µl der Tetramethylbenzidinlösung zugegeben und diesmal nur für 10 min inkubiert. Die dabei stattfindende Farbreaktion wird durch Zugabe von 100 µl 0,2 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption der Lösung sollte innerhalb von 30 min bei 450 nm gemessen werden. Die Berechnung der Werte erfolgt nach Erstellen der Standardkurve.

3 Ergebnisse

3.1 Serumspiegel von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS im Vergleich zu Referenzwerten gesunder Kinder

In den Blutseren des Patientenkollektivs wurden die Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS mittels Radioimmunoassay ermittelt.

Diese Werte werden unabhängig vom Tumortyp, und unabhängig vom Gesundheitszustand des Patienten mit altersentsprechenden Referenzwerten gesunder Kinder im Alter von 0 bis 20 Jahren verglichen (Referenzwerte für IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 aus Schweizer, 1998 [50], Referenzwerte ALS männlich und weiblich aus Juul 1998 [26]). Die Referenzwerte der gesunden Kinder liegen als Perzentilenkurven des 5., 50. und 95. Perzentils vor, die Werte der erkrankten Kinder werden als Einzelpunkte in Beziehung zu den Referenzwerten gesetzt. In den Abbildungen 1a)-f) ist auf der x-Achse das Alter der Kinder in Jahren, auf der y-Achse der Serumspiegel der gemessenen Parameter in ng/ml aufgetragen. Zu jedem gemessenen Einzelwert lässt sich die Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert ermitteln.

Um zu einer repräsentativen Aussage über die Verteilung der Werte innerhalb der Gruppe eines Tumortyps zu gelangen, werden die vier Tumortypen, von denen über 15 Messwerte vorliegen, zur Beschreibung herausgegriffen. Dazu zählen das aRMS mit 19 Messwerten, das eRMS mit 29 Messwerten, der PNET mit 22 Messwerten und das Neuroblastom mit 25 Messwerten.

Die Anteile, welche die verschiedenen Tumortypen in der Gruppe der Werte ausmachen, die unter dem 5. Perzentil oder über dem 95. Perzentil liegen, sind aufgrund verschiedener Gruppengrößen nicht repräsentativ. Deshalb werden die Anteile der Werte innerhalb der Gruppe eines Tumortyps angegeben, die unter dem 5. Perzentil oder über dem 95. Perzentil liegen.

Da von einem Patienten in den meisten Fällen mehr als ein Messwert vorliegt, unterscheidet sich die Patientenzahl von der Messwertezahl. Bei der Betrachtung der Patienten wird angegeben, wie viele Patienten überlebt haben und wie viele Patienten verstorben sind. Bei der Betrachtung der Messwerte wird angegeben, bei wie vielen Messwerten zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein

makroskopischer Tumor vorlag oder eine komplette Remission erreicht war. Siehe Abbildungen 3.1a-f und Tabelle 3.1a-e.

Tabelle 3.1-a

Anteil der Serumwerte in Prozent	<5. Perzentil	< 50. Perzentil	>50. Perzentil	>95. Perzentil
Referenzgruppe	5%	50%	50%	5%
IGF-I	30%	80%	20%	2%
IGF-II	28%	60%	39%	10%
IGFBP-2	3%	28%	72%	19%
IGFBP-3	27%	77%	23%	2%
ALS	M: 60,0% W: 38% Ges: 50 %	M: 83% W: 57% Ges: 70%	M: 27% W: 43% Ges: 30%	M: 3% W: 37% Ges: 20%

Prozentualer Anteil der IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS Serumwerte gesunder Kinder (=Referenzgruppe in erster Zeile) und erkrankter Kinder (Zeile 2 bis 6) unter dem 50., bzw. dem 5. Perzentil und über dem 50., bzw. dem 95. Perzentil, angegeben in Prozent. Für die Serumspiegel der ALS ist das Patientenkollektiv in männliche (M) und weibliche (W) Patienten aufgeteilt.

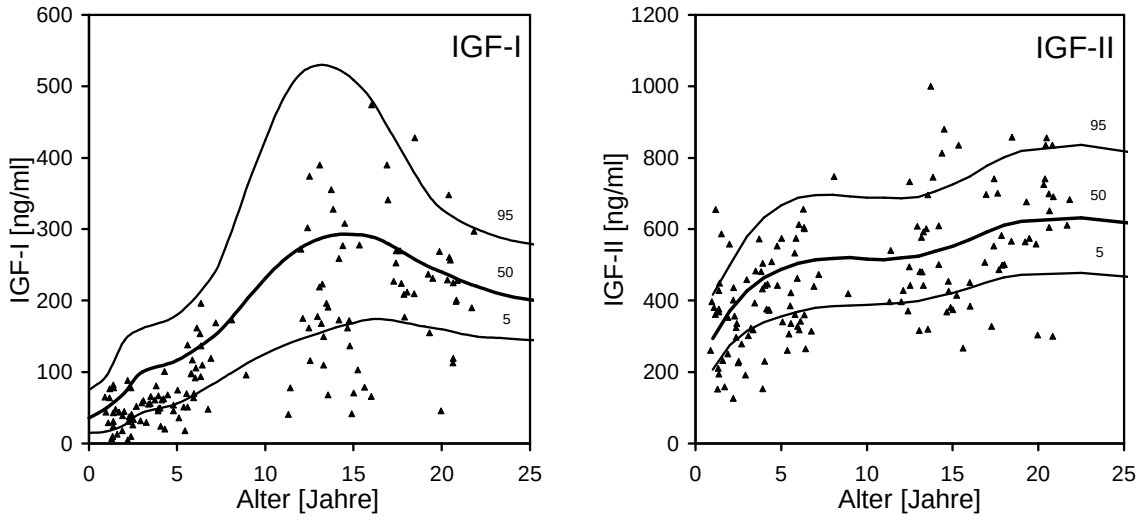
IGF-I: Vergleich der IGF-I Serumwerte der erkrankten Kinder mit den Referenzwerten. Die gemessenen Werte der Tumorpatienten liegen insgesamt deutlich niedriger als die altersentsprechenden Referenzwerte. Es finden sich 80% der Werte der Tumorpatienten unterhalb des 50. Perzentils. Das sind 30% mehr im Vergleich zur Referenzgruppe.
Unterhalb des 5. Perzentils liegen in der Patientengruppe 30% der Werte, was den Anteil der Referenzgruppe, der definitionsgemäß 5% beträgt, um den Faktor sechs übersteigt.
Oberhalb des 50. Perzentils liegen in der Patientengruppe 20% der Werte, was weniger als einem Fünftel der Referenzwertgruppe entspricht. Oberhalb des 95.

Perzentils finden sich in der Patientengruppe 2% der Werte, in der Referenzgruppe liegen hier 5% der Werte.

Da die bei den Patienten gemessenen Werte zu 30% unter dem 5. Perzentil liegen, soll ihre Zusammensetzung im Folgenden genauer betrachtet werden:

Von den Messwerten der aRMS liegen 47% unter dem 5. Perzentil. Bei eRMS sind es 31%, bei PNET 23% bei Neuroblastomen 36% und bei allen anderen Tumoren 22% die unter dem 5. Perzentil liegen. Das zeigt, dass bei RMS und Neuroblastomen ein auffällig hoher Prozentsatz besonders niedrige Werte für IGF-I aufweist. Von den 32 Patienten, von denen IGF-I Werte unter dem 5. Perzentil gefunden werden, sind 13 verstorben. Auffällig ist, dass alle verstorbenen Patienten mit aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom IGF-I Werte unter dem 5. Perzentil zeigen. Siehe Tabelle 3.1b und Abbildung 3.1a.

Abbildung 3.1.1-a und -b



Vergleich der gemessenen Serumwerte aller in die Auswertung einbezogenen Tumorpatienten für IGF-I und IGF-II angegeben in ng/ml und dargestellt als Einzelpunkte, mit altersentsprechenden Referenzwerten [26] [50]
dargestellt als Linien des 5., 50. und 95. Perzentils.

IGF-II: Die IGF-II Serumwerte der Patientengruppe weichen weniger als die gemessenen IGF-I Werte von den Werten der Referenzgruppe ab. Es liegen

61% aller Patientenmesswerte unter dem 50. Perzentil und 39% über dem 50. Perzentil. In der Referenzgruppe liegen hier jeweils 50% der Werte. Innerhalb der Werte der Patientengruppe zeigt sich eine Verteilung zugunsten sehr niedriger Werte. Ferner liegen 28% unterhalb des 5. Perzentils. Das heißt, der Anteil der Werte der Patientengruppe unter dem 5. Perzentil ist ca. sechsmal so groß wie der Anteil der Werte der Referenzgruppe. Mit 39% ist der Anteil der Werte der Patientengruppe über dem 50. Perzentil um 11% niedriger als der Anteil der Referenzwerte. Innerhalb des Anteils der Werte der Patientengruppe über dem 50. Perzentil liegen jedoch mit 10% doppelt so viele Werte über dem 95. Perzentil, wie in der Referenzgruppe. Siehe Abbildung 3.1b.

Für IGF-II ergibt sich eine Verteilung der Werte innerhalb der vier größten Tumorgruppen wie folgt: 87% aller IGF-II Messwerte bei Neuroblastomen liegen unter dem 5. Perzentil, sowie 26% der aRMS, 24% der eRMS, 18% der PNET und 48% aller anderen Tumoren. Für die Neuroblastome zeigt sich hier somit eine sehr auffällige Verteilung. Für überlebende und verstorbene Patienten, sowie beim Vorliegen eines makroskopisch identifizierbaren Tumors oder bei kompletter Remission ergibt sich für IGF-II hier keine Auffälligkeiten bei der Verteilung. Siehe Tabelle 3.1c.

Tabelle 3.1-b

IGF-I <5. Perzentil	Gesamt-zahl <5. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller anderen Tumo-ren
Patienten-zahl	32	50%	6	86%	7	64%	4	40%	7	47%	8	38%
Überlebende	19	47%	3	75%	4	50%	0	0%	4	33%	8	47%
Verstorbene	13	76%	3	100%	3	100%	4	100%	3	100%	0	0%
Messwerte-zahl	41	30%	9	47%	9	31%	5	23%	9	36%	9	21%
makroskop Tu	30	30%	7	44%	6	25%	5	38%	6	38%	6	20%
CR	9	31%	2	67%	3	60%	0	0%	2	50%	2	20%
Status unbekannt	2		0		0		0		1		1	

Anteil der IGF-I Werte unter dem 5. Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.
In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

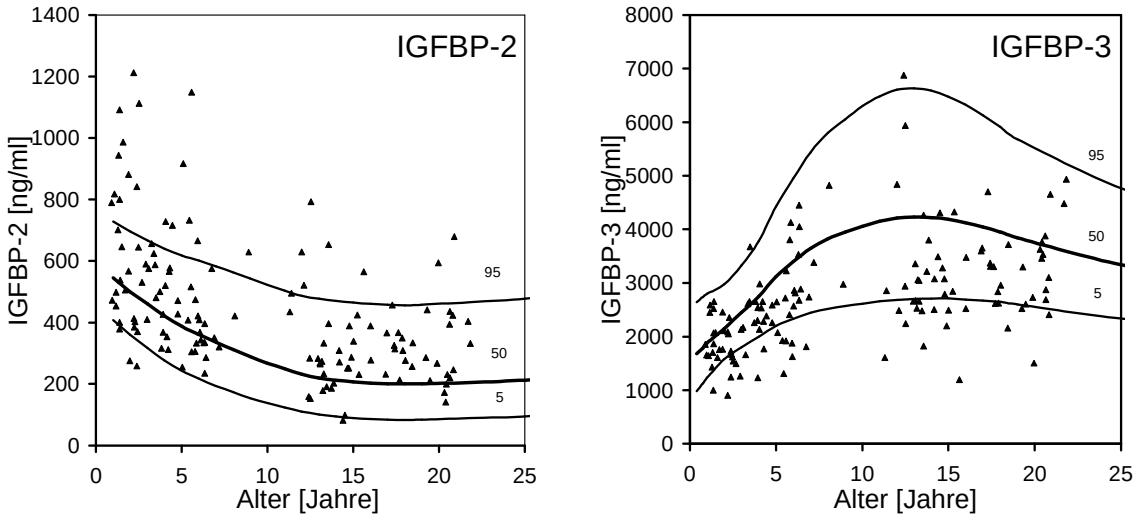
Tabelle 3.1-c

IGF-II <5. Perzentil	Gesamt-zahl <5. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller anderen Tumo-ren
Patienten-zahl	30	47%	3	43%	7	64%	4	40%	9	60%	7	33%
Überlebende	20	43%	2	50%	5	63%	1	16%	6	50%	6	35%
Verstorbene	10	59%	1	33%	2	66%	3	75%	3	100 %	1	25%
Messwerte-zahl	39	28%	5	26%	7	24%	4	18%	13	87%	10	24%
makroskop Tu	29	29%	4	25%	4	17%	4	31%	9	56%	8	27%
CR	7	24%	1	33%	3	60%	0	0%	2	50%	1	10%
Status unbekannt	3		0		0		0		2		1	

Anteil der IGF-II Werte unter dem 5. Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.
In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

IGFBP-2: IGFBP-2 liegt im Serum des betrachteten Patientenkollektivs generell wesentlich höher als bei der Referenzgruppe, insbesondere bei Patienten unter 5 Jahren. Über dem 50. Perzentil liegen hier mit 72% der Werte 22% mehr Werte als in der Referenzgruppe, was maßgeblich durch den hohen Anteil der Werte oberhalb des 95. Perzentils zustande kommt. Oberhalb des 95. Perzentils liegen 19% aller Werte der Patientengruppe und somit ist der Anteil der Werte hier fast viermal größer als in der Referenzgruppe. In der Referenzgruppe befinden sich nur 5% der Werte über dem 95. Perzentil. Unter dem 50. Perzentil beträgt der Anteil der Werte der gesamten Patientengruppe insgesamt 28%, wovon 3% unter dem 5. Perzentil liegen. Siehe Abbildung 3.1c.

Abbildung 3.1-c und -d



Vergleich der gemessenen Serumwerte aller in die Auswertung einbezogenen Tumorpatienten für IGFBP-2 und IGFBP-3 angegeben in ng/ml und dargestellt als Einzelpunkte, mit altersentsprechenden Referenzwerten [50] [26] *dargestellt als Linien des 5., 50. und 95. Perzentils.*

Da bei den IGFBP-2 Werten der Anteil der Werte über dem 95. Perzentil sehr hoch ist, wurden diese genauer betrachtet. In den großen Tumorgruppen liegen bei den aRMS 16%, bei den eRMS 14%, bei den PNET 23% und bei den Neuroblastomen 28% über dem 95. Perzentil. Von allen anderen Tumorgruppen liegen insgesamt 17% über dem 95. Perzentil. Zu vermerken ist, dass fünf von sieben Messwerten beim Nephroblastom über dem 95. Perzentil liegen. Auffällig ist auch, dass von den Werten in den großen Tumorgruppen, die in diesem niedrigen Bereich gefunden werden, relativ viele Patienten verstorben sind. Siehe Tabelle 3.1d.

IGFBP-3: IGFBP-3 wurde im Serum des Patientenkollektivs im Vergleich zu der Referenzgruppe in geringerer Konzentration gemessen. Es liegen 77% der Werte der Patientengruppe unter dem 50. Perzentil. Damit entspricht der Anteil der Werte zwischen dem 5. und dem 50. Perzentil mit 50% fast dem der Referenzwerte, der Anteil unter dem 5. Perzentil liegt mit 27% entsprechend hoch.

Über dem 50. Perzentil finden sich nur 23% der Werte. Nach oben hin dünnen sich die Werte aus. Über dem 95. Perzentil liegen nur zwei Messwerte, was einem Anteil von 2% der Gesamtwerte der Patientengruppe entspricht.
In dem großen Anteil der Werte (27%) unter dem 5. Perzentil fällt keine der Gruppen, die mit über 15 Werten an den Gesamtwerten beteiligt sind, besonders ins Gewicht. Sie sind alle mit ca. 30% ihrer Werte in diesem Bereich vertreten. Es fällt aber auf, dass in allen Tumorgruppen viele Patienten, von denen Werte unter dem 5. Perzentil gemessen wurden, verstorben sind. Siehe Abbildung 3.1d und Tabelle 3.1e.

Tabelle 3.1-d

IGFBP-2 >95. Perzentil	Gesamt-zahl >95. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller ande-ren Tumo-ren
Patienten-zahl	23	36%	3	43%	3	27%	4	40%	6	40%	7	33%
Überleben-de	16	34%	2	50%	1	13%	2	33%	4	33%	7	41%
Verstorbe-ne	7	41%	1	33%	2	67%	2	50%	2	67%	0	0%
Messwer-tezahl	26	19%	3	16%	4	14%	5	23%	7	47%	7	17%
makroskop Tu	18	18%	1	6%	4	16%	3	23%	5	31%	5	17%
CR	3	10%	2	66%	0	0%	0	0%	0	0%	1	10%
Status unbekannt	5		0		0		2		2		1	

Anteil der IGFBP-2 Werte über dem 95. Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt. In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

Tabelle 3.1-e

IGFBP-3 <5. Perzentil	Gesamt-zahl <5. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller ande-ren Tumo-ren
Patienten-zahl	30	47%	4	57%	7	64%	5	50%	7	47%	7	33%
Überleben-de	16	34%	2	50%	4	50%	1	17%	5	42%	4	24%
Verstorbe-ne	14	82%	2	66%	3	100 %	4	100 %	2	66%	3	75%
Messwerte-zahl	37	27%	6	32%	7	24%	8	36%	8	32%	8	19%
makroskop Tu	25	26%	5	31%	5	21%	7	54%	4	25%	5	17%
CR	6	21%	1	33%	2	40%	0	0%	1	25%	2	20%
Status unbekannt	5		0		0		1		3		1	

Anteil der IGFBP-3 Werte unter dem 5. Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.
In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

ALS: Die Serumwerte für die Acid-labile-subunit werden in männliche und weibliche Patienten aufgeteilt, da die Referenzwerte aus der Literatur geschlechtsabhängig vorlagen.
Die Werte der männlichen Patienten liegen mit 83% unter dem 50. Perzentil und mit 64% unter dem 5. Perzentil niedriger als die Werte der weiblichen Patienten, bei denen sich 57% unter dem 50. Perzentil und davon 39% unter dem 5. Perzentil finden. In beiden Gruppen übersteigt der Anteil der Messwerte un-

ter dem 50. Perzentil den der Referenzwerte. Werden beide Gruppen gemeinsam betrachtet liegen 70% unter dem 50. Perzentil. Bei männlichen und weiblichen Patienten findet sich ein Grossteil der Messwerte außerhalb der Perzentilenkurven, wobei bei der Gruppe der männlichen Patienten die hohen Werte über dem 95. Perzentil mit nur 3% vertreten sind. Bei der Gruppe der weiblichen Patienten liegt dieser Anteil mit 39% sehr hoch.

Betrachtet man die Messwerte der weiblichen Patienten (bei den männlichen Patienten liegen hier nur zwei Messwerte) über dem 95. Perzentil genauer, zeigt sich, dass hier insgesamt 22 Messwerte von 12 Patientinnen liegen. Von diesen Patientinnen haben 10 überlebt und zwei sind verstorben. An den insgesamt Überlebenden machen die zehn über dem 95. Perzentil gemessenen Werte einen Anteil von 38% aus. Die zwei Werte der Verstorbenen, die über dem 95. Perzentil gemessen wurden, machen an den insgesamt Verstorbenen einen Anteil von 67% aus.

(Bei diesen geringen Messewertzahlen kann hier dennoch nicht von einem signifikanten Unterschied zugunsten der Verstorbenen gesprochen werden.)

Die Messwerte von aRMS sind mit 71% aller ihrer Messwerte über dem 95. Perzentil vertreten, eRMS mit 60% aller ihrer Messwerte, PNET mit 64% aller ihrer Messwerte, Neuroblastome mit 21% und andere Tumore mit 17% aller ihrer Messwerte.

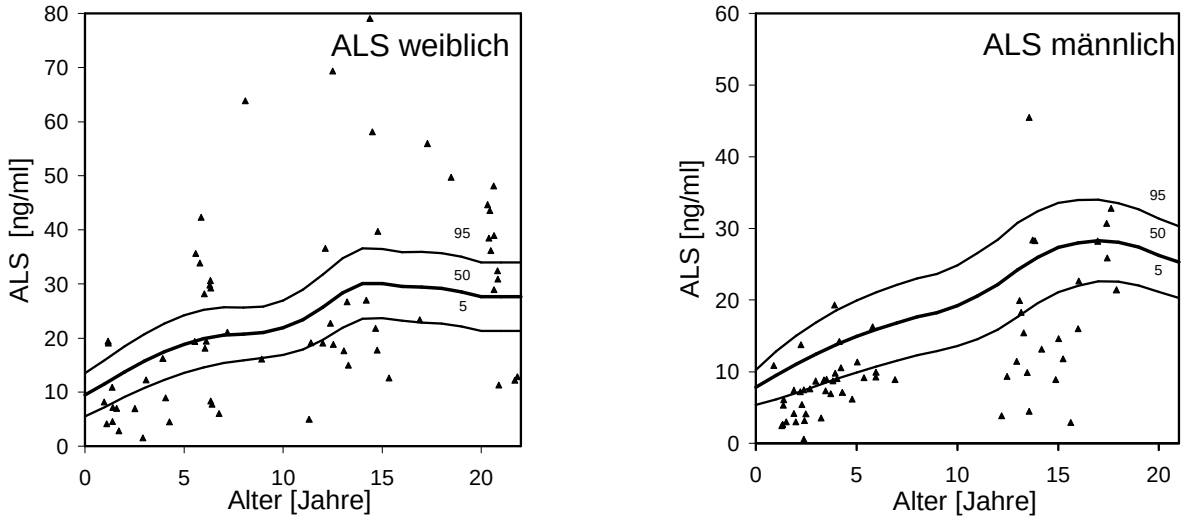
Von den 22 gemessenen Werten über dem 95. Perzentil liegt bei 15 Werten zum Zeitpunkt der Messung ein makroskopisch sichtbarer Tumor vor, was 32% aller Werte mit makroskopisch sichtbarem Tumor zum Zeitpunkt der Messung entspricht. Eine komplette Remission liegt bei sieben Werten zum Zeitpunkt der Messung vor, was 50% aller Werte mit kompletter Remission zum Zeitpunkt der Messung entspricht. Bei aRMS und eRMS lag bei keiner Patientin zum Zeitpunkt der Messung eine komplette Remission vor. Ein makroskopisch sichtbarer Tumor lag zum Zeitpunkt der Messung bei aRMS mit einem Anteil von 83% und bei eRMS mit einem Anteil von 75% aller Werte mit makroskopisch sichtbarem Tumor zum Zeitpunkt der Messung vor.

Bei der Betrachtung der Messwerte unter dem 5. Perzentil liegen hier 24 Messwerte (=39% aller gemessen Werte) von 15 Patientinnen (=50% aller Pa-

tientinnen) und 38 Messwerte (=64% aller gemessenen Werte) von 23 Patienten (=82% aller Patienten). Von den weiblichen Patienten haben 14 überlebt, was einen Anteil von 54% aller überlebenden weiblichen Patienten ausmacht und eine Patientin ist verstorben, was einen Anteil von 33% aller weiblichen verstorbenen Patienten ausmacht. Von den männlichen Patienten haben 11 überlebt, was einem Anteil von 61% aller überlebenden männlichen Patienten entspricht und neun Patienten sind verstorben, was 82% aller männlichen verstorbenen Patienten entspricht.

Bei den männlichen Patienten ist das Neuroblastom mit 89% aller seiner gemessen Werte und das aRMS mit 80% aller seiner gemessenen Werte besonders häufig vertreten. Bei den weiblichen Patienten ist ebenfalls das Neuroblastom mit 50% aller seiner gemessenen Werte am häufigsten vertreten. Eine Abhängigkeit der Tiefe der Messwerte vom Vorhandensein eines makroskopisch sichtbaren Tumors besteht lediglich bei der Gruppe der Neuroblastome bei weiblichen Patienten. Bei sieben Messwerten konnte hier ein makroskopisch sichtbarer Tumor festgestellt werden, was einem Anteil von 54% aller Messwerte, bei denen zum Zeitpunkt der Messung ein Tumor makroskopisch sichtbar war, entspricht. Siehe Abbildungen 3.1e , 3.1f und Tabellen 3.1f, 3.1g und 3.1h.

Abbildung 3.1-e und -f



Vergleich der gemessenen Serumwerte aller in die Auswertung einbezogenen Tumorpatienten für ALS angegeben in ng/ml und dargestellt als Einzelpunkte, mit altersentsprechenden Referenzwerten [50] [26] *dargestellt als Linien des 5., 50. und 95. Perzentils.*

Tabelle 3.1-f

ALS männl <5. Perzentil	Gesamt-zahl <5. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller ande-ren Tumo-ren
Patienten-zahl	23	82%	3	75%	7	88%	2	100%	6	100%	5	63%
Überleben-de	11	61%	2	66%	4	50%	0	0%	4	100%	1	33%
Verstorbe-ne	9	82%	1	100%	2	100%	2	100%	1	100%	3	60%
Messwer-tezahl	38	64%	8	80%	13	62%	3	50%	8	89%	6	43%
makroskop Tu	29	69%	7	88%	10	59%	3	100%	5	83%	4	50%
CR	9	60%	1	50%	3	75%	0	0%	3	100%	2	33%
Status unbekannt	3				1				1		1	

Anteil der ALS-Werte der männlichen Patienten unter dem 5.Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.

In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

Tabelle 3.1-g

ALS weibl <5. Perzentil	Gesamt-zahl <5. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller ande-ren Tumo-ren
Patienten-zahl	15	50%	1	50%	1	50%	1	17%	4	50%	8	67%
Überleben-de	14	54%	1	100%	1	50%	1	20%	3	43%	8	73%
Verstorbe-ne	1	33%	0	0%	0	0%	0	0%	1	100%	0	0%
Messwer-tezahl	24	39%	1	14%	1	20%	2	18`%	7	50%	13	54%
makroskop Tu	20	43%	0	0%	0	0%	2	50%	7	54%	11	55%
CR	4	29%	1	100%	1	100%	1	14`%	0	0%	1	25%
Status unbekannt								1				

Anteil der ALS-Werte der weiblichen Patienten unter dem 5.Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.

In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

Tabelle 3.1-h

ALS weibl >95. Perzentil	Gesamt-zahl >95. Perzentil	% aller Werte	aRMS	% aller aRMS	eRMS	% aller eRMS	PNET	% aller PNET	Nbl	% aller Nbl	Andere Tumo-ren	% aller ande-ren Tumo-ren
Patienten-zahl	12	40%	1	50%	1	50%	4	67%	3	38%	3	25%
Überleben-de	10	38%	0	0%	1	50%	4	80%	3	43%	2	18%
Verstorbe-ne	2	67%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	1	100%
Messwer-tezahl	22	36%	5	71%	3	60%	7	64%	3	21%	4	17%
makroskop Tu	15	32%	5	83%	3	75%	2	50%	2	15%	3	15%
CR	7	50%	0	0%	0	0%	5	71%	1	100%	1	25%
Status Unbekannt								1				

Anteil der ALS-Werte der weiblichen Patienten über dem 95.Perzentil. Die vier häufigsten Diagnosen aRMS, eRMS, PNET und Neuroblastom sind einzeln aufgeführt.

In der ersten Spalte ist jeweils die absolute Zahl der Werte, in der zweiten Spalte jeweils der Anteil, den diese Messwerte an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe ausmachen, eingetragen.

3.2 Verhältnis von IGF-I und IGFBP-3 im Serum erkrankter und gesunder Kinder

Aus den im Serum gemessenen Werten der Parameter IGF-I und IGFBP-3 wird deren Verhältnis zueinander bestimmt. Dazu wird der Quotient aus dem in einer Serumprobe gemessenen IGF-I Wert und dem aus der gleichen Probe bestimmten IGFBP-3 Wert berechnet. Hieraus lässt sich die theoretische Menge des ungebundenen und damit mitogen wirksamen IGF-I im Serum abschätzen. IGF-I liegt im Serum bekanntlich zu ca. 98% im Komplex mit IGFBP-3 und ALS gebunden vor, zu ca. 2% liegt es in freier Form vor. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form des IGF-I.

$$[98\%] \quad \Leftrightarrow \quad [2\%]$$

$$[\text{IGF-I/IGFBP-3/ALS}] \Leftrightarrow [\text{IGF-I}] + [\text{IGFBP-3}] + [\text{ALS}]$$

Schon bei geringer Abnahme des IGFBP-3 Spiegels verschiebt sich dieses Gleichgewicht entsprechend zugunsten der freien Form von IGF-I, welches dann mitogen wirksam werden kann.

Zur Auswertung des gemessenen Verhältnisses von IGF-I zu IGFBP-3 wird wiederum der Vergleich mit den altersentsprechenden Referenzwerten angestellt. Wie in den Ergebnissen unter 3.1 gezeigt, liegen sowohl IGF-I als auch IGFBP-3 bei erkrankten Kindern im Serum in niedrigerer Konzentration vor, als bei gesunden Kindern. Der Serumspiegel an IGF-I ist bei erkrankten Kindern im Vergleich zu den Referenzwerten noch niedriger als der Serumspiegel an IGFBP-3 im Vergleich zu den Referenzwerten. Daraus ergibt sich, was auch die Berechnung des Quotienten IGF-I/IGFBP-3 zeigt: im Serum erkrankter Kinder ist das Verhältnis von IGF-I zu IGFBP-3 niedriger als im Serum gesunder Kinder. Siehe Tabelle 3.2a.

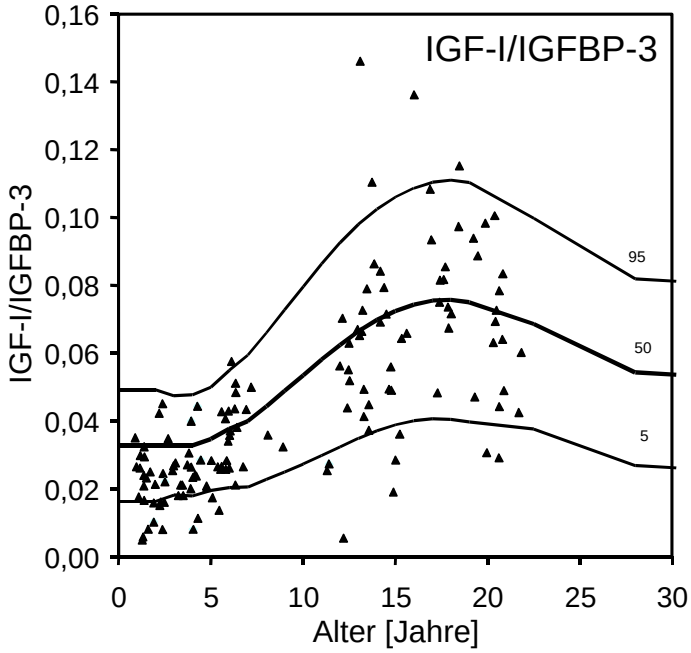
Tabelle 3.2-a

Quotient IGF-I/IGFBP-3		<5. Perzentil	<50. Perzentil	>50. Perzentil	>95. Perzentil
Anteil der Serumwerte in %	Referenzwerte	5%	50%	50%	5%
	Patientenkollektiv	18%	71%	29%	4%

Prozentualer Anteil des IGF-I/IGFBP-3 Quotienten im Serum gesunder Kinder (=Referenzgruppe in erster Zeile) und erkrankter Kinder (in zweiter Zeile) unter dem 50., bzw. dem 5. Perzentil und über dem 50., bzw. dem 95. Perzentil, angegeben in Prozent.

Bei den Tumorpatienten liegen 71% des errechneten IFG-I/IGFBP-3 Verhältnisses unter dem 50. Perzentil und somit nur 29% oberhalb des 50. Perzentils. Unterhalb des 5. Perzentils liegen 18% der errechneten Werte. Mit 4% oberhalb des 95. Perzentils entspricht der Anteil der Werte bei erkrankten Kindern nahezu dem Anteil der Werte der Referenzgruppe. Die Serumspiegel von IGF-I liegen also im Serum erkrankter Kinder im Verhältnis niedriger als die Serumwerte von IGFBP-3.

Abbildung 3.2



Fraktion an rechnerisch ungebundenem und damit mitogen wirksamem IGF-I als Quotient der Serumwerte von IGF-I und IGFBP-3 aller in die Auswertung einbezogenen Tumorpatienten im Vergleich mit altersentsprechenden Referenzwerten (5.-95. Perzentil) [50].

3.3 Korrelation der gemessenen Parameter im Serum untereinander

Um die Abhängigkeit der im Serum gemessenen Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 rechnerisch zu bestimmen, werden die Parameter miteinander korreliert und das Bestimmtheitsmaß berechnet. Dabei wird auch der Korrelationskoeffizient r, das Bestimmtheitsmaß R^2 und die Signifikanz p angegeben.

Besonderes Interesse gilt der Abhängigkeit zwischen der Höhe der Konzentrationen an IGF-I und IGFBP-3 im Serum. Diese beiden Parameter sind im Serum der Tumorpatienten hochsignifikant ($p < 0{,}001$) positiv miteinander korreliert ($r = 0{,}6918$, $R^2 = 0{,}4786$). Das heißt, bei hohem IGF-I Spiegel im Serum wird mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch ein hoher IGFBP-3 Spiegel gefunden. IGF-

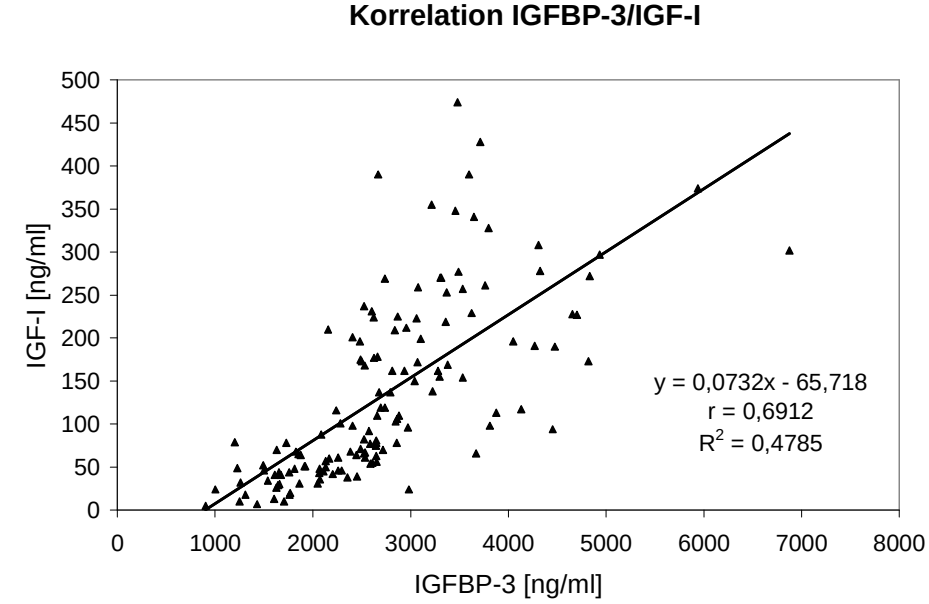
I und IGFBP-2 sind hingegen auf einem Signifikanzniveau von p <0,001 negativ miteinander korreliert (r = -0,5755, R^2 = 0,3312). Das bedeutet, dass bei hohem IGF-I Spiegel im Serum mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein niedriger IGFBP-2 Spiegel gefunden wird und umgekehrt. Siehe Tabelle 3.3a und Abbildung 3.3a und 3.3b.

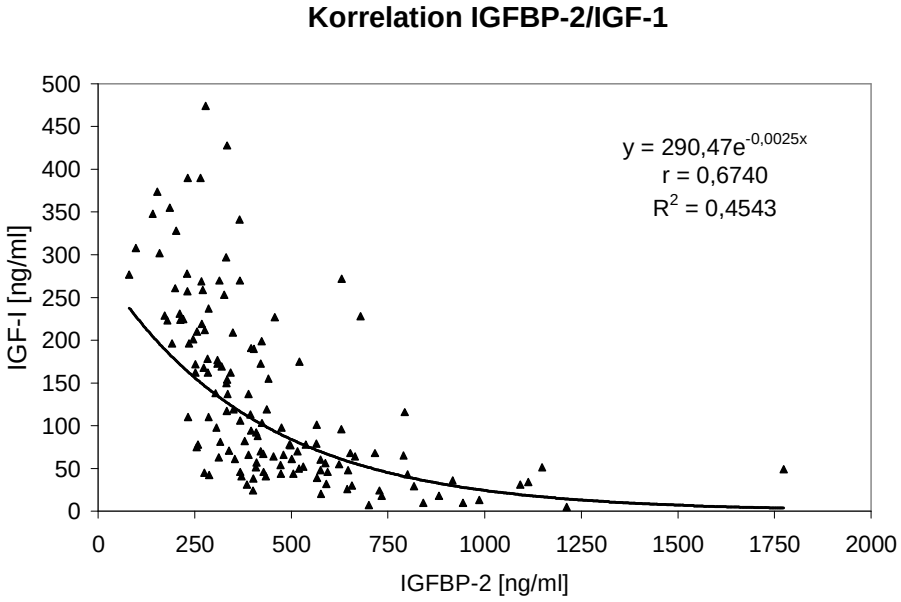
Tabelle 3.3-a

	IGF-I/IGF-II	IGF-I/IGFBP-2	IGF-I/IGFBP-3	IGF-II/IGFBP-2	IGF-II/IGFBP-3	IGFBP-2/IGFBP-3
r	0,6515	-0,5755	0,6918	-0,5509	O,6159	-0,5038
R^2	0,4244	0,3312	0,4786	0,3035	0,3793	0,2538
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Korrelationskoeffizient r, Bestimmtheitsmaß R^2 und Signifikanz p für die im Serum gemessenen Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3.

Abbildung 3.3-a und -b





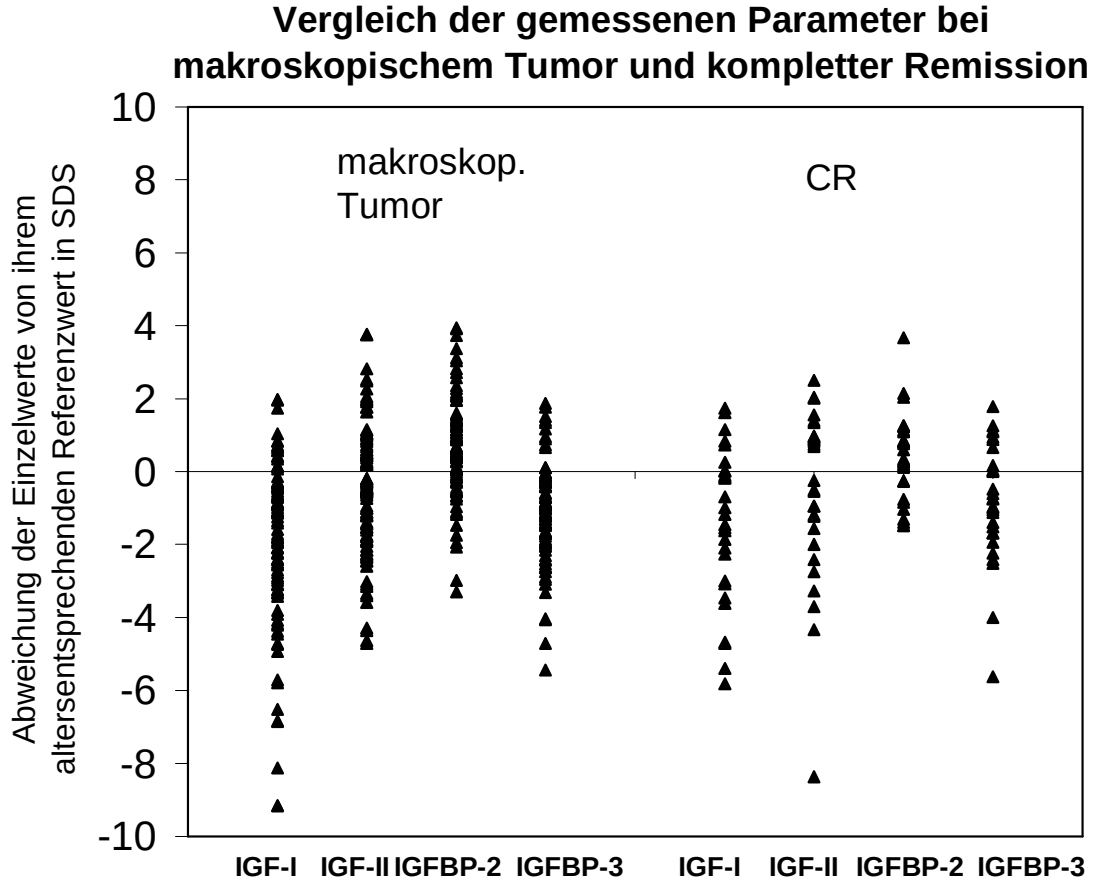
Gegenseitige Abhängigkeit der gemessenen Serumwerte für a) IGFBP-3 und IGF-I, b) IGFBP-2 und IGF-I in ng/ml.

Angegeben ist die Gleichung der Trendlinie, das Bestimmtheitsmaß $R^{2,}$ der Korrelationskoeffizient r und die Signifikanz p.

3.4 Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit vom Tumorstatus

Die Serumproben aller in die Auswertung einbezogenen Patienten wurden nach dem Kriterium makroskopisch identifizierbarer Tumor (makroskop. Tumor) oder komplette Remission (CR) in zwei Gruppen eingeteilt. Durch Gegenüberstellung der in diesen beiden Gruppen ermittelten Werte der Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 kann theoretisch eine Abhängigkeit der Serumspiegel der einzelnen Parameter vom Vorhandensein eines makroskopisch feststellbaren Tumors festgestellt werden. Siehe Abbildung 3.4.

Abbildung 3.4



Abhängigkeit der Serumspiegel von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 vom Tumorstatus. Die linke Gruppe zeigt die gemessenen Parameter bei Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor, die rechte Gruppe bei Patienten mit kompletter Remission. Die Werte sind als Abweichung des jeweils altersentsprechenden Referenzwerts in SDS dargestellt. Der altersentsprechende Referenzwert liegt bei y=0, die im Serum gemessenen Werte der Patienten sind als Einzelpunkte im Diagramm eingetragen.

Die Einzelwerte der Serumspiegel werden als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in Standard Deviation Scores (SDS) betrachtet. Der altersentsprechende Referenzwert liegt in Abbildung 3.4 definitionsgemäß bei

Null, die Abweichung vom jeweiligen Referenzwert ist als positiver oder negativer Wert eines Einzelpunktes auf der y-Achse abzulesen. Da bei dieser Einteilung der Serumproben die Gruppengröße verschieden ist und die gemessenen Serumspiegel weder unabhängige noch abhängige Stichproben darstellen, wird auf einen Vergleich der jeweiligen Gruppenmittelwerte oder der Mediane verzichtet. In der vorliegenden Stichprobe zeigt sich kein unterschiedliches Verhalten der Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines makroskopisch identifizierbaren Tumors oder bei kompletter Remission.

3.5 Serumspiegel der gemessenen Parameter in Abhängigkeit von der Therapiedauer

Die Patienten wurden nach ihrem individuellen Krankheitsverlauf in drei Gruppen unterteilt: überlebende Patienten mit kompletter Remission, überlebende Patienten bei denen ein Tumor makroskopisch identifizierbar ist und bereits verstorbene Patienten.

Die Serumproben dieser Patienten wurden dann innerhalb der ersten Gruppeneinteilung nach der Zeitdauer, die seit Diagnosestellung bis zur Probenentnahme vergangen ist, in vier Untergruppen eingeteilt. Für die Untergruppen wurden die Zeiträume „null bis drei Monate“, „drei bis sechs Monate“, „sechs bis zwölf Monate“ und „über zwölf Monate“ nach Diagnosestellung gewählt.

Bei allen Patienten wurde innerhalb der ersten 3 Monate mit der Therapie begonnen. Abbildung 3.5a bis 3.5d zeigt die Entwicklung der im Patientenserum gemessenen Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 über den Zeitverlauf von Diagnosestellung bis länger als zwölf Monate. Die Messwerte der Parameter sind als Abweichung von den altersentsprechenden Referenzwerten als Einzelpunkte in die Abbildungen eingetragen. Der jeweilige altersentsprechende Referenzwert liegt definitionsgemäß bei y = 0. Die Abweichung eines Messwertes von seinem Referenzwert ist auf der y-Achse in SDS abzulesen. Überlebende Patienten mit kompletter Remission, überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor und verstorbene Patienten sind durch verschieden strukturierte Symbole gekennzeichnet. Auf der x-Achse sind von

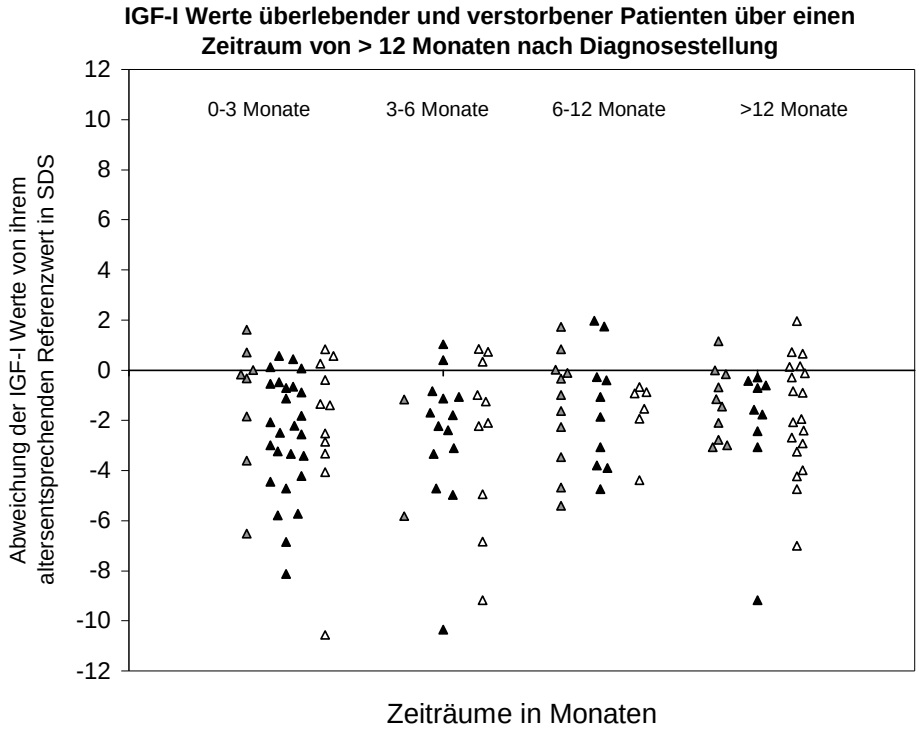
links nach rechts die vier Untergruppen aufgetragen, die nach dem Zeitpunkt seit Diagnosestellung festgelegt wurden.

IGF-I: Bei den überlebenden Patienten mit kompletter Remission bleiben die IGF-I Werte über den gesamten Zeitverlauf stets niedriger als die altersentsprechenden Referenzwerte. Sie liegen zu 63%, 100%, 72% und 90% unter den Referenzwerten. Es ist im Zeitverlauf kein nennenswerter Abfall oder Anstieg der IGF-I Werte zu verzeichnen.

In der Gruppe der überlebenden Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor liegen in den ersten drei Gruppen zwischen 86% und 80% unter den Referenzwerten, in der vierten Gruppe liegen alle Werte niedriger als die Referenzwerte.

Für die Gruppe der verstorbenen Patienten ist ebenfalls keine wesentliche Änderung der IGF-I Werte über den gesamten Zeitraum zu erkennen. Hier liegen 72% der Werte zwischen null und drei Monaten tiefer als die Referenzwerte, zwischen drei und sechs Monaten sind 70%, zwischen sechs und zwölf Monaten 100% und über zwölf Monate 73% niedriger als die Referenzwerte anzutreffen. Siehe Abbildung 3.5a.

Abbildung 3.5-a



Abhängigkeit der Serumspiegel für IGF-I von Tumorstatus und Krankheitsverlauf nach 3, 6 und 12 Monaten Therapie bzw. Diagnosestellung. Die Werte sind als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.
Die Gruppen sind eingeteilt in:

▲ *1. überlebende Patienten mit kompletter Remission*

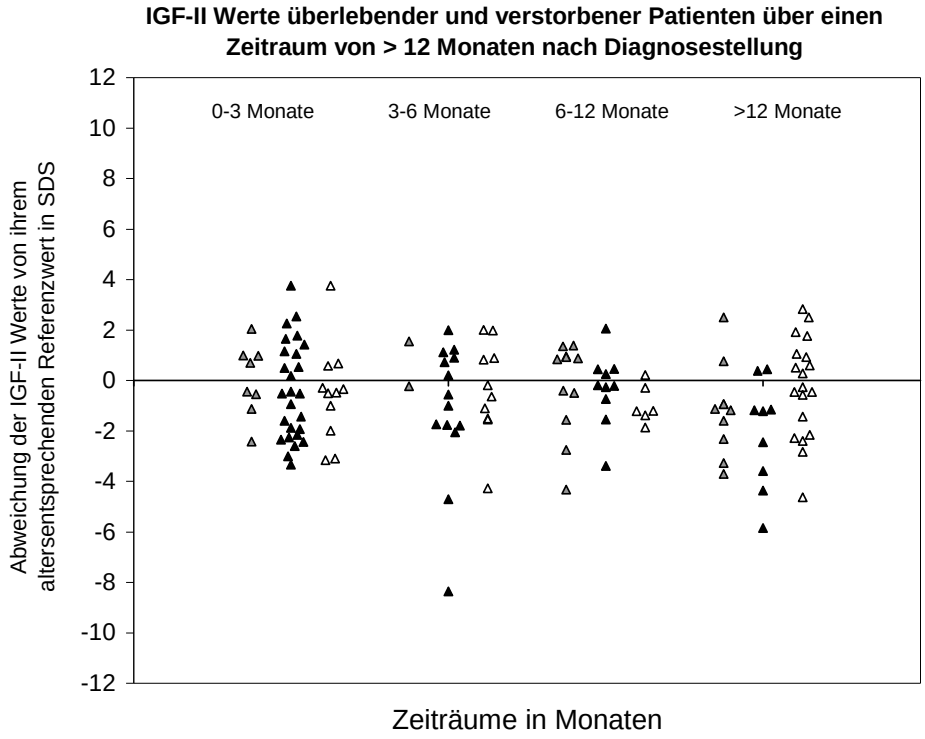
▲ *2. überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor*

△ *3. verstorbene Patienten*

IGF-II: Die Serumspiegel von IGF-II fallen bei den überlebenden Patienten mit kompletter Remission über den Zeitverlauf von über einem Jahr leicht ab. Sie sind in der Wertegruppe von null bis drei Monate und der Wertegruppe drei bis sechs Monate um die altersentsprechenden Referenzwerte verteilt, bei den Werten zwischen sechs und zwölf Monaten liegen 55% der Werte niedriger als die Referenzwerte, in der Wertegruppe über zwölf Monaten liegen 77% der Werte niedriger als die Referenzwerte.

Die IGF-II Serumspiegel der überlebenden Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor liegen in den ersten drei Zeitgruppen zu 57% bis 60% unter den Referenzwerten, in der Gruppe über zwölf Monate nach Diagnosestellung liegen 78% unter den altersentsprechenden Referenzwerten. Ein leichter Abfall der Serumspiegel ist hier festzustellen.
Die IGF-II Werte der verstorbenen Patienten liegen zu 72%, 60%, 83% und bei mehr als zwölf Monaten seit Diagnosestellung nur noch zu 52% unter den Referenzwerten. Bei dieser Patientengruppe ist im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen ein leichter Anstieg der IGF-II Serumspiegel zu beobachten. Siehe Abbildung 3.5b.

Abbildung 3.5-b



Abhängigkeit der Serumspiegel für IGF-II von Tumorstatus und Krankheitsverlauf nach 3, 6 und 12 Monaten Therapie bzw. Diagnosestellung. Die Werte sind als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.
Die Gruppen sind eingeteilt in:

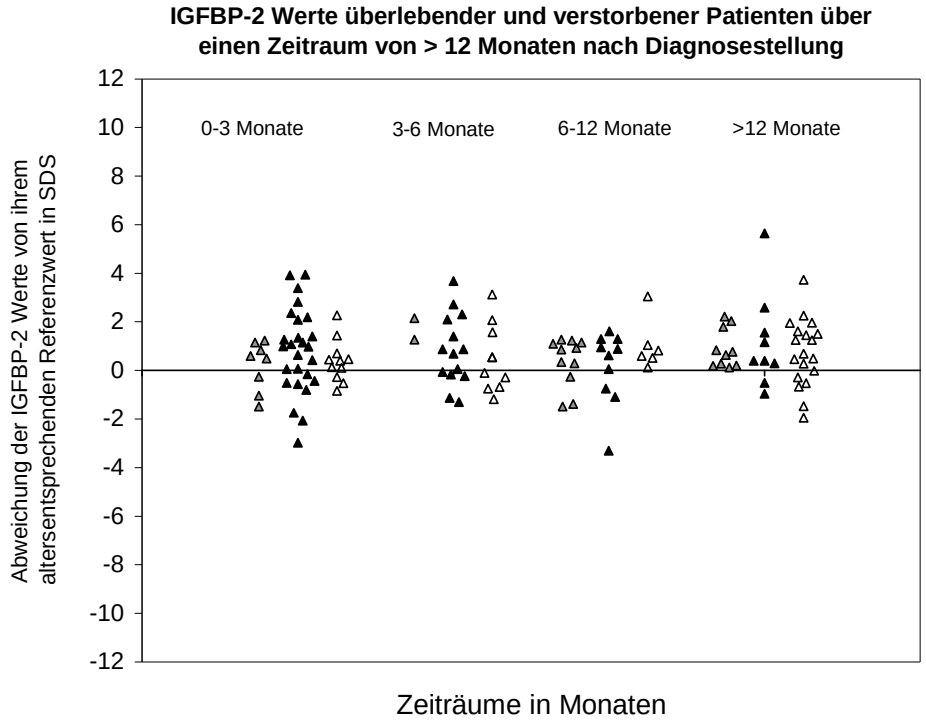
▲ *1. überlebende Patienten mit kompletter Remission*

▲ *2. überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor*

△ *3. verstorbene Patienten*

IGFBP-2: Bei Betrachtung der IGFBP-2 Serumspiegel fällt auf, dass fast alle Werte der drei Patientengruppen in allen Zeiträumen über den Referenzwerten liegen. Dabei ist in der Gruppe der überlebenden Patienten mit kompletter Remission ein Anstieg zu finden. Hier liegen 62%, 100%, 73% und 100% über den altersentsprechenden Referenzwerten. Siehe Abbildung 3.5c.

Abbildung 3.5-c



Abhängigkeit der Serumspiegel für IGFBP-2 von Tumorstatus und Krankheitsverlauf nach 3, 6 und 12 Monaten Therapie bzw. Diagnosestellung. Die Werte sind als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.

Die Gruppen sind eingeteilt in:

▲ *1. überlebende Patienten mit kompletter Remission*

▲ *2. überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor*

△ *3. verstorbene Patienten*

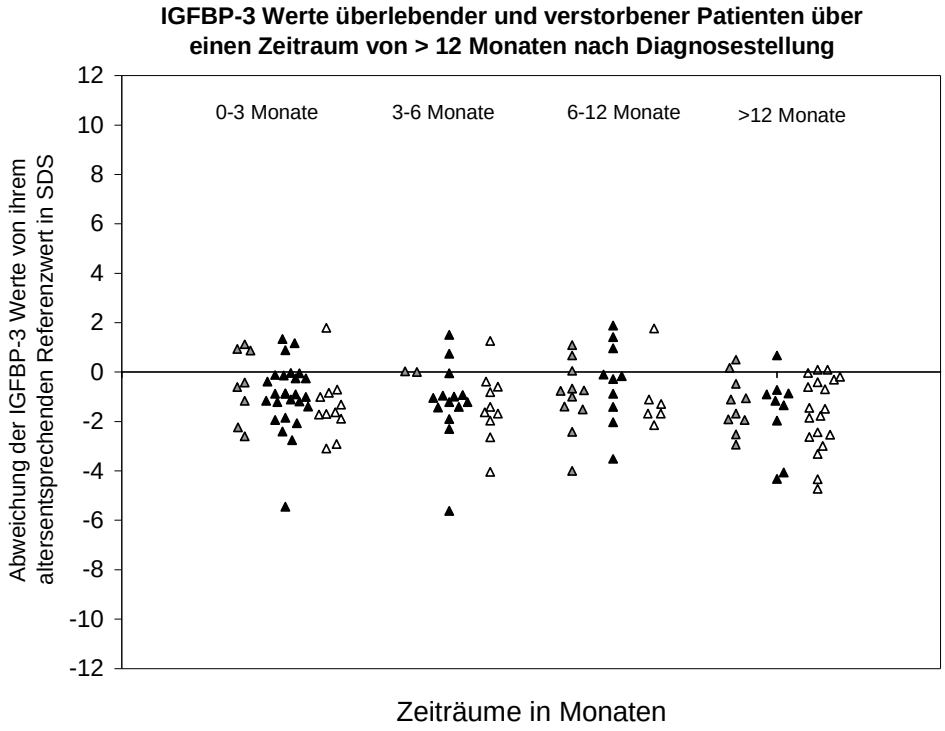
Die Gruppe der überlebenden Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor zeigt von 69% im ersten Zeitraum über 57% im zweiten und 70% im dritten Zeitraum bis zu 78% im vierten Zeitraum keinen wesentlichen Anstieg.

Die IGFBP-2 Serumspiegel der verstorbenen Patienten liegen im ersten Zeitraum mit 73% höher als die Referenzwerte, im zweiten Zeitraum ist der größere Anteil der Werte aber unter den Referenzwerten zu finden. Im Zeitraum sechs

bis zwölf Monate liegen alle gemessenen IGFBP-2 Werte höher als die Referenzwerte und im letzten Zeitraum sind es 68%, die über den Referenzwerten liegen. Hier ist wie in der zweiten Patientengruppe weder ein Anstieg noch ein Abfall der Serumspiegel erkennbar.

IGFBP-3: Für IGFBP-3 liegen die Serumspiegel der drei Patientengruppen insgesamt tiefer als die altersentsprechenden Referenzwerte. Bei den überlebenden Patienten mit kompletter Remission fällt ein leichter Abfall der Serumspiegel von 62%, die im ersten Zeitraum unter den Referenzwerten liegen auf 80%, die im letzten Zeitraum unter den Referenzwerten zu finden sind. In den beiden anderen Patientengruppen (überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor und verstorbene Patienten) ist weder ein Anstieg noch ein Abfall der Werte zu verzeichnen. Bei ihnen liegen die gemessenen IGFBP-3 Serumspiegel in allen Zeiträumen zu 70% bis 90% unter den Referenzwerten. Siehe Abbildung 3.5-d.

Abbildung 3.5-d



Abhängigkeit der Serumspiegel für IGFBP-3 von Tumorstatus und Krankheitsverlauf nach 3, 6 und 12 Monaten Therapie bzw. Diagnosestellung. Die Werte sind als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.

Die Gruppen sind eingeteilt in:

▲ *1. überlebende Patienten mit kompletter Remission*

▲ *2. überlebende Patienten mit makroskopisch identifizierbarem Tumor*

△ *3. verstorbene Patienten*

3.6 Einzelverläufe der Serumkonzentrationen bei Patienten mit eRMS und PNET

Von vier Patienten werden exemplarisch die Verläufe der gemessenen Serumspiegel gezeigt. Die Patienten wurden so ausgewählt, dass die Werte von jeweils zwei der Patienten miteinander vergleichbar sind. Im ersten Beispiel ist die Diagnose in beiden Fällen ein „embryonales Rhabdomyosarkom“, bei bei-

den Patienten ist zu allen Messzeitpunkten makroskopisch ein Tumor identifizierbar. Patient A ist verstorben, Patient B lebt. Von beiden Patienten wurden in jeweils fünf Proben die Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, und IGFBP-3 bestimmt. Siehe Tabelle 3.6a und 3.6b.

Tabelle 3.6-a

Patient A	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5
IGF-I [SDS]	-3,31	-2,23	-2,10	-0,83	-4,74
IGF-II [SDS]	-0,35	-1,11	-0,20	0,29	-1,43
IGFBP-2 [SDS]	-0,53	-0,68	-1,17	-0,54	1,24
IGFBP-3 [SDS]	-0,84	-0,81	-0,59	-1,45	-1,86

Tabelle 3.6-b

Patient B	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5
IGF-I [SDS]	-2,56	-2,49	-2,23	-1,14	-1,87
IGF-II [SDS]	-1,60	-0,45	1,12	0,20	0,44
IGFBP-2 [SDS]	1,35	1,08	0,68	-1,12	0,06
IGFBP-3 [SDS]	-0,13	-0,03	-0,93	-0,04	-0,28

Tabelle 3.6a und 3.6b: IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 Werte von zwei Patienten mit „eRMS“ die im Verlauf ihrer Krankheit bestimmt wurden.

Die **IGF-I** Werte beider Patienten zeigen einen ähnlichen Verlauf. Sie liegen bei allen fünf Messwerten unter den Referenzwerten. Bei beiden Patienten steigen sie bis zum vierten Messwert leicht an. Beide Patienten zeigen bei Ende der Beobachtung einen Abfall der IGF-I Werte. Bei dem überlebenden Patienten A ist der Abfall des IGF-I Spiegels von –0,83 SDS auf –4,74 SDS sehr deutlich, bei dem verstorbenen Patienten B ist nur ein leichter Abfall des IGF-I Spiegels zu verzeichnen. Siehe Abbildung 3.6a. Die **IGF-II** Spiegel der beiden Patienten zeigen einen weniger einheitlichen Verlauf. Zu Beginn liegen die Werte beider Patienten unter den Referenzwerten. Patient A überschreitet den Referenzwert bei Wert vier, bei Patient B ist ein Gipfel der Serumspiegel bei Wert drei erreicht.

Abbildung 3.6-a

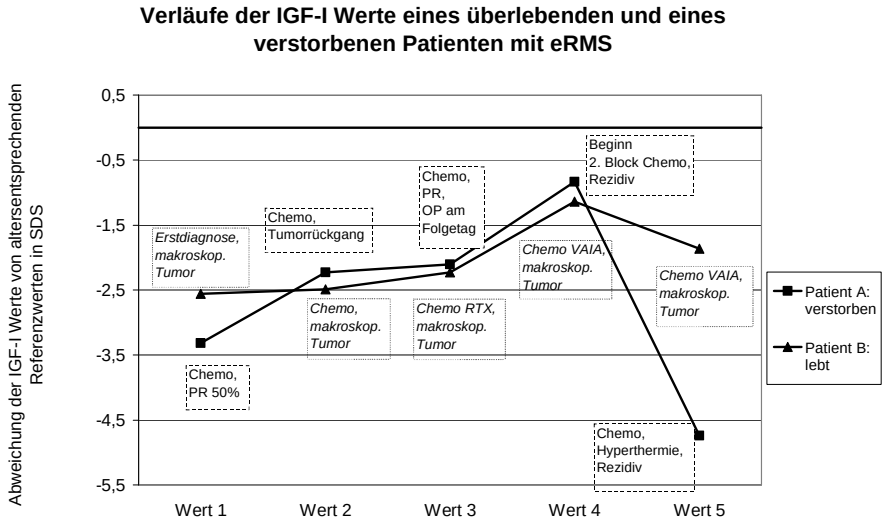
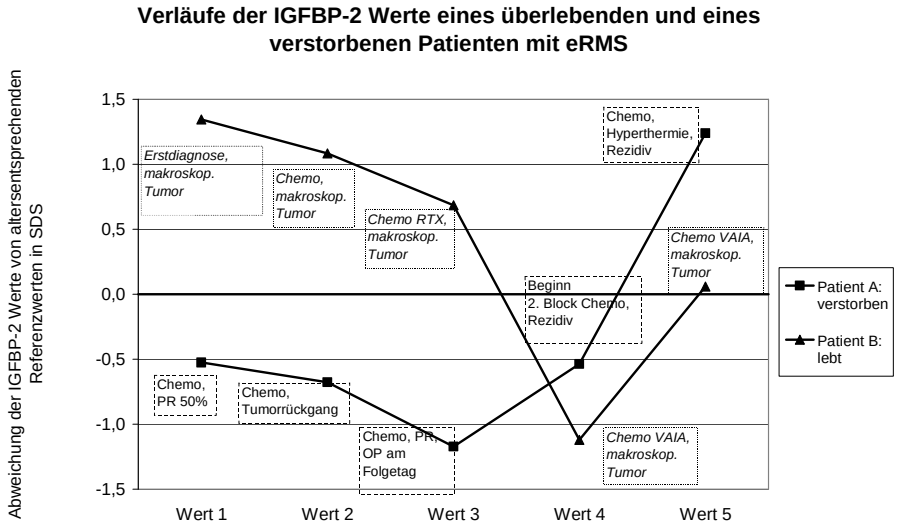


Abbildung 3.6-b



Betrachtung der Serumspiegel von IGF-I und IGFBP-2 für zwei Patienten mit gleicher Tumorart bei individueller Krankheitsentwicklung.

Um eine vergleichende Betrachtung zu ermöglichen, sind die Werte als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.

Bei Betrachtung des Verlaufs der **IGFBP-2** Serumspiegel fällt auf, dass die Werte bei Patient B zwar anfangs höher liegen, als die Werte des Patienten A, aber beim letzten Messwert steigt bei beiden Patienten der Serumspiegel an IGFBP-2 deutlich an. Siehe Abbildung 3.6b. **IGFBP-3** zeigt bei dem verstorbenen Patienten A einen deutlichen Abfall der Serumspiegel bei Wert vier und fünf. Bei Patient B liegen, wie auch bei Patient A, alle fünf Messwerte unter den Referenzwerten. Es ist ein negativer Gipfel bei Wert 3 und ein leichter Abfall des IGFBP-3 Spiegels bei Wert 5 zu verzeichnen.

Patientin C und Patient D sind beide an einem „PNET“ erkrankt. Patientin C hat einen günstigen Verlauf mit kompletter Remission, sie lebt. Patient D ist verstorben, bei ihm war bis zu seinem Tod ein Tumor makroskopisch nachweisbar. Bei beiden Patienten wurden in vier Serumproben die Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 bestimmt. Siehe Tabelle 3.6c und 3.6d.

Tabelle 3.6-c

Patient C	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4
IGF-I [SDS]	-0,18	0,84	-0,99	1,73
IGF-II [SDS]	0,68	1,39	0,96	0,93
IGFBP-2 [SDS]	-0,26	-0,25	0,29	-1,39
IGFBP-3 [SDS]	1,13	0,05	1,10	0,67

Tabelle 3.6-d

Patient D	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4
IGF-I [SDS]	0,84	-1,40	-2,53	-0,99
IGF-II [SDS]	-0,51	0,58	-1,01	0,82
IGFBP-2 [SDS]	0,40	0,46	0,13	0,29
IGFBP-3 [SDS]	-1,69	-1,89	-1,71	-1,96

Tabelle 3.6c und 3.6d: IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 Werte von zwei Patienten mit „PNET“ die im Verlauf ihrer Krankheit bestimmt wurden.

Abbildung 3.6-c

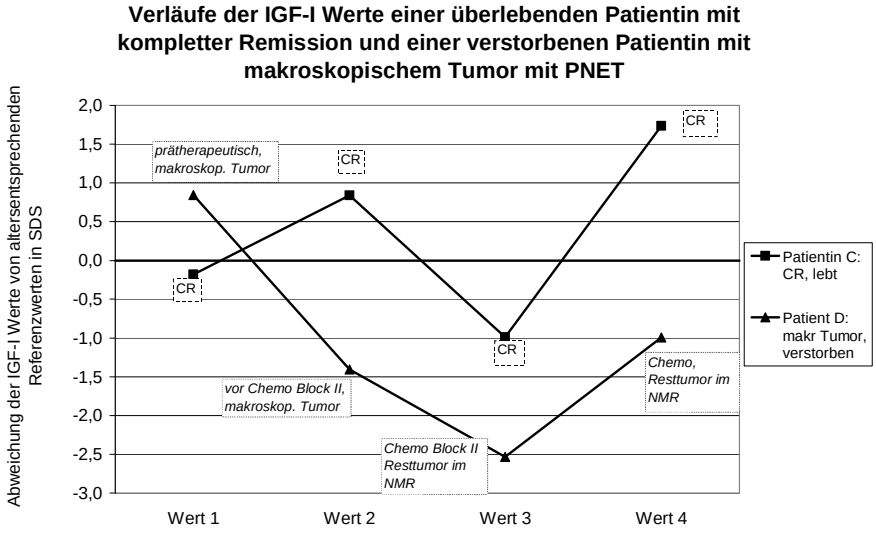
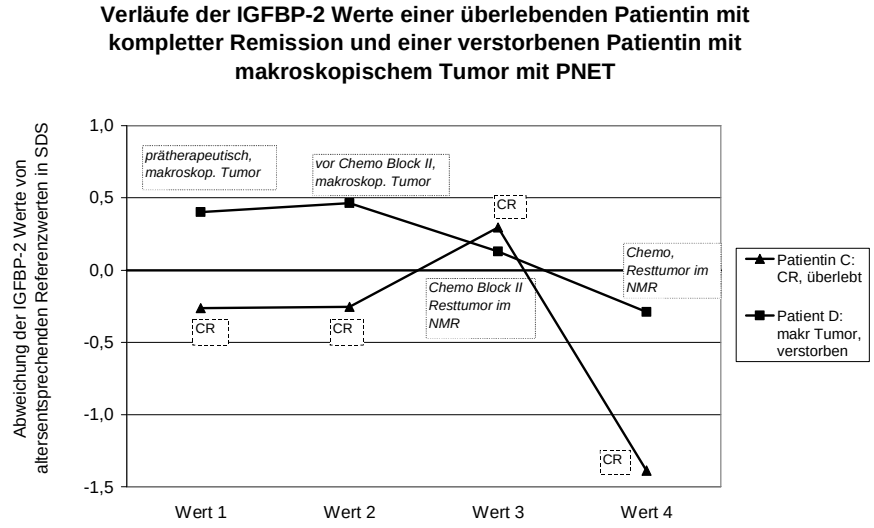


Abbildung 3.6-d



Betrachtung der Serumspiegel von IGF-I und IGFBP-2 für zwei Patienten mit gleicher Tumorart bei individueller Krankheitsentwicklung.

Um eine vergleichende Betrachtung zu ermöglichen, sind die Werte als Abweichung vom altersentsprechenden Referenzwert in SDS dargestellt.

Die **IGF-I** Serumspiegel beider Patienten zeigen bei ihrem dritten Messwert einen Tiefpunkt und steigen beide beim vierten Messwert wieder an, wobei die überlebende Patientin ab Messwert zwei stets höhere IGF-I Serumspiegel zeigt. Bei ihr steigt der letzte Messwert auf +1,73 SDS über den Referenzwert an. Bei Patient D steigt dieser letzte Messwert von –2,53 SDS auf –0,99 SDS an, bleibt damit aber unter dem Referenzwert. Siehe Abbildung 3.6c. Die **IGF-II** Serumspiegel von Patientin C zeigen eine geringe Variationsbreite zwischen +0,68 und +0,93 SDS. Bei Patient D hingegen ist ein steiler Anstieg von einem steilen Abfall bei Wert drei und wiederum einem steilen Anstieg bei Wert vier gefolgt. Für **IGFBP-2** ist bei beiden Patienten beim letzten Wert ein Abfall der Serumspiegel unter den Referenzwert zu messen. Bei Patient D lag der IGFBP-2-Serumspiegel zuvor leicht über den Referenzwerten und fiel nur in geringem Maße ab, Patientin C lag bei Wert eins und zwei leicht unter den Referenzwerten, bei Wert drei leicht darüber und fiel bei Wert vier stark nach unten ab. Siehe Abbildung 3.6d. **IGFBP-3** bleibt bei Patientin C mit einer Variationsbreite von ca. 1 SDS bei allen vier Messwerten über den Referenzwerten. Bei Patient D lagen alle vier Messwerte ohne nennenswerten Anstieg oder Abfall zwischen –1,5 und –2,0 SDS.

4 Diskussion

Bei Tumorerkrankungen liegen als Begleiterscheinung häufig Veränderungen im Gleichgewicht des IGF-Systems vor, die im Serum nachgewiesen werden können. Da maligne Erkrankungen im Kindesalter selten vorkommen, ist bei kindlichen Tumoren, im Gegensatz zu Tumoren des Erwachsenenalters, bisher wenig über Veränderungen der Serumspiegel der Komponenten des IGF-Systems bei Vorliegen einer Tumorerkrankung bekannt. Bei Nephroblastomen, Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen und verschiedenen soliden Tumoren wird in der Literatur von niedrigen IGF-I, IGF-II und IGFBP-3 Spiegeln und erhöhten IGFBP-2 Spiegeln berichtet [14] [12] [39] [38]. Über die Rolle der ALS bei Tumorerkrankungen ist bisher fast nichts bekannt.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Restserumproben von Kindern mit verschiedenen soliden Tumoren auf ihre Serumspiegel der verschiedenen Komponenten des IGF-Systems untersucht, um weitere Zusammenhänge zwischen Tumorerkrankungen und Veränderungen der Serumspiegel der Komponenten des IGF-Systems erkennen zu können.

4.1 Abweichungen der gemessenen Parameter von den Referenzwerten gesunder Kinder

In dieser vorliegenden retrospektiven Studie wurden bei Kindern mit unterschiedlichen soliden Tumoren die Serumspiegel von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS gemessen und mit Referenzwerten gesunder Kinder verglichen. Da die Diagnosen der Kinder neun verschiedene Tumortypen einschließen, ergibt sich eine relativ heterogene Untersuchungsgruppe, die zunächst als Gesamtheit und später unterteilt nach Diagnosen betrachtet wird.
Betrachtet man die Gesamtheit der Gruppe der Kinder mit verschiedenen soliden Tumoren, lässt sich Folgendes feststellen: Die Serumspiegel von IGF-I, IGFBP-3 und ALS liegen deutlich niedriger, als die Referenzwerte gesunder Kinder. Die für IGF-II gemessenen Serumspiegel der an Tumoren erkrankten Kinder liegen nur geringfügig niedriger als die Referenzwerte gesunder Kinder. IGFBP-2 wurde im Serum der Tumorpatienten im Vergleich zu den Referenzwerten gesunder Kinder deutlich erhöht gemessen. Dies steht im Einklang mit

Studien, in denen bei Kindern mit Leukämie, Non-Hodgkin Lymphomen und anderen soliden Tumoren, unabhängig vom Tumortyp, niedrige Serumspiegel für IGF-I, IGF-II und IGFBP-3 und deutlich erhöhte Spiegel an IGFBP-2 gemessen wurden [38] [39]. Im Gegensatz dazu wurden bei anderen Tumoren erhöhte Serumspiegel an IGF-I nachgewiesen, wie z.B. bei Prostata-Karzinom [7], Mammakarzinom [20] und Lungenkrebs [34], bei denen die Serumspiegel zum Teil sogar positiv mit dem Tumorstatus korreliert waren.

Dies zeigt, dass bislang keine einheitliche Aussage über die Veränderungen der Parameter des IGF-Systems im Serum bei Tumorerkrankungen getroffen werden kann, sondern dass diese Veränderungen 1.) für verschiedenartige Tumoren unterschiedlich ausfallen, 2.) bei Kindern anders als bei Erwachsenen ausgelenkt sind und 3.) vermutlich von weiteren Faktoren abhängig sind.

Um Aussagen über die Veränderungen des IGF- Systems im Zusammenhang mit den vorliegenden Tumorerkrankungen treffen zu können, wurden die vier größten der untersuchten Tumorgruppen (eRMS, aRMS, Neuroblastom und PNET) herausgegriffen und die Abweichung der Messwerte innerhalb dieser Gruppen von den entsprechenden Referenzwerten gemessen.

IGF-I: Bei aRMS, eRMS und Neuroblastomen wurden in der vorliegenden Studie besonders häufig niedrige Serumspiegel für IGF-I gemessen. Dies steht im Einklang mit den oben angeführten Studien [38] [39], widerspricht aber in gewissem Maße der Kenntnis, dass Neuroblastomzellen auf IGF-I als Wachstumsfaktor ansprechen und vermutlich in der Lage sind, IGF-I und IGF-II mRNA in erhöhtem Maße zu exprimieren und sich damit selbst, d.h. autokrin/parakrin zum Wachstum anzuregen [57] [19]. Möglicherweise war die von den Neuroblastomzellen selbst produzierte Menge an IGF-I aber nur zu gering, als dass sie sich in messbar erhöhten Serumspiegeln feststellen ließ. Auffällig war, dass von 76% aller verstorbenen Patienten der vorliegenden Studie IGF-I Werte unter dem 5. Perzentil gemessen wurden, wohingegen nur von 47% der überlebenden Patienten IGF-I Serumspiegel unter dem 5. Perzentil lagen.

Bei den verstorbenen Patienten zeigen sich also auffällig häufig niedrige IGF-I Serumspiegel. Insbesondere bei Patienten, die an einem aRMS, eRMS, PNET oder Neuroblastom verstorben sind, lagen die Serumspiegel an IGF-I sehr nied-

rig. Von allen bei an dieser Erkrankung verstorbenen Patienten lag mindestens ein Messwert unter dem 5. Perzentil. Das bedeutet, die Höhe der IGF-I Serumspiegel kann mit der Schwere der Erkrankung, bzw. der Malignität des Tumors zusammenhängen.

Ob die Höhe der IGF-I Serumspiegel nicht nur von der Schwere der Erkrankung, sondern auch von der Tumormasse abhängt, konnte hier nicht bestätigt werden. Betrachtet man die Messwertezahl der Patienten, deren IGF-I Serumspiegel unter dem 5. Perzentil lagen, so zeigte sich keine unterschiedliche Verteilung der Werte in Abhängigkeit vom Vorliegen eines makroskopischen Tumors oder einer kompletten Remission zum Zeitpunkt der Serumgewinnung. In beiden Gruppen lagen ca. 30% der gemessenen IGF-I Serumwerte unter dem 5. Perzentil.

IGF-II: Die IGF-II Serumspiegel der Gesamtheit der Tumorpatienten lagen nur geringfügig niedriger als die Serumspiegel für IGF-II der gesunden Referenzgruppe. Bei der Gruppe der Neuroblastome und der eRMS fielen aber gehäuft deutlich niedrigere IGF-II Serumspiegel auf. Bei den Neuroblastompatienten zeigen vor allem die Verstorbenen unter den Patienten niedrige Werte. Bei den eRMS lässt sich kein Unterschied zwischen verstorbenen und überlebenden Patienten feststellen. Die niedrig gemessenen IGF-II Serumspiegel bestätigen die Ergebnisse früherer Studien, in denen bei kindlichen Tumoren ebenfalls niedrige IGF-II Serumspiegel gemessen wurden, sie widersprechen damit aber zahlreichen anderen Studien, in denen erhöhte Serumspiegel für IGF-II bei dem Vorliegen einer Tumorerkrankung nachgewiesen wurden. Dies waren allerdings Tumoren, die im Erwachsenenalter auftreten. Beispielsweise lagen bei Brustkrebspatientinnen erhöhte IGF-II Serumspiegel vor, die mit der Tumorgröße korrelierten, und sogar ein deutlicher Abfall der IGF-II Serumspiegel nach operativer Entfernung des Tumors [24]. Bei Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms zeigten sich in einer Studie ebenfalls deutlich erhöhte IGF-II Serumspiegel, allerdings nur bei niedrigmalignen Stadien der Erkrankung [47].

Widersprüchlich zu dem Ergebnis der vorliegenden Studie ist auch das Ergebnis einer Studie mit Weichteiltumoren, in der an RMS-Zellen gezeigt wurde, dass diese in der Lage sind, IGF-II mRNA in erhöhtem Maße zu exprimieren,

wobei die Expression an IGF-II mRNA je höher war, desto weniger differenziert die Zelle war [58]. Bei erhöhter Expression an IGF-II mRNA ist auch eine erhöhte Sekretion an IGF-II ins Blut anzunehmen, wodurch es zu erhöhten IGF-II Serumspiegeln kommen müsste.

Auch für Neuroblastomzellen, Rhabdomyosarkomzellen und Nephroblastomzellen wurde in anderen Studien nachgewiesen, dass sie in erhöhtem Maße IGF-II mRNA exprimieren [10] [11] [51].

In der vorliegenden Studie fiel bei insgesamt niedrigen IGF-II Serumspiegeln der Tumorpatienten auf, dass bei den Werten von Patienten mit einem eRMS, bei denen zum Zeitpunkt der Messung eine komplette Remission vorlag, gehäuft auffällig niedrige IGF-II Spiegel gemessen wurden. Dieses Ergebnis steht wiederum im Einklang mit den oben angeführten Studien und der Annahme, dass IGF-II von Tumorzellen selbst produziert und in das Serum sezerniert wird und dass somit bei kompletter Remission weniger IGF-II im Serum zirkuliert, als bei Vorhandensein eines Tumors.

In der vorliegenden Studie, wie auch in zahlreichen anderen Studien, wurden also widersprüchliche Ergebnisse für die Höhe der IGF-II Serumspiegel bei Vorliegen einer Tumorerkrankung gefunden. Dies spricht dafür, dass die IGF-I Serumspiegel, ähnlich wie die IGF-II Serumspiegel nicht maßgeblich von der Tumormasse abhängen, sondern dass andere Faktoren einen größeren Einfluss auf die beobachteten Veränderungen nehmen. Eine weitere Erklärung für konträre Ergebnisse wäre, dass die bisher durchgeführten Studien zu kleine Fallzahlen oder zu heterogene Untersuchungsgruppen aufwiesen.

IGFBP-2: Für IGFBP-2 wurden bei den erkrankten Kindern wesentlich höhere Serumspiegel gemessen, als in der Referenzgruppe gesunder Kinder. 19 % aller Werte lagen hier über dem 95. Perzentil. Hohe IGFBP-2 Serumspiegel bei Vorliegen einer Tumorerkrankung wurden auch in zahlreichen anderen Studien gesehen. Beispielsweise wurden beim Lungenkarzinom [32], Prostatakarzinom [8], Kolonkarzinom [47] und auch bei kindlichen Tumoren wie ALL, Non Hodgkin Lymphom, Nephroblastom [61] und anderen soliden Tumoren [38] erhöhte IGFBP-2 Serumspiegel gemessen. Zum Teil zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe der IGFBP-2 Spiegel und dem Tumorstadium [8] [28]

[47]. Die positive Korrelation zwischen Tumormasse und IGFBP-2 Serumspiegel ließ sich in der vorliegenden Studie nicht bestätigen. Zwar wurden insgesamt bei Vorliegen eines Tumors, im Gegensatz zum Vorliegen einer kompletten Remission, gehäuft erhöhte Werte für IGFBP-2 gemessen, bei den aRMS traten jedoch gehäuft hohe IGFBP-2 Werte bei Vorliegen einer kompletten Remission auf. Bei PNET und Neuroblastomen ist jeweils kein Unterschied der Höhe der IGFBP-2 Serumspiegel in Abhängigkeit von der Tumormasse festgestellt worden.

Bei Betrachtung der Herkunft der Werte der vorliegenden Studie, die über dem 95. Perzentil liegen, fällt auf, dass bei Patienten mit einem Neuroblastom auffällig hohe Werte gemessen wurden. Dieses Ergebnis passt zu der Kenntnis, dass Neuroblastom- sowie Nephroblastomzellen vermehrt IGFBP-2 mRNA exprimieren [46] [61] und zu der Kenntnis, dass auch bei anderen Tumorzellen wie z.B. leukämischen Zellen oder malignen lymphatischen Zellen eine erhöhte Expression an IGFBP-2 gefunden wurde [15] [38].

IGFBP-3: Die Serumspiegel für IGFBP-3 liegen bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Tumorpatienten, unabhängig vom Tumortyp, deutlich niedriger als die Referenzwerte gesunder Kinder. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den schon oben angeführten Studien, in denen bei Vorliegen von malignen Erkrankungen ebenfalls niedrige Serumspiegel für IGFBP-3 gemessen wurden [38] [28] [39] [7]. In einer weiteren Studie, in der versucht wurde das Risiko für Kinder an einer Leukämie zu erkranken abzuschätzen, zeigte sich bei Vorliegen erhöhter IGFBP-3 Serumspiegel ein geringeres Erkrankungsrisiko [40].

Das heißt, erhöhte IGFBP-3 Serumspiegel könnten durch das Binden des mitogenen IGF-I und IGF-II vor einer malignen Erkrankung schützen, sowie niedrige IGFBP-3 Serumspiegel dazu prädisponieren könnten.

Andererseits ist bekannt, dass IGFBP-3 möglicherweise über einen IGF-unabhängigen Mechanismus die Apoptose von Zellen induziert und über diesen Weg das Tumorwachstum hemmt [42] [43]. In der vorliegenden Studie zeigte sich kein Unterschied der Höhe der gemessenen IGFBP-3 Serumspiegel in Abhängigkeit vom Vorliegen eines Tumors oder kompletter Remission.

Die unter dem 5. Perzentil gemessenen IGFBP-3 Werte stammen auffällig häufig, unabhängig vom Tumortyp, von verstorbenen Patienten, weshalb die Ergebnisse vermuten lassen, dass das Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben bei niedrigen IGFBP-3 Serumspiegeln erhöht ist.

ALS: Die Serumspiegel der Acid-labile-subunit, der an Tumoren erkrankten Kinder der vorliegenden Studie, lagen zum Großteil in den extremen Bereichen über dem 95. Perzentil und unter dem 5. Perzentil. Die Annahme, dass hohe ALS-Serumspiegel, zum Beispiel über Erhöhung der Bindungsaffinität von IGFBP-3 gegenüber IGF-I und IGF-II [1], vor raschem Tumorwachstum schützt, kann in der vorliegenden Studie nicht eindeutig bestätigt werden. Unter den Werten, die über dem 95. Perzentil lagen, war bei einem größeren Anteil der PNET und der Neuroblastome zum Zeitpunkt der Serumgewinnung eine komplette Remission eingetreten, als dass ein Tumor makroskopisch nachweisbar war. Bei den eRMS und aRMS war hingegen häufiger ein makroskopisch sichtbarer Tumor nachweisbar, als dass eine komplette Remission eingetreten war. Bei den Werten unter dem 5. Perzentil zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in Abhängigkeit vom Vorliegen eines Tumors oder einer kompletten Remission. Ob die ALS-Serumspiegel von verstorbenen oder überlebenden Patienten stammen, zeigte ebenfalls keinen wesentlichen Unterschied in der Höhe der gemessenen Werte. Zu extremen Werten in der Tabelle 3.1g kommt es durch sehr geringe Fallzahlen, wodurch sich keine Aussage ableiten lässt. Insgesamt liegt eine zu geringe Anzahl an Messwerten vor, um ein statistisch verlässliches Ergebnis zu erzielen. In der Literatur ist bisher wenig über die ALS im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen bekannt. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen wären wünschenswert um diesen Zusammenhang weiter aufzuklären.

4.2 Gegenseitige Abhängigkeit der Parameter des IGF-Systems

Um festzustellen, ob auch bei den an malignen Tumoren erkrankten Kindern die bekannten Abhängigkeiten der Serumspiegel der IGF's und ihrer Bindeproteine besteht, wurden in der vorliegenden Arbeit die Korrelationen der Parameter IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 zueinander ermittelt.

Wie erwartet sind signifikant positiv miteinander korreliert: IGF-I zu IGFBP-3, IGF-II zu IGFBP-3 und IGF-I zu IGF-II. Signifikant negativ korreliert sind IGF-I zu IGFBP-2, IGF-II zu IGFBP-2 und IGFBP-3 zu IGFBP-2. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Wachstumshormon in den untersuchten Serumproben ein wesentlicher Regulator der Parameter des IGF-Systems ist. Durch die vorliegenden Tumorerkrankungen zeigte sich keine Änderung dieser bekannten Korrelationen.

4.3 Biologische Verfügbarkeit von IGF-I

Unter Punkt 4.1 wurde diskutiert, dass erhöhte IGFBP-3 Serumspiegel vor dem Erkranken an einer malignen Erkrankung schützen können, oder aber erniedrigte IGFBP-3 Serumspiegel dazu prädisponieren. Da die biologische Verfügbarkeit von IGF-I und IGF-II durch ihre Bindeproteine, vor allem IGFBP-3, bestimmt wird, liegt die Frage nahe, welche Rolle das Verhältnis von IGF-I zu IGFBP-3 im Serum im Bezug auf das Entstehen einer malignen Erkrankung spielt.

Um die Menge an freiem und damit potentiell mitogen wirksamem IGF-I abzuschätzen, wurde das IGF-I/IGFBP-3 Verhältnis bestimmt. Hierbei ergab sich für den Großteil der Messwerte ein Verhältnis, das deutlich niedriger liegt, als die Ratio der Referenzwerte. Dies ergibt sich daraus, dass die IGF-I Serumspiegel der Tumorpatienten im Vergleich zu ihren Referenzwerten etwas niedriger liegen, als die IGFBP-3 Serumspiegel der Tumorpatienten zu ihren Referenzwerten.

Zu erwarten gewesen wäre jedoch eine, im Vergleich zu den Referenzwerten gesunder Kinder, erhöhte IGF-I/IGFBP-3 Ratio, die besagt, dass mehr freies IGF-I zur Rezeptorbindung zur Verfügung steht und somit mitogen wirken kann.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie steht im Einklang mit dem Ergebnis einer Studie, welche die IGF-I/IGFBP-3 Ratio bei einem Tumor der Ewing-Sarkom-Familie untersuchte; sie zeigte bei metastasiertem Tumor eine niedrigere IGF-I/IGFBP-3 Ratio, als bei nicht metastasiertem Tumor [52]. Ebenfalls der Erwartung aus den experimentellen Erkenntnissen entsprechend, zeigten unter diesen Patienten jene mit den höheren IGFBP-3 Spiegeln, bzw. niedrigeren IGF-I

Spiegeln (= niedrige IGF-I/IGFBP-3 Ratio) den Trend zu einer besseren Überlebensrate [52], was sich in der vorliegenden Studie nicht bestätigte: 88% der verstorbenen Patienten zeigen hier bei mindestens der Hälfte ihrer Messwerte eine IGF-I/IGFBP-3 Ratio unter dem 50. Perzentil.
Inzwischen ist bekannt, dass auch IGFBP-6 eine hohe Bindungsaffinität zu IGF-I und vor allem IGF-II besitzt und damit ebenso wie IGFBP-3 Einfluss auf die freie Verfügbarkeit von IGF-I und IGF-II und damit auf ihre mitogenen Eigenschaften nimmt [22]. Das IGF-I/IGFBP-3 Verhältnis ist allein also nicht aussagekräftig genug. IGFBP-6 wurde in der vorliegenden Studie aber mangels eines zuverlässigen Assays nicht gemessen.

4.4 Abhängigkeit der Serumspiegel des IGF-Systems von der Tumormasse

Die Ergebnisse aus früheren Studien, dass einige Tumorzelllinien in der Lage sind, Faktoren des IGF-Systems zu exprimieren [15] [19] [58] [11] [57] und dass bei einzelnen Tumoren eine Korrelation der Serumspiegel der Komponenten des IGF-Systems mit der Tumormasse festgestellt wurde [24], führten zu der Annahme, dass auch in der vorliegenden Arbeit die Tumormasse mit der Höhe der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems korreliert. Um dies zu untersuchen, wurden die Messwerte der Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe beinhaltete Messwerte, bei denen zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei dem Patienten ein makroskopisch sichtbarer Tumor nachweisbar war. Die andere Gruppe beinhaltete die Messwerte von Patienten, die sich in kompletter Remission befanden, d.h. bei denen zum Zeitpunkt der Probeentnahme keine Tumormasse mehr im Körper nachzuweisen war.
Im Vergleich dieser beiden Gruppen zeigten die untersuchten Serumspiegel für IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 keine Unterschiede. Dieses Ergebnis ist bei Betrachtung der Messwerte zwar offensichtlich (Abb.3.4), muss aufgrund der zugrunde liegenden Daten jedoch rein deskriptiv bleiben. Da es sich um eine retrospektive Studie mit Restseren handelt, wurde eine größere Anzahl der Serumproben zu einem Zeitpunkt abgenommen, zu dem bei dem jeweiligen Patienten ein Tumor nachweisbar war, als zu dem Zeitpunkt, als eine komplette

Remission eingetreten war. Viele Patienten haben nie eine komplette Remission erreicht. So kommen beim Vergleich unterschiedliche Gruppengrößen zustande, in die jeweils unterschiedlich viele Messwerte eines Patienten eingehen. Bei dieser Gruppenzusammensetzung dürfen keine statistischen Aussagen über die Werte getroffen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Annahme nicht, dass die Serumspiegel mit der Tumormasse korrelieren. Dies deutet zwar nicht darauf hin, dass die untersuchten Tumoren die Faktoren des IGF-Systems selbst produzieren, schließt es aber auch nicht aus. Die produzierte Menge eines Parameters des IGF-Systems kann so gering sein, dass sie sich nicht auf den gesamten Serumspiegel auswirkt, aber dennoch über autokrine und parakrine Mechanismen in der Lage ist, das Tumorwachstum zu stimulieren. Im Hinblick auf IGF-II kommen hier „Pro“ IGF-II Formen in Betracht, die durch geringere Bindungsaffinität zu den Bindeproteinen eine höhere biologische Wirksamkeit zeigen [14].

Weiterhin wurde bei der Auswertung der Daten in der vorliegenden Studie die Tumorgröße nicht berücksichtigt, von welcher die Menge der möglicherweise produzierten Komponenten des IGF-Systems ebenfalls stark abhängen kann.

Andererseits unterliegen die Serumspiegel der Komponenten des IGF-Systems vielen Einflüssen wie Wachstumshormonkonzentration, Ernährungsstatus, Leber- und Nierenfunktion und Nebenwirkungen der Tumortherapie, die letztlich eine stärkere Auswirkungen auf den Serumspiegel haben können, als die vermehrte Produktion der Parameter selbst.

4.5 Zusammenhang der Serumspiegel des IGF-Systems mit dem Krankheitsverlauf

Da keine Abhängigkeit der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems mit der Tumormasse festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, ob sie eine Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf zeigen.

Hierzu wurden die Patienten der vorliegenden Studie in drei Gruppen mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf eingeteilt und über einen Zeitraum von mehr als 12 Monate beobachtet. Die Gruppen waren 1.) überlebende Patienten, die bis

zum Ende des Beobachtungszeitraumes eine komplette Remission erreicht haben, 2.) überlebende Patienten, bei denen am Ende des Beobachtungszeitraumes ein Tumor makroskopisch identifizierbar war und 3.) Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraumes verstorben waren.

In der Gruppe der überlebenden Patienten, die über den Beobachtungszeitraum eine komplette Remission erreicht haben, zeigten sich die meisten Veränderungen der gemessenen Serumspiegel: ein leichter Anstieg der IGFBP-2 Serumspiegel, ein leichter Abfall der IGFBP-3 Serumspiegel und ein deutlicher Abfall der IGF-II Serumspiegel.

Bei den verstorbenen Patienten stiegen die IGF-II Serumspiegel an. Ansonsten waren keine eindeutigen Veränderungen der Serumspiegel festzustellen. Bei dieser Betrachtungsform fällt vor allem der Gesundheitszustand des Patienten ins Gewicht.

Objektive Daten über Leber- und Nierenfunktion, Wachstumshormonspiegel, Ernährungsstatus oder Ausmaß an weiteren Nebenwirkungen der Therapie wurden in der vorliegenden Studie nicht erhoben. Bei schlechtem Gesundheitszustand mit kataboler Stoffwechsellage, die aufgrund der malignen Erkrankung und der intensiven Therapieblöcke häufig besteht, kann sich eine Resistenz gegenüber Wachstumshormon ausbilden, woraus niedrige Serumspiegel an IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und ALS resultieren [9] [33] [4]. Durch Beeinträchtigung der Leber und der Nierenfunktion mittels der eingesetzten Chemotherapeutika oder direkte Bestrahlung von Körperpartien oder der betroffenen Organe resultiert eine geringere Syntheseleistung der Hauptsyntheseorte für die Komponenten des IGF-Systems [18], was bei schwerer kranken Patienten, bei denen eine intensivere Therapie notwendig wird, stärkere Auswirkungen zeigt, als bei Patienten, die auf die Chemotherapie ansprechen und bei denen es zu einer kompletten Remission der Tumorerkrankung kommt.

Der deutliche Abfall der IGF-II Serumspiegel bei den überlebenden Patienten, die eine komplette Remission während des Beobachtungszeitraums erreichten, spricht aber stark dafür, dass IGF-II durch den Tumor selbst produziert wird. Daher sind auch erhöhte IGF-II Serumspiegel bei Vorliegen eines Tumors zu messen und diese Spiegel sind bei Eintreten einer Remission rückläufig. Die-

ses Ergebnis stünde mit den anfangs zitierten Studien, die für eine Produktion von IGF-II durch den Tumor selbst sprechen [10] [11] [51] [58] im Einklang. Es widerspricht jedoch den unter Punkt 3.1 und 3.4 erhobenen Ergebnissen der vorliegenden Studie. Dort wurden niedrigere IGF-II Serumspiegel bei erkrankten Kindern im Vergleich zur Referenzgruppe gemessen und bei den stark erniedrigten Werten (< 5. Perzentil) keine Abhängigkeit der Serumspiegel vom Tumorstatus gesehen. Weiterhin muss beachtet werden, dass der Abfall der IGF-II Serumspiegel, der unter Punkt 3.5 gemessen wurde, von anfangs schon niedrigen IGF-II Serumspiegeln ausgeht. Es kann also nicht von einer Normalisierung der Werte gesprochen werden.

Der bei den verstorbenen Patienten auftretende Anstieg der IGF-II Serumspiegel über den Beobachtungszeitraum kann bei angenommenem Wachstum des Tumors, damit einhergehender Verschlechterung des Gesundheitszustandes und schließlich Tod des Patienten ebenfalls als Anzeichen für eine Produktion von IGF-II durch den Tumor gesehen werden. Doch auch hier muss beachtet werden, dass bereits zu Beginn der Messung niedrige und nicht erhöhte IGF-II Serumspiegel vorlagen und es im Verlauf eher zu einer Normalisierung als zu einem tatsächlichen Anstieg der Serumspiegel für IGF-II kommt. Eine Abhängigkeit der IGF-II Serumspiegel vom Wachstum des Tumors ist also sehr wenig wahrscheinlich.

Eine Abhängigkeit der IGF-II Serumspiegel vom Gesundheitszustand der Patienten ist nicht anzunehmen, da sich bei besserer Organ- und somit Synthesefunktion für IGF-II, ausgeglichenerem Wachstumshormonspiegel und besserem Ernährungsstatus eine Normalisierung der IGF-II Serumspiegel bei den überlebenden Patienten, die eine komplette Remission erreicht haben, einstellen müsste und sich ein Abfall der IGF-II Serumspiegel bei den verstorbenen Patienten zeigen müsste. Dies ist in der vorliegenden Studie genau umgekehrt der Fall.

Der leichte Abfall der IGFBP-3 Serumspiegel bei überlebenden Patienten, die während des Beobachtungszeitraums eine komplette Remission erreicht haben, steht im Widerspruch zu den aus früheren Studien gewonnenen Kenntnissen, die zeigten, dass bei Vorliegen einer Tumorerkrankung erniedrigte IGFBP-

3 Serumspiegel gemessen wurden und dass hohe IGFBP-3 Serumspiegel eventuell sogar vor einer Tumorerkrankung schützen können [28] [38] [39] [7] [40]. Unter Punkt 3.1 wurden bei dem vorliegenden Patientenkollektiv insgesamt niedrigere IGFBP-3 Serumspiegel als bei der Referenzgruppe gemessen. Ein weiterer Abfall der schon zu Beginn des Beobachtungszeitraums niedrigen IGFBP-3 Serumspiegel bei den überlebenden Patienten, die eine komplette Remission erreichten (also vermutlich im Verlauf zu einem besseren Gesundheitszustand gelangten) spricht also weder für den angenommenen Zusammenhang der niedrigen IGFBP-3 Serumspiegel bei Vorliegen eines Tumors, noch für den wesentlichen Einfluss des Gesundheitszustandes auf die IGFBP-3 Serumspiegel.

Der leichte Anstieg der IGFBP-2 Serumspiegel bei überlebenden Patienten, die über den Beobachtungszeitraum eine komplette Remission erreichten, widerspricht ebenfalls den an früherer Stelle bereits zitierten Studien [15] [46], die zeigen konnten, dass IGFBP-2 vom Tumor selbst produziert wird und widerspricht auch der Kenntnis, dass sich in vereinzelten Studien sogar eine positive Korrelation der IGFBP-2 Serumspiegel mit der Tumormasse zeigten [8] [28] [47]. Dieses Ergebnis widerspricht auch den zuvor unter Punkt 3.4 und Punkt 3.1 gewonnenen Ergebnissen der vorliegenden Studie, in der sich zwar keine positive Korrelation der IGFBP-2 Serumspiegel mit der Tumormasse zeigte, jedoch deutlich höhere IGFBP-2 Serumspiegel bei den erkrankten Patienten im Vergleich zu der gesunden Referenzgruppe festzustellen waren.

Der Anstieg der IGFBP-2 Serumspiegel könnte hier mit dem besseren Gesundheitszustand der Patienten, bei dem auch eine bessere Syntheseleistung für IGFBP-2 zu erwarten ist, erklärt werden.

Die unter Punkt 3.5 gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Studie können somit weder eindeutig die Theorie bestätigen, dass die Serumspiegel von der Produktion durch den Tumor selbst messbar beeinflusst werden, noch können sie eindeutig die Theorie bestätigen, dass sie im Wesentlichen vom Gesundheitszustand des Patienten abhängen.

4.6 Einzelverläufe pädiatrischer Tumorpatienten

Um die unterschiedlichen Entwicklungen der Serumspiegel der gemessenen Parameter an Beispielen zu beobachten, wurden vier Patienten ausgewählt, von denen jeweils ein verstorbener und ein überlebender Patient mit gleicher Tumorart verglichen wurden.

IGF-I: Bei beiden Patienten mit eRMS lagen alle Messwerte für IGF-I, wie aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse von Punkt 3.1 erwartet, unter den Referenzwerten.

Zunächst glichen sie sich von niedrigen Werten ausgehend den Referenzwerten an, was möglicherweise durch eine Besserung des Gesundheitszustandes erklärbar ist. Der massive Abfall des IGF-I Serumspiegels bei dem verstorbenen Patienten vom vorletzten Messwert, wo ein Rezidiv festgestellt wurde, zum letzten Messwert, spricht für die Theorie, dass es zu einem Abfall der IGF-I Serumspiegel durch eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes und nicht zu einem Anstieg der IGF-I Serumspiegel durch Tumorwachstum kommt. Dieser Trend wurde bei der Betrachtung der gesamten Gruppe der verstorbenen Patienten unter Punkt 3.5 nicht beobachtet. Hier zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der IGF-I Serumspiegel in Abhängigkeit des Verlaufs der Tumorerkrankung. Für an eRMS verstorbenen Patienten wurden unter Punkt 3.1 jedoch besonders häufig niedrige IGF-I Serumspiegel gesehen. Insofern passt der Verlauf der IGF-I Serumspiegel (<5. Perzentil) des verstorbenen Patienten zu der zuvor gewonnenen Erkenntnis von Punkt 3.1.

Für die beiden Patientinnen, die an einem PNET erkrankt sind, zeigte sich ein anderes Bild. Bei der überlebenden Patientin mit kompletter Remission stieg der IGF-I Serumspiegel beim letzten Wert steil an, bei der verstorbenen Patientin fiel der IGF-I Serumspiegel zunächst deutlich unter die Referenzwerte ab und näherte sich beim letzten gemessenen Wert wieder den Referenzwerten. Der initiale Abfall und die weiterhin niedrigen IGF-I Serumspiegel bei der verstorbenen Patientin sind auch hier mit einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes und geringerer IGF-I Produktion vor allem durch die Leber erklärbar. Für an PNET verstorbene Patienten wurden unter Punkt 3.1 ebenfalls besonders häufig niedrige IGF-I Serumspiegel (<5. Perzentil) gemessen. Der

steile Anstieg des IGF-I Serumspiegels der überlebenden Patientin beim letzten gemessenen Wert über die Referenzwerte hinaus ist so jedoch nicht erklärbar.

IGF-II: Für die IGF-II Werte des an eRMS erkrankten überlebenden Patienten wurde zunächst ein steiler Anstieg der Serumspiegel beobachtet. Im Verlauf wurde, wie für die IGF-I Serumspiegel eine Annäherung der Werte an die Referenzwerte gesehen.

Bei dem verstorbenen Patienten zeigte sich zunächst ebenfalls ein Anstieg der IGF-II Serumspiegel, dann aber, kurz nachdem ein Rezidiv festgestellt wurde, ein massiver Abfall der Werte. Diese Entwicklung der gemessenen Serumspiegel passt zu der Aussage früherer Studien, in denen bei Vorliegen einer Tumorerkrankung erniedrigte IGF-II Serumspiegel gemessen wurden [38] [39] und könnte mit dem Einfluss des schlechteren Gesundheitszustandes erklärbar sein. Eine vermehrte Produktion von IGF-II durch den Tumor liegt hier nicht messbar vor. Diese Beobachtung widerspricht den vorangegangenen Ergebnissen von Punkt 3.5, wo sich bei der Gruppe aller an verschiedenen Tumorerkrankungen verstorbenen Patienten ein Anstieg der IGF-II Serumspiegel im zeitlichen Verlauf zeigte. Für an eRMS erkrankten Patienten wurde unter Punkt 3.1 bei den besonders niedrigen IGF-II Serumspiegeln (<5. Perzentil) kein wesentlicher Unterschied für verstorbene oder überlebende Patienten gesehen.

Ähnlich wie bei dem an eRMS erkrankten überlebenden Patienten näherte sich der IGF-II Serumspiegel der an einem PNET erkrankten überlebenden Patientin den Referenzwerten im Verlauf an. Bei dieser Patientin zeigten sich auch schon hohe Ausgangswerte. Bei der an PNET erkrankten und verstorbenen Patientin zeigten sich sehr uneinheitliche Werte für die IGF-II Serumspiegel, so dass hier keine Aussage über ihre Entwicklung gemacht werden kann. Der letzte gemessene Wert zeigte einen deutlichen Anstieg des IGF-II Serumspiegels. Ginge man davon aus, dass sich dieser Trend fortsetzt, würde dies zu den unter Punkt 3.5 gewonnenen Erkenntnissen passen und könnte eventuell durch IGF-II Produktion durch den Tumor verursacht sein. Unter Punkt 3.1 wurden für an PNET erkrankten und verstorbenen Patienten jedoch widersprüchlich dazu häufiger niedrige IGF-II Serumspiegel (< 5. Perzentil) gemessen als bei überlebenden Patienten.

IGFBP-2: Für den an eRMS erkrankten und überlebenden Patienten wurden zunächst von hohen Ausgangswerten der IGFBP-2 Serumspiegel steil abfallende Werte, bis unter die Referenzwerte, gemessen. Beim letzten Messwert zeigte sich wieder eine Annäherung an die Referenzwerte.

Bei dem verstorbenen Patienten zeigte sich von zunächst niedrigen Ausgangswerten bei Eintreten des Rezidivs ein steiler Anstieg der IGFBP-2 Serumspiegel über die Referenzwerte.

Dieser Anstieg der IGFBP-2 Serumspiegel im zeitlichen Verlauf wurde bei der Gruppe aller an verschiedenen Tumorerkrankungen verstorbenen Patienten nicht beobachtet. Unter Punkt 3.5 ließen sich keine wesentlichen Veränderungen der IGFBP-2 Serumspiegel in Abhängigkeit des Verlaufs der Erkrankung feststellen. Speziell für eRMS wurden unter Punkt 3.1 jedoch etwas häufiger erhöhte IGFBP-2 Serumspiegel (> 95. Perzentil) gemessen. Bei Vorliegen eines eRMS könnten die erhöhten IGFBP-2 Serumspiegel also mit einer Produktion durch den Tumor erklärbar sein.

Bei der an einem PNET erkrankten überlebenden Patientin kam es, bei zunächst im Bereich der Referenzwerte liegenden IGFBP-2 Serumspiegeln, beim letzten Messwert zu einem steilen Abfall des IGFBP-2 Serumspiegels. Bei der an einem PNET erkrankten verstorbenen Patientin fallen die IGFBP-2 Serumspiegel im Verlauf ebenfalls, aber nur leicht, ab. Hier liegt also keine messbare Produktion von IGFBP-2 durch den Tumor vor. Für an PNET erkrankte und verstorbene Patienten wurden unter Punkt 3.1 ebenfalls nicht wesentlich häufiger erhöhte IGFBP-2 Serumspiegel (> 95. Perzentil) gemessen als bei an PNET erkrankten überlebenden Patienten. Für einen wesentlichen Einfluss des Gesundheitszustandes sprechen die Verläufe dieser beiden Patienten somit ebenfalls nicht.

IGFBP-3: Bei dem an einem eRMS erkrankten überlebenden Patienten wurde bei einem Messwert ein Abfall der IGFBP-3 Serumspiegel beobachtet, die Werte glichen sich jedoch rasch wieder den Referenzwerten an. Dieser Verlauf entspricht dem unter Punkt 3.5 gewonnenen Ergebnis. Hier wurde ebenfalls kein wesentlicher Anstieg oder Abfall der IGFBP-3 Serumspiegel für überlebende

Patienten mit bis zum Ende des Beobachtungszeitraums fortbestehendem makroskopisch identifizierbarem Tumor beobachtet.

Für den an einem eRMS erkrankten verstorbenen Patienten wurde von anfangs schon niedrigen Ausgangswerten ein steiler Abfall der IGFBP-3 Serumspiegel gemessen. Diesmal trat der Abfall der Serumspiegel schon bei Messwert drei, also vor dem Feststellen des Rezidivs ein. Unter Punkt 3.5 wurde keine wesentliche Änderung der IGFBP-3 Serumspiegel im zeitlichen Verlauf für alle an unterschiedlichen Tumoren verstorbenen Patienten gemessen. Speziell für eRMS zeigten sich aber unter Punkt 3.1 besonders häufig niedrige IGFBP-3 Serumspiegel (< 5. Perzentil).

Bei der an einem PNET erkrankten überlebenden Patientin bewegten sich die gemessenen Werte der IGFBP-3 Serumspiegel im Bereich der Referenzwerte. Es war kein nennenswerter Anstieg oder Abfall zu verzeichnen. Bei der an einem PNET erkrankten verstorbenen Patientin liegen alle gemessenen Werte der IGFBP-3 Serumspiegel deutlich unter den Referenzwerten, ebenfalls ohne nennenswerten Anstieg oder Abfall. Unter Punkt 3.1 wurden auch für an PNET erkrankte und verstorbene Patienten besonders häufig niedrige IGFBP-3 Serumspiegel gemessen.

Die Werte der IGFBP-3 Serumspiegel der unter Punkt 3.6 beobachteten Patienten stimmen mit den in vorhergehenden Studien gewonnenen Erkenntnissen überein, dass bei Vorliegen einer Tumorerkrankung häufig niedrige IGFBP-3 Serumspiegel gemessen werden [38] [39] [28] [7].

5 Schlussfolgerungen

1.)

Die bei Kindern mit soliden Tumoren gemessenen Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems (IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS) weichen von den altersentsprechenden Referenzwerten gesunder Kinder ab.
IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und ALS Serumspiegel liegen niedriger als die Referenzwerte, IGFBP-2 Serumspiegel liegen höher als die Referenzwerte. Dieses Muster zeigte sich einheitlich für die einzeln ausgewerteten Tumortypen eRMS, aRMS, PNET und Neuroblastom. Dies spricht gegen eine Produktion an bedeutenden Mengen von IGF-I oder IGF-II, wohl aber von IGFBP-2 durch solide Tumoren.

2.)

Die ermittelten Korrelationen zeigten die bereits bekannten Zusammenhänge der Parameter des IGF-Systems im Serum: positive Korrelation von IGF-I und IGF-II, IGF-I und IGFBP-3 und negative Korrelation von IGF-I und IGFBP-2, IGF-II und IGFBP-2 und IGFBP-2 und IGFBP-3. Dies spricht für die weiterhin funktionierende Regulation durch das hypophysär ausgeschüttete Wachstumshormon. Durch das Vorliegen einer Tumorerkrankung kam es zu keiner Änderung dieses Zusammenspiels.

3.)

Es wurden anhand des molekularen Verhältnisses keine erhöhten Mengen an freiem und damit mitogen wirksamen IGF-I nachgewiesen.

4.)

Bei der Gesamtheit der Patienten zeigten die Serumspiegel der Parameter des IGF- Systems keinen direkten Zusammenhang mit der Tumormasse. Bei Patienten mit nachweisbarer Tumormasse lagen keine höheren Serumspiegel der

Parameter des IGF-Systems vor als bei Patienten ohne nachweisbare Tumormasse.

5.)

Bei der Einzelauswertung der Tumortypen eRMS, aRMS, PNET und Neuroblastom zeigten sich uneinheitliche und zum Teil gegensätzliche Abhängigkeiten der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems in Abhängigkeit von der Tumormasse, was der Grund dafür sein kann, dass bei der Gesamtheit der Patienten mit unterschiedlichen Tumoren keine Abhängigkeit der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems von der Tumormasse festgestellt werden kann.

6.)

Bei verstorbenen Patienten wurden besonders häufig niedrige IGF-I und IGFBP-3 Serumspiegel gemessen, was für eine Abhängigkeit dieser beiden Serumspiegel von der Schwere der Erkrankung spricht.

7.)

Die Veränderungen der Serumspiegel der gemessenen Parameter über den Zeitraum von länger als 12 Monaten ließen sich jedoch weder durch wesentlichen Einfluss des Gesundheitszustandes der Patienten noch durch Produktion der Parameter durch den Tumor erklären.

8.)

Bei Betrachtung der Einzelverläufe zweier an eRMS und PNET erkrankten Patienten bestätigten sich die zuvor gewonnen Erkenntnisse, dass IGF-I und IGF-II nicht in Mengen produziert wurden, welche im Serum messbar waren und dass, wie häufig bei anderen Tumorerkrankungen, erniedrigte IGFBP-3 Serumspiegel auftreten. Niedrige IGF-I und IGF-II Serumspiegel scheinen in einem direkten Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung zu stehen. Eine Pro-

duktion von IGFBP-2 durch den Tumor scheint bei eRMS vorzuliegen, bei PNET bestätigte sich diese Annahme nicht.

9.)

Die Regulierung der Serumspiegel des IGF-Systems ist sehr komplex und hängt von vielen verschieden Faktoren ab. Sie ist bei den verschiedenen soliden Tumoren nicht einheitlich.

Die Heterogenität und geringe Größe der untersuchten Gruppe, bzw. der Untergruppen, ließ aber keine statistische Auswertung der Ergebnisse zu.

Um eine genauere und repräsentative Aussage über die Veränderungen der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems bei Erkrankungen an soliden Tumoren im Kindesalter treffen zu können, müssten die verschiedenen Tumortypen gesondert und bei größerer Gruppengröße untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Da die Parameter des IGF-Systems eine Schlüsselrolle bei essentiellen Zellfunktionen spielen, sind sie auf der Zellebene eng mit der Entstehung von Krebs verknüpft. Tumorzellen produzieren Parameter des IGF-Systems häufig in veränderter Menge, was sich in Veränderungen der Serumspiegel dieser Parameter im Vergleich zu den Referenzbereichen gesunder Population wiederspiegelt. In dieser Studie wurden die Serumspiegel von IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und ALS bei Kindern, die an soliden malignen Tumoren erkrankt sind, gemessen und mit Referenzwerten gesunder Kinder verglichen. Diese sind die im Serum am stärksten vertretenen Komponenten des IGF-Systems. Hier wurde festgestellt, dass die Serumspiegel an IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 und ALS niedriger und die IGFBP-2 Serumspiegel deutlich höher als die altersentsprechenden Referenzwerte lagen. Bei Kindern, die an einem Neuroblastom erkrankt waren, fielen im Vergleich zu Kindern mit anderen soliden malignen Tumoren besonders die niedrigen IGF-I, IGF-II und hohen IGFBP-2 Spiegel auf. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine mögliche Produktion von IGF-I und IGF-II durch den Tumor. Für IGFBP-2 kann eine vermehrte Produktion durch den Tumor aufgrund der erhöhten Serumspiegel aber angenommen werden.

Bei den meisten Tumortypen fielen erhöhte IGFBP-2 Serumspiegel bei Vorliegen eines makroskopisch nachweisbaren Tumors auf, außer bei aRMS. In der Gesamtbetrachtung der Gruppen zeigte sich jedoch keine Abhängigkeit der Serumspiegel der Komponenten des IGF-Systems von der Tumormasse. Zu diesem Ergebnis kann es durch gegensätzliche Veränderungen der Serumspiegel des IGF-Systems bei den verschiedenen Tumortypen kommen.

Bei Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorben sind, wurden unabhängig vom Tumortyp besonders häufig niedrige IGF-I, IGF-II und IGFBP-3 Serumspiegel, nicht aber erhöhte IGFBP-2 Serumspiegel beobachtet, was für eine Abhängigkeit der Serumspiegel von der Schwere der Erkrankung spricht. Diese Abhängigkeit konnte in der anschließenden Betrachtung der Entwicklung der Serumspiegel des IGF-Systems über einen längeren Zeitraum leider nicht bestätigt werden.

Diese Veränderungen der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems sind bei den untersuchten Tumortypen nicht einheitlich. Da die Gruppengröße der einzelnen Tumortypen relativ klein war, können in dieser Studie nur Trends beschrieben, aber keine repräsentative Aussage abgeleitet werden. Weitere Studien mit größeren Patientengruppen sind zur Aufklärung der Veränderungen der Serumspiegel der Parameter des IGF-Systems bei den verschiedenen soliden malignen Tumorerkrankungen im Kindesalter notwendig.

7 Anhang

7.1 Puffer, Lösungen und Antikörper

Radioimmunoassay

Puffer zur Ansäuerung der Zellüberstände

0,5 M Ortho-Phosphorsäure

1% BSA1

1% Triton X-100

0,1% NaN_3

1 mM PMSF

Assaypuffer

0,05 M Natriumphosphat (7,1g/l Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1,35 g/l NaH_2PO_4 x H_2O)

0,1 M NaCl (5,83 g/l)

0,05% NaN_3

0,2% fettsäurefreies BSA

0,1% Triton X-100

pH = 7,4 (mit NaOH eingestellt)

Puffer A

20 mM Phosphatpuffer, pH = 2,8 (mit konz. HCl eingestellt)

2,5926 mM Ortho-Phosphorsäure

16,409 mM NaH_2PO_4 x H_2O

5 mM EDTA

120 mM NaCl

0,02% NaN_3

0,2% BSA fettfrei

0,1% Triton X-100

Puffer B

100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,8

75,55 mM $Na_2 HPO_4 \times 2H_2O$

24,45 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$

40 mM NaCl

0,02% NaN_3

0,2% BSA fettfrei

0,1% Triton X-100

4℃ kaltes deionisiertes Wasser

4% Polyethylenglycol 6000

IgG: Kaninchen-Gammaglobulinlösung: 50 mg Lyophylisat/10 ml Assaypuffer (wird zur unspezifischen Bindung 1:100 eingesetzt)

1. Antikörper: polyklonal, aus Kaninchen, durch Immunisierung mit rekombinantem IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 bzw. IGFBP-3 gewonnen.

2. Antikörper: polyklonal, Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum 1:160 mit 4℃ kaltem 4% Polyethylenglycol 6000-Lösung ver dünnt (frisch hergestellt)

Die rekombinanten humanen Proteine IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und IGFBP-3 wurden von der Firma Mediagnost (Reutlingen, Deutschland) bezogen.

ALS-ELISA

Anti-ALS-IgG beschichtete Mikrotiterplatten

Total-ALS-Standards (A-F), lyophilisiert

Total-ALS-Kontrollen, lyophilisiert

ALS-Assaypuffer

Total-ALS-Antikörper-Enzym-Konjugat, an Meerrettichperoxidase gekoppelt, in Proteinpuffer (BSA) und Konservierungsmittel

TMB-Chromogen-Lösung:Mischung aus Tetramethylbenzidin (TMB) in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid

Waschkonzentrat: gepufferte NaCl-Lösung mit einem nichtionischen Detergenz

ALS-Probenpuffer

Stopp-Lösung: 0,2 M Schwefelsäure

7.2 Geräte

Vortex-Mixer: Multi-Tube-Vortexer (Baxter Scientific Products)
Pipettiermaschine: Hamilton Microlab 2200 (Hamilton Company)
Zentrifuge: Rotixa 50 RS (Hettich)
Gammacounter: LB 2111 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG)
ELISA-Reader: Mikroplatten Reader MRX-II (Dynex Technology)

7.3 Verwendete Abkürzungen

ALS	Acid Labile Subunit
aRMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
eRMS	embryonales Rhabdomyosarkom
CR	Complete Remission
CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studie
EDTA	Ethylendiamintertraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HDC	Hochdosis Chemotherapie
hGH	human Growth Hormone
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IGF-I-R	Insulin.like Growth Factor-I-Rezeptor
IGF-II-R	Insulin-like Growth Factor-II-Rezeptor
KMT	Knochenmark Transplantation
LOH	Loss of Heterozygosity
LOI	Loss of Imprinting
makroskop. Tumor	makroskopischer Tumor
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NSB	Non Specifc Binding
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PEG	Polyethylenglykol
PR	Partial Remission
r	Korrelationskoeffizient
R	Bestimmtheitsmaß
SDS	Standard Deviation Score
VGPR	Very Good Partial Remission
WT1, WT2	Wilms-Tumor Gen 1,2

8 Literaturnachweise

1 Barreca A PP, Arvigo A, Voci A, Giordano G, Minuto F (1995). "Functions and regulation of the acid-labile subunit of the 150 K complex." Prog Growth Factor Res **6**(2-4): 231-9.

2 Birkebaek NH, Fisker S, Clausen N, Tuovinen V, Sindet-Pedersen S and Christiansen JS (1998). "Growth and endocrinological disorders up to 21 years after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood." Med Pediatr Oncol **30**(6): 351-6.

3 Blum WF and Ranke MB (1990). "Use of insulin-like growth factor-binding protein 3 for the evaluation of growth disorders." Horm Res **33 Suppl 4**: 31-7.

4 Brennan BM, Gill M, Pennells L, Eden OB, Thomas AG and Clayton PE (1999). "Insulin-like growth factor I, IGF binding protein 3, and IGFBP protease activity: relation to anthropometric indices in solid tumours or leukaemia." Arch Dis Child **80**(3): 226-30.

5 Bunn RC and Fowlkes JL (2003). "Insulin-like growth factor binding protein proteolysis." Trends Endocrinol Metab **14**(4): 176-81.

6 Camacho-Hubner C (2000). "Insulin-like growth factor-binding proteins and neoplasia: an overview." Growth Horm IGF Res **10 Suppl A**: S14-5.

7 Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann P, Gaziano JM, Pollak M and Giovannucci E (2002). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer." J Natl Cancer Inst **94**(14): 1099-106.

8 Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR and Rosenfeld RG (1993). "Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients." J Clin Endocrinol Metab **76**(4): 1031-5.

9 Dai J and Baxter RC (1994). "Regulation in vivo of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex." Endocrinology **135**(6): 2335-41.

10 El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH and Helman LJ (1990). "Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors." Cell Growth Differ **1**(7): 325-31.

11 El-Badry OM, Romanus JA, Helman LJ, Cooper MJ, Rechler MM and Israel MA (1989). "Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II." J Clin Invest **84**(3): 829-39.

12 Elmlinger MW, Bell M, Schuett BS, Langkamp M, Kutoh E and Ranke MB (2001). "Transactivation of the IGFBP-2 promoter in human tumor cell lines." Mol Cell Endocrinol **175**(1-2): 211-8.

13 Elmlinger M (2002). Die erhöhte Expression des Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 in Tumoren: Molekulare Ursache, IGF-unabhängige Wirkung über Integrine und klinische Bedeutung. Habilitation, Eberhardt-Karls Universität Tübingen.

14 Elmlinger MW, Rauschnabel U, Koscielniak E, Weber K and Ranke MB (1999). "Secretion of noncomplexed 'Big' (10-18 kD) forms of insulin-like growth factor-II by 12 soft tissue sarcoma cell lines." Horm Res **52**(4): 178-85.

15 Elmlinger MW, Wimmer K, Biemer E, Blum WF, Ranke MB and Dannecker GE (1996). "Insulin-like growth factor binding protein 2 is differentially expressed in leukaemic B- and T-cell lines." Growth Regul **6**(3): 152-7.

16 Excel HiM (Version 2000). Microsoft Corporation 1985-2000.

17 Frommer KW, Reichenmüller K, Hoeflich A, Ranke MB, Schuett BS, Dock G and Elmlinger MW (2006). "Direct Pro-Apoptotic Effects of IGFBP-2 on the Human Breast Cancer Cell Line Hs578T."

18 Gesellschaft fü Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (2002). "Protokoll der CWS (Cooperrative Weichteilsarkom Studie)."

19 Grellier P, De Galle B and Babajko S (1998). "Expression of insulin-like growth factor-binding protein 6 complementary DNA alters neuroblastoma cell growth." Cancer Res **58**(8): 1670-6.

20 Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE and Pollak M (1998). "Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer." Lancet **351**(9113): 1393-6.

21 Harms V (1998). "Biomathematik, Statistik und Dokumentation." 7. Aufl., Harms-Verlag, Kiel.

22 Headey SJ, Leeding KS, Norton RS and Bach LA (2004). "Contributions of the N- and C-terminal domains of IGF binding protein-6 to IGF binding." J Mol Endocrinol **33**(2): 377-86.

23 Hoflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H and Wolf E (1998). "Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines." FEBS Lett **434**(3): 329-34.

24 Holdaway IM, Lethaby AE, Mason BH, Singh V, Harman JE, MacCormick M and Civil ID (2001). "Effect of breast surgery on serum levels of insulin-like growth factors (IGF-I, IGF-II, and IGF binding protein-3) in women with benign and malignant breast lesions." Ann Surg Oncol **8**(1): 25-31.

25 Holly JM, Gunnell DJ and Davey Smith G (1999). "Growth hormone, IGF-I and cancer. Less intervention to avoid cancer? More intervention to prevent cancer?" J Endocrinol **162**(3): 321-30.

26 Juul A, Moller S, Mosfeldt-Laursen E, Rasmussen MH, Scheike T, Pedersen SA, Kastrup KW, Yu H, Mistry J, Rasmussen S, Muller J, Henriksen J and Skakkebaek NE (1998). "The acid-labile subunit of human ternary insulin-like growth factor binding protein complex in serum: hepatosplanchnic release, diurnal variation, circulating concentrations in healthy subjects, and diagnostic use in patients with growth hormone deficiency." J Clin Endocrinol Metab **83**(12): 4408-15.

27 Kaatsch P and Spix C Deutsches Kinderkrebsregister.

28 Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B and Karasik A (1993). "Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen." J Clin Endocrinol Metab **77**(1): 229-33.

29 Kiess W, Koepf G, Christiansen H and Blum WF (1997). "Human neuroblastoma cells use either insulin-like growth factor-I or insulin-like growth factor-II in an autocrine pathway via the IGF-I receptor: variability of IGF, IGF binding protein (IGFBP) and IGF receptor gene expression and IGF and IGFBP secretion in human neuroblastoma cells in relation to cellular proliferation." Regul Pept **72**(1): 19-29.

30 Korner C, Nurnberg B, Uhde M and Braulke T (1995). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains." J Biol Chem **270**(1): 287-95.

31 Koscielniak E, Morgan M and Treuner J (2002). "Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management." Paediatr Drugs **4**(1): 21-28.

32 Lee DY, Kim SJ and Lee YC (1999). "Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients." J Korean Med Sci **14**(4): 401-4.

33 LeRoith D, Baserga R, Helman L and Roberts CT, Jr. (1995). "Insulin-like growth factors and cancer." Ann Intern Med **122**(1): 54-9.

34 London SJ, Yuan JM, Travlos GS, Gao YT, Wilson RE, Ross RK and Yu MC (2002). "Insulin-like growth factor I, IGF-binding protein 3, and lung cancer risk in a prospective study of men in China." J Natl Cancer Inst **94**(10): 749-54.

35 Menouny M, Binoux M and Babajko S (1998). "IGFBP-2 expression in a human cell line is associated with increased IGFBP-3 proteolysis, decreased IGFBP-1 expression and increased tumorigenicity." Int J Cancer **77**(6): 874-9.

36 Mertens F, Mandahl N, Mitelman F and Heim S (1994). "Cytogenetic analysis in the examination of solid tumors in children." Pediatr Hematol Oncol **11**(4): 361-77.

37 Minniti CP, Tsokos M, Newton WA, Jr. and Helman LJ (1994). "Specific expression of insulin-like growth factor-II in rhabdomyosarcoma tumor cells." Am J Clin Pathol **101**(2): 198-203.

38 Mohnike K, Kluba U, Blum WF, Aumann V, Vorwerk P and Mittler U (1995). "[Serum concentrations of insulin-like growth factors (IGF)-I and IGF-II and IGF binding proteins (IGFBP)-2 and IGFBP-3 in 49 children with ALL, NHL or solid tumors]." Klin Padiatr **207**(4): 225-9.

39 Mohnike KL, Kluba U, Mittler U, Aumann V, Vorwerk P and Blum WF (1996). "Serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and insulin-like growth factor binding proteins -2 and -3 in children with acute lymphoblastic leukaemia." Eur J Pediatr **155**(2): 81-6.

40 Petridou E, Dessypris N, Spanos E, Mantzoros C, Skalkidou A, Kalmanti M, Koliouskas D, Kosmidis H, Panagiotou JP, Piperopoulou F, Tzortzatou F and Trichopoulos D (1999). "Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 in relation to childhood leukaemia." Int J Cancer **80**(4): 494-6.

41 Rajah R, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T and Cohen P (1995). "Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth." Prog Growth Factor Res **6**(2-4): 273-84.

42 Rajah R, Lee KW and Cohen P (2002). "Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation." Cell Growth Differ **13**(4): 163-71.

43 Rajah R, Valentinis B and Cohen P (1997). "Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism." J Biol Chem **272**(18): 12181-8.

44 Ranke MB and Elmlinger M (1997). "Functional role of insulin-like growth factor binding proteins." Horm Res **48 Suppl 4**: 9-15.

45 Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW and Flehmig B (2003). "Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma." Horm Res **60**(4): 174-80.

46 Reeve JG, Kirby LB, Brinkman A, Hughes SA, Schwander J and Bleehen NM (1992). "Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines." Int J Cancer **51**(5): 818-21.

47 Renehan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM and O'Dwyer ST (2000). "Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer." Br J Cancer **83**(10): 1344-50.

48 Schmiegelow M, Lassen S, Poulsen HS, Feldt-Rasmussen U, Schmiegelow K, Hertz H and Muller J (2000). "Cranial radiotherapy of childhood brain tumours: growth hormone deficiency and its relation to the biological effective dose of irradiation in a large population based study." Clin Endocrinol (Oxf) **53**(2): 191-7.

49 Schuett BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB and Elmlinger M (2004). "Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells." Journal of Molecular Endocrinology **32**: 859-868.

50 Schweizer R (1998). Insulin-like Growth Factor-Binding-Protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, IGF-I und IGF-II bei Wachstumshormonmangel und Ullrich-Tuner-Syndrom, vor und während der Therapie mit Wachstumshormon (WH). Universitäts-Kinderklinik Tübingen. Tübingen, Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.

51 Scott J, Cowell J, Robertson ME, Priestley LM, Wadey R, Hopkins B, Pritchard J, Bell GI, Rall LB, Graham CF and et al. (1985). "Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumour and embryonic tissues." Nature **317**(6034): 260-2.

52 Toretsky JA, Steinberg SM, Thakar M, Counts D and Pironis B (2001). "Insulin-like Growth Factor Type 1 (IGF-I) and IGF Binding Protein-3 in Patients with Ewing Sarcoma Family Tumors." American Society of Clinical Oncology Annual Meeting.

53 Twigg SM and Baxter RC (1998). "Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit." J Biol Chem **273**(11): 6074-9.

54 Visser M, Sijmons C, Bras J, Arceci RJ, Godfried M, Valentijn LJ, Voute PA and Baas F (1997). "Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma." Oncogene **15**(11): 1309-14.

55 Werner H, Shen-Orr Z, Rauscher FJ, 3rd, Morris JF, Roberts CT, Jr. and LeRoith D (1995). "Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with suppression of insulin-like growth factor I receptor gene expression." Mol Cell Biol **15**(7): 3516-22.

56 Yee D (1994). "The insulin-like growth factor system as a target in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **32**(1): 85-95.

57 Yee D, Favoni RE, Lebovic GS, Lombana F, Powell DR, Reynolds CP and Rosen N (1990). "Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor." J Clin Invest **86**(6): 1806-14.

58 Yun K (1992). "A new marker for rhabdomyosarcoma. Insulin-like growth factor II." Lab Invest **67**(5): 653-64.

59 Yun K (1998). "Genomic imprinting and carcinogenesis." Histol Histopathol **13**(2): 425-35.

60 Zhan S, Shapiro DN and Helman LJ (1994). "Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma." J Clin Invest **94**(1): 445-8.

61 Zumkeller W, Schwander J, Mitchell CD, Morrell DJ, Schofield PN and Preece MA (1993). "Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in the plasma of children with Wilms' tumour." Eur J Cancer **29A**(14): 1973-7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die durch ihre Hilfe zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Professor Ranke für die Überlassung des Themas.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Professor Koscielniak, für die Bereitstellung der Proben und Daten und inhaltliche Diskussion.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Martin Elmlinger für seine gute Betreuung mit anregender Diskussion hinsichtlich aller Fragen und Probleme zu jeder Zeit.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Dr. Roland Schweizer für seine geduldige Bereitschaft vor allem bei Computerproblemen aller Art eine Lösung zu finden.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des endokrinologischen Labors, vor allem bei Karin Weber, für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken, die mich sehr nett in ihre Gemeinschaft aufgenommen haben und mich in die Labormethoden einarbeiteten.

Ich danke meinen Eltern und meinen Freunden, für ihre unermüdliche moralische und praktische Unterstützung, die wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.
Ein ganz besonderer Dank geht an Andi für seine unendliche Geduld.

Lebenslauf

Katrin Martin

Geburtstag:	31.01.1976
Geburtsort:	Böblingen
Schulbildung:	1982-1986 Grundschule Waldenbuch
	1986-1995 Geschwister-Scholl Gymnasium Tübingen
	1993 Amador-Valley High School Californien
	1995 Abitur
Studium:	Beginn 1996 an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
	1998 Ärztliche Vorprüfung
	1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2002-2003 Praktisches Jahr
	1. Teil in La Paz, Bolivien 2. Teil in Sion, Schweiz 3. Teil in Friedrichshafen, Lehrkrankenhaus Tübingen
	07.11.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Beruf:	Juli 2004 - März 2006 Assistentin in der Kinderklinik Friedrichshafen
	seit April 2006 Assistentin in der Kinderchirurgie der Universitäts-Kinderklinik beider Basel, Schweiz