

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Spezifität von MicroRNA371 als
Serumtumormarker bei Keimzelltumoren - Expression in der
Hodenvene und in anderen Körperflüssigkeiten sowie bei
anderen Tumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Raphael Iheru Ikogho
aus Henstedt-Ulzburg

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Abstrakt/Abstract.....	2
1.1 Abstrakt.....	2
1.2 Abstract.....	4
2 Einleitung	5
2.1 Epidemiologie der Keimzelltumoren des Hodens	5
2.2 Ätiologie	5
2.3 Histologische Einteilung	6
2.4 Stadieneinteilung.....	6
2.5 Therapie der Keimzelltumoren.....	9
2.6 Bedeutung der Tumormarker bei Hodentumoren	10
2.7 Welche neuen Marker bei Hodentumoren wurden bisher evaluiert?	11
2.8 Was sind MicroRNAs?.....	12
2.9 Warum könnte miR-371 ein neuer wertvoller Marker sein?	13
3. Arbeitshypothese/Fragestellung.....	15
4 Material und Methoden.....	17
4.1 Patientenkollektiv	17
4.2 Ethikerklärung	18
4.3 Laboruntersuchungen.....	18
4.4 Statistische Methoden	19
5. Ergebnisse	20
5.1 Messungen der miR-371a-3p-Expression in den verschiedenen Kollektiven	20
5.2 Assoziation der miR-Spiegel mit klinisch-pathologischen Faktoren.....	26
6. Diskussion	27
7. Schlussfolgerungen	33
8. Abkürzungsverzeichnis	34
9. Literaturverzeichnis.....	36
10. Anhang	45
10.1 Ergänzende Tabellen	45
10.2 Eidesstattliche Versicherung.....	50
10.3 Lebenslauf	51
10.4 Publikationsliste.....	52
10.5 Danksagung.....	53

1 Abstrakt/Abstract

1.1 Abstrakt

Einführung: Serum-Spiegel von MicroRNA-371a-3p (miR-371) gelten als Kandidat für einen neuen Serum-Biomarker für testikuläre Keimzelltumoren (KZT). Unklar ist, ob die gemessenen Serumspiegel-Erhöhungen spezifisch vom KZT verursacht werden. Ziel der vorliegenden Studie war es, Evidenz für die KZT-Spezifität von miR-371 zu schaffen.

Material und Methoden: Bei 64 Patienten mit KZT wurden die Serum-Spiegel von miR-371 im peripheren Venenblut (CVB) und im Hodenvenenblut (TVB) mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Bei 51 Patienten lag ein nichtmetastasiertes Erkrankungsstadium (CS1) vor, 13 waren metastasiert (Stadium CS2-3). Bei 33 der 51 CS1 Patienten wurden präoperative Messungen mit postoperativen Messwerten verglichen. Bei 9 KZT-Patienten wurde der miR-371 Serum-Spiegel zusätzlich in der tumorbegleitenden Hydrozelenflüssigkeit bestimmt. Die klinischen Parameter Histologie, Alter, Tumorgröße, Hodengröße und pathologisches Tumorstadium (pT-Stadium) wurden statistisch auf eine Assoziation mit der miR-Expressionshöhe untersucht. Als Kontrolle für die KZT-Spezifität von miR-371 wurden miR-Spiegel in TVB (n=10) und CVB (n=24) von gesunden Männern sowie bei 24 Patienten mit anderen Karzinomerkrankungen ermittelt.

Ergebnisse: Die Expression von miR-371 ist bei KZT-Patienten signifikant höher als bei Kontrollpersonen. Hodenvenenblut enthält signifikant höhere miR-Mengen als das korrespondierende periphere Venenblut. Tumorbegleitende Hydrozelenflüssigkeit enthält miR-Spiegel, die stets wesentlich höher lagen als in der korrespondierenden Kubitalvene. Postoperativ zeigte sich bei KZT-Patienten im CS1 ein Abfall der miR-Spiegel in den Normbereich. Patienten mit anderen malignen Erkrankungen wiesen keine erhöhte miR371-Expression auf. In der Gesamtgruppe aller KZT-Patienten fanden sich signifikante Assoziationen der peripheren miR-Messwerte mit den Faktoren Tumor- und Hodengröße. Die Hodenvenen-miR-Spiegel waren bei multivariater statistischer Analyse mit der Hodengröße signifikant assoziiert. In der Gruppe der metastasierten Patienten waren die peripheren miR-Spiegel assoziiert mit der Tumorgröße. In der univariaten statistischen Analyse ergab sich darüber hinaus eine signifikante Assoziation zwischen den Hodenvenen miR-Spiegeln und dem pT-Stadium.

Schlussfolgerungen: Die vorliegende Arbeit erbringt Evidenz dafür, dass zirkulierende MicroRNA-371a-3p-Moleküle spezifisch von den Zellen der Keimzelltumoren produziert werden. Den stärksten Hinweis geben die sehr hohen miR371-Konzentrationen im Hodenvenenblut und in den tumorbegleitenden Hydrozelen der Tumorpatienten. Weitere Evidenz für die Spezifität stammt vom raschen Abfall der miR-Serumspiegel in den Normbereich nach *Ablatio testis* bei den Patienten im CS1, d. h. nach Beseitigung des mutmaßlich einzigen Bildungsortes von miR-371. Ein deutlicher Hinweis auf die Spezifität der miR-371 ist zudem das Fehlen von erhöhten Serumspiegeln bei anderen Tumoren. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MicroRNA-371a-3p ein spezifischer neuer Tumormarker für die Keimzelltumoren ist, der gute Aussichten hat, die klassischen Marker zu ergänzen.

1.2 Abstract

Introduction: Serum levels of microRNA-371a-3p (miR-371) are suggested as a novel serum-biomarker of germ cell tumors (GCTs). However, the specificity of circulating miR-371 molecules is unresolved so far. The aim of the present study was to provide evidence for the specificity of miR-371 for GCT.

Materials and methods: MiR-371 levels were measured by quantitative polymerase chain reaction in serum of cubital vein blood (CVB) and testicular vein blood (TVB) in 64 GCT patients (51 with clinical stage (CS) 1, and 13 with CS2-3). In 33 of 51 CS1 patients preoperative serum miR levels were compared with those measured postoperatively. MiR levels were also measured in tumor surrounding hydroceles of nine GCT patients. Measurements of miR levels in 24 patients with other malignant diseases and in 24 controls of healthy donors (TVB, n=10; CVB, n=24) served as controls for the specificity of miR-371 expression for GCT. Descriptive statistical methods were used to compare miR-levels found in CVB with those in TVB and to explore for associations of miR-levels with histology, age, tumor size, testicular size, and pathologic tumor stage.

Results: The expression of miR-371 in GCT patients is significantly higher than in controls. MiR-371 levels were significantly higher in TVB than in corresponding CVB. Hydrocele miR levels were much higher than corresponding CVB levels. After treatment, miR-371 levels dropped to normal range. There was no increased miR-371 expression in other malignancies. Multivariate statistical analysis revealed significant associations of tumor size and testis length with miR levels in CVB of all patients and of CS2-3 patients. MiR levels in TVB were associated with the length of testis. Univariate analysis revealed a significant association of pathologic tumor stage (pT) with miR levels in TVB.

Conclusions: This study provides evidence for the specific expression of miR-371 molecules by GCT cells. The key results are the findings of significantly higher levels of miR-371 in testicular vein blood and in neoplastic hydrocele fluid than in the peripheral circulation. Further evidence for the specificity comes from the rapid decrease of miR serum levels to normal range after cure as well as from the absence of miR-371 expression in other malignancies and healthy donors. Another indication for the specificity is the significant associations of miR levels with testis length and tumor size. In summary, microRNA-371a-3p appears to be a specific new marker for germ cell tumors that warrants further clinical evaluation.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie der Keimzelltumoren des Hodens

Nach Angaben des Robert Koch Institutes (RKI) erkrankten im Jahr 2010 in Deutschland etwa 3.820 Männer an Hodenkrebs. Das entspricht einer Inzidenz von knapp 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer und Jahr ¹. Damit gehören Hodentumore mit einem Anteil von 1,5% an allen Krebserkrankungen beim Mann zu den seltenen Krebsarten. Im selben Jahr erkrankten laut RKI 65.830 Männer an Prostata-, 35.040 an Lungen- und 33.800 an Darmkrebs. Betrachtet man allerdings nur die Altersgruppe der Männer zwischen 20 und 40 Jahren, so ist der Hodenkrebs in dieser Altersgruppe die häufigste maligne Erkrankung. In diese Altersgruppe fallen etwa 70% aller Betroffenen, 10% sind jünger als 20 Jahre und 20% sind älter als 40 Jahre. Eine der besonderen Auffälligkeiten stellt die unterschiedliche geographische Verbreitung von Hodenkrebs dar ^{2,3}. Während die Inzidenz von malignen testikulären Keimzelltumoren (KZT) in Nordeuropa, sowie Nordamerika und Australien hoch ist, treten in Asien und Afrika Hodentumore deutlich seltener auf ^{4,5,6}.

2.2 Ätiologie

Die Ätiologie der testikulären Keimzelltumoren ist weiterhin nicht geklärt ^{7,8}. Inzwischen gibt es jedoch gesicherte Risikofaktoren, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, an einem malignen Keimzelltumor des Hodens zu erkranken, einhergehen ⁹. Der mit Abstand größte Risikofaktor ist der vorangegangene Hodenkrebs. Im Vergleich zur männlichen Normalbevölkerung haben Hodenkrebspatienten ein etwa 30-fach erhöhtes relatives Risiko ¹⁰. Ein weiterer Risikofaktor ist der *Maldeszensus testis*. Selbst wenn dieser adäquat therapiert wurde, besteht weiterhin ein etwa 4-6-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass das Erkrankungsrisiko des kontralateralen, normal deszendierten Hoden ebenfalls deutlich erhöht ist ¹¹. Ebenso spielen genetische Faktoren in der Pathogenese des Hodenkrebses eine wichtige Rolle. Bei männlichen Geschwistern, und hier ganz besonders bei Zwillingen eines betroffenen Patienten, besteht ein etwa 4-8-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko ^{12,13}. Die Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie (TIN), die erstmals im Jahre 1972 als Vorläuferversion der Keimzelltumoren beschrieben wurde ¹⁴, gilt heute als gesicherte Präneoplasie ^{15,16,17}.

2.3 Histologische Einteilung

Die Einteilung der Neubildungen des Hodens werden anhand von histologischen und biochemischen Eigenschaften vorgenommen ^{18,19,20,21}. Von den „echten“ Hodentumoren entfallen 90% auf die germinalen Tumoren. Diese teilen sich auf in 40% reine Seminome und 60% Nichtseminome (NSGCT), wobei die NSGCT alle nichtseminomatösen Tumoren und auch die Mischtumoren mit Seminomanteilen beinhalten. Die übrigen 10% der Hodentumore entfallen auf nichtgerminale Tumoren (Leydig-Zell-Tumoren etwa 3% aller Hodentumore, Sertoli-Zell-Tumore, Granulosazelltumore).

Tabelle 1: Modifizierte WHO-Klassifikation der malignen KZT von 2004

Tumoren	Anteil an allen KZT [%]
<i>Tumoren von einem histologischen Typ</i>	
Seminom	40,0
Spermatozytäres Seminom	1,0
Embryonales Karzinom	11,0
Dottersacktumor	0,7
Chorionkarzinom	0,3
Teratom	2,2
<i>Tumoren von mehr als einem histologischen Typ</i>	
Embryonales Karzinom und Teratom	9,0
Chorionkarzinom mit anderem Tumor	8,0
Andere Tumorkombinationen	27,0

2.4 Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation hat in der Praxis der Stadieneinteilung bei den testikulären Keimzelltumoren nur eine untergeordnete Bedeutung. Für die Einteilung der KZT haben heute klinische Stadien-Einteilungen, die in enger Beziehung zu Therapie und Prognose stehen, die weiteste Verbreitung gefunden. Die Grundlage dieser Einteilungen liefert die Lugano-Klassifikation ²². Heute sind die mit Abstand bedeutendsten Einteilungssysteme der malignen Keimzelltumoren des Hodens zum einen die nach Vorschlag der „Union for International Cancer Control“ (UICC) modifizierte 3-Etagen-Einteilung ²³ und zum anderen die Einteilung der metastasierten Stadien in drei Prognosegruppen nach

Vorschlag der „International Germ Cell Cancer Collaborative Group“ (IGCCCG) ²⁴. Zieht man die "Lugano Klassifikation" zur Einteilung heran, so handelt es sich beim Vorliegen eines klinischen Stadiums I, um eine ausschließlich auf den Hoden beschränkte Erkrankung. Im Stadium II liegen Metastasen in den abdominellen Lymphknoten unterhalb des Zwerchfells, im Stadium III supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen und/oder eine hämatogene Metastasierungen vor.

Tabelle 2: Lugano-Klassifikation

Stadium	Klinisch	Pathologisch
I	Kein klinischer oder bildgebender Metastasennachweis	Negative retroperitoneale Lymphknoten
IIA	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Querdurchmesser < 2 cm	Nicht mehr als 5 Lymphknotenmetastasen, keine Lymphknotenmetastase > 2 cm
IIB	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Querdurchmesser von 2–5 cm	Mehr als 5 Lymphknotenmetastasen oder Metastasen von 2–5 cm oder Infiltration des extranodularen Gewebes
IIC	Retroperitoneale Lymphknoten mit einem Querdurchmesser von > 5 cm	Lymphknotenmetastasen > 5 cm oder retroperitonealer Tumor in benachbarte Strukturen eingebrochen
III	Supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen und/oder hämatogene Aussaat	Supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen und/oder hämatogene Aussaat
Wird ein »c« (»clinical«) anstelle des »p« (»pathological«) dem Befund vorangestellt, so liegt keine histologische Absicherung vor. (»clinical stage« = CS, »pathological stage« = PS)		

Patienten mit einer metastasierten Erkrankung werden nach den Vorgaben der IGCCCG eingeteilt (Tabelle 3). Hier werden die Histologie, die Lokalisation des Primärtumors, die Lokalisation von Metastasen und die Höhe der Serumentumormarker (AFP, β -HCG und LDH) nach Orchiektomie zur Einteilung in eine der drei Prognosegruppen („good“, „intermediate“ und „poor“) herangezogen. Alle internationalen Leitlinien folgen dieser Einteilung ²⁵.

Tabelle 3: Klassifikation der Prognose-Kriterien nach der IGCCCG

Gute Prognose		5-Jahres-Überlebensrate > 90 %	
Nichtseminom			
Testis/primärer retroperitonealer Tumor <u>und</u> "niedrige Marker" <u>und</u> keine nicht pulmonalen viszeralen Metastasen		"niedrige Marker":	<ul style="list-style-type: none"> • AFP < 1.000 ng/ml, • β-HCG < 1.000 ng/ml (< 5.000 IU/l) • LDH < 1,5 x Normalwert
Seminom			
jede Primärlokalisierung, jede Markerhöhe <u>und</u> keine nicht pulmonalen viszeralen Metastasen			
Intermediäre Prognose		5-Jahres-Überlebensrate ca. 80 %	
Nichtseminom			
Testis/primärer retroperitonealer Tumor <u>und</u> "intermediäre Marker" <u>und</u> keine nicht pulmonalen viszeralen Metastasen		"intermediäre Marker": *	<ul style="list-style-type: none"> • AFP 1.000-10.000 ng/ml • β-HCG 1.000-10.000 ng/ml (5.000-50.000 IU/l) • LDH 1,5 -10 x Normalwert
Seminom			
jede Primärlokalisierung, jede Markerhöhe <u>und</u> nicht pulmonale viszerale Metastasen (Leber, ZNS, Skelett, Intestinum)			
Schlechte Prognose		5-Jahres-Überlebensrate ca. 50 %	
Nichtseminom			
primärer mediastinaler Keimzelltumor oder Testis/ retroperitonealer Tumor mit nicht pulmonalen viszeralen Metastasen (Leber, ZNS, Skelett, Intestinum) <u>oder</u> "hohe Marker"		"hohe Marker": *	<ul style="list-style-type: none"> • AFP > 10.000 ng/ml, • β-HCG > 10.000 ng/ml (50.000 U/l) • LDH > 10 x Normalwert

* mindestens ein Labor-Parameter muss die Bedingung erfüllen

2.5 Therapie der Keimzelltumoren

Seit der Einführung von Cisplatin in die Chemotherapie des Hodenkrebses im Jahre 1977 gehört diese Krebsart zu den prognostisch günstigen mit entsprechend hohen relativen 5-Jahres-Überlebensraten (97% in 2010) und geringer Mortalität ²⁶. So verstarben im Jahre 2010 in Deutschland lediglich 166 Männer an Hodenkrebs ¹. Die Therapiemaßnahmen bei den Keimzelltumoren sind in den europäischen Leitlinien festgelegt. Regelmäßig werden Aktualisierungen veröffentlicht. Grundsätzlich richtet sich die Therapie nach der Histologie (Seminom oder Nichtseminom) und nach dem klinischen Stadium der Erkrankung ^{27,25}. Mit Ausnahme der Fälle, in denen bereits bei Diagnosestellung eine lebensbedrohende Metastasierung vorliegt und somit primär eine Chemotherapie eingeleitet werden muss ²⁸, beginnt die Behandlung der Keimzelltumoren mit der operativen Entfernung des primären Tumors ²⁹. Diese erfolgt mittels *Ablatio testis* über einen inguinalen Zugang ³⁰. Bei unklaren Befunden wird zur Dignitätsklärung eine intraoperative Schnellschnittdiagnostik empfohlen ^{31,32,33}. Auch eine organerhaltende Therapie ist bei Vorliegen einer imperativen Indikation (synchrone bilaterale Tumoren, metachroner kontralateraler Tumor oder Solitärhoden) und präoperativ normalem Testosteronspiegel möglich ^{34,35}.

Bei etwa 5% der Patienten mit einem malignen Keimzelltumor liegt eine Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie (TIN) im kontralateralen Hoden vor, die mittels Hodenbiopsie sicher diagnostiziert werden kann ^{36,37}. Aus diesem Grund wird aktuell in Deutschland im Rahmen der inguinalen *Abatio testis* häufig eine kontralaterale skrotale Doppelbiopsie zur Detektion einer möglichen TIN durchgeführt ³⁸.

Bei den frühen Stadien ohne Nachweis einer Metastasierung genügt nach der *Ablatio testis* in vielen Fällen eine Überwachungsstrategie (sog. Surveillance-Strategie). In Risikofällen kann auch eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, die im Falle eines Seminoms in einer einmaligen Carboplatin-Gabe besteht ³⁹ und beim Nichtseminom in der Verabreichung eines Zyklus der Kombinationstherapie Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) ^{40,25}.

In den späteren Stadien erfolgt nach der *Ablatio testis* zumeist eine Chemotherapie nach dem PEB-Schema mit drei bis vier Zyklen. Zeigt sich bei den Abschlussuntersuchungen nach Chemotherapie ein Residualtumor im Retroperitoneum, so muss im Falle der Nichtseminome eine operative Resektion aller Residualherde erfolgen ⁴¹. Die früher beim Seminom häufig angewendete Strahlentherapie wird heute

nur noch im Stadium IIa und IIb beim Seminom angewendet und bei der lokalen Radiatio der TIN im Hoden ⁴².

2.6 Bedeutung der Tumormarker bei Hodentumoren

Die Bestimmung der Tumormarker (TM) ist für die Diagnostik, die klinische Stadieneinteilung, das Therapiemonitoring und für die Nachsorge von Hodentumoren unverzichtbar ^{43,44,45}. Aktuell werden das Alphafetoprotein (AFP), die β -Untereinheit des humanen Choriongonadotropins (β -HCG) und die Laktatdehydrogenase (LDH) im klinischen Alltag routinemäßig als Tumormarker bestimmt. Die LDH ist kein spezifischer Tumormarker für KZT, es lässt sich jedoch eine positive Korrelation mit den klinischen Tumorstadien feststellen ⁴⁶. AFP und β -HCG sind bei 80% der metastasierten Hodentumore und bei 57% der Nichtseminome im CS1 erhöht ⁴⁷. Dabei deutet eine AFP-Erhöhung immer auf das Vorliegen von Anteilen eines embryonalen Karzinoms, eines Dottersacktumors oder von Mischtumoren hin. Reine Seminome und reine Chorionkarzinome produzieren niemals AFP. Findet sich bei einem histologisch reinen Seminom eine AFP-Erhöhung, sollte immer eine Referenzpathologie zur Mitbeurteilung herangezogen werden, da die AFP-Erhöhung auf eine nicht-seminomatöse Tumorkomponente hindeutet. Eine Erhöhung des β -HCG ist bei etwa 20% der Seminome zu finden ^{48,49}. Etwa 80% der embryonalen Karzinome und alle Patienten mit einem Chorionkarzinom zeigen ebenfalls eine β -HCG-Erhöhung. Bei der Beurteilung der Tumormarker ist immer auch die jeweilige Halbwertszeit zu berücksichtigen (β -HCG 24-36 Stunden; AFP 5-7 Tage). Die Isoenzyme der LDH haben unterschiedliche Halbwertszeiten zwischen fünf Stunden und fünf Tagen, daher eignet sich die LDH lediglich zur Beurteilung des Krankheitsverlauf von Tumoren, da sie sehr gut mit der Tumormarklast korreliert. In der IGCCCG-Klassifikation, die der Einteilung fortgeschrittener Stadien dient, wird den Tumormarkern als Prognosekriterium eine zentrale Bedeutung beigemessen ²⁴. Neben der Lokalisation der Fernmetastasen ist die Höhe der Tumormarker ein entscheidendes Kriterium zur Zuordnung in eine der drei Prognosegruppen. An Hand dieser klinischen Einteilung wird u.a. der Umfang der notwendigen Chemotherapie festgelegt (z.B. drei vs. vier Zyklen Polychemotherapie nach dem PEB-Schema).

Die humane alkalische Plazenta-Phosphatase (hPLAP), die als Marker des Seminoms angesehen wurde ⁵⁰, hat sich als nicht valider Parameter in der Diagnostik erwiesen und ist nach den aktuellen europäischen Leitlinien verzichtbar. Ebenso verhält es sich

mit der neuronenspezifischen Enolase (NSE), die aktuell weder in der Primärdiagnostik noch in der Verlaufskontrolle eine Rolle spielt ^{51,43,52}.

2.7 Welche neuen Marker bei Hodentumoren wurden bisher evaluiert?

Die folgenden Kriterien müssen bei einem idealen Tumormarker erfüllt sein:

- (1) die Substanz wird ausschließlich von dem betreffenden Tumorgewebe produziert (ist spezifisch),
- (2) die Substanz wird vom Produktionsort Tumor so in Körperflüssigkeiten abgeleitet, dass sie dort technisch gut und sicher gemessen werden kann,
- (3) die Messwerte im Serum korrelieren gut mit der Tumormasse (Anzahl der produzierenden Tumorzellen),
- (4) der Marker kann auch in einem frühen Stadium der Tumorerkrankung bestimmt werden (ist also sensitiv),
- (5) der Marker hat eine so kurze Halbwertszeit, dass die Substanz nicht in Körpergeweben akkumuliert und durch verspätete Abgabe falsch-positive Ergebnisse erbringen kann,
- (6) die Messwerte des Marker korrelieren mit dem Therapie-Ergebnis ^{53,54}.

Aufgrund der geringen Expression und der damit verbundenen begrenzten Sensitivität, vor allem in frühen Stadien sind die klassischen Tumormarker bei einer großen Anzahl von Patienten mit KZT nicht nutzbar ⁵⁵. Bereits bei der Entdeckung der Sekretion von Hypophysenvorderlappenhormonen durch Hodentumoren im Jahre 1932 durch Zondek ⁵⁶, was einem frühen HCG-Nachweis mittels Tierversuch entsprach, zeigte sich, dass nur etwas mehr als die Hälfte der Patienten einen positiven Test aufwies. Seither wird nach besseren, spezifischeren und sensitiveren Biomarkern für die Keimzelltumoren gesucht. Im Zuge des labortechnisch-methodischen Fortschritts in der Labordiagnostik wurde eine Serie von neuen Markern vorgeschlagen. Vor allem die Antikörper-basierte Proteindiagnostik (Radioimmuno-Assay und ELISA-Techniken) führte zu einer Vielzahl von Biomarker-Evaluationen, die jedoch bis auf die heute gebräuchlichen Marker β -HCG und AFP keine weiteren praktikablen Ergebnisse brachte ⁵⁷. Bereits 1991 konnte ein erster Antikörper (TRA-1-60) zur Detektion vorhandener Anteile eines Embryonalen Karzinoms entwickelt werden ^{58,59}. Die sehr hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen machte den Einsatz für die klinische Routine jedoch unbrauchbar ⁶⁰. Die Neuronenspezifische Enolase (NSE) wurde ebenfalls als Marker eingesetzt. In initialen

Studien konnte die NSE ähnliche Werte für die Spezifität und Sensitivität bei der Diagnostik von Seminomen aufweisen^{61,62}. Größere Untersuchungen zeigten jedoch eine Vielzahl an falsch-positiven Ergebnissen, sodass sich dieser Marker ebenfalls nicht zum routinemäßigen Einsatz eignet^{51,63}. Ebenso wurden die M2-Pyruvat Kinase⁶⁴, Lectin-reaktive AFP (LCA), die Tumornekrosefaktoren Fas/Apo-1 und CD30, das Akut-Phase-Protein (CRP), angiogenetische Wachstumsfaktoren (PTN, FGF-2), Cytokeratin 18 (*CK-18*) evaluiert und für ungeeignet befunden⁶⁵⁻⁷⁰.

Nach Einführung der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) in die klinische Routinediagnostik und nach Bekanntwerden der kurzkettigen RNAs konnten einige Studien eine Erhöhung der Serumspiegel von sogenannten MicroRNAs (miRs) bei Patienten mit Keimzelltumoren nachweisen. Insbesondere die Cluster miR-367, miR-371-373 und miR-302 sind hier von großer Bedeutung^{71,72,73,74}. Auch einige im Blutkreislauf zirkulierende DNA-Fragmente (ctDNA) konnten im Serum von Hodentumorpatienten nachgewiesen und als Marker von Keimzelltumoren genutzt werden^{75,76,77}. Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) gelang ebenfalls⁷⁸. Allerdings konnten diese CTC nur bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden⁷⁹.

2.8 Was sind MicroRNAs?

MicroRNAs (miRs) sind kleine nicht-kodierende Moleküle aus Ribonukleinsäure (RNA), bestehend aus ca. 20 Basenpaaren, die an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt sind. Sie spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen, wie z. B. der Zelldifferenzierung, der Apoptose und der Tumorentwicklung^{84,85,86}. Ein Vorläufermolekül der miRs wurde erstmals 1993 beschrieben⁸⁷. Die heute bekannte Bezeichnung als MicroRNAs wurde jedoch erst ab 2001 geprägt^{88,89}. Laut der 21. Veröffentlichung der Datenbank miRBase aus dem Juni 2014 sind inzwischen etwa 1.200 verschiedene MicroRNAs beim Menschen bekannt. Insgesamt finden sich zum gleichen Zeitpunkt etwa 36.000 MicroRNAs aus 223 verschiedenen Spezies in der Datenbank. Zur Unterscheidung der verschiedenen MicroRNAs gibt es eine genaue Nomenklatur. Die Namengebung der MicroRNAs erfolgt nach der zeitlichen Reihenfolge der Sequenzierung. Die drei vorangestellten Buchstaben deuten immer auf die Spezies hin (beim Menschen hsa für Homo Sapiens). Bei paralogen Sequenzen, in denen sich die MicroRNAs nur an einer oder zwei Stellen unterscheiden, wird ein Buchstabe angehängt (Beispiel: hsa-miR-10a und hsa-miR-10b). Verschiedene Haarnadel Loci, die

zu identischen MicroRNAs führen, erhalten Zahlen als Anhang (Beispiel: hsa-mir-550b-1, hsa-mir-550b-2 und hsa-mir-550b-3). Wenn hingegen zwei unterschiedliche MicroRNAs aus den entgegengesetzten Armen eines Haarnadelvorläufers entstehen, erhalten sie den Anhang 3p (3' Arm) oder 5p (5' Arm) (Beispiel: hsa-miR-17-3p und hsa-miR-17-5p)^{90,91}.

Es ist inzwischen bekannt, dass einige MicroRNAs in unterschiedlichen Krebsgeweben stark exprimiert werden^{92,93}. Vor allem die drei Mitglieder des Clusters miR-371-3 (miR-371a-3p, miR-372, miR-373-3p) haben eine starke Assoziation mit Keimzelltumoren gezeigt^{94,95,71,74,82,83}. Nach der Freisetzung aus der Tumorzelle bleiben sie in Körperflüssigkeiten stabil^{96,97} und können dort mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) nachgewiesen werden.

2.9 Warum könnte miR-371 ein neuer wertvoller Marker sein?

Erstmals zeigten Murray und Mitarbeiter im Jahre 2011 bei einem kindlichen Hodentumor erhöhte Serumwerte von MicroRNAs 371-3, die dann unter der Chemotherapie in den Normalbereich zurückgingen⁷¹. In mehreren Pilotstudien konnte die Beobachtung von erhöhten Serumspiegel der miR371-3 bei Patienten mit Keimzelltumoren bestätigt werden⁸⁰. In einer kleinen Serie von 11 Patienten mit KZT im CS1 (6 Seminome und 5 Nichtseminome) konnte bei allen Patienten präoperativ eine signifikante Erhöhung der drei miRs im peripheren Kubitalvenenblut (CVB) im Vergleich zu den Kontrollpatienten gezeigt werden⁷². In der am 5. postoperativen Tag nach inguinaler *Ablatio testis* durchgeführten Verlaufskontrolle war ein hochsignifikanter Abfall der miR-Serumspiegel zu beobachten. Die ergänzende Arbeit⁸¹ unterstrich die bereits beschriebenen Ergebnissen. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Abfall der Serumspiegel von miR371-3 nach Durchführung einer Polychemotherapie nach dem PEB-Schema bei 4 Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium. Da der Serumspiegel des miR371-Clusters in dieser Untersuchung einen um das etwa 300-fach erhöhten Wert gegenüber den Kontrollpatienten zeigte, schien dieses Cluster das sensitivste der drei untersuchten miR-Cluster zu sein. MiR-372 zeigte im Vergleich 23-fach und miR-373 nur noch 13-fach erhöhte Werte. Die sehr starke tumorbedingte Erhöhung des miR-371a-3p-Serumspiegels und der schnelle Abfall nach erfolgter Therapie, macht insbesondere diese miR zu einem sehr vielversprechenden Tumormarker⁸¹.

In einer anderen Untersuchung von insgesamt 80 Patienten mit KZT und 47 Kontrollpatienten fand eine internationale Arbeitsgruppe ⁷³ bei allen Hodenkrebspatienten signifikant erhöhte MicroRNA-Spiegel im Serum. Hierbei wurden die Cluster miR-367 und miR-371-3 untersucht. Analog zu früheren Studien ⁸¹ konnte gezeigt werden, dass die erhöhten Serumspiegel bei Patienten im CS1 nach operativer Therapie auf den Wert der Kontrollpatienten zurückgehen. Es zeigte sich zudem ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Serumspiegels und der vorliegenden Tumorlast.

In einer weiteren Untersuchung ⁸² konnte gezeigt werden, dass sich im Serum von Hodenkrebspatienten signifikant erhöhte Serumspiegel von miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p und miR-373-3p im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten finden. Im Vergleich zu den klassischen Tumormarkern fand sich eine deutlich erhöhte Sensitivität (84,7%) vor allem beim Cluster miR-371a-3p. MiR-367-3p zeigte bei Nichtseminomen deutlich höhere Serumspiegel als bei Seminomen. Darüber hinaus zeigten sich die höchsten Werte bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Stadium und bei Patienten mit Metastasierung. Analog zu den Ergebnissen der beiden vorgenannten Arbeitsgruppen zeigten sich bei 9 Patienten im CS1 postoperativ deutlich rückläufige miR-371a-3p-Serumspiegel, welches auf eine tumorspezifische Entstehung hindeutet.

In allen Pilotstudien zeigen diese neuen Marker ein hohes Potenzial für einen sinnvollen klinischen Einsatz, jedoch wurde die Frage nach der Spezifität bisher noch nicht ausreichend geklärt ⁸³.

3. Arbeitshypothese/Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage nach der Spezifität der miR-371 für die KZT geklärt werden. Stammt diese MicroRNA tatsächlich aus den Keimzelltumoren oder ist die Nachweisbarkeit dieser MicroRNA im Serum nur ein zufällig entdecktes unspezifisches Nebenprodukt beim Metabolismus der Tumoren? Ist miR-371 im Serum so spezifisch für die Keimzelltumoren, dass diese RNA als Serum-Biomarker geeignet ist?

Grundsätzlich lässt sich Spezifität daran erkennen, dass der neue Marker nur bei KZT erhöht ist und nicht bei gesunden Männern und auch nicht bei Patienten mit anderen Tumoren ¹⁰⁰.

Der postulierte Tumormarker sollte nach der Behandlung (z.B. nach der operativen Entfernung des Tumors) von den erhöhten Werten in den Normalbereich zurückgehen ¹⁰¹.

Außerdem sollte die postulierte Markersubstanz in der venösen Abstrombahn des KZT in höherer Konzentration vorliegen als im peripheren Blut. Eine weitere Bestätigung der Spezifität wäre, dass miR-371 in Kompartimenten in der unmittelbaren Umgebung des KZT in höherer Konzentration vorliegt als im peripheren Blut. Hier ist vor allem die Flüssigkeit in Begleithydrozelen zu betrachten. Aufgrund der unmittelbaren Lagebeziehung zum Tumor ist eine Penetration von miR-Molekülen vom Tumor in die umgebende Hydrozelenflüssigkeit zu erwarten. Hier besteht eine bekannte Analogie zum β -HCG, das bei KZT-Patienten in der umgebenden Hydrozele in stark erhöhter Konzentration gefunden wurde ¹⁰².

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist, die Spezifität von miR-371 für die Keimzelltumoren zu belegen. Hierzu werden präoperative Messungen im Serum von Patienten mit KZT vorgenommen und mit postoperativen Messwerten verglichen. Zudem werden die miR-371 Messungen mit denen von Patienten mit anderen Tumoren und von gesunden Kontrollpersonen verglichen.

Außerdem wird der miR-371-Spiegel im Hodenvenenblut von Patienten mit KZT gemessen und mit den entsprechenden Messwerten aus dem peripheren Blut derselben Patienten verglichen. Als drittes wird Flüssigkeit von Begleithydrozelen bei KZT bezüglich des Gehaltes an miR-371 gemessen und mit Hydrozelenflüssigkeit von idiopathischen Hydrozelen verglichen.

Die Messwerte werden statistisch korreliert mit klinisch-pathologischen Faktoren, um weitere Hinweise auf die Spezifität der miR-371 Spiegel für KZT zu gewinnen.

Die antizipierten Ergebnisse der genannten Untersuchungen sind zum einen, dass postoperative Messungen einen signifikanten Abfall der miR-Spiegel zeigen. Des Weiteren wird erwartet, dass sich bei anderen Tumoren (Nicht-Keimzelltumoren) miR-371 nur etwa in Höhe der gesunden Kontrollpersonen finden wird, und dass sich in der Hodenvene deutlich höhere Werte finden als im peripheren Blut bei KZT-Patienten und schließlich, dass sich in der neoplastischen Hydrozele eine deutliche Erhöhung der miR-371-Spiegel findet.

Treffen diese antizipierten Ergebnisse zu, so wäre dies eine starke Evidenz dafür, dass miR-371 tatsächlich ein hoch-spezifischer Tumormarker für KZT ist.

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Allen Patienten, die zwischen Juni 2011 und Dezember 2014 in der Klinik für Urologie des Albertinen-Krankenhaus Hamburg, aufgrund des Verdachtes auf einen malignen Keimzelltumor behandelt wurden, wurde vor Behandlungsbeginn im Rahmen der klinisch erforderlichen Blutabnahmen ca. 10 ml Blut aus der Kubitalvene (CVB, *median cubital vein blood*) entnommen. Das Blutröhrchen wurde für ca. eine Stunde senkrecht bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine erste Sedimentierung des Serums zu erzielen. Im Zentrallabor des Albertinen-Krankenhauses wurde dann in der üblichen Technik das Serum abzentrifugiert (4000 Umdrehungen, 5 Minuten). Das Serum wurde in Cryo-Röhrchen abgefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Hodenvenenblut (TVB, *tesicular vein blood*) wurde intraoperativ aus einer Vene des Samenstranges durch Punktion mit einer 18 Gauge Flügelkanüle gewonnen (Abb. 1). In der Regel war es so möglich, etwa 2 ml TVB zu aspirieren. In einigen Fällen war das



Abbildung 1: Intraoperativer Situs der Hodenvenenblutentnahme.

Venengeflecht jedoch so fragil, dass eine Gewinnung von Hodenvenenblut technisch nicht möglich war. Für die vorliegende Arbeit konnten die Daten von 64 Patienten ausgewertet werden. Das Alter bei Diagnosestellung lag im Mittel bei 38 Jahren. Der jüngste Patient war 18, der älteste 55 Jahre alt. Histologisch lag bei 43 der Patienten ein Seminom (67,2%) bei den übrigen 21 lag ein Nichtseminom (32,8%) vor. Bei 51 Patienten lag ein nichtmetastasiertes Erkrankungsstadium (klinisches Stadium 1: CS1), bei den übrigen 13 Patienten ein metastasiertes Stadium (CS2-3) vor. In 35 Fällen lag

ein rechtseitiger, in den anderen 29 lag ein linksseitiger Tumor vor (54,7% vs. 45,3%). Bei allen 64 Patienten wurde sowohl Kubital- als auch Hodenvenenblut auf die zuvor beschriebene Weise gewonnen (klinische Details siehe ergänzende Tabelle 1). Die Daten von sechs Patienten dieser Untersuchung wurden bereits in einer früheren Publikation präsentiert^{81,98}. Zum Vergleich der miR-Spiegel von KZT-Patienten wurden die Spiegel in TVB und CVB mit denen von gesunden Männern verglichen. Als Kontrolle

dienten 10 Patienten mit nicht-malignen Hodenerkrankungen. Bei zwei dieser Kontrollpatienten wurde das TVB im Rahmen einer antegraden Sklerosierung beim Vorliegen einer *Varikozele testis* gewonnen. Bei den anderen acht Patienten erfolgte eine Orchiektomie aus anderen Gründen (ergänzende Tabelle 2). Bei neun Patienten mit malignem testikulären Keimzelltumor konnte aus der den Tumor umgebenden Hydrozele ausreichend Flüssigkeit gewonnen werden (2 ml), um diese Flüssigkeit ebenfalls bezüglich ihrer microRNA-Spiegel zu analysieren. Hierbei dienten drei Patienten mit idiopathischer Hydrozele testis als Kontrollpatienten (ergänzende Tabelle 3). Bei 24 Patienten mit einer nicht-testikulären malignen Erkrankung (NTMs) wurde vor Behandlungsbeginn eine Blutentnahme aus der Kubitalvene zur Messung der Serum-miR-Spiegel (miR-371a-3p-Spiegel) vorgenommen. Hierbei handelte es sich um acht Blasenkarzinome, sieben Prostatakarzinome, vier Nierenzellkarzinome, ein Schilddrüsenkarzinom, ein Ösophaguskarzinom, ein Leberzellkarzinom, ein Kolon-, sowie ein Rektumkarzinom. 20 Männer mit nicht-malignen Hodenpathologien dienten als Kontrolle. Siebzehn dieser Patienten mit nicht-maligner Hodenpathologie wurden bereits in einer früheren Publikation aufgeführt⁸¹.

4.2 Ethikerklärung

Alle peripheren Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der ohnehin erforderlichen routinemäßigen Blutentnahmen bei der Hodentumorthherapie. Bei allen Patienten wurde vor dem Untersuchungsbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Bremen genehmigt (ref. 301, 2011). Die Richtlinien der Deklaration von Helsinki wurden eingehalten.

4.3 Laboruntersuchungen

Alle Laboruntersuchungen erfolgten im Zentrum für Humangenetik der Universität Bremen. Die laboranalytischen Aspekte sind nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertationsschrift. Die miR371-Spiegel wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR (real-time PCR bzw. qPCR) gemessen, wobei das Messergebnis als Relativwert (RQ, i.e. Relativer Quantifikation) in Relation zu einer anderen microRNA (miR-93 bzw. miR-20) als innerem Standard ausgedrückt wurde. Diese microRNA wird bei allen Männern exprimiert und ist in ihrer Expressionshöhe unabhängig von Keimzelltumoren. Die gesamte RNA aus jeweils 200 µl der untersuchten Körperflüssigkeiten wurde mittels des miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die miR-371a-3p-Serumspiegel

wurden mittels qPCR mit dem TaqMan miRNA Assay (Applied Biosystems, Darmstadt) gemessen. Die labortechnische Vorgehensweise bei der miR371-Messung wird ausführlich in früheren Veröffentlichungen dargestellt⁹⁹.

4.4 Statistische Methoden

Die RQ-Werte (Relativer Quantifikations-Wert) der microRNA-Messungen wurden zusammen mit den zugehörigen klinischen Daten tabelliert und mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Datenbank Software (MS Excel, Microsoft Corp., Redmond, USA) gesichert. Um die Korrelation zwischen den präoperativ erhobenen RQ-Werten in der Hodenvene und den im peripheren Blut gemessenen Werten zu analysieren, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet (Pearson product-moment coefficient correlation). Die mittleren RQ-Werte (mean) der verschiedenen klinischen Subkollektive wurden statistisch miteinander verglichen mit Hilfe des Wilcoxon Mann Whitney U-Test unter Verwendung der InStat software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet¹⁰³.

Der Quotient aus dem präoperativen Hodenvenen-RQ Wert und dem RQ Wert aus dem peripheren Blut (TVB/CVB Quotient) wurde für jeden einzelnen Patienten und für jede Kontrollperson berechnet. Die arithmetischen Mittelwerte der TVB/CVB Quotienten der folgenden klinischen Subkollektive wurden miteinander verglichen: Gesamtgruppe aller KZT Patienten, CS1 Patienten, CS2-3 Patienten, Kontrollpersonen.

Die folgenden klinischen Parameter wurden auf eine statistische Assoziation mit der miR-Expressionshöhe geprüft: Histologie (Seminom versus Nichtseminom), Alter, Tumorgröße, Hodengröße (längster Durchmesser), pathologisches Tumorstadium (pT-Stadium) und Seitenlokalisation (rechts versus links). Diese Assoziationsanalyse wurde für die Gesamtgruppe aller Patienten (n=64) sowie für die Stadium 1 Patienten (CS1, n=51) und die metastasierten Patienten (CS2-3, n=13) durchgeführt, wobei einerseits die Quotienten TVB/CVB und andererseits selektiv die Hodenvenen-Werte und die CVB-Messwerte auf Assoziationen geprüft wurden. Die hierfür erforderlichen statistischen Berechnungen wurden mit der R Software Version 3.01 (The R Project for Statistical Computing) durchgeführt¹⁰⁴.

5. Ergebnisse

5.1 Messungen der miR-371a-3p-Expression in den verschiedenen Kollektiven

Die Verlaufsmessungen im peripheren Blut von Patienten im CS1 zeigen einen massiven Rückgang der miR-371-Spiegel nach der *Ablatio testis*. Abbildung 2 zeigt den Vergleich der prä- und postoperativ detektierten Messwerte der miR-371-Expression im CS1. Die erste Säule der Abbildung 2 stellt die mittlere Höhe der präoperativen miR-Spiegel bei 33 Patienten mit klinischem Stadium 1 dar. Die dritte Säule zeigt den postoperativen mittleren miR-Messwert in dieser Patientengruppe. Es wird deutlich, dass es postoperativ zu einem Abfall um mindestens zwei Zehnerpotenzen gekommen ist. Zur Veranschaulichung ist der mittlere Messwert der Kontrollpersonen (letzte Säule) und die mittlere Höhe der Hodenvenenmessung (zweite Säule) dargestellt.

Postoperativ kommt es bei den untersuchten 33 Patienten zu einem signifikanten Abfall auf Werte von $RQ < 9$ (Abb. 2 und ergänzende Tabelle 1).

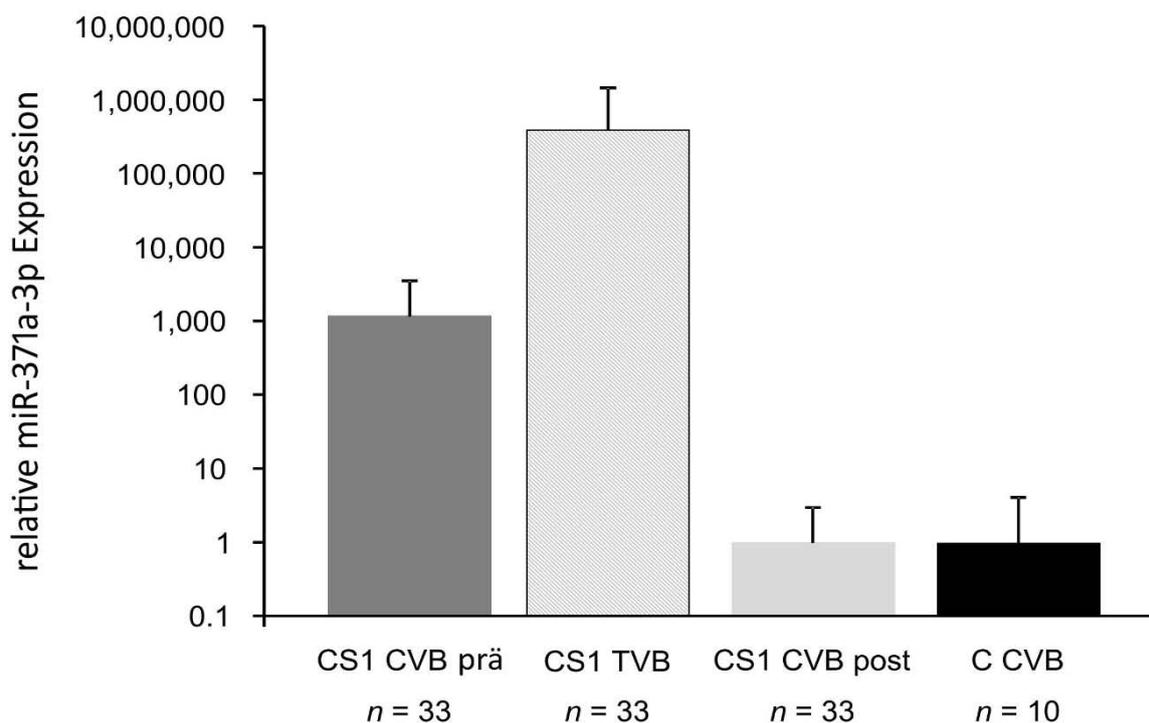


Abbildung 2: Prä- und postoperativer Vergleich der miR-371-Expression im CS1

CS1: klinisches Stadium 1; CVB: Kubitalvenenbut; TVB: Hodenvenenblut;

C: Kontrollpatienten; prä: präoperativ; post: postoperativ

Abb. 3 zeigt die miR-371-Expression bei anderen malignen Tumoren. Insgesamt wurden 24 Patienten in diese Gruppen eingeschlossen, von denen 19 urologische

und fünf gastro-enterologische Tumore hatten. Bei diesen Patienten fand sich 13-mal keine, 10-mal eine geringe und lediglich einmal eine minimale miR-371-Expression. Die gemessenen Spiegel lagen somit stets im Bereich der gesunden Kontrollen (Abb.3). Sechs dieser Patienten wiesen gar keine nachweisbare Expression auf. Hodenvenenblut weist eine signifikant höhere Expression von miR-371a-3p auf als die korrespondierende periphere Vene (CVB). Das Blut aus der Hodenvene wies auch bei gesunden Probanden leicht höhere miR-Messwerte auf, als das korrespondierende Kubitalvenenblut.

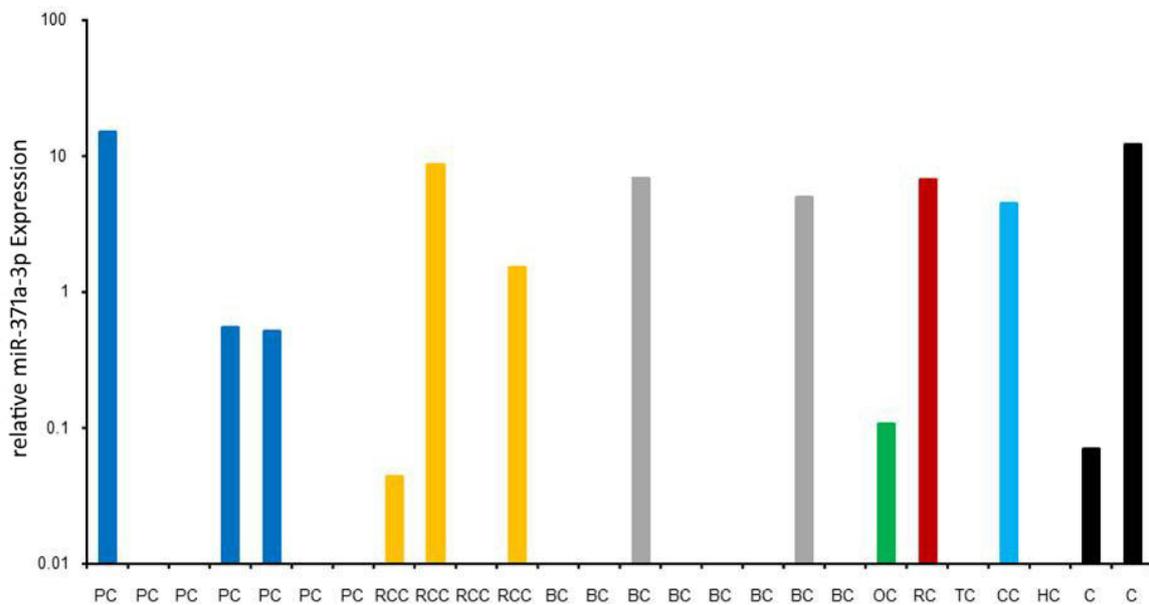


Abbildung 3: miR-371-Expression bei anderen malignen Tumoren (Jede Säule entspricht dem Messwert bei einem individuellen Patienten.)

PC: Prostatakarzinom; RCC: Nierenzellkarzinom; BC: Blasenkarzinom; OC: Ösophaguskarzinom; RC: Rektumkarzinom; TC: Schilddrüsenkarzinom; CC: Kolonkarzinom; HC: Leberzellkarzinom

Die Relation der miR-Spiegel in der Hodenvene (TVB) versus miR-Spiegel in der Kubitalvene (CVB) betrug $TVB/CVB=294$ bei Patienten im Stadium 1, 80 bei Patienten im metastasiertem Stadium und bei den Kontrollen 4,6 (Tabelle 4, Abb. 4 und ergänzende Tabellen 1-2). Die medianen RQ-Werte der miR-371a-3p-Messungen in den verschiedenen Subkollektiven sind in Abb. 4 in Form eines Boxplot dargestellt jeweils mit den Interquartil-Bereichen und den Streubereichen. Auch hier wird deutlich, dass die miR-Konzentrationen im Hodenvenenblut auch in den Subkollektiven stets höher liegen als in den peripheren Venen. Die Ergebnisse

der statistischen Vergleiche der einzelnen Subkollektive untereinander sind in der ergänzenden Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: miR-371a-3p-Expression in CVB und im korrespondierenden TVB

Gruppe	Serumquelle	n	Mittlerer Wert	RQ-	Relation TVB/CVB
C	CVB	10	0.9		4.58
C	TVB	10	4.3		
CS1	CVB	51	1,843.6		294.02
CS1	TVB	51	542,064.6		
CS2-3	CVB	13	6,186.9		80.29
CS2-3	TVB	13	496,766.6		
CS1-3	CVB	64	2,725.8		195.49
CS1-3	TVB	64	532,863.4		

C: Kontrollen; CS1: klinisches Stadium 1; CS2-3: klinisches Stadium 2 und 3; RQ: Relativer Quantifikations-Wert; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut

Tumorbegleitende Hydrozelenflüssigkeit enthält sehr hohe miR-Spiegel, die in allen Fällen höher waren, als in der korrespondierenden peripheren Kubitalvene. Bei den idiopathischen Hydrozelen gesunder Kontrollpatienten ließ sich keine miR-371a-3p-Expression in der Hydrozelenflüssigkeit nachweisen (Abb. 4 und ergänzende Tabelle 3).

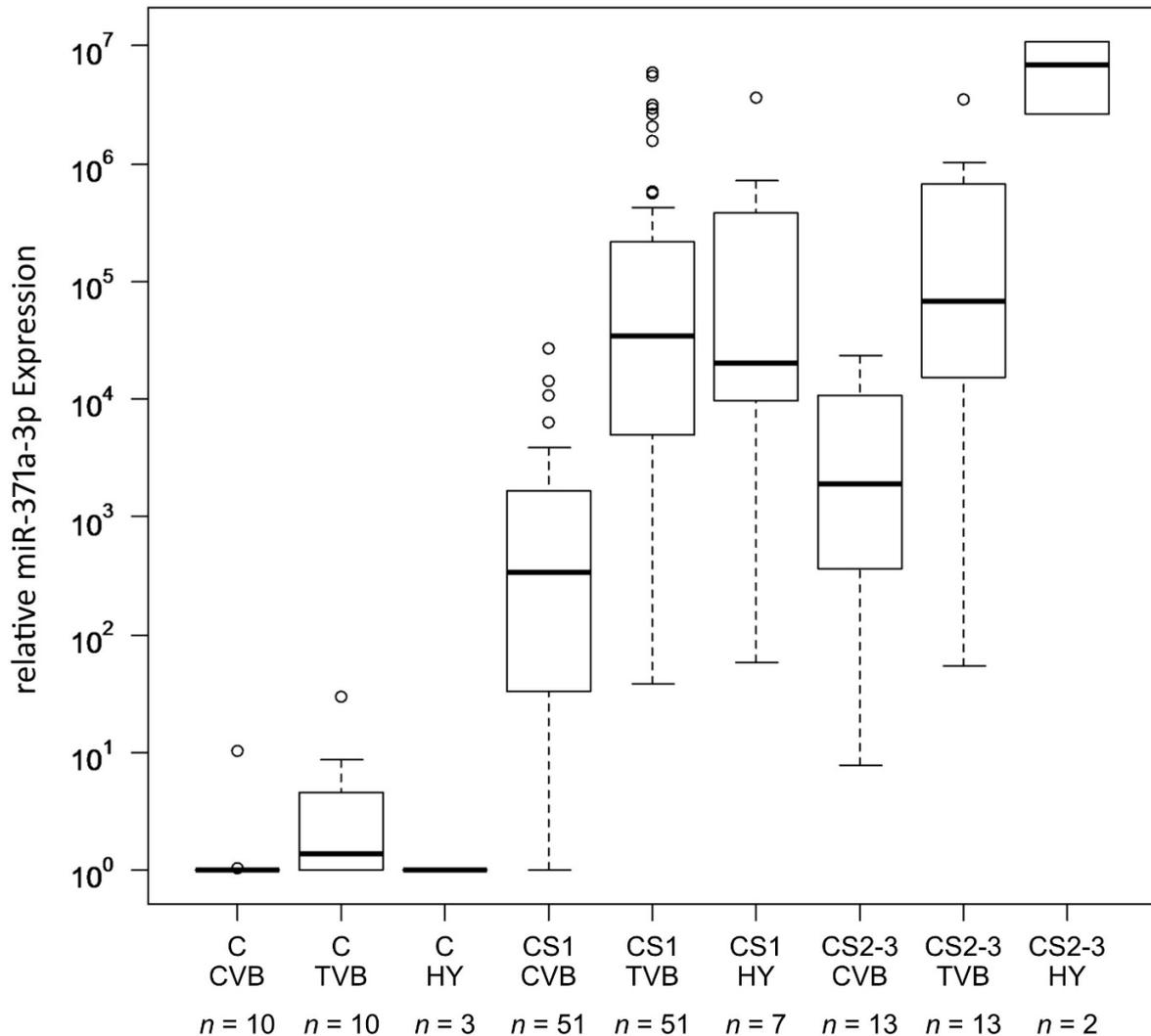


Abbildung 4: Vergleich der miR-371-Expression in unterschiedlichen Kompartimenten
 C: Kontrollpatienten; HY: Hydrozelenflüssigkeit; CS1: klinisches Stadium 1; CS2-3: klinisches Stadium 2-3; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut

Zwischen den individuellen Messwerten in Hodenvene und Kubitalvene besteht eine nur schwache Korrelation mit einem Pearson Korrelations-Koeffizienten von $R^2 = 0.62$ in der Gruppe der Stadium 1 Patienten und einem Koeffizienten von $R^2 = 0.63$ bei den metastasierten Fällen (Abb.5 und 6). Bei dieser Berechnung wurde in beiden Gruppen jeweils ein Ausreißer-Wert („outlier“) nicht berücksichtigt.

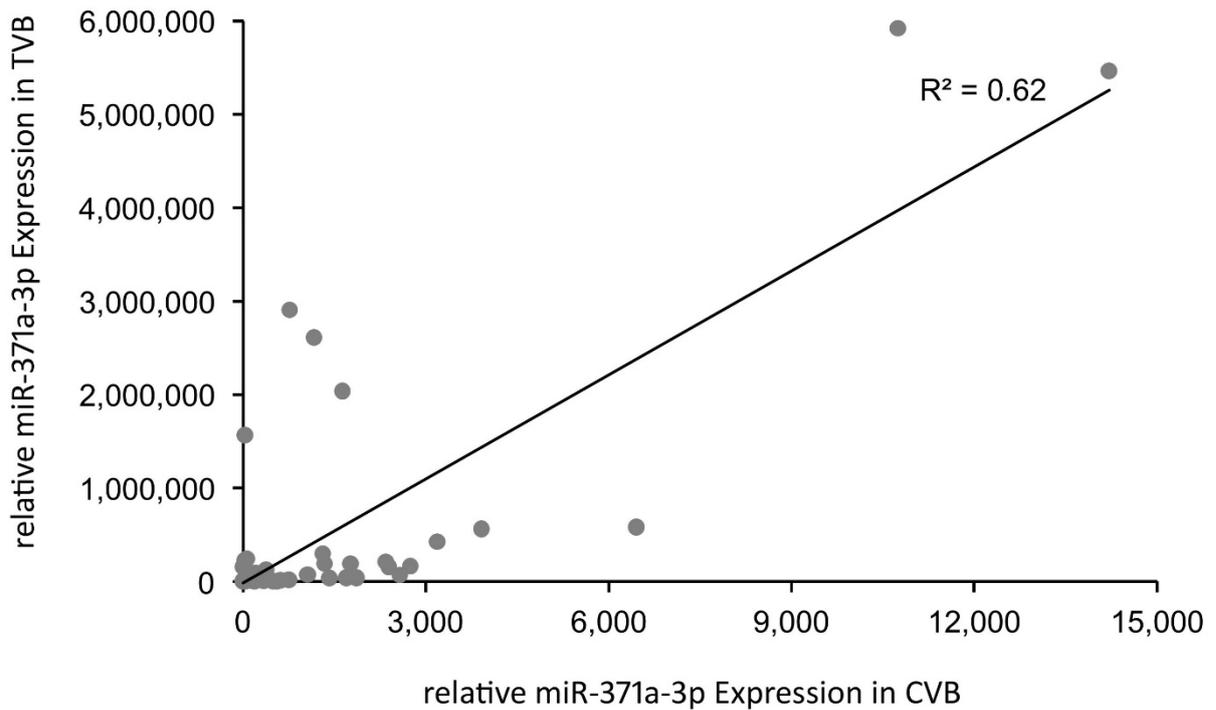


Abbildung 5 Korrelation individueller miR-Messwerte in TVB und CVB im CS1
 R= Pearson Korrelations-Koeffizienten; TVB: Hodenvenenblut; CVB: Kubitalvenenblut

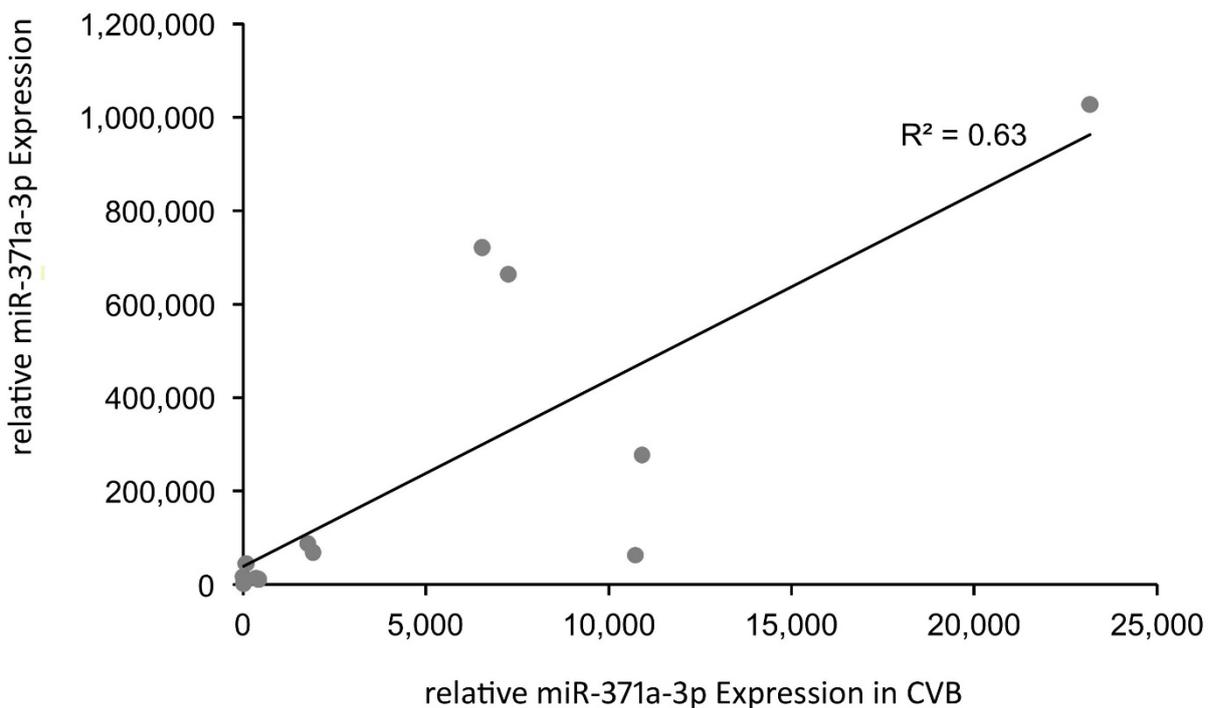


Abbildung 6 Korrelation individueller miR-Messwerte in TVB und CVB im CS2-3
 R= Pearson Korrelations-Koeffizienten; TVB: Hodenvenenblut; CVB: Kubitalvenenblut

Als Kernergebnisse können hier festgehalten werden:

- 1.) Die miR-Expressionen sind bei KZT-Patienten signifikant höher als bei Kontrollpersonen.
- 2.) Hodenvenenblut zeigt signifikant höhere miR-Messwerte als das aus korrespondierenden peripheren Venen.

5.2 Assoziation der miR-Spiegel mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die statistische Prüfung von möglichen Assoziationen der miR-Spiegel in den Subkollektiven mit klinisch-pathologischen Faktoren erbrachte ein komplexes Ergebnismuster. Aufgrund der großen interindividuellen Schwankungsbreiten wurde bei der Analyse der Hodenvenen-Messwerte stets der logarithmische Wert verwendet. Die Ergebnisse der multivariaten und der univariaten Analysen sind in den ergänzenden Tabellen 5-6 dargestellt.

Der Quotient TVB/CVB war in der multivariaten Analyse in keinem der Subkollektive (Stadium 1, Stad. 2-3, alle KZT) mit einem der untersuchten Faktoren assoziiert.

Bezogen auf die Gesamtgruppe aller KZT-Patienten fanden sich signifikante Assoziationen der peripheren miR-Messwerte mit den Faktoren Tumorgröße und Hodengröße. Die miR-Spiegel im Hodenvenenblut waren nur mit der Hodengröße signifikant assoziiert.

Betrachtet man selektiv die Patienten im CS1, so findet sich keine Assoziation zwischen den peripheren miR-Spiegeln und einem der klinisch-pathologischen Faktoren. Die Hodenvenen-Messwerte waren in diesem Subkollektiv jedoch signifikant mit der Hodengröße assoziiert.

In der Gruppe der metastasierten Patienten waren die peripheren miR-Spiegel assoziiert mit der Tumorgröße. Die Hodenvenen-Messwerte in dieser Gruppe waren hingegen mit keinem der Faktoren assoziiert.

Betrachtet man nur die univariaten statistischen Analysen, so ergeben sich signifikante Assoziationen zwischen den peripheren miR-Spiegeln und allen geprüften Faktoren mit Ausnahme des Patientenalters.

Die Hodenvenen- miR-Spiegel in der Gesamtgruppe der KZT-Patienten erwiesen sich als assoziiert mit Tumorgröße, Hodengröße und pT-Stadium.

6. Diskussion

Hodentumormarker sind für die Diagnostik, die klinische Stadieneinteilung, das Therapiemonitoring und für die Nachsorge von Hodentumoren unverzichtbar. Da nicht jeder Hodentumor die klassischen Hodentumormarker AFP und oder β -HCG produziert, ist es Gegenstand der klinischen Forschung neue Markersubstanzen zu entdecken. Hierbei ist man u.a. auf miR-371 gestoßen. Ziel dieser Arbeit war es die Spezifität von miR-371 bei KZT zu überprüfen. Ein spezifischer Tumormarker zeichnet sich dadurch aus, dass er ausschließlich oder zumindest fast ausschließlich von den Zellen des entsprechenden Tumors synthetisiert wird⁵³. Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass bei gesunden Männern keine Erhöhung der microRNA-371-Spiegel vorliegt^{81,73,82}. Der höchste gemessene miR-371-Spiegel bei Gesunden liegt bei RQ=10. In der vorliegenden Arbeit konnte nun ergänzend gezeigt werden, dass auch bei anderen malignen Tumoren die miR-Spiegel maximal bei RQ=10 und zumeist weit darunter, somit im Bereich der gesunden Kontrollen lagen (Abb. 2 und 3). Sechs dieser 24 Patienten wiesen keine nachweisbare Expression auf. Bei den 24 untersuchten Fällen wurden insgesamt 6 unterschiedliche Tumorarten mit unterschiedlichen Stadien untersucht. Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine microRNA-371-Erhöhung im Serum offenbar nur durch Keimzelltumoren verursacht wird und nicht etwa allgemein durch das Vorhandensein von Karzinomzellen im Körper. Vice versa zeigt dieses Ergebnis, dass miR-371 offenbar ein spezifischer Biomarker für Keimzelltumoren ist.

Die Hydrozele ist eine der häufigsten krankhaften Veränderungen am Genitale. Diese gutartige Erkrankung entsteht durch eine überschüssige Produktion von seröser peritestikulärer Flüssigkeit aus der *Tunica vaginalis testis*. In der weit überwiegenden Mehrheit der Fälle ist diese Flüssigkeitsansammlung idiopathisch bedingt („idiopathische Hydrozele“), und betroffen sind hiervon in der Regel Männer im Alter von über 50 Jahren. In wenigen Fällen handelt es sich aber um eine symptomatische Hydrozele, zumeist ausgelöst durch Entzündungen oder Traumata. Bei den Hodentumoren findet sich in einigen Fällen eine begleitende Hydrozele, wobei nicht klar ist, ob die Hydrozele als Folge der Tumorbildung anzusehen ist oder ob zufällig eine idiopathische Hydrozele bei einem tumortragenden Hoden besteht. Die Flüssigkeit bei tumorbegleitender Hydrozele liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zur testikulären Neoplasie. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine Penetration von

Stoffwechselprodukten des Tumors in die umgebende Hydrozelenflüssigkeit stattfindet. Diesem Postulat entsprechend hatte bereits Zondek 1932 bei zwei Hodentumor-Patienten in der umgebenden Hydrozelenflüssigkeit eine Hormonaktivität nachweisen können. Viele Jahre später wurden die klassischen Tumormarker β -HCG und AFP in tumorbegleitender Hydrozelenflüssigkeit mit modernen Labormethoden in hoher Konzentration nachgewiesen¹⁰⁵.

In Analogie zu dem klassischen Bericht von Dorfinger et al.¹⁰² konnten in der vorliegenden Arbeit sehr hohe Konzentrationen von miR-371a-3p in den tumorbegleitenden Hydrozelen gemessen werden. Hohe RQ-Werte fanden sich ausnahmslos in allen neun untersuchten Fällen. Darüber hinaus waren in allen Fällen die Messwerte in der Hydrozelenflüssigkeit höher als im peripheren Serum. Dieses Ergebnis findet eine naheliegende Erklärung darin, dass offenbar eine direkte Penetration von microRNA-Molekülen vom Erzeugungsort Keimzelltumor in die umgebende Hydrozelenflüssigkeit vorliegt. Da die Hydrozele kein Durchflussreservoir ist, verbleiben und akkumulieren die sezernierten microRNA-Moleküle in der Hydrozelenflüssigkeit und erreichen dort höhere Konzentrationen als im peripheren Blut, in dem eine ständige Verdünnung durch zirkulierendes Blut besteht.

Der *Plexus pampiniformis*, das Geflecht der Hodenvenen am Samenstrang ist der einzige venöse Abfluss aus dem Hoden. Auf diesem Wege werden alle Stoffwechselprodukte des Hodens abgeleitet und in den großen Körperkreislauf eingeschleust. Daher enthalten die Hodenvenen die Sekretionsprodukte des Hodens in viel höherer Konzentration als die Venen der peripheren Zirkulation, wo eine ständige Vermischung mit dem Gesamtvolumen des Blutes und somit eine Verdünnung stattfindet. Dies gilt für die vom Hoden produzierten androgenen Hormone und insbesondere für die von Hodentumoren sezernierten Biomarker β -HCG und AFP^{106,107,108}.

In der vorliegenden Arbeit konnte an einer großen Zahl von Patienten (n=64) gezeigt werden, dass diese klassischen biologischen Gesetzmäßigkeiten auch für microRNA-371 gelten. Tatsächlich konnte in der Hodenvene bei allen Fällen eine höhere Marker-Konzentration gefunden werden als in der peripheren Zirkulation. Bemerkenswert ist, dass auch bei gesunden Kontrollpersonen in der Hodenvene ein leicht höherer miR-Messwert vorliegt als in der peripheren Armvene. Dieser Befund spricht dafür, dass auch im gesunden Hoden eine geringe Basisproduktion von miR-

371 erfolgt. Aber der Unterschied der miR-Spiegel zwischen Hoden- und Armvene ist bei Gesunden (etwa Faktor 4) um ein vielfaches niedriger als bei den Patienten mit testikulärem Keimzelltumor (Faktor 195). In Anbetracht der bekannten vaskulären Anatomie des Skrotums ist die einzige rationale Erklärung für die hohen miR-Spiegel im Hodenvenenblut, dass diese miR-Moleküle spezifisch von den Hodentumorzellen hergestellt und ausgeschüttet werden. Diese Beobachtung entspricht exakt den Nachweisen von hohen Konzentrationen von β -HCG und AFP in der Hodenvene bei Patienten mit Keimzelltumor ^{109,110,111,107}.

Die Höhe der MicroRNA-Spiegel in Hodenvene und Kubitalvene korrelieren bei individuellen Patienten nur mäßig. Die Pearson-Korrelationsanalyse erbrachte Korrelations-Koeffizienten von $R^2=0,62$ (CS1-Patienten) und $R^2=0,62$ (metastasierte Patienten). Diese geringe Korrelation lässt den Schluss zu, dass neben der Einspeisung von miR-371-Molekülen aus dem primären Produktionsort (Primärtumor, Hodenvene) noch unbekannte biologische Mechanismen Einfluss auf die miR-371-Spiegelhöhe im peripheren Blut haben müssen.

Das Verhältnis der miR-Konzentrationen in Hodenvene und Armvene (Quotient Testikularvenenblut versus Kubitalvenenblut; TVB/CVB) betrug im Stadium 1 $TVB/CVB=294$ und lag damit wesentlich höher als bei metastasierten Fällen mit $TVB/CVB=80$. Dieser Unterschied der Quotienten kann nicht durch unterschiedliche statistische Korrelationen in den verschiedenen Stadien erklärt werden, denn die Pearson Korrelations-Koeffizienten sind mit $R^2=0.62$ im Stadium 1 und $R^2=0.63$ bei den metastasierten Fällen nahezu identisch. Auch zeigte sich, dass der Quotient TVB/CVB mit keinem der explorierten klinischen Faktoren assoziiert ist. Es gibt jedoch eine stochastische Erklärung für die unterschiedlichen Quotienten. Im Stadium 1 ist der Primärtumor im Hoden die einzige Quelle im Körper, von der eine microRNA-371-Sekretion ausgeht. Bei metastasierten Fällen hingegen muss angenommen werden, dass die metastatischen Herde ebenfalls microRNA in die Blutbahn abgeben und auf diese Weise die miR-Konzentration in der peripheren Zirkulation erhöhen.

Im Quotienten TVB/CVB ist somit bei metastasierten Fällen der Nenner (CVB) wesentlich höher als bei den Fällen im Stadium 1, und daher ist der Betrag des Quotienten TVB/CVB bei den metastasierten Fällen deutlich geringer als bei den Stadium 1 Fällen. Auch diese statistischen Detail-Ergebnisse belegen, dass

microRNA-371 Moleküle offenbar spezifisch von den Keimzelltumorzellen ausgeschüttet werden.

Bei den Patienten ohne erkennbare Metastasen (klinisches Stadium 1) wurden postoperative Messungen vorgenommen, also Messungen zu einem Zeitpunkt, an dem keine miR-produzierenden Tumorzellen im Körper mehr vorhanden sein sollten. Erwartungsgemäß fand sich bei diesen Patienten keine erkennbare oder zumindest keine erhöhte miR-Expression mehr. Die Marker-Ausschüttung war mit der chirurgischen Beseitigung des Tumors beendet worden. Dieser signifikante miR-371-Abfall nach der Operation entspricht dem Verhalten eines typischen spezifischen Tumormarkers¹⁰¹. Für miR-371 war diese Kinetik bei jeweils einer kleinen Anzahl von Patienten bereits früher gezeigt worden^{71,73,81,82}. Die vorliegende Arbeit bestätigt dieses typische Markerverhalten nun an einer wesentlich größeren Patientenzahl (n=33).

Um weitere Hinweise auf die Spezifität von miR371a-3p für KZT zu bekommen, wurden umfangreiche statistische Analysen zur Suche nach Assoziationen von klinisch-pathologischen Parametern mit der miR-Expressionshöhe durchgeführt. Es ergab sich ein sehr komplexes und vielschichtiges Bild von Ergebnissen, da die Untersuchungen getrennt für Hodenvenen- und Armvenenblut erfolgten und hierbei jeweils die Gesamtgruppe aller KZT-Patienten, und zusätzlich die Stadium 1 Fälle (CS1) und die metastasierten Fälle selektiv betrachtet wurden. Darüber hinaus wurden die statistischen Evaluationen sowohl in univariater als auch in multivariater Analyse durchgeführt. Ein übergeordnetes erklärendes Muster der bei univariater Analyse gefundenen signifikanten Assoziationen (ergänzende Tabelle 6) lässt sich nicht erkennen. Kritisch muss hier allerdings eingeräumt werden, dass die Ergebnisse durch das Problem der Vielfachtestungen („multiple testing“) zufällig beeinflusst sein können. Auch könnten aufgrund der oftmals kleinen Subkollektive Zufallsergebnisse entstanden sein. Die zwei signifikanten Faktoren Hodengröße und Tumorgöße sollen an dieser Stelle betont werden, da sie bei der multivariaten Analyse des Gesamtkollektivs und auch in verschiedenen Teilkollektiven gefunden wurden (ergänzende Tabelle 5). Beide Faktoren scheinen nicht nur statistisch signifikant, sondern auch klinisch bedeutsam zu sein. Beide Faktoren können als Kennzeichen für die Anzahl der Tumorzellen gewertet werden. Die statistisch-

signifikante Assoziation der miR-Spiegel mit der Hodengröße und der Tumorgöße kann somit auch als ein weiterer Hinweis auf die spezifische Produktion der miR-Moleküle in den KZT-Zellen angesehen werden. Bei diesem Ergebnis könnte es eine Rolle gespielt haben, dass das untersuchte Patientengut wesentlich mehr reine Seminome als Nichtseminome umfasste. Für die Seminome gilt die gut gesicherte Erfahrung, dass die Tumorgöße mit dem Metastasierungsrisiko korreliert ¹¹².

Etwas überraschend ist dagegen das Detail-Ergebnis, dass die miR-Spiegel im Hodenvenenblut bei Stadium1 Fällen nicht mit der Tumorgöße korrelieren. Dieses negative Ergebnis könnte mit der heterogenen Zusammensetzung vieler Keimzelltumoren in Zusammenhang stehen, denn nicht alle histologischen Bestandteile der KZT exprimieren die miR-371 in gleicher Weise. Bei den Seminomen bestehen häufig nekrotische Areale, die keinerlei Stoffwechselaktivität (und Marker-Expression) aufweisen aber dennoch in die Abmessung der Gesamtgröße des Tumors mit eingehen. Bei den Nichtseminomen gibt es häufig zystische, also zellarme Areale, die ebenfalls keine Marker und auch keine miR-371 exprimieren. Auch ist aus anderen Voruntersuchungen zur miR-371-Expression bei KZT bekannt, dass die miR-371 von reifen Teratomen, einer häufigen Komponente bei Nichtseminomen, nicht sezerniert wird ⁸¹. Die hier aufgeführten Tumor-Komponenten (Nekrose-Areale, Zysten, Teratome) produzieren definitiv kein miR-371, gehen aber in die Größen-Abschätzung des Tumors mit ein. Die fehlende Assoziation von Tumorgöße und miR-Spiegelhöhe in der Hodenvene, also in der direkten Ausflussbahn des Tumors, ist daher wahrscheinlich mit diesen miR-inaktiven Arealen im Tumor zu erklären.

Ein anderer möglicher Grund für die fehlende signifikante Assoziation von Tumorgöße und miR-Serumspiegel, könnte in der bereits früher beschriebenen Beobachtung liegen, dass die Intensität der im Tumorgewebe nachweisbaren miR-Expression nicht mit der im Serum gefundenen miR-Spiegelhöhe korreliert ⁸¹. Eine starke Expression von miR-371 im Tumorgewebe korreliert also nicht mit der miR-371-Spiegelhöhe im Serum. Entscheidend für die in der Hodenvene gefundene miR-Spiegelhöhe ist einerseits die Anzahl der miR-produzierenden Tumorzellen, aber andererseits gibt es offensichtlich auch noch weitere Faktoren, welche die Einleitung der produzierten microRNAs in das abführende Gefäßsystem begünstigen. Insgesamt scheint die Produktion von tumor-assoziiertes microRNA auf bestimmte

Tumorareale beschränkt zu sein. Aus diesem Grund korreliert die Tumorgroße nicht in jedem Fall direkt mit der im Serum gemessenen miR-Spiegelhöhe.

Insgesamt erscheinen sich somit die biologischen Mechanismen bei der Freisetzung von mirR-371 deutlich von den stochastischen Mechanismen bei der Freisetzung der klassischen Biomarker β -HCG und AFP zu unterscheiden, wo eine recht enge Korrelation besteht zwischen der Marker-Expression im Tumorgewebe und den Serumspiegeln ^{113,47,114,43}.

Von den zahlreichen Einzelergebnissen bei der statistischen Assoziationsanalyse verdient ein Ergebnis noch besondere Beachtung: Die Assoziation von höherem pT-Stadium mit der miR-Expression. Diese Assoziation fand sich für Hodenvenenblut bei allen klinischen Stadien und für peripheres Serum in der Gesamtgruppe der KZT-Patienten sowie in der Untergruppe der Patienten im Stadium 1 (ergänzende Tabelle 6). Das Stadium pT2 bezeichnet eine vaskuläre Invasion des Tumors ¹¹⁵. Dies bedeutet, dass für Patienten mit pT2 gewissermaßen eine direkte Ableitung von ausgeschüttetem miR-371 aus dem Primärtumor in die Hodenvene möglich wird. Die hier gefundene statistische Assoziation der miR-Spiegel mit diesem lokalen Tumorstadium findet somit eine sehr einleuchtende rationale biologische Erklärung. Daher darf dieser Assoziation durchaus eine klinische Relevanz zugesprochen werden, obwohl die statistische Analyse lediglich auf der univariaten, nicht aber auf der höherwertigen multivariaten Ebene das Signifikanzniveau erreichte.

7. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit erbringt klare Evidenz für die Annahme, dass zirkulierende microRNA-371a-3p-Moleküle in spezifischer Weise von den Zellen der Keimzelltumoren produziert und ausgeschüttet werden.

Den stärksten Hinweis auf diese Beziehung ergeben die Nachweise von hohen microRNA-371-Konzentrationen in der Hodenvene der Tumorpatienten und in den tumorbegleitenden Hydrozelen. Ein anderer starker Hinweis auf die Spezifität der miR-Serumspiegel ist der sofortige Abfall der Serumspiegel in den Normbereich nach *Ablatio testis* bei den CS1 Patienten, also nach Beseitigung der mutmaßlich alleinigen Produktionsstätte.

Weitere Hinweise auf die Spezifität der miR-371-Serumspiegel für KZT ergeben sich aus dem Fehlen von erhöhten Serumspiegeln bei anderen Tumoren und bei gesunden Kontrollpatienten, sowie durch die statistischen Assoziationen der miR-Serumspiegel mit der Hodengröße und dem höheren lokalen Tumorstadium (pT-Stadium).

Obwohl alle hier vorgestellten Daten ausschließlich microRNA-371a-3p betreffen, ist es überaus wahrscheinlich, dass gleiche oder zumindest sehr ähnliche Ergebnisse für die anderen Kandidaten-MicroRNAs (miR #302, #372, #373, #367) zutreffen, weil diese microRNAs sehr eng biologisch und genetisch mit der miR-371 verbunden sind^{95,83}. Frühere Studien konnten schon zeigen, dass die klinischen Eigenschaften aller genannten microRNAs sehr ähnlich sind⁸².

Im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung von microRNAs als Serum-Tumormarker bei Keimzelltumoren, erscheint es sinnvoll zu sein, jeweils mehrere der genannten microRNAs in den Testansatz einzubeziehen, um die Sensitivität des Tests zu erhöhen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass microRNA-371 ein spezifischer neuer Tumormarker für die Keimzelltumoren ist. MicroRNA-371 hat gute Aussichten, die klassischen Marker zu ersetzen oder zumindest zu ergänzen. Prospektive kontrollierte Studien müssen nun die klinische Wertigkeit des Markers validieren.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
Apo	Apoptose-Antigen
BC	Bronchialkarzinom
c	<i>clinical</i>
C	Kontrolle
CC	Kolonkarzinom
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CK	Cytokeratin
CRP	C-reaktives Protein
CS	klinisches Stadium
cs	<i>clinical stage</i>
CTC	<i>Circulating tumor cell</i>
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i>
CVB	Kubitalvenenblut
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fas	Fas-Rezeptor
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
HC	Leberzellkarzinom
hPLAP	humane plazentare alkalische Phosphatase
hsa	homo sapiens
HY	Hydrozele
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaboration Group
IU	Internationale Einheit
KZT	maligner testikulärer Keimzelltumor
l	Liter
LCA	Lektin reaktives α -Fetoprotein
LDH	Laktat-Dehydrogenase
li	links
Log	logarithmisch
M	Metastasen
miR	MicroRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
N	Lymphknoten
n.m	nicht gemessen
ng	Nanogramm
NS	Nichtseminom
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NSGCT	Nichtseminom
NTM	nicht-testikuläre maligne Erkrankung
OC	Ösophaguskarzinom
p	pathologisch
PC	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEB	Cisplatin Etoposid Bleomycin
post	postoperativ
prä	präoperativ

ps	<i>pathological stage</i>
PTN	Pleiotrophin
pT-Stadium	lokales pathologisches Stadium
p-Wert	Signifikanzwert
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	Pearson Korrelations-Koeffizienten
RC	Rektumkarzinom
RCC	Nierenzellkarzinom
re	rechts
ref	Referenz
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Relativer Quantifikations-Wert
S	Seminom
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
T	Tumor
TC	Schilddrüsenkarzinom
TIN	Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie
TM	Tumormarker
TRA-1-60	Monoklonaler Antikörper
TVB	Hodenvenenblut
U	Einheit
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentralesnervensystem

9. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut, Deutschland. GdeKi: Krebs in Deutschland 2009/2010 (ed 8. Ausgabe). Berlin, Robert Koch Institut, 2013
2. Mikuz G: [Testicular cancer - a matter of geography?: Epidemiology and etiopathogenesis of germ cell tumors.][Article in German]. *Pathologe* 35:211-217, 2014
3. Trabert B, Chen J, Devesa SS, et al: International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* 3:4-12, 2014
4. Kolonel LN, Ross RK, Thomas DB, et al: Epidemiology of testicular cancer in the Pacific Basin. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 62:157-160, 1982
5. Bray F, Richiardi L, Ekbom A, et al: Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: Continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int. J. Cancer* 118:3099-3111, 2006
6. Manecksha RP, Fitzpatrick JM: Epidemiology of testicular cancer. *BJU Int.* 104:1329-1333, 2009
7. Moller H: Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology. *Eur. Urol.* 23:8-13, 1993
8. McGlynn KA, Cook MB: Etiologic factors in testicular germ-cell tumors. *Future Oncol.* 5:1389-1402, 2009
9. Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, et al: Epidemiology of testicular cancer: An overview. *Int. J. Cancer* 116:331-339, 2005
10. Zequi SD, da Costa WH, Santana TB, et al: Bilateral testicular germ cell tumours: a systematic review. *BJU Int.* 110:1102-1109, 2012
11. Dieckmann KP, Pichlmeier U: Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* 22:2 -14, 2004
12. Kratz CP, Mai PL, Greene MH: Familial testicular germ cell tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:503-513, 2010
13. Kharazmi E, Hemminki K, Pukkala E, et al: Cancer Risk in Relatives of Testicular Cancer Patients by Histology Type and Age at Diagnosis: A Joint Study from Five Nordic Countries. *Eur. Urol.* 68:283-289, 2015
14. Skakkebaek NE: Possible carcinoma in situ of the testis. *Lancet* ii:516-517, 1972

15. Rorth M, Rajpert-De Meyts E, Andersson L, et al: Carcinoma in situ in the testis. *Scand. J. Urol. Nephrol. suppl.* 205:166-186, 2000
16. Dieckmann KP, Skakkebaek NE: Carcinoma in situ of the testis: A review of biological and clinical features. *Int. J. Cancer* 83:815-822, 1999
17. Sharma P, Dhillon J, Sexton WJ: Intratubular Germ Cell Neoplasia of the Testis, Bilateral Testicular Cancer, and Aberrant Histologies. *Urol. Clin. North Am.* 42:277-285, 2015
18. Sesterhenn IA, Davis CJJ: Pathology of germ cell tumors of the testis. *Cancer Control* 11:374-387, 2004
19. Emerson RE, Ulbright TM: Morphological approach to tumours of the testis and paratestis. *J. Clin. Pathol.* 60:866-880, 2007
20. Wittekind C: Biologie und Pathologie von Keimzelltumoren des Hodens. *Onkologie* 14:602-610, 2008
21. Heidenreich A, Knüchel-Clarke R, Pfister D: [Importance of pathology for therapy planning of testicular germ cell tumors].[Article in German]. *Pathologe* 35:266-273, 2014
22. Cavalli F, Monfardini S, Pizzocaro G: Report on the International Workshop on staging and treatment of testicular cancer. *Eur. J. Cancer* 16:1367-1372, 1980
23. Krege S, Beyer J, Souchon R, et al: European Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the Second Meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): Part I. *Eur. Urol.* 53:478-496, 2008
24. IGCCCG, Group IGCCC: International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J. Clin. Oncol.* 15:594-603, 1997
25. Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al: Guidelines on Testicular Cancer: 2015 Update. *Eur. Urol.* Aug 18. pii: S0302-2838(15)00703-4. doi: 10.1016/j.eururo.2015.07.044. [Epub ahead of print], 2015
26. Einhorn LH, Donohue J: Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* 87:293-8, 1977

27. Krege S: Latest recommendations of the European Germ cell Cancer Group on diagnosis and treatment of germ cell cancer., in Krege S (ed): Diagnosis and Management of Testicular Cancer. Heidelberg, Springer, 2015, pp 3-15
28. Leibovitch I, Little JSJ, Foster RS, et al: Delayed orchiectomy after chemotherapy for metastatic nonseminomatous germ cell tumors. J. Urol. 155:952-954, 1996
29. Kliesch S: Diagnostik und Primärtherapie des Hodentumors. Urologe A 43:1494-1499, 2004
30. Heidenreich A, Albers P: Ablatio testis und Enukleationsresektion. Aktuelle Urol. 40:179-187, 2009
31. Connolly SS, D'Arcy FT, Bredin HC, et al: Value of frozen section analysis with suspected testicular malignancy. Urology 67:162-165, 2006
32. Dieckmann KP, Frey U, Lock G: Contemporary diagnostic work up of testicular germ cell tumours. Nat. Rev. Urol. 10:703-712, 2013
33. Subik MK, Gordetsky J, Yao JL, et al: Frozen section assessment in testicular and paratesticular lesions suspicious for malignancy: its role in preventing unnecessary orchiectomy. Hum. Pathol. 43:1514-1519, 2012
34. Heidenreich A, Weissbach L, Hörtl W, et al: Organ Sparing Surgery for malignant Germ Cell Tumors of the Testis. J. Urol. 166:2161-2165, 2001
35. Giannarini G, Dieckmann KP, Albers P, et al: Organ-sparing surgery for adult testicular tumours: a systematic review of the literature. Eur. Urol. 57:780-790, 2010
36. Hoei-Hansen CE, Olesen IA, Jorgensen N, et al: Current approaches for detection of carcinoma in situ testis. Int. J. Androl. 30:398-405. , 2007
37. Dieckmann KP, Kulejewski M, Heinemann V, et al: Testicular biopsy for early cancer detection - objectives, technique and controversies. Int. J. Androl. 34:e7-e13, 2011
38. Dieckmann KP, Anheuser. P, Gnoss A, et al: Kontralaterale Biopsie beim Hodentumor. Die Praxis in Deutschland 2014. Urologe A 53:1651-1655, 2014
39. Oliver RT, Mead GM, Rustin GJ, et al: Randomized Trial of Carboplatin Versus Radiotherapy for Stage I Seminoma: Mature Results on Relapse and Contralateral Testis Cancer Rates in MRC TE19/EORTC 30982 Study (ISRCTN27163214). J. Clin. Oncol. 29:957-962, 2011

40. Tandstad T, Ståhl O, Håkansson U, et al: One Course of Adjuvant BEP in Clinical Stage I Nonseminoma Mature and Expanded Results from the SWENOTECA group. *Ann. Oncol.* 25:2167-2172, 2014
41. Chéry L, Dash A: The Role of Postchemotherapy Surgery in Germ Cell Tumors. *Urol. Clin. North Am.* 42:331-342, 2015
42. Hanna N, Einhorn LH: Testicular Cancer: A Reflection on 50 Years of Discovery. *J. Clin. Oncol.* 32:3085-3092, 2014
43. Krege S, Albers P, Heidenreich A: Markersysteme beim Hodentumor. *Urologe A* 50:313-321, 2011
44. Barlow LJ, Badalato GM, McKiernan JM: Serum tumor markers in the evaluation of male germ cell tumors. *Nat. Rev. Urol.* 7:610-617, 2010
45. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, et al: Testicular Cancer, Version 2.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 13:772-799, 2015
46. von Eyben FE: Laboratory markers and germ cell tumors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40:377-427, 2003
47. Nørgaard-Pedersen B, Schultz HP, Arends J, et al: Tumour markers in testicular germ cell tumours. Five-year experience from the DATECA Study 1976-1980. *Acta Radiol. Oncol.* 23:287-294, 1984
48. Weissbach L, Bussar-Maatz R, Löhrs U, et al: Prognostic Factors in Seminomas with Special Respect to HCG: Results of a Prospective Multicenter Study. *Eur. Urol.* 36:601-608, 1999
49. Vesprini D, Chung P, Tolan S, et al: Utility of serum tumor markers during surveillance for stage I seminoma. *Cancer* 118:5245-5250, 2012
50. Koshida K, Uchibayashi T, Yamamoto H, et al: Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. *Br-J-Urol* 77:138-42, 1996
51. Gross AJ, Dieckmann KP: Neuron-specific enolase - a serum tumour marker in malignant germ-cell tumours? *Eur. Urol.* 24:277-278, 1993
52. Doherty AP, Bower M, Christmas TJ: The role of tumour markers in the diagnosis and treatment of testicular germ cell cancers. *Br. J. Urol.* 79:247-252, 1997
53. Lange PH, Winfield HN: Biological markers in urologic cancer. *Cancer* 60:464-472, 1987
54. Bates SE, Longo DL: Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Sem. Oncol.* 14:102-138, 1987

55. Light PA: Tumour markers in testicular cancer. *J. Roy. Soc. Med.* 78:19-24, 1985
56. Zondek B: Maligne Hodentumoren und Hypophysenvorderlappenhormone. Hormonale Diagnostik aus Harn, Hydrocelenflüssigkeit und Tumorgewebe. *Klin. Wochenschr.* 11:274-279, 1932
57. Syring I, Müller SC, Ellinger J: Novel tumor markers in the serum of testicular germ cell cancer patients: a review. *Current Biomarker Findings* 4:133-137, 2014
58. Marrink J, Andrews PW, van Brummen PJ, et al: TRA-1-60: a new serum marker in patients with germ-cell tumors. *Int. J. Cancer* 49:368-372, 1991
59. Gels ME, Marrink J, Visser P, et al: Importance of a new tumor marker TRA-1-60 in the follow-up of patients with clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Ann. Surg. Oncol.* 4:321-327, 1997
60. Lajer H, Daugaard G, Andersson AM, et al: Clinical use of serum TRA-1-60 as tumor marker in patients with germ cell cancer. *Int J Cancer* 100:244-6, 2002
61. Kuzmits R, Schernthaner G, Krisch K: Serum neuron-specific enolase. A marker for responses to therapy in seminoma. *Cancer* 60:1017-1021, 1987
62. Fossa SD, Klepp O, Paus E: Neuron-specific enolase - a serum tumour marker in seminoma? *Br. J. Cancer* 65:297-299, 1992
63. Tandstad T, Klepp O: Neuron-specific enolase in testicular cancer--clinical experiences with serum neuron-specific enolase in patients with testicular cancer at diagnosis and during follow-up. *Acta Oncol.* 42:202-206, 2003
64. Pottek T, Müller M, Blum T, et al: Tu-M2-PK in the blood of testicular and cubital veins in men with testicular cancer. *Anticancer Res.* 20:5029-5033, 2000
65. Ellinger J, Müller SC, Dietrich D: Epigenetic biomarkers in the blood of patients with urological malignancies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15:505-516, 2015
66. Kawai K, Kojima T, Miyanaga N, et al: Lectin-reactive alpha-fetoprotein as a marker for testicular tumor activity. *Int J Urol.* 12:284-289, 2005
67. Hara S, Miyake H, Nakamura I, et al: Increased Fas ligand expression in the tumor tissue and serum of patients with testicular germ cell tumors with seminomatous elements. *Urology* 58:471-476, 2001
68. Latza U, Foss H., Durkop DH, et al: CD 30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of the soluble molecule. *Amer. J. Pathol.* 146:463-471, 1995

69. Saito K, Kihara K: Role of C-reactive protein in urological cancers: a useful biomarker for predicting outcomes. *Int. J. Urol.* 20:161-171, 2013
70. de Haas EC, di Pietro A, Simpson KL, et al: Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. *Neoplasia* 10:1041-1048, 2008
71. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, et al: Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 135:119-125, 2011
72. Belge G, Dieckmann KP, Spiekermann M, et al: Serum Levels of MicroRNAs miR-371-3: A Novel Class of Serum Biomarkers for Testicular Germ Cell Tumors? *Eur. Urol.* 61:1068-1069, 2012
73. Gillis AJ, Rijlaarsdam MA, Eini R, et al: Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle. *Mol. Oncol.* 7:1083-1092, 2013
74. Ruf CG, Dinger D, Port M, et al: Small RNAs in the peripheral blood discriminate metastasized from non-metastasized seminoma. *Mol. Cancer* 13:47, 2014
75. Kawakami T, Okamoto K, Ogawa O, et al: XIST unmethylated DNA fragments in male-derived plasma as a tumour marker for testicular cancer. *Lancet* 363:40-42, 2004
76. Ellinger J, Albers P, Müller SC, et al: Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int.* 104:48-52, 2009
77. Ellinger J, Wittkamp V, Albers P, et al: Cell-Free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients With Testicular Germ Cell Cancer. *J. Urol.* 181:363-371, 2009
78. Nastaly P, Ruf CG, Becker P, et al: Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors. *Clin. Cancer Res.* 20:3830-3841, 2014
79. Yuasa T, Yoshiki T, Tanaka T, et al: Detection of circulating testicular cancer cells in peripheral blood. *Cancer Lett.* 143:57-62, 1999
80. Bezan A, Gerger A, Pichler M: MicroRNAs in Testicular Cancer: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Anticancer Res.* 34:2709-2713, 2014

81. Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, et al: MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br. J. Cancer* 107:1754-1760, 2012
82. Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, et al: Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers. *J. Urol.* 193:331-337 2015
83. Rijlaarsdam MA, van Agthoven T, Gillis AJ, et al: Identification of known and novel germ cell cancer-specific (embryonic) miRs in serum by high-throughput profiling. *Andrology* 3:85-91, 2015
84. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297, 2004
85. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6:259-269, 2006
86. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, et al: MiRNAs in human cancer. *J. Pathol.* 223:102-115, 2011
87. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854, 1993
88. Ruvkun G: Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294:797-799, 2001
89. Ambros V, Lee RC: Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *Methods Mol. Biol.* 265:131-158, 2004
90. Sharma V, Misteli T: Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS Lett.* 587:1832-1839, 2013
91. Griffiths-Jones S: miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol.* 342:129-138, 2006
92. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al: MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur. Urol.* 59:671-681, 2011
93. Ralla B, Stephan C, Meller S, et al: Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 51:200-231, 2014
94. Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, et al: High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J. Pathol.* 213:319-328, 2007

95. Palmer RD, Murray MJ, Saini HK, et al: Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. *Cancer Res.* 70:2911-2923, 2010
96. Reis LO, Pereira TC, Lopes-Cendes I, et al: MicroRNAs: a new paradigm on molecular urological oncology. *Urology* 76:521-527, 2010
97. Weber DG, Casjens S, Rozynek P, et al: Assessment of mRNA and microRNA Stabilization in Peripheral Human Blood for Multicenter Studies and Biobanks. *Biomark. Insights* 5:95-102, 2010
98. Spiekermann M, Dieckmann KP, Balks T, et al: Is Relative Quantification Dispensable for the Measurement of MicroRNAs as Serum Biomarkers in Germ Cell Tumors? *Anticancer Res.* 35:117-121, 2015
99. Spiekermann M, Belge G, Winter N, et al: MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. *Andrology* 3:78-84, 2015
100. Vaitukaitis JL: When Is a Tumor Marker Not a Tumor Marker? *N. Engl. J. Med.* 293:1370-1371, 1975
101. Wagener C, Hossfeld DK: Analytische und diagnostische Validität von Tumormarkern. *Onkologe* 2:278-286, 1996
102. Dorfinger K, Kratzik C, Madersbacher S, et al: Tumor markers in hydrocele fluids of patients with benign and malignant scrotal diseases. *J. Urol.* 158:851-855, 1997
103. Armitage P, Berry G, Matthews JNS: *Statistical methods in medical research* (4th ed.). Oxford, Blackwell Scientific, 2002
104. R Core Team R: *The R Project for Statistical Computing. A language and environment for statistical computing.* Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing, 2013
105. Madersbacher S, Kratzik C, Gerth R, et al: Human chorionic gonadotropin (hCG) and its free subunits in hydrocele fluids and neoplastic tissue of testicular cancer patients: insights into the in vivo hCG-secretion pattern. *Cancer Res* 54:5096-5100, 1994
106. Fiet J, Jardin B, Gourmel B, et al: Spermatic blood beta HCG levels in testicular tumors and in varicocele. *Progr. Clin. Biol. Res.* 203:117-120, 1985
107. Light PA, Tyrrell CJ: Testicular tumour markers in spermatic vein blood. *Br. J Urol.* 59:74-75, 1987

108. Hartmann M, Pottek T, Bussar-Maatz R, et al: Elevated human chorionic gonadotropin concentrations in the testicular vein and in peripheral venous blood in seminoma patients. An analysis of various parameters. *Eur. Urol.* 31:408-413, 1997
109. Wieland RG, Guevara A, Hallberg MC, et al: Spermatic and peripheral venous levels of gonadotropin and testosterone in a teratoma with embryonal cell carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29:398-400., 1969
110. Zenico T, Zoli M, Fiori M, et al: Beta-human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in central and peripheral venous blood of patients with testicular tumors. *Eur. Urol.* 21:37-38, 1992
111. Mumperow E, Hartmann M: Spermatic cord beta-human chorionic gonadotropin levels in seminoma and their clinical implications. *J. Urol.* 147:1041-1043, 1992
112. Warde P, Specht L, Horwich A, et al: Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis. *J. Clin. Oncol.* 20:4448-4452, 2002
113. Scardino PT, Cox HD, Waldmann TA, et al: The value of serum tumor markers in the staging and prognosis of germ cell tumors of the testis. *J. Urol.* 118:994-999, 1977
114. Ehrlich Y, Beck SD, Foster RS, et al: Serum tumor markers in testicular cancer. *Urol. Oncol.* 31:17-23, 2013
115. Wittekind C: TNM-Klassifikation der Hodentumoren Definitionen und Voraussetzungen einer richtigen Anwendung. *Pathologe* 35:252-255, 2014

10. Anhang

10.1 Ergänzende Tabellen

Ergänzende Tabelle 1: Klinische Details und relative miR-371a-3p-Expression in CVB und TVB.

Fall Id	Alter (Jahre)	Histologie S/NS	Teratomanteil in %	Tumorgröße (mm)	Hodenlänge (mm)	pT Stadium	Lokalisation rechts/links	CS	CVB (RQ) Prä-op	TVB (RQ)	CVB (RQ) Post-op
14	35	NS	95%	35	40	pT1	re	1	0.000	669.549	0.000
15	26	S	0	33	45	pT1	re	1	771.729	2,901,834.938	0.022
17	28	NS	0	9	43	pT1	re	1	554.700	2,506.816	n.m.
18	48	S	0	15	45	pT1	re	1	492.184	2,094.250	3.593
19	41	S	0	25	55	pT1	re	1	1,765.523	189,358.699	0.030
20	41	S	0	55	55	pT2	re	1	1,162.388	2,607,999.372	n.m.
21	48	S	0	10	50	pT1	re	1	186.708	1,540.696	0.000
22	22	NS	100%	9	50	pT1	li	1	0.113	695.662	0.000
23	52	S	0	15	32	pT2	re	1	32.767	5,268.124	0.000
25	45	S	0	37	55	pT1	re	1	1,062.353	73,131.747	0.293
26	35	NS	0	54	55	pT2	re	1	2,391.268	151,149.076	n.m.
27	37	S	0	9	43	pT1	re	1	0.542	5,677.671	0.000
28	55	NS	0	9	70	pT2	li	1	10,754.019	5,913,475.246	3.577
29	32	S	0	38	50	pT3	li	1	2,572.260	67,437.259	n.m.
30	37	S	0	9	38	pT1	re	1	0.170	579.579	1.130
31	50	S	0	30	54	pT2	re	1	0.672	36.965	0.000
32	31	S	0	28	50	pT1	li	1	33.209	1,561,473.360	0.013
33	54	S	0	13	35	pT1	li	1	13.014	8,031.733	0.000
34	18	NS	80%	33	55	pT1	li	1	160.518	5,145.532	6.255
36	49	S	0	13	40	pT2	li	1	174.149	8,164.584	0.062
37	36	S	0	15	50	pT1	re	1	200.198	89,097.046	n.m.
38	33	S	0	4	35	pT1	re	1	0.379	5,797.373	0.000
39	45	S	0	40	65	pT2	li	1	14,219.408	5,457,765.911	n.m.
41	41	NS	60%	50	50	pT1	li	1	1,337.139	189,940.808	0.000
42	32	NS	80%	45	55	pT1	li	1	9.545	4,816.550	0.000
43	52	S	0	9	35	pT1	li	1	39.062	1,880.759	0.000
44	31	S	0	45	50	pT2	re	1	3,916.182	558,048.824	0.000
45	34	NS	100%	11	35	pT1	re	1	31.333	225,293.666	n.m.
47	46	S	0	13	33	pT1	re	1	33.220	2,823.738	0.000
50	33	S	0	40	65	pT1	re	1	2,346.870	208,113.811	n.m.

51	30	S	0	28	42	pT2	re	1	0.000	151,462.180	0.000
53	31	NS	60%	30	40	pT2	li	1	3,187.045	420,303.413	1.780
54	31	S	0	35	55	pT2	li	1	1,421.810	29,555.272	0.000
55	25	S	0	18	38	pT1	li	1	11.377	9,126.662	4.421
56	47	S	0	70	45	pT2	li	1	6,455.190	578,028.342	6.840
57	35	S	0	14	55	pT1	re	1	148.968	50,024.153	n.m.
58	41	S	0	12	40	pT2	li	1	375.604	121,497.565	n.m.
59	43	S	0	20	55	pT2	re	1	751.362	15,619.596	0.000
60	45	S	0	65	70	pT2	li	1	1,696.171	36,117.169	2.216
61	41	S	0	19	50	pT1	re	1	58.824	236,977.188	n.m.
62	18	NS	40%	60	60	pT2	li	1	26,865.548	3,192,757.666	n.m.
63	38	NS	0	20	45	pT1	li	1	161.033	2,634.268	0.000
64	26	NS	0	17	55	pT2	li	1	1,859.997	34,846.722	0.000
84	48	S	0	15	40	pT1	re	1	29.599	1,978.289	0.845
85	33	S	0	36	52	pT2	re	1	2,744.063	159,439.236	n.m.
86	23	NS	0	24	55	pT2	re	1	1,310.144	295,863.813	n.m.
87	46	S	0	20	45	pT1	re	1	618.618	7,776.402	0.000
88	44	S	0	40	55	pT2	re	1	338.361	5,757.536	n.m.
89	51	S	0	19	50	pT1	re	1	2.682	1,021.958	n.m.
90	33	S	0	21	38	pT1	re	1	93.625	9,529.994	n.m.
91	49	S	0	50	52	pT2	li	1	1,632.434	2,035,125.560	n.m.
3	20	NS	0	28	50	pT2	re	2b	6,541.110	720,353.011	n.m.
5	26	NS	0	13	52	pT2	re	2a	431.569	9,396.291	n.m.
7	31	NS	0	35	40	pT2	li	2c	10,735.459	61,398.650	n.m.
8	31	S	0	65	65	pT2	li	2b	10,923.638	275,641.593	n.m.
9	47	NS	30%	80	80	pT2	re	2a	23,165.973	1,026,819.036	n.m.
10	32	S	0	25	45	pT1	re	2b	20.331	52.810	n.m.
11	41	S	0	21	32	pT2	re	2a	89.679	43,094.204	n.m.
12	50	S	0	20	55	pT2	li	2a	359.082	12,488.574	n.m.
15	38	NS	100%	15	40	pT1	re	2a	6.894	15,602.878	n.m.
16	46	S	0	60	65	pT2	li	2a	17,209.141	3,476,888.376	n.m.
18	53	S	0	75	75	pT2	li	2a	7,255.988	663,159.012	n.m.
31	46	S	0	45	60	pT2	li	2a	1,914.112	67,292.799	n.m.
4	48	S	0	30	50	pT2	li	3	1,776.780	85,778.392	n.m.

S: Seminom; NS: Nicht-Seminom; CS: klinisches Stadium; pT: pathologisches Tumorstadium; prä-op: präoperativ; post-op: postoperative; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; RQ: Relativer Quantifikations-Wert; n.m.: nicht gemessen; li: links; re: rechts

Ergänzende Tabelle 2: Individuelle Ergebnisse der miR-371a-3p-Messungen im CVB und im TVB der Kontrollpatienten.

Fall Id	Alter	Diagnose	CVB (RQ)	TVB (RQ)
12	42	Spermatozele	0.000	0.000
32	56	Spermatozele	0.037	0.000
33	51	Posttraumatische Fibrose	0.000	28.737
34	50	Epididymoorchitis	0.000	7.769
57	18	Varikozele	0.000	0.000
59	52	Spermatozele	0.000	0.000
63	48	Benigner Nebenhodentumor	0.000	0.000
79	36	Varikozele	9.259	0.758
90	41	Spermatozele	0.000	1.693
96	40	Epididymitis	0.000	3.652

CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; RQ: Relativer Quantifikations- Wert

Ergänzende Tabelle 3: Individuelle Ergebnisse des miR-371a-3p Spiegels in der Hydrozelenflüssigkeit.

Fall Id	Alter	CS	CVB (RQ)	TVB (RQ)	HY (RQ)
25	45	1	1,062.4	73,131.8	707,459.9
26	35	1	2,391.3	151,149.1	20,033.1
28	55	1	10,754.2	5,913,475.3	3,604,889.4
43	52	1	39.1	1,880.8	39,827.8
50	33	1	2,346.9	208,113.8	17,529.8
64	26	1	1,860.0	34,846.7	1,893.8
89	51	1	2.7	1,022.0	56.2
6	27	2b	13,043.9	n.a.	10,999,951.7
18	53	2a	7,256.0	663,159.0	2,632,363.8
125	86	C	n.d.	n.a.	n.d.
128	46	C	n.a.	n.a.	n.d.
131	75	C	n.d.	n.a.	n.d.

C: Kontrolle; CS: Klinisches Stadium; n.a. nicht verfügbar; n.d.: nicht messbar; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; RQ: Relativer Quantifikations-Wert; HY: Hydrozelenflüssigkeit

Ergänzende Tabelle 4: Statistische Quervergleiche (p-Wert) der miR-371a-3p-Spiegel der Patientengruppen aus Abbildung 4.

Patientenkollektiv / Serumquelle	Patientenkollektiv / Serumquelle	p-Wert
C / CVB	CS1 / CVB	< 0.0001
	CS2-3 / CVB	< 0.0001
C / TVB	CS1 / TVB	< 0.0001
	CS2-3 / TVB	< 0.0001
CS1 / CVB	CS1 / TVB	< 0.0001
	CS2-3 / CVB	0.0277
CS1 / HY	CS1 / CVB	0.0313
	C / CVB	0.0004
	C / TVB	0.0007
	CS2-3 / CVB	0.0456
CS2-3 / CVB	CS2-3 / TVB	0.0002

C: Kontrollpatient; CS1: klinisches Stadium 1; CS2-3: klinisches Stadium 2 und 3; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; HY: Hydrozelenflüssigkeit

Ergänzende Tabelle 5: Signifikante Assoziation von miR-Spiegeln in TVB und CVB mit klinischen Parametern bei Patienten im CS1 und CS2-3: Univariate Analyse.

Patientengruppe	Serumquelle	Signifikante	p-Wert
alle Patienten	CVB	Hodengröße	< 0.0001
		Tumorgröße	< 0.0001
		pT-Stadium	0.0005
		Lokalisation	0.0327
		Histologie	0.0415
alle Patienten	TVB	Hodengröße	0.0005
		Tumorgröße	0.0406
		pT-Stadium	0.0312
CS1	CVB	Hodengröße	0.0010
		Tumorgröße	0.0028
		pT-Stadium	0.0046
CS1	TVB	Lokalisation	0.0262
		Hodengröße	0.0006
		pT-Stadium	0.028
CS2-3	CVB	Tumorgröße	0.0001
		Hodengröße	0.0080
CS2-3	TVB	Tumorgröße (log Wert)	0.0300
		pT-Stadium (log Wert)	0.0165

CS1: klinisches Stadium 1; CS2-3: klinisches Stadium 2 und 3; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; Log: logarithmisch; pT: pathologisch

Ergänzende Tabelle 6: Signifikante Assoziation von miR-Spiegeln in TVB und CVB mit klinischen Parametern/Faktoren bei Patienten im CS1 und CS2-3: Multivariate Analyse

Patientengruppe	Serumquelle	Klinische Parameter mit Signifikante Assoziation	p-Wert
alle Patienten	Relation CVB/TVB	Keine	
alle Patienten	CVB	Tumorgröße	0.0211
		Hodengröße	0.0493
alle Patienten	TVB	Hodengröße	0.0129
CS1	Relation CVB/TVB	keine	
CS1	CVB	keine	
CS1	TVB	Hodengröße	0.0068
CS2-3	Relation CVB/TVB	keine	
CS2-3	CVB	Tumorgröße	0.012
CS2-3	TVB	keine (log Wert)	

CS1: klinisches Stadium 1; CS2-3: klinisches Stadium 2 und 3; CVB: Kubitalvenenblut; TVB: Hodenvenenblut; Log: logarithmisch; Relation: Quotient der miR Messwerte TVB versus CVB

10.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Raphael Ikogho versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Untersuchungen zur Spezifität von MicroRNA371 als Serumtumormarker bei Keimzelltumoren - Expression in Hodenvene und in anderen Körperflüssigkeiten sowie bei anderen Tumoren.] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Schenefeld, den 12.02.2016

10.3 Lebenslauf

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

10.4 Publikationsliste

1: Dieckmann KP, Anheuser P, Gehrckens R, Aries SP, Ikogho R, Hollburg W. Factor V Leiden mutation triggering four major complications to standard dose cisplatin-chemotherapy for testicular seminoma: a case report. BMC Urol. 2015 Mar 17;15:21.

2: Spiekermann M, Belge G, Winter N, Ikogho R, Balks T, Bullerdiek J, Dieckmann KP. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. Andrology. 2015 Jan;3(1):78-84.

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Raphael Ikogho hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Dieckmann KP, Anheuser P, Gehrckens R, Aries SP, Ikogho R, Hollburg W. Factor V Leiden mutation triggering four major complications to standard dose cisplatin-chemotherapy for testicular seminoma: a case report. BMC Urol. 2015 Mar 17;15:21. Beitrag im Einzelnen: Zusammenstellung der klinischen Daten des Patienten für den Fallbericht, Literatur-Recherche, Mithilfe bei der Verfassung des Publikationstextes.

Publikation 2:

Spiekermann M, Belge G, Winter N, Ikogho R, Balks T, Bullerdiek J, Dieckmann KP. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. Andrology. 2015 Jan;3(1):78-84. Beitrag im Einzelnen: Rekrutierung der Patienten, klinische Datensammlung, Tabellierung der klinischen Daten, Zusammenführung von klinischen Daten und microRNA-Meßergebnissen. Mithilfe bei der endgültigen Texterstellung für die Publikation.

Hamburg, den 12.02.2016

Prof. Dr. med. K.-P. Dieckmann

Raphael Ikogho

10.5 Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater und urologischem Mentor, Herrn Professor Dr. med. Klaus-Peter Dieckmann, Chefarzt der Urologie des Albertinen-Krankenhauses, für die Überlassung des Themas, die vorbildliche wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, den grenzenlosen Optimismus und die unerschütterliche Motivation danken, ohne die die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht hätte realisiert werden können.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jörn Bullerdiek und die Mitarbeiter des Zentrums für Humangenetik in Bremen für die MicroRNA-Bestimmung, sowie Herrn Dr. Wosniok für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dirk Mumm und die Mitarbeiter des Zentrallabors des Albertinen-Krankenhauses für die Aufbereitung der Serumproben. Allen übrigen Kollegen, die zum Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken.

Meinen beiden Schwestern Belinda und Ezimena möchte ich für die vielen Anregungen bei der Gestaltung und der tatkräftigen Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Bei meinen Eltern Anita und Samuel Ikogho möchte ich mich für die grenzenlose Unterstützung bei allen meinen bisherigen und zukünftigen Projekten bedanken. Ihnen möchte ich die vorliegende Arbeit widmen.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau Nina für ihre Liebe, Ihre Nachsicht und ihre bedingungslose Unterstützung bedanken.