

**Die Bedeutung von Serum – microRNAs (miR-367-3p, miR-371a-3p,
miR-372-3p, miR-373-3p) als Biomarker beim Hodentumor**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Joanna Caroline Bartels

aus Göttingen

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.06.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. S. C. Müller

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	9
1.1	Hodentumor	9
1.1.1	Epidemiologie.....	9
1.1.2	Ätiologie	10
1.1.3	Anatomie und Morphologie	11
1.1.4	Klassifikation	13
1.1.5	Diagnose	18
1.1.6	Therapie	18
1.2	Tumormarker.....	18
1.2.1	Alpha-Fetoprotein.....	19
1.2.2	Humanes Choriongonadotropin	20
1.2.3	Laktatdehydrogenase.....	20
1.3	microRNA.....	21
1.3.1	Geschichte	21
1.3.2	Biogenese von microRNAs	22
1.3.3	microRNAs als Tumorsuppressorgene und Onkogene.....	23
1.3.4	microRNAs als Tumormarker	26
1.3.5	microRNAs und Tumoren.....	27
1.4	Zielsetzung.....	30
2.	Material und Methoden	31
2.1	Materialien.....	31
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Labormaterialien	32
2.1.3	Chemikalien	32
2.1.4	Kits	33
2.1.5	Primer.....	33
2.1.6	Probenmaterial	34
2.1.7	Positivkontrolle	34
2.1.8	Lösungen	35

2.1.9	Software	35
2.2	Methode	36
2.2.1	Probensammlung	36
2.2.2	RNA-Isolation aus Serum.....	36
2.2.3	RNA-Isolation aus Tumorzellen	37
2.2.4	cDNA-Synthese.....	38
2.2.5	Präamplifikation.....	39
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.2.7	Quantifizierung der Messergebnisse.....	46
2.2.8	Statistische Auswertung	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Patientenkollektiv	49
3.2	cel-miR-39 Wiederfindung	52
3.3	Screening-Phase.....	54
3.4	Validierungsphase.....	57
3.4.1	Expression der microRNAs	57
3.4.2	Expression zirkulierender microRNAs in Patienten mit Hodentumor, gesunden Kontrollen und benignen Befunden	58
3.4.3	Korrelation der microRNA-Levels mit dem Tumorstadium.....	66
3.4.4	Prä- und postoperativer Vergleich der microRNA-Levels	67
4.	Diskussion	71
4.1	Screeningphase	72
4.2	Validierungsphase.....	73
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Danksagung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFP	Alpha - Fetoprotein
AUC	area under the curve
bzw.	beziehungsweise
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
Ct	cycle threshold
CUP	cancer of unknown primary
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DS	Dottersacktumor
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EC	Embryonales Karzinom
et al.	et alii (und andere)
GEKID	Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HDL	high density lipoprotein
hPLAP	humane planzentare alkalische Phosphatase
HWZ	Halbwertszeit
IE	Internationale Einheit
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
ITGCN	intratubular testicular germ cell neoplasia
KI	Konfidenzintervall
LATS2	Large Tumor Suppressor homolog 2
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
miRNA	micro Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl

noRT	no-Reverse-Transcriptase-Control
NS	Nicht-Seminom
nt	Nukleotid
NTC	No-Template-Control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert Koch-Institut
RLA	retroperitoneale Lymphadenektomie
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	rounds per minute
rT	reifes Teratom
S	Seminom
Tab.	Tabelle
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen-Klassifikation
UICC	Union internationale contre le cancer
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UTR	untranslated region
vs.	versus
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
95 %-KI	95 % - Konfidenzintervall

1. Einleitung

1.1 Hodentumor

1.1.1 Epidemiologie

Mit 1,6 % machen Hodentumoren nur einen kleinen Teil aller Krebserkrankungen aus, jedoch stellen sie das häufigste Tumorleiden bei jungen Männern dar (Robert Koch-Institut, 2012). Im Alter von 25 - 45 Jahren entfallen 23 % der bösartigen Neoplasien auf das Hodenkarzinom, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 38 Jahren liegt (Robert Koch-Institut, 2012; Winter et al., 2005). Neben dem Hauptaltersgipfel zwischen 30 – 34 Jahren gibt es noch zwei geringere Anstiege in der Häufigkeit. Zum einen bei Jungen in den ersten fünf Lebensjahren, zum anderen bei Männern über 60 Jahren (Huyghe et al., 2003).

Nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch-Instituts (RKI) in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) ist in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Inzidenz des Hodenkarzinoms in Deutschland und Europa zu verzeichnen. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde außerdem eine Verdopplung der Neuerkrankungsrate festgestellt. Im Jahr 2012 erkrankten demnach 4.500 Männer an einem Malignom des Hodens. Altersstandardisiert nach Europastandard bedeutet dies eine Inzidenz von 9,5/100.000 Personen. Deutschland weist damit nach Norwegen, Dänemark und der Schweiz die vierthöchste Neuerkrankungsrate im internationalen Vergleich auf (Stang et al., 2010). Als Grund für den Anstieg der Fallzahlen werden verbesserte diagnostische Techniken, ein erhöhtes Krankheitsbewusstsein, der damit verbundene frühere Diagnosezeitpunkt und eine Veränderung von Umweltfaktoren in Betracht gezogen. Gleichzeitig ist die Mortalität durch Einführung der zytostatischen Therapie mit Cisplatin im Jahr 1974 in den darauf folgenden Jahren deutlich zurückgegangen (Feldman et al., 2008). Die Sterberate beträgt heute noch 0,3/100.000 (153 Sterbefälle/Jahr) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 96 % (Robert Koch-Institut, 2012). Als Folge der Tumorerkrankung und deren Therapie leiden jedoch viele der Patienten an Infertilität und den Nebenwirkungen der Behandlung (Feldman et al., 2008).

Ein großes Problem in der Früherkennung von Hodentumoren ist der allgemein geringe Informationsstand junger Männer in Bezug auf die Selbstuntersuchung (Hautmann und Huland, 2006; Schmelz, 2010). So werden nur ca. 50 % der Neoplasien in den ersten zwei Monaten diagnostiziert (Schmelz, 2010). Obwohl sich etwa 90 % der Tumoren bei Erstdiagnose in den Tumorstadien T1 und T2 befinden, weisen zu diesem Zeitpunkt immerhin 50 % der Nicht-Seminome schon eine lymphogene und hämatogene Metastasierung auf (Hautmann und Huland, 2006). Ein Screening wird aufgrund der geringen Fallzahlen der Erkrankung nicht durchgeführt (Gilligan et al., 2010). Da die frühe Diagnose jedoch entscheidend mit dem Erkrankungsstadium und der Prognose korreliert, kommt der regelmäßigen Selbstuntersuchung eine große Bedeutung zu.

1.1.2 Ätiologie

Zum heutigen Zeitpunkt ist eine genaue Ursache der Entstehung des Hodenkarzinoms noch unbekannt (Stang et al., 2010; Schmelz, 2010). Jedoch sind verschiedene Risikofaktoren bekannt: Die Wichtigsten sind eine vorausgegangene Neoplasie des kontralateralen Hodens und ein kindlicher Kryptorchismus. Trotz adäquater Behandlung durch frühzeitige Orchidopexie besteht ein 4 - 32-fach erhöhtes Tumorrisiko sowohl des maldeszendierten, als auch des kontralateralen Hodens. Eine genetische Disposition wird aufgrund des 4 - 8-fach erhöhten Auftretens von Tumoren bei Verwandten ersten Grades angenommen (Hautmann und Huland, 2006). Ebenso stehen X-chromosomal vererbte Änderungen des Gens TGCT1 im Verdacht, das Entartungsrisiko um etwa 50 % zu erhöhen (Haag et al., 2012/13). Als weitere risikoe erhöhende Faktoren werden endo-krinologische Veränderungen (Östrogenüberschuss), Mumpsorchitis, Hodentrauma, kalorienreiche Ernährung in der Kindheit, Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft und seltene Störungen der Geschlechtsentwicklung (z.B. Klinefelter-Syndrom) angenommen (Hautmann und Huland, 2006; Robert Koch-Institut, 2012). Auch die Zugehörigkeit zur weißen Rasse wird als Risikofaktor diskutiert (Manski, 2013).

1.1.3 Anatomie und Morphologie

Es können benigne und maligne Tumoren des Hodens unterschieden werden. Benigne Tumoren sind das Fibrom, Rhabdomyom und Adenom.

Die malignen Hodentumoren teilen sich auf in germinative Tumoren und gonadale Stromatumoren (Abb. 1). Erstere gehen von den Keimzellen aus und umfassen 95 % aller Hodenkarzinome. Die aus Binde- und Stützgewebe entstehenden gonadalen Stromatumoren machen 4 % der Neoplasien aus. Zu ihnen zählen die Leydig-, Sertoli- und Granulosazelltumoren. Metastasen, deren Ursprung meist ein malignes Lymphom darstellt, bilden 1 % der malignen Neubildungen im Hoden (Haag et al., 2012/13).

Die testikuläre intratubuläre Neoplasie (ITGCN, intratubular testicular germ cell neoplasia) bildet die gemeinsame Vorstufe aller Keimzelltumoren des Hodens. Diese Präkanzerose geht mit einer Entartungswahrscheinlichkeit von nahezu 100 % einher (Dieckmann et al., 2005). Je nach entartendem Zelltypus unterscheidet man Seminome und Nicht-Seminome, die beide zu etwa 50 % auftreten. Seminome haben ihren Ursprung in der Entartung von Spermato gonien und treten typischerweise zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf. Nach histopathologischen Kriterien werden sie in drei Kategorien unterteilt: das klassische, das anaplastische und das spermatozytische Seminom (Weinstein und Hirsch, 2012). Die Gruppe der Nicht-Seminome besteht aus verschiedenen Histologien, in absteigender Häufigkeit Teratokarzinomen (unreifes bzw. reifes Teratom), embryonalen Karzinomen, Dottersacktumoren und Chorionkarzinomen (Feldman et al., 2008). Diese Tumoren haben mit 25 – 30 Jahren einen deutlich früheren Altersgipfel. Mischtypen, die sowohl seminomatöse Anteile als auch Anteile nicht-seminomatöser Tumoren enthalten, machen ca. 10 – 30 % maligner Neubildungen aus. Im Gegensatz zu Nicht-Seminomen bleiben Seminome lange auf den Hoden beschränkt und metastasieren erst spät. Die Metastasierung erfolgt fast ausschließlich lymphogen in die ipsilateralen retroperitonealen, paracavalen und paraaortalen Lymphknoten. Je nach Anzahl und Größe der befallenen Lymphknoten unterscheidet man eine solitäre von einer multiplen Ausbreitung. Ab einem Durchmesser der Absiedlung von über 5 cm spricht man von „Bulky Disease“.

Eine hämatogene Metastasierung tritt meist erst sekundär auf und betrifft in der Regel die Lunge, aber auch Gehirn und Skelettsystem können betroffen sein. Eine Ausnahme bilden Chorionkarzinome, die in 10 % der Fälle schon primär hämatogen streuen.

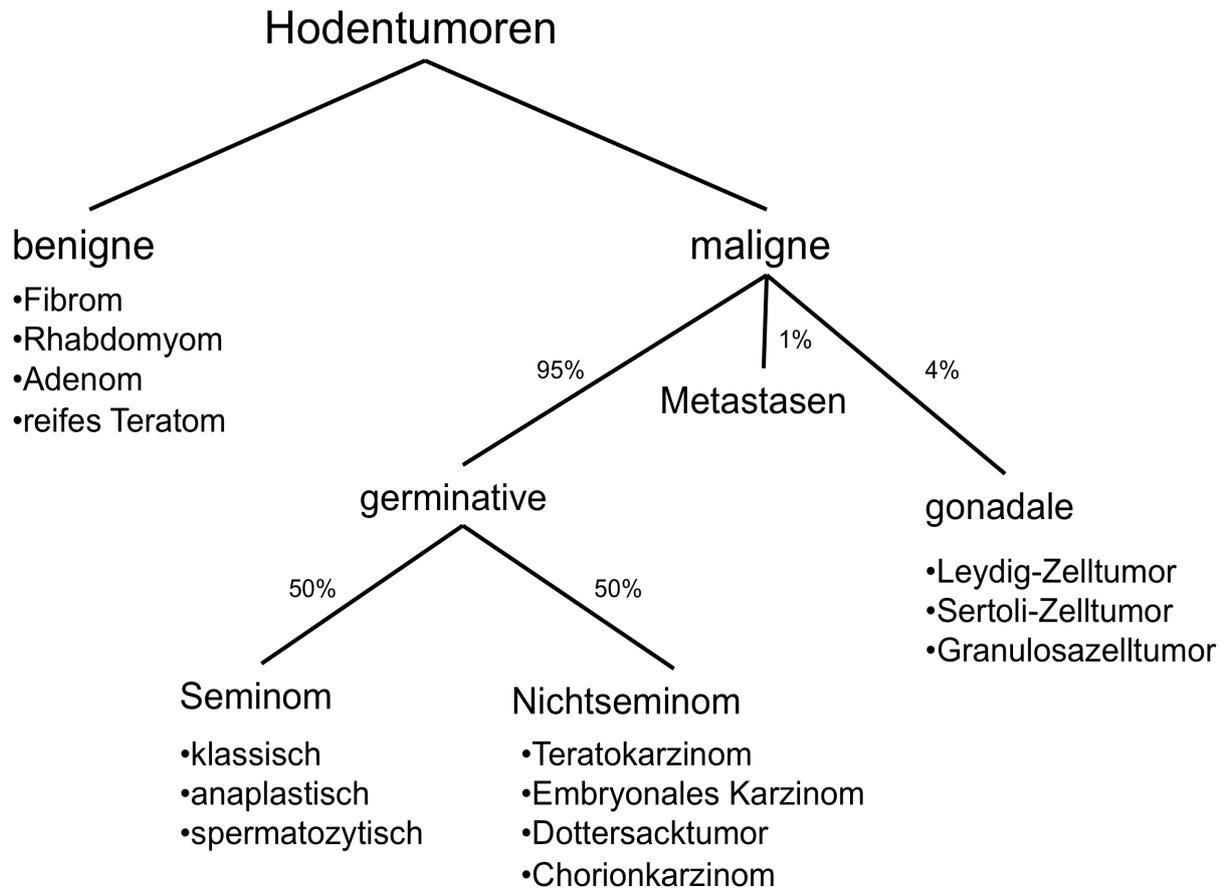


Abb. 1: Einteilung der Hodentumoren in die histologischen Subtypen

1.1.4 Klassifikation

Neben der Unterscheidung von Seminom und Nicht-Seminom ist die Einteilung in Tumorstadien von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck existieren mehrere Klassifikationssysteme, anhand derer eine prognostische Einschätzung sowie auch das therapeutische Vorgehen abgeleitet werden können.

Nach histologischen Aspekten werden die Hodentumoren mithilfe der TNM-Klassifikation (Tumor, Nodus, Metastasen) der Union internationale contre le cancer (UICC) eingeteilt. Ergänzt wird diese durch eine S-Kategorie. Hierbei gibt „T“ Auskunft über die Ausdehnung und Größe des Tumors, wobei durch den Zusatz von „p“ die postoperative, pathologische Untersuchung des Gewebes angezeigt wird. „N“ steht für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. „M“ gibt an, ob bereits Fernmetastasen vorhanden sind. Das zusätzliche „S“ steht für den positiven Nachweis von Serumentumormarkern und differenziert die gemessenen Werte.

Tab. 1: TNM-Klassifikation nach Union internationale contre le cancer (UICC), 7. Edition von 2010

Die Klassifikation von Tumoren erfolgt nach Beurteilung von Tumorausdehnung, Nodus- (Lymphknoten-)befall und Metastasen.

Primärtumor

pTis	intratubulärer Keimzelltumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pT1	Tumor auf Hoden/Nebenhoden begrenzt, ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion (Tunica vaginalis intakt)
pT2	Tumor auf Hoden/Nebenhoden begrenzt, mit Blut-/Lymphgefäßinvasion (Tunica vaginalis befallen)
pT3	Tumor infiltriert Samenstrang ohne oder mit Blut-/Lymphgefäßinvasion
pT4	Tumor infiltriert Skrotum ohne oder mit Blut-/Lymphgefäßinvasion

Lymphknotenmetastasen

NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen LK-Metastasen
N1	solitäre oder multiple LK, max. 2 cm in größter Ausdehnung, max. 5 LK befallen
N2	multiple regionale LK (> 5) oder LK-Konglomerat 2 - 5 cm in größter Ausdehnung oder extranodale Ausbreitung
N3	LK-Konglomerat > 5 cm in größter Ausdehnung

Fernmetastasen

M0	keine Fernmetastasen
M1	vorhandene Fernmetastasen
M1a	nicht-regionale LK- oder Lungenmetastasen
M1b	andere Fernmetastasen

Serumtumormarker

SX	Serumtumormarker nicht bekannt/erhoben
S0	alle Serumtumormarker im Normbereich (AFP < 9 ng/ml, HCG < 2 IE/l, LDH < 248 IE/l)
S1	AFP < 1.000 ng/ml und HCG < 5.000 IE/l und LDH < 1,5 x Normwert nicht überschritten
S2	AFP 1.000 – 10.000 ng/ml oder HCG 5.000 – 50.000 IE/l oder LDH 1,5 – 10 x Normwert
S3	AFP > 10.000 ng/ml oder HCG > 50.000 IE/l oder LDH > 10 x Normwert

Diese Einteilung nach TNM-Kriterien dient weiterhin der Stadieneinteilung des Hodenkarzinoms nach UICC 2010 (Union internationale contre le cancer).

Tab. 2: Stadieneinteilung des Hodentumors anhand der TNM-Klassifikation nach Union internationale contre le cancer (UICC) von 2010

Die Stadieneinteilung von Hodentumoren erfolgt nach Beurteilung von Tumorausdehnung, Nodus- (Lymphknoten)befall und Metastasen.

Stadium	TNM- Gruppierung
Stadium 0	pTis N0 M0 S0/X
Stadium I	
Stadium IA	pT1 N0 M0 S0
Stadium IB	pT2-4 N0 M0 S0
Stadium IS	jedes pT N0 M0 S1-3
Stadium II	
Stadium IIA	jedes pT N1 M0 S0 jedes pT N1 M0 S1
Stadium IIB	jedes pT N2 M0 S0 jedes pT N2 M0 S1
Stadium IIC	jedes pT N3 M0 S0 jedes pT N3 M0 S1
Stadium III	
Stadium IIIA	jedes pT jedes N M1/M1a S0 jedes pT jedes N M1/M1a S1
Stadium IIIB	jedes pT N1-3 M0 S2 jedes pT jedes N M1/M1a S2
Stadium IIIC	jedes pT N1-3 M0 S3 jedes pT jedes N M1/M1a S3 jedes pT jedes N M1b jedes S

Im Gegensatz zur TNM-Einteilung, die lediglich eine Aussage über die Pathologie des resezierten Gewebes geben kann, dienen die Lugano- und IGCCG-Klassifikation dem Zweck der Prognose- und Risikoeinschätzung und der Therapieplanung.

Eine Einteilung nach Cavalli, die sog. Lugano-Klassifikation von 1980, unterstützt in erster Linie die Entscheidung über das weitere therapeutische Vorgehen.

Tab. 3: Lugano-Klassifikation von Hodentumoren nach Cavalli von 1980

Lugano I	Tumor auf den Hoden beschränkt, ohne Metastasen; Low-risk: Tumor < 4 cm High-risk: Tumor > 4 cm oder Rete testis Invasion
Lugano II	retroperitoneale Lymphknotenmetastasen, unterhalb des Zwerchfells
Lugano II A	LK < 2 cm
Lugano II B	LK 2 – 5 cm
Lugano II C	LK > 5 cm „Bulky disease“
Lugano III	Organmetastasen oder LK-Metastasen oberhalb des Zwerchfells

Die IGCCCG-Klassifikation (International Germ Cell Cancer Collaboration Group), die bei Tumoren mit Metastasenbildung angewandt wird, besitzt prognostischen Wert. Bei dieser Einteilung wird zwischen Seminomen und Nicht-Seminomen differenziert.

Tab. 4: International Germ Cell Cancer Collaboration Group (IGCCCG) – Einteilung von Hodentumoren mit Metastasenbildung

Prognose	Nicht-Seminom	Seminom
gut	56 % aller Fälle 5-JÜR > 90 %	90 % aller Fälle 5-JÜR 86 %
	testikulärer/retroperitonealer Primärtumor	jeder Primärtumor
	keine Fernmetastasen (außer pulmonal)	keine Fernmetastasen (außer pulmonal)
	Tumormarker AFP < 1.000 ng/ml HCG < 5.000 IE/l LDH < 1,5 x Normwert	Tumormarker AFP normal jeder HCG-Wert jeder LDH-Wert
intermediär	28 % aller Fälle 5-JÜR 80 %	10 % aller Fälle 5-JÜR 73 %
	testikulärer/retroperitonealer Primärtumor	jeder Primärtumor
	keine Fernmetastasen (außer pulmonal)	viszerale Fernmetastasen (außer pulmonal)
	Tumormarker AFP 1.000-10.000 ng/ml HCG 5.000-50.000 IE/l LDH 1,5-10 x Normwert	Tumormarker AFP normal jeder HCG-Wert jeder LDH-Wert
schlecht	16 % aller Fälle 5-JÜR 50 %	nicht definiert
	mediastinale Primärtumoren	
	viszerale Fernmetastasen (außer pulmonal)	
	Tumormarker AFP > 10.000 ng/ml HCG > 50.000 IE/l LDH > 10 x Normwert	

5-JÜR: 5-Jahres-Überlebensrate
(nach Schmelz et al., 2006)

1.1.5 Diagnose

Eine Größenzunahme des Hodens, Schweregefühl und Gynäkomastie sind erste Anhaltspunkte, die in der anamnestischen Erhebung den Verdacht auf einen Hodentumor aufkommen lassen. Schmerzen treten in den meisten Fällen nicht oder sehr spät auf. Bei der manuellen Palpation können Veränderungen von Konsistenz, Größe und Oberflächenstruktur auffallen. Die reduzierte Verschiebbarkeit der Skrotalhaut und eine negative Diaphanoskopie deuten ebenfalls auf einen Tumor hin. Weitere Diagnostik umfasst die Sonographie des Hodens und die Bestimmung der Tumormarker AFP, HCG und LDH im Serum.

Nach histologischer Sicherung der Diagnose folgt das Staging und die Metastasensuche mithilfe der Computertomographie (CT) von Abdomen, Thorax und eventuell dem Schädel.

1.1.6 Therapie

Goldstandard in der Therapie des malignen Hodentumors stellt die radikale Orchiektomie über einen inguinalen Zugang dar (Krege et al., 2008). Im Zuge dieser Operation erfolgt gegebenenfalls zusätzlich eine Probebiopsie des kontralateralen Hodens. Je nach Tumorentität, Stadium und individueller Risikoabwägung folgen weitere therapeutische Schritte. Diese umfassen Radiatio, Polychemotherapie nach PEB-Schema (Cisplatin + Etoposid + Bleomycin), retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) und Active Surveillance.

1.2 Tumormarker

Als etablierte Tumormarker für das Hodenkarzinom gelten zum heutigen Zeitpunkt alpha-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin (HCG) und Laktatdehydrogenase (LDH). Die Bestimmung der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase (hPLAP) kann fakultativ erfolgen (Albers et al., 2011), hat sich jedoch aufgrund sehr

geringer Spezifität nicht als sinnvoll erwiesen. Insgesamt nur 60 % aller malignen Hodentumoren weisen erhöhte Tumormarker auf (Belge et al., 2012). Diese Tatsache erschwert die Diagnose und die Nachsorge der Marker-negativen Patienten erheblich. Allen Markern gemein ist eine gute Spezifität, die jedoch stark abhängig von den einzelnen Tumor-Subtypen ist. So kann AFP in erster Linie bei Dottersacktumoren, HCG bei Chorionkarzinomen in erhöhtem Maße gefunden werden (Murray und Coleman, 2012). Auch die Sensitivitäten der Marker zeigen mit Werten von 30 - 50 % deutliche Schwächen (Neumann et al., 2011). Zur Zeit kann die mangelnde Genauigkeit der bekannten Marker eine histologische Untersuchung des Gewebes nicht ersetzen (Doherty et al., 1997). So liegt der Schwerpunkt des Einsatzes dieser Marker in der Verlaufskontrolle und Nachsorge. Ihre Serumkonzentrationen sind zum Teil Bestandteil der Klassifikationen nach TNM- und IGCCCG-Standard. In der Primärdiagnose ist ihre Aussagekraft jedoch deutlich eingeschränkt und das Fehlen positiver Marker bedeutet keinesfalls den Ausschluss eines malignen Geschehens (Gilligan et al., 2010).

1.2.1 Alpha-Fetoprotein

Bei Frauen wird das Glykoprotein alpha-Fetoprotein (AFP) während der Schwangerschaft vom Dottersack gebildet. Darüber hinaus kommt es bei malignen Veränderungen des Gastrointestinaltraktes und der Leber, wie zum Beispiel dem hepatozellulären Karzinom, vor (Gilligan et al., 2010). Das onkofetale Protein ist im Serum gesunder Männer nicht nachweisbar (Hautmann und Huland, 2006). Bei Nicht-Seminomen, insbesondere Dottersacktumoren und embryonalen Karzinomen, steigt die Serumkonzentration mit fortschreitendem Tumorstadium an; bis zu 60 % der Nicht-Seminome zeigen erhöhte (positive) Serumspiegel. Bei Tumoren vom Seminom-Typ findet sich kein Anstieg der AFP-Werte. Erhöhte Serumwerte schließen ein Seminom sogar aus. AFP weist eine Sensitivität von 35,7 % und eine Spezifität von 97,1 % auf (Neumann et al., 2011). Der Normwert für AFP liegt bei < 9 IE/ml bzw. < 15 ng/ml. Die Halbwertszeit (HWZ) beträgt etwa 5 - 7 Tage (Gilligan et al., 2010).

1.2.2 Humanes Choriongonadotropin

Humanes Choriongonadotropin (HCG) wird von Keimzelltumoren gebildet und kann im Serum nachgewiesen werden. Hier zeigt sich eine Sensitivität von 32,6 % und eine Spezifität von 98,9 % (Neumann et al., 2011). Noch genauer ist jedoch die Bestimmung der beta-Untereinheit des Glykoproteins, da insbesondere Hypophysentumoren ebenfalls eine Erhöhung von HCG bewirken können. Auch andere Tumoren, wie Blasen-, Nieren-, Lungen- und gastrointestinale Karzinome können einen Serumanstieg von HCG bewirken (Gilligan et al., 2010). HCG ist sowohl bei 30 % der Seminome als auch bei ca. 50 % der Nicht-Seminome nachzuweisen, die höchsten Konzentrationen treten bei Chorionkarzinomen auf. Normwerte im Serum liegen bei 0 - 2 IE/l für HCG und < 5 IE/l für beta-HCG. Die Halbwertszeit liegt bei 24 Stunden.

1.2.3 Laktatdehydrogenase

Patienten mit Keimzelltumoren zeigen in bis zu 60 % der Fälle einen Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum. Das Auftreten dieses Markers ist relativ unspezifisch in Bezug auf das Hodenkarzinom, da viele verschiedene auch nicht maligne Veränderungen im Körper einen Anstieg der LDH bewirken können (Gilligan et al., 2010). Jedoch ist ein Anstieg der LDH mitunter die einzige Veränderung im Blut von Seminom-Patienten und geht in diesen Fällen mit dem Stadium der Tumorausbreitung einher. Insgesamt beträgt die Sensitivität von LDH 31,4 % und die Spezifität 97,8 % (Neumann et al., 2011). Die Normwerte von LDH liegen bei unter 248 IE/l.

1.3 microRNA

1.3.1 Geschichte

1993 entdeckte Rosalind Lee in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) das Gen *lin-4*, welches anstelle von Proteinen für zwei kleine RNA-Stränge kodierte (Lee et al., 1993). Der größere dieser RNA-Stränge wurde später als Precursor (pre-miRNA) identifiziert, der andere, kleinere als reife microRNA (miRNA). Durch komplementäre Bindung der ca. 20 Nukleotide (nt) langen microRNA an die 3' UTR des Gens *lin-14* konnte eine verminderte Translation entsprechender messenger RNA (mRNA) nachgewiesen werden. Nach der Erstbeschreibung dieser micro-Ribonukleinsäure dauerte es noch weitere acht Jahre, bis diese als solche benannt und als eigene Gruppe von small RNAs anerkannt wurde. Im Jahr 2000 wurde eine weitere, ebenfalls 22 nt lange microRNA, *let-7*, in *C. elegans* gefunden, die einen ähnlichen Regulationseinfluss auf das Gen *lin-41* ausübte (Reinhart et al., 2000). Der Einfluss von microRNAs auf die Genregulation (Wachstum, Differenzierung und Apoptose) ist seither ein wichtiges Thema in der Forschung, insbesondere seitdem in den letzten Jahren ihre Rolle in der Entstehung von Krankheiten wie Tumoren bekannt wurde. Der Anstieg der Publikationen zum Thema microRNA macht die wachsende Bedeutung deutlich (Publikationen bei Pubmed in 2001: 5; in 2013: 7241).

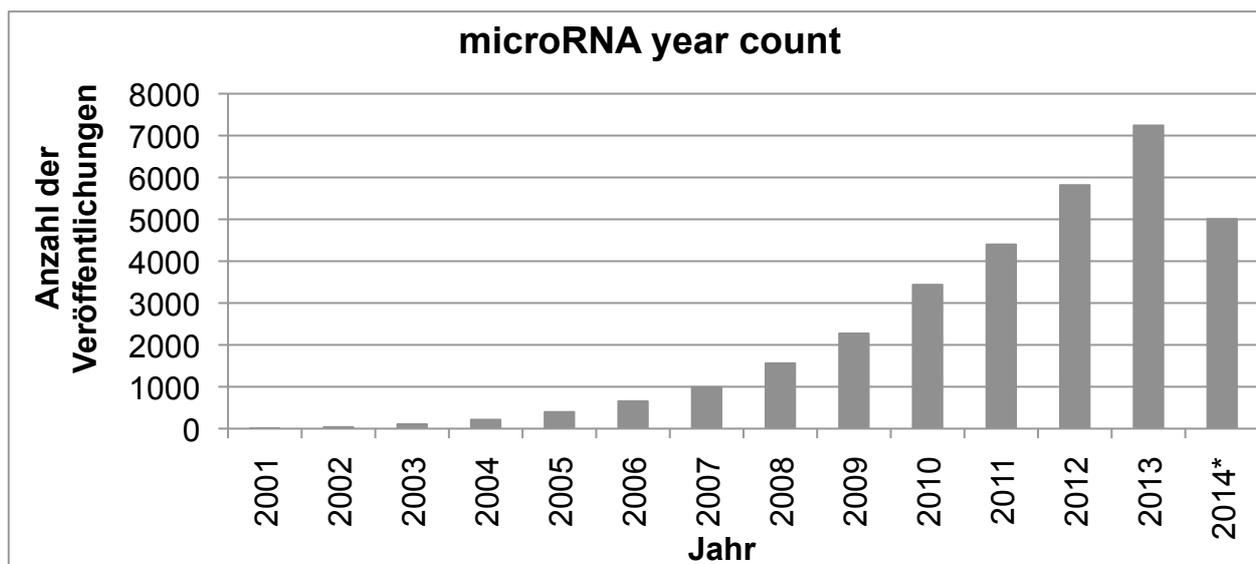


Abb. 2: Veröffentlichungen pro Jahr zum Thema „microRNA“ in Pubmed (*Stand: 24.07.2014)

MicroRNAs sind mit 19 - 25 nt Länge sehr kleine, nicht-kodierende RNA Moleküle. Dennoch regulieren sie durch Bindung an mRNA bis zu 30 % des menschlichen Genoms (Croce, 2009). Über die Hälfte aller microRNA-kodierenden Gene liegt in Krebs-assoziierten Regionen des Genoms, woraus ihre wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen abzuleiten ist (Calin et al; 2004).

1.3.2 Biogenese von microRNAs

Die Bildung von microRNAs beginnt im Nukleus der Zelle mit der Transkription des microRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II. Es entsteht eine ca. 3.000 nt lange RNA-Vorläuferstruktur, die in Haarnadelform vorliegt. Dieses Primärtranskript, die primary microRNA (pri-miRNA), besitzt einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und eine 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende. Aus diesem Vorläufermolekül spaltet das RNase III Enzym, Drosha, und sein Kofaktor Pasha nun die 60 - 80 nt lange precursor microRNA (pre-miRNA) heraus. Die entstandenen pre-microRNAs werden dann mithilfe des Ran- GTP-abhängigen Transporters Exportin 5 aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert. Hier entfernt ein weiteres RNase III Enzym, Dicer, die terminale Schleife der Haarnadel, sodass ein 22 nt langer doppelsträngiger microRNA:miRNA* Komplex (miRNA:miRNA* duplex) entsteht, der durch Spaltung der Stränge die reife einzelsträngige microRNA (mature miRNA) freisetzt. Die microRNA wird in den sogenannten RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) aufgenommen und beeinflusst so die mRNA Regulation auf zwei verschiedenen Wegen. Durch perfekt komplementäre Bindung der microRNA an die mRNA wird die sofortige Zerstörung und der Abbau des mRNA-Stranges eingeleitet. Eine nicht exakt komplementäre Bindung bewirkt die dauerhafte Assoziation des RISC-Komplexes an die mRNA und verhindert so ihre Translation und die Produktion entsprechender Proteine. Dieser Mechanismus wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der Stilllegung von Genen (negative Regulierung der Genexpression). Von beiden genannten Mechanismen wird letzterer weitaus häufiger beobachtet (Wittmann und Jäck, 2010).

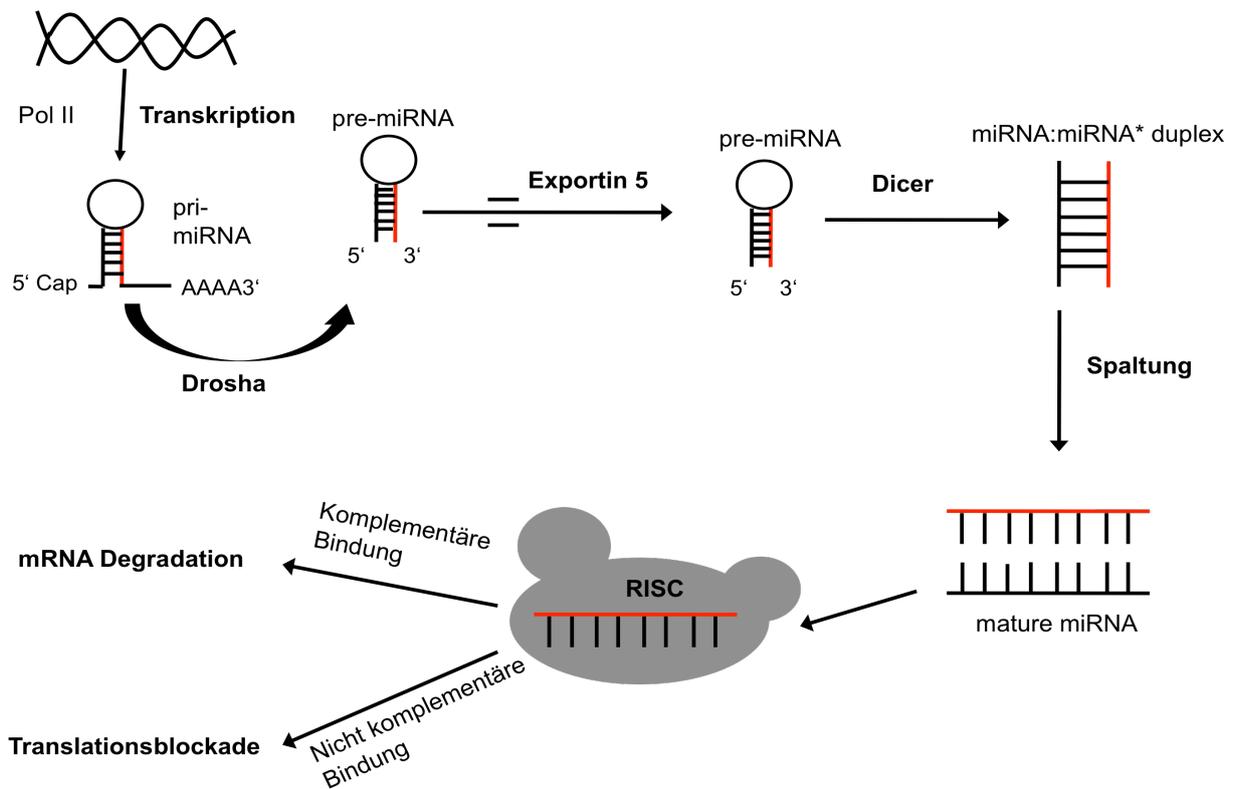


Abb. 3: Biogenese und Funktion von microRNAs

Pol II: Polymerase II; pri-miRNA: primary microRNA; pre-miRNA: precursor microRNA; miRNA: microRNA; mRNA: messenger RNA; RISC: RNA-induced silencing complex; mature miRNA: mature microRNA

1.3.3 microRNAs als Tumorsuppressorgene und Onkogene

Die Entstehung von Tumoren beruht auf Mutationen bestimmter Proteine und Fehlern in den Kontrollmechanismen einer Zelle. Viele Schritte des Zellzyklus sind abhängig von bestimmten Proteinen. Daher unterliegen die kodierenden Genome während des gesunden Zellzyklus regelmäßigen Kontrollen. Wird ein Fehler entdeckt, führt dies automatisch zum programmierten Zelltod, der Apoptose. Kommt es nun zu einer Veränderung dieser Gene, kann der Kontrollmechanismus der Zelle umgangen werden und die Zelle teilt sich unkontrolliert weiter, was der Entstehung von malignen Tumoren entspricht.

Die für diesen Ablauf wichtigen Proteine sind die Tumorsuppressorgene und die Onkogene. Tumorsuppressorgene verhindern, wenn aktiviert, die Entstehung von Tumoren. Tritt jedoch eine Mutation in dem kodierenden Gen auf, wird die schützende Funktion aufgehoben und die Tumorentwicklung wird eingeleitet. Onkogene können durch Mutation aus sogenannten Protoonkogenen entstehen. Zu diesen Protoonkogenen gehören alle den Zellzyklus kontrollierenden Gene, da durch ihren Ausfall oder ihre Veränderung die Kontrollmechanismen umgangen werden können.

Die Eigenschaft von microRNAs, Einfluss auf die Translation von mRNA und somit auf die Expression von Proteinen zu nehmen, gibt ihnen das Potential, durch Reduktion oder Amplifikation sowohl als Tumorsuppressorgene als auch als Onkogene zu wirken (Bartel et al., 2004) (Abb. 4). MicroRNAs mit onkogener Wirkung werden auch als Oncomirs bezeichnet (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

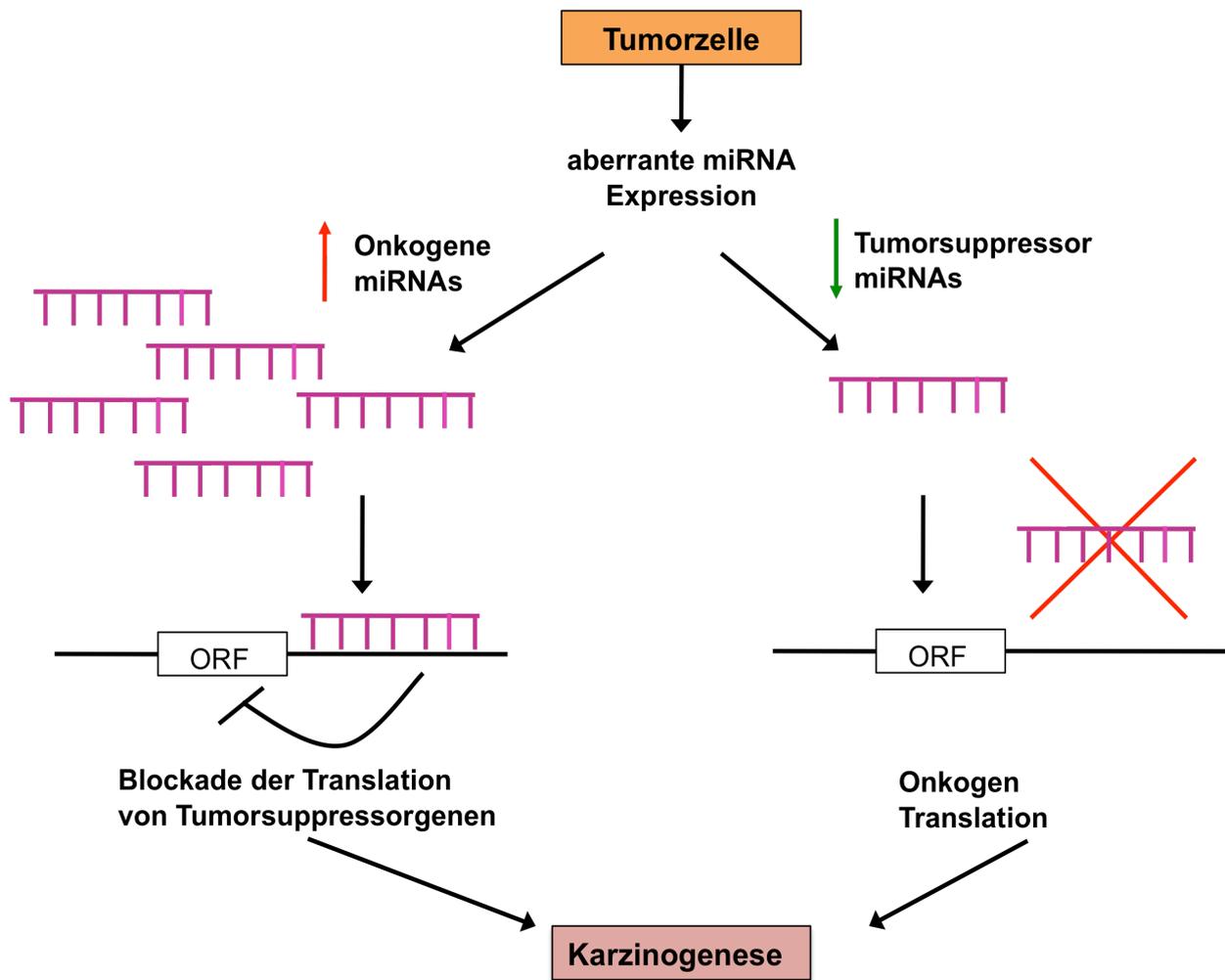


Abb. 4: MicroRNAs als Onkogene und Tumorsuppressorgene

Hochregulation onkogener microRNAs (miRNAs) blockiert die Translation von Tumorsuppressorgenen und führt zur Tumorbildung. Herabregulation oder Verlust von microRNAs mit Tumorsuppressorfunktion fördert die Translation von Onkogenen und damit die Bildung onkogener Proteine und letztlich die Tumorentstehung; ORF: open reading frame

(nach Paranjape et al., 2009)

1.3.4 microRNAs als Tumormarker

Gute Tumormarker müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um einen zuverlässigen Einsatz in der Tumorerkennung und Nachsorge zu garantieren. Sie sollten eine hohe Organspezifität aufweisen, Aussagen über Tumorprogredivenz und -stadium liefern und bestenfalls 100 %ige Spezifität und Sensitivität zeigen. Außerdem sollten sie mittels gering invasiver, standardisierter und reproduzierbarer Methoden gewonnen und bestimmt werden können (Dietrich et al., 2014).

Wie Mitchell et al. (2008) nachweisen konnten, kommen microRNAs tumorspezifisch in den entsprechenden Geweben, aber auch frei zirkulierend im Blut betroffener Patienten vor. Eine Korrelation der microRNA-Konzentration mit der Tumormasse ist anzunehmen. Die Spezifität der einzelnen microRNAs lässt Rückschlüsse auf ihr Ursprungsgewebe und damit den Entstehungsort maligner Entartungen zu (Lu et al., 2005). Chen et al. (2008) konnten zeigen, dass sich diese freien microRNAs höchst stabil gegenüber exogenen Einflüssen verhalten. Starke Temperaturschwankungen, unterschiedliche pH-Levels und auch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren hatten keinen nennenswerten Einfluss auf ihre Expression.

Extrazelluläre RNA kann in vier unterschiedlichen Formen im Blut auftreten: In freier Form, gebunden an Argonaut-2, gebunden an HDL (high density lipoprotein) oder in Vesikeln/Exosomen (Taylor und Gercel-Taylor, 2013). Diese Vesikel ermöglichen den Transport genetischer Information, wie auch onkogener Proteine zwischen Zellen und tragen möglicherweise zur Ausbreitung von Tumoren bei (Taylor und Gercel-Taylor, 2013). Die Resistenz der microRNAs auf endogene RNase-Aktivität deutet darauf hin, dass auch microRNAs im Blut verpackt in Exosomen vorkommen (Mitchell et al., 2008). Das Auftreten tumorassoziierter Mikrovesikel konnte erstmals im Blut von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen gezeigt werden (Taylor et al., 1983). Die Expression von Mikrovesikeln ist unabhängig von Geschlecht und Alter der Patienten (Hunter et al., 2008), verglichen mit gesunden Personen weisen Tumorpatienten jedoch deutlich (3 - 4-fach) höhere Levels an extrazellulären Vesikeln auf (Gercel-Taylor et al., 2012). Ob microRNAs aus lysierten Tumorzellen freigesetzt oder aktiv von Tumorzellen sezerniert werden, ist noch nicht endgültig geklärt (Chen et al., 2012; Taylor und Gercel-Taylor, 2013).

Ihre einfache Gewinnung durch Blutentnahme, ihre hohe Stabilität gegenüber externen und internen Einflüssen und ihre Organspezifität machen exosomale microRNAs zu vielversprechenden Tumormarkern.

1.3.5 microRNAs und Tumoren

Voorhoeve et al. konnten 2006 als Erste einen Zusammenhang von miR-372-3p und miR-373-3p mit testikulären Keimzelltumoren nachweisen und vermuteten daher ihre Wirkung als Onkogene. Die Autoren nahmen an, dass miR-372-3p und miR-373-3p durch direkte Inhibition der Expression des Tumorsuppressors LATS2 (Large Tumor Suppressor homolog 2) die p53-vermittelte Inhibition von CDK (Cyclin dependent Kinase) neutralisieren und so die Proliferation und Tumorgenese erlauben (Abb. 5).

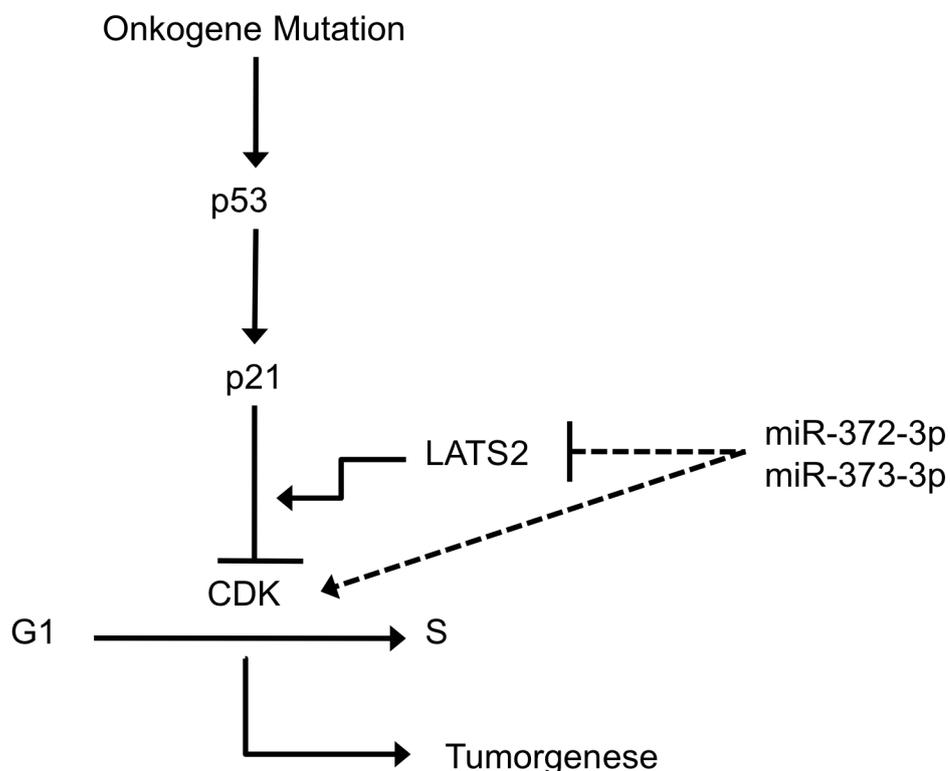


Abb. 5: miR-372-3p und 373-3p unterdrücken onkogen-aktivierten p53-Pfad
 CDK: Cyclin dependent Kinase; LATS2: Large Tumor Suppressor homolog 2
 (nach Voorhoeve et al., 2006)

Gillis et al. (2007) untersuchten Gewebeproben von 56 Hodentumorpatienten und Kontrollen auf die Expression von 156 microRNAs. Das Ergebnis war eine deutliche Überexpression des Clusters miR-371a-3p, -372-3p, -373-3p in Seminomen, embryonalen Karzinomen und Dottersacktumoren. Palmer et al. (2010) stützten diese Erkenntnis in einer Studie mit 74 Hodentumorpatienten und 24 gesunden Kontrollpatienten. Die Arbeitsgruppe zeigte darüber hinaus einen Zusammenhang des Clusters miR-302-3p/367-3p mit malignen Hodentumoren auf. Die zu diesem Cluster gehörenden microRNAs miR-302a-3p - 302d-3p teilen eine identische Seed-Sequenz (AAGUGC) mit den miR-372-3p - 373-3p (Palmer et al., 2010). Die Seed-Sequenz ist eine 6 - 8 Nukleotide lange Sequenz am 5'-Ende der microRNA und besitzt eine wichtige Funktion in der Zielerkennung der microRNAs (Zhang et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden von Murray et al. (2010) in einer Studie mit 23 pädiatrischen Keimzelltumorproben und zwei Proben erwachsener Patienten konstatiert. Anhand eines Fallbeispiels konnte außerdem der postoperative Abfall von miR-372-3p im Serum eines vierjährigen Jungen mit Dottersacktumor beschrieben werden (Murray et al., 2011). Auch Belge et al. (2012) untersuchten den Verlauf der microRNA-Serumlevels anhand einer Kohorte von elf Hodentumorpatienten. Trotz der kleinen Studiengröße zeigte sich fünf Tage postoperativ ein signifikanter Abfall der miR-371a-3p – 373-3p. Dieckmann et al. (2012) bestätigten ein erhöhtes Vorkommen von miR-371a-3p – 373-3p im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren. In den Untersuchungen der Serumproben von 24 Hodentumorpatienten erwies sich miR-371a-3p als viel versprechender Tumormarker. Postoperativ fanden auch Dieckmann et al. eine rapide Regression der Serum-microRNAs und zeigten so die schnelle Clearance der microRNAs.

Alle Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass die Cluster miR-371a-3p – 373-3p und miR-302-3p/367-3p großes Potential als Biomarker für Keimzelltumoren der Hoden aufweisen, jedoch noch weitere Untersuchungen anhand größerer Kohorten vonnöten sein werden, um diese Erkenntnis weiter auszubauen und zu untermauern.

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, wie wichtig microRNAs in der Entstehung von Tumoren und deren Detektion sind. Diverse Forschungsgruppen konnten für

verschiedene Tumorentitäten die Expression spezifischer microRNAs nachweisen. Eine klare Differenzierung zwischen Tumor und gesunder Kontrolle konnte bisher für folgende Tumoren konstatiert werden (Tab. 5):

Tab. 5: Nachweis von Serum-microRNAs bei verschiedenen Tumorentitäten

Tumortyp	Referenz
Blasenkarzinom	Scheffer et al., 2012
Brustkrebs	Heneghan et al., 2010; Iorio et al., 2005; Zhu et al., 2009
Burkitt-Lymphom	Eis et al., 2005; Metzler et al., 2004
Chronisch lymphatische Leukämie	Calin et al., 2002
Kolorektalkarzinom	Huang et al., 2010; Ng et al., 2009
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	Lawrie et al., 2008
Hepatozelluläres Karzinom	Murakami 2006; Yamamoto et al., 2009
Hirntumor (Glioblastom)	Ciafrè et al., 2005; Skog et al., 2008
Lungenkarzinom	Chen et al., 2008; Hu et al., 2010; Rabinowits et al., 2009
Magenkarzinom	Tsujiura et al., 2010
Nierenzellkarzinom	Wulfken et al., 2011
Ovarialtumor	Mitchell et al., 2008; Resnick et al., 2009
Pankreaskarzinom	Ho et al., 2010; Wang et al., 2009
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	He et al., 2005
Prostatakarzinom	Brase et al., 2011; Mahn et al., 2011

1.4 Zielsetzung

Anknüpfend an die Erkenntnisse vorangegangener Studien, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktion der Cluster miR-371a-3p – 373-3p (miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) und miR-302-3p/367-3p (miR-302a-3p, miR-302b-3p, miR-302d-3p, miR-367-3p) als Tumormarker für Keimzelltumoren des Mannes zu überprüfen und bestehende Beobachtungen zu ergänzen.

Ein Zusammenhang der genannten microRNA-Cluster ist durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits bewiesen worden. Die Qualität der verschiedenen microRNAs als Biomarker für das Hodenkarzinom soll hier genauere Betrachtung finden.

Zu diesem Zweck wird das Serum von Patienten mit Hodentumoren maligner Genese mit dem Serum von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit benignen Veränderungen des Hodens verglichen. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten werden die Untersuchungen an einem deutlich größeren Kollektiv von n = 208 durchgeführt.

Die Qualität der einzelnen microRNAs soll auf ihr Differenzierungsvermögen von Malignomen und nicht malignen Proben geprüft werden. Die Levels der microRNAs werden mit Blick auf verschiedene Fragestellungen verglichen. Betrachtet werden Unterschiede in der Expression der microRNAs zwischen malignen, benignen und gesunden Serumproben. Darüber hinaus soll analysiert werden, ob eine Differenzierung der unterschiedlichen Tumorentitäten (Seminom vs. Nicht-Seminom) anhand der microRNA-Levels möglich ist. Auch die Fähigkeit der microRNAs die Ausdehnung und eventuell Metastasierung der malignen Neubildungen des Hodens anhand der Korrelation mit der Stadieneinteilung nach TNM, Lugano und IGCCCG widerzuspiegeln, ist Teil der Untersuchung.

Um die Qualität der microRNAs als Tumormarker einschätzen zu können, werden die diagnostische Spezifität und Sensitivität berechnet. Außerdem wird der Verlauf des Levels der microRNAs im Serum nach Orchiektomie beobachtet, um Informationen über die Halbwertszeit und Tumorspezifität der microRNAs zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
ABI Prism 7900HT	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Einkanal-Pipetten Research® (0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnpipette 4510 Digital 8 Channel Manual Pipette (5 µl – 50 µl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Matrix EXP Pipette 8 Channel (5 µl - 250 µl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Multipette stream®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop-Photometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler UNO – Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.1.2 Labormaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axygen, Union City, California, USA
Integrity Filter Tips (30 µl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Tubes (0,2 ml)	ABGene, Epsom, England
Safe- Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serum-S-Monovette	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
384-Well PCR Platten	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Ethanol 100 %	VWR, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
TE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNase AWAY	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA

2.1.4 Kits

Die verwendeten Kits wurden gemäß der Herstellervorschrift gelagert.

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
mirVana™ PARIS™ Kit AM 1556	Ambion, Life Technologies, Austin, Texas
TaqMan® PreAmp Master Mix Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
TaqMan® Universal Master Mix II with UNG	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
TaqMan® Small RNA Assays	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A V 2.1	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
miScript miRNA cel-miR-39	Qiagen, Hilden, Germany

2.1.5 Primer

Alle Primer stammen von der Firma Applied Biosystems.

miRNA Primer Assay	Part Nummer	Assay ID Nummer	microRNA Sequenz 5' → 3'
cel-mir-39	4440887	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
hsa-miR-371a-3p	4440887	002124	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU
hsa-miR-372-3p	4440887	000560	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
hsa-miR-373-3p	4440887	000561	GAAGUGCUCGUAUUUUGGGGUGU
hsa-miR-367-3p	4440887	000555	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA
miR-302a-3p	4440887	000529	UAAGUGCUCUCCAUGUUUUGGUGA
miR-302b-3p	4440887	000531	UAAGUGCUCUCCAUGUUUUGAGUAG
miR-302c-3p	4440887	000533	UAAGUGCUCUCCAUGUUUCAGUGG

2.1.6 Probenmaterial

Die Serumproben für diese Studie wurden innerhalb des Zeitraumes von 1996 bis 2012 in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn gesammelt. Die Sammlung der Proben erfolgte nach den Standards der Biobank-Initiative des CIO (Centrum für Integrative Onkologie) Köln/Bonn. Insgesamt wurde eine Summe von 208 Proben untersucht. 89 Proben stammten von Patienten mit malignem Hodentumor (Seminom n = 55; Nicht-Seminom n = 34). Die Gruppe der Nicht-Seminome teilte sich weiter auf in 3 Embryonalkarzinome, 1 Dottersacktumor und 30 Mischtumoren (mit Anteilen von Embryonalkarzinomen, Teratomen, Dottersackkarzinomen, Chorionkarzinomen und Seminomen). 17 Proben stammten von Patienten mit benignen Hodenbefunden (Epidermoidzyste n = 7; Leydig-Zelltumor n = 4; Adenom n = 1; reifes Teratom n = 1; Hodeninfarkt n = 1; Spindelzelltumor n = 1; Narbengewebe n = 1; Fibrom n = 1). Die gesunde Kontrollgruppe umfasste 102 Proben. Als gesunde Kontrollpersonen galten alle Männer ohne benigne oder maligne Veränderungen der Hoden. Alle Proben wurden präoperativ gewonnen. Neun der Patienten mit malignem Hodentumor wurde zusätzlich fünf Tage postoperativ Blut abgenommen, um die Levels der microRNAs vergleichen zu können. Aufgrund der Fragestellung handelte es sich ausschließlich um männliche Patienten und Kontrollpersonen.

Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung ihres Blutes. Die Ethik – Kommission des Universitätsklinikums Bonn bewilligte die Durchführung der Studie (Antrag vom 26.07.2012, Lfd. Nr. 169/12). Die Untersuchungen wurden im Sinne der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes 1983 und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

2.1.7 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Tera1 der American Type Culture Collection (ATCC) eingesetzt. In der Studie von Gillis et al. (2007) wurde gezeigt, dass die Ziel-microRNAs von der Tera1 Zelllinie exprimiert werden. Die Zelllinie entstammt einem

Seminom und wurde 1970 aus der Lungenmetastase eines 47-jährigen Patienten gewonnen.

2.1.8 Lösungen

<i>Lösung</i>	<i>Hersteller</i>
1 % DEPC-Wasser	DEPC Treated Water, Ambion, AM9920
1×TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0)	AppliChem, Darmstadt, A0386

2.1.9 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
Data Assist V 3.01	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
RQ Manager V 2.1.1	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
SDS Software V 2.4	Applied Biosystems, Life Technologies, California, USA
SPSS V 21.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.2 Methode

2.2.1 Probensammlung

Die Abnahme des Blutes wurde mit Serum-S-Monovetten durchgeführt, die ein Silikat als Gerinnungsaktivator enthielten. Die weitere Verarbeitung des geronnenen Blutes erfolgte nach einer Zeit von 30 – 120 Minuten. Nach Zentrifugation mit 4000 rpm (rounds per minute) für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden Serum-Aliquots von 2 ml erstellt. Diese wurden bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 RNA-Isolation aus Serum

Die Isolation zellfrei zirkulierender RNA aus 400 µl Serum wurde mit dem mirVana™ PARIS™ Kit der Firma Ambion® durchgeführt. Dieses Kit ist sowohl zur Aufreinigung vollständiger RNA wie auch microRNA geeignet. Zur Inhibition von Enzymen wie RNasen wurde das Ausgangsmaterial (Serum) denaturiert und anschließend durch Acid-Phenol:Chloroform in zwei Phasen aufgetrennt. Die untere Phenol/Chloroform-Phase enthält die Proteine, die Interphase DNA und die obere wässrige Phase die RNA. Letztere wurde mit Ethanol gemischt und auf einen Glasfaser-Filter gegeben, in dem die RNA immobilisiert hängen bleibt. Im letzten Schritt wurde die RNA aus dem Filter gewaschen und aufgefangen.

Um später die Effizienz der durchgeführten RNA-Isolation überprüfen zu können, wurde das Standard-Protokoll um einen Schritt erweitert: die Zugabe von synthetischer microRNA als Housekeeper. Es wurde microRNA-39 des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39) verwendet. Da diese kein Homolog in der menschlichen Sequenz besitzt, ermöglicht die Quantifizierung während der PCR einen Rückschluss auf den Erfolg der Aufreinigung und cDNA-Umwandlung. Während des so genannten Spikings wurden dem Serum 25 fmol cel-miR-39 als exogene Kontrolle hinzugefügt.

In einem Eppendorfgefäß wurden 400 µl Denaturierungspuffer vorgelegt und anschließend mit dem zuvor bei 16.000 rpm 5 Minuten zentrifugiertem Serum gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte das Spiking mit 5 µl synthetischer cel-miR-39 ($c = 5 \text{ fmol}/\mu\text{l}$). Im nächsten Schritt wurden 800 µl Acid-Phenol:Chloroform hinzugefügt und durch mehrmaliges Kippen und Vortexen gut vermischt. Es folgte nun eine Zentrifugation des Gemisches bei 10.000 rpm für 15 Minuten. Nach der hierdurch erfolgten Trennung der Phasen wurden von der oberen wässrigen Phase 500 µl in ein neues Eppendorfgefäß gebracht. Dieser Schritt erfolgte ein zweites Mal, wobei wiederum 500 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurden. Nun wurde das 1,25-fache Volumen 100 %igen Ethanol (625 µl) hinzugefügt und das Gemisch auf einen Filter pipettiert. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde der Durchfluss entfernt. Um Verunreinigungen der im Filter gebundenen Nukleinsäuren zu entfernen, erfolgten ein einmaliges Waschen mit 700 µl Waschpuffer 1 und zweimaliges Waschen mit 500 µl Waschpuffer 2/3. Der Filtereinsatz wurde daraufhin in ein neues Collection Tube überführt. Durch Auftragen von 50 µl 95 °C heißer Elution Solution und anschließender Zentrifugation für 1 Minute mit 10.000 rpm konnte die RNA aus dem Filter gelöst und als Eluat aufgefangen werden. Dieses RNA-enhaltende Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3 RNA-Isolation aus Tumorzellen

5×10^6 Zellen der Tera1 Zelllinie wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 400 µl Cell Disruption Buffer aus dem mirVana Paris Kit für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Denaturierungspuffer hinzugefügt und weiter verfahren wie bei der Serumaufreinigung. Im Anschluss wurde die RNA Konzentration am NanoDrop-Photometer gemessen.

2.2.4 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit und das Standardprotokoll verwendet. Dieses Kit ermöglicht es, reife microRNA von ihren Vorläufern zu unterscheiden und gezielt umschreiben zu können. Die microRNA-spezifischen Loop-Primer (Abb. 6) sind besonders effektiv und präzise bei der Umwandlung sehr kleiner Sequenzen, wie der microRNA, die im Schnitt aus nur 20 nt besteht. Die Loop-Primer binden spezifisch an die jeweiligen microRNA-Sequenzen und verlängern diese, sodass nachfolgend die Reverse Transkriptase arbeiten und einen komplementären DNA-Strang aus dNTPs synthetisieren kann.

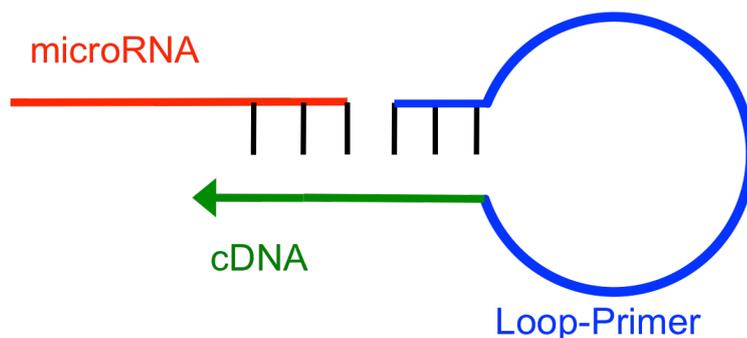


Abb. 6: Aufbau eines Loop Primer

Im Kit enthalten waren Multiscribe[™] RT Enzyme (50 U/ μ l), dNTP mix (100 mM total), 10 \times RT Buffer und ein RNase Inhibitor (20 U/ μ l). Hinzugefügt wurden noch die spezifischen Loop-Primer und Wasser. Zu 5 μ l dieses Ansatzes wurden 2,5 μ l der isolierten RNA hinzugefügt und alles, wie vom Hersteller angegeben, nach folgendem Schema im Thermocycler inkubiert.

Zeit [min]	30:00	30:00	5:00	unendlich
Temperatur [°C]	16	42	85	4

Die erzeugte cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5 Präamplifikation

Um die gering konzentrierten microRNAs in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sicher nachweisen zu können, wurde die synthetisierte cDNA in einem Zwischenschritt vervielfältigt. Das Prinzip der Präamplifikation ist dasselbe wie das einer PCR. Die Taq-Polymerase wird aktiviert und die cDNA-Stränge denaturiert, sodass die Primer anlagern und die Taq-Polymerase einen komplementären Strang anbauen kann. Nach diesem Prinzip wird das Ausgangsmaterial pro Durchlauf verdoppelt.

Bei der Präamplifikation wurden 12 Zyklen durchlaufen. Hierzu wurde das TaqMan® PreAmp Master Mix Kit von Applied Biosystems verwendet. 6,25 µl TaqMan® PreAmp Master Mix, 1,25 µl Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A und 5 µl der verdünnten cDNA ergaben ein Gesamtvolumen von 12,5 µl, das im Thermocycler nach Angaben des Protokolls inkubiert wurde.

	Enzym Aktivierung	12 Zyklen	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
Zeit [min]	10:00	00:15	4:00
Temperatur [°C]	95	95	60

Die präamplifizierte cDNA wurde 1:10 mit 0,1 × TE pH 8,0 Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Zu diesem Zweck werden drei Schritte durchlaufen (Abb. 7). Zunächst wird die DNA bei 95 °C denaturiert und somit in ihre Einzelstränge zerlegt. Die in dieser Arbeit verwendete HotStart Polymerase benötigt zudem eine verlängerte Erhitzungsphase, um aktiviert zu werden, da sie zur Verhinderung unspezifischer Bindungen zuvor durch Antikörper im aktiven Zentrum blockiert ist. Im nächsten Schritt (Annealing) wird die Temperatur auf 60 °C gesenkt, sodass sich die spezifischen Primer

und die fluoreszenzmarkierte Probe optimal anlagern können. Darauf folgt die Elongationsphase, in der die DNA-Polymerase freie Nukleotide am 3'-Ende beginnend anbaut. Diese Schritte werden 40 mal durchlaufen, wobei die DNA jeweils verdoppelt wird.

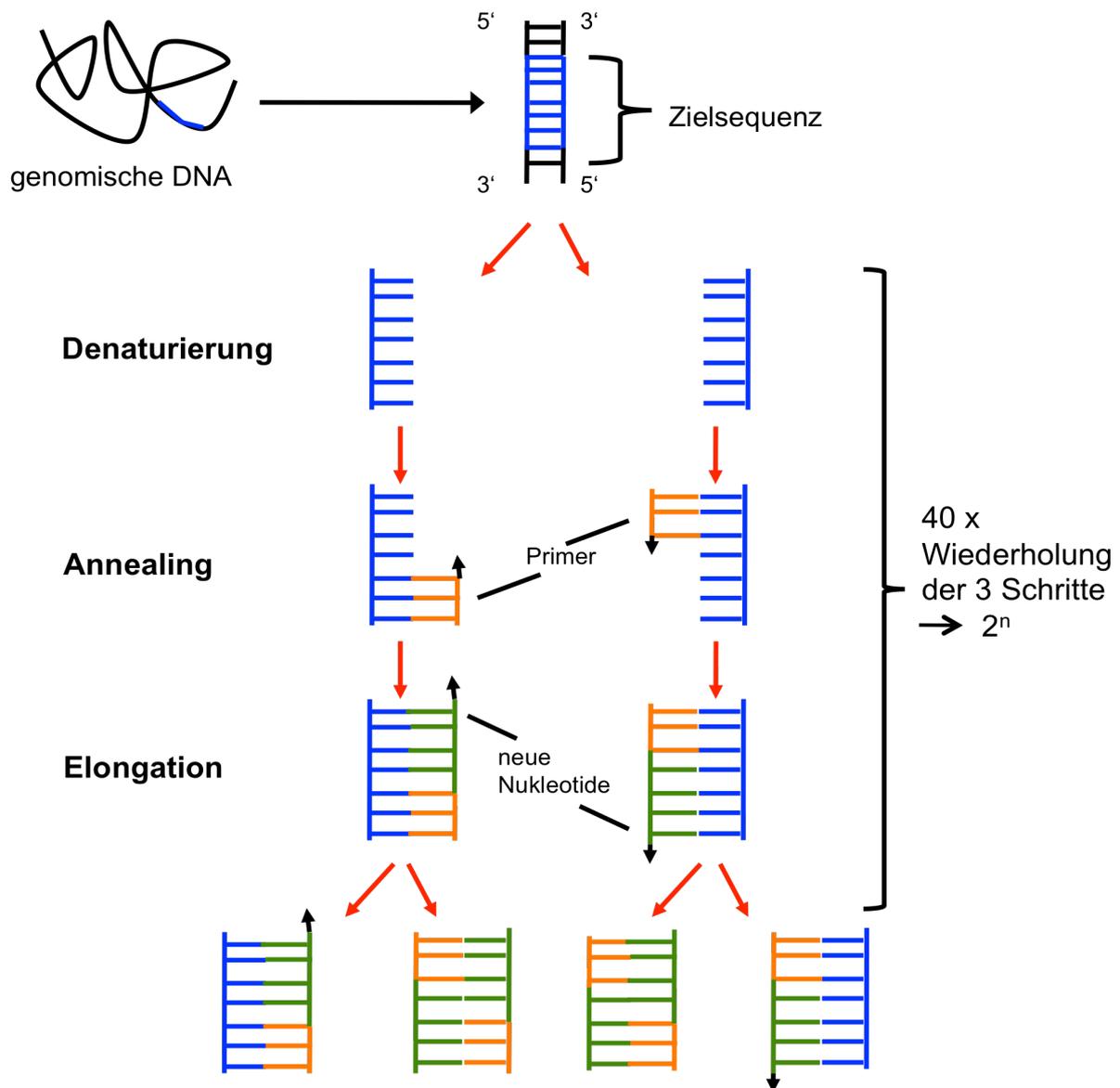


Abb. 7: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die spätere Quantifizierung der PCR wird durch den Einsatz einer fluorogenen Sonde (TaqMan Probe) ermöglicht. Diese Sonde bindet spezifisch an eine Sequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer und besitzt am 5'-Ende einen fluoreszenten Reporter-Farbstoff (R) sowie am 3'-Ende einen Quencher (Q). Im Ausgangszustand befinden sich Reporter und Quencher nah beieinander, wodurch die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird. Verdrängt nun aber die Taq-Polymerase die Sonde von ihrer Bindungsstelle am DNA-Strang, verlieren Reporter und Quencher ihre räumliche Nähe zueinander und der Reporter-Farbstoff wird messbar (Abb. 8). Es entsteht ein sequenzspezifisches Signal, welches in Abhängigkeit der Templatekonzentration mit jedem durchlaufenen PCR-Zyklus zunimmt.

Das Signal wird nach jedem Zyklus gemessen. Sobald es einen bestimmten Schwellenwert (threshold) überschritten hat, kann es von unspezifischen Hintergrundsignalen unterschieden werden. Dieser Punkt wird durch den Ct-Wert (Cycle threshold) gekennzeichnet, der besagt, in welchem Zyklus die Schwelle überschritten wurde. Somit ist der Ct-Wert charakteristisch für die Menge an RNA, die in der Probe vorliegt. Abbildung 9 zeigt das zunehmende Signal in Abhängigkeit der durchlaufenen Zyklen. Ct-Werte von 35 und größer wurden als nicht nachweisbar angesehen.

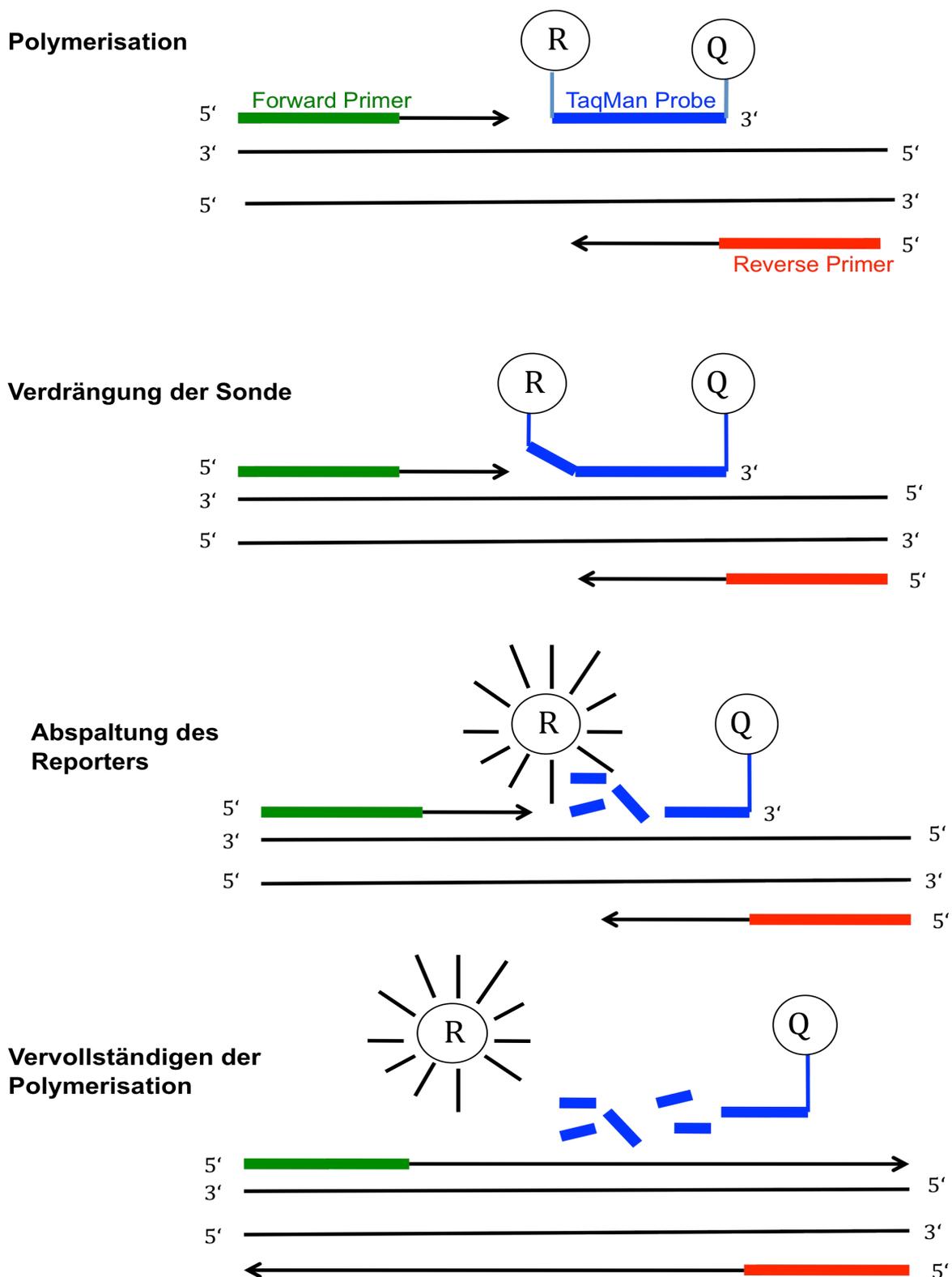


Abb. 8: Schematische Darstellung der Funktion der TaqMan Sonde
 R: fluoreszenter Reporter-Farbstoff; Q: Quencher

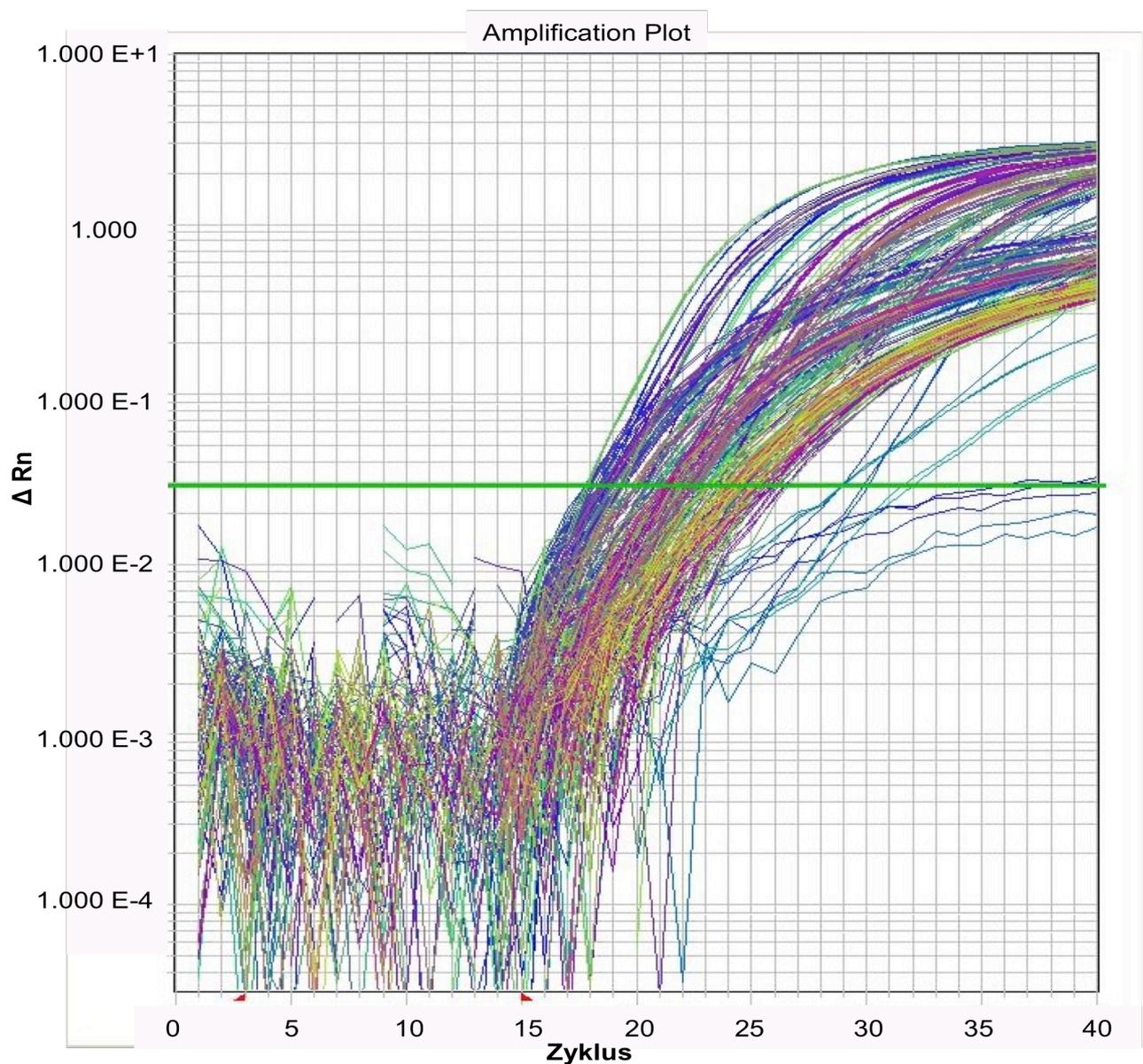


Abb. 9: Polymerase-Kettenreaktion

Dargestellt sind die Amplifikationskurven eines PCR-Durchlaufs mithilfe der Software SDS. Die grüne Horizontale entspricht dem Schwellenwert (threshold). Die y-Achse beschreibt die normalisierte Fluoreszenz-Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffes (ΔR_n), die x-Achse die Anzahl durchlaufener Zyklen

In der vorliegenden Arbeit wurde der TaqMan[®] Universal Master Mix II with UNG der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieses Kit enthält die AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs sowie dTTPs, einen passiven ROX Referenz-Fluoreszenzfarbstoff, der der Normalisierung des Signals der Dreifachbestimmung der einzelnen Proben dient und Uracil-N-Glycosylase (UNG). Dieses Enzym hydrolysiert in bereits amplifizierten

PCR-Produkten uracil-glykosidische Bindungen. Während der PCR-Reaktion wird, wenn vorhanden, dUTP anstatt dTTP in die neu synthetisierten Amplifikate eingesetzt. Vor jedem Zyklus degradiert die UNG die uracil-haltigen Produkte und macht sie als Vorlage (Template) für die folgenden Reaktionen unbrauchbar. Eine Reamplifikation wird so verhindert. Die UNG wird im Zuge der Temperaturerhöhung zu Beginn des nächsten PCR-Zyklus inaktiviert. TaqMan[®] Assays für die jeweilige microRNA wurden hinzugefügt. In diesen Assays waren Forward- und Reverse-Primer, sowie die spezifische TaqMan Probe.

Der PCR-Ansatz wurde auf eine 384-Well-Platte aufgetragen. Jedes Well erhielt 10 µl des Gemisches, wobei für jede Probe eine Dreifachbestimmung in drei nebeneinander liegenden Wells durchgeführt wurde. Die genaue Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Volumina des PCR-Ansatzes

TaqMan [®] Universal MM II	Primer & Probe	preAmp cDNA	Wasser
5 µl	0,5 µl	2,5 µl	2 µl

Das Temperaturprofil wurde dem Protokoll von Applied Biosystems entnommen und im ABI Prism 7900HT programmiert.

	UNG Aktivierung	Polymerase Aktivierung	40 Zyklen	
			Denaturierung	Annealing/ Elongation
Zeit [min]	2:00	10:00	00:15	1:00
Temperatur [°C]	50	95	95	60

Zusätzlich wurden Negativkontrollen zum Nachweis der Spezifität der Primer und dem Ausschluss von Verunreinigungen mit genomischer DNA des PCR-Ansatzes durchgeführt. Dazu wurden No-Template-Controls (NTC) mit Wasser anstelle von DNA-Probenmaterial und no-Reverse-Transcriptase-Controls (noRT) ohne Enzym eingesetzt. Die spezifische Bindung an RNA wurde durch Einsatz genomischer DNA überprüft. Als

Positivkontrolle wurde eine Standardkurve aus der Hodentumorzelllinie Tera1 in sechs Verdünnungsschritten angefertigt.

Verdünnungsschritt	1	2	3	4	5	6
Tera1-Konzentration in ng/μl	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0000001

Anhand der Steigung der Geraden, dem Slope, konnte die Effizienz der PCR für jeden Primer berechnet werden.

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

Optimal wäre ein 100 %ige Verdopplung, also um den Faktor 2 in jedem PCR-Zyklus. Dies ist jedoch ein theoretischer Ansatz, der in der Praxis kaum zu erreichen ist. Die verwendeten Primer wiesen im Durchschnitt eine Effizienz von 96,8 % auf.

Primer	cel-miR-39	miR-367	miR-371a	miR-372	miR-373
Effizienz [%]	100	95,4	97,2	91,8	92,4

Als spätere Referenz-Probe wurde ein Kalibrator gefertigt und eingesetzt. Dieser Kalibrator setzte sich aus Material der Stammzelllinie Tera1 und cel-miR-39 zusammen.

2.2.7 Quantifizierung der Messergebnisse

Der Logarithmus der eingesetzten Menge der Proben verhält sich umgekehrt proportional zu den gemessenen Ct-Werten. Daher kann anhand des Ct-Wertes ein Rückschluss auf die im Serum enthaltene Menge microRNA gezogen werden. Die relative Quantifizierung unserer Ziel-microRNAs und der Vergleich einer großen Zahl von Proben erfordert jedoch eine einheitliche Messgröße oder einen gemeinsamen Bezug. Diese Verbindung kann durch ein endogenes Referenzgen erreicht werden. Die Voraussetzungen für ein solches Referenzgen sind seine ubiquitäre und konstante Expression, ohne auf innere und äußere Einflüsse zu reagieren. Es muss also in malignen wie nicht malignen Organismen stets dieselbe Ausprägung aufweisen. Da sich diverse endogene Referenzgene in unseren Versuchen als unzuverlässig herausstellten, verwendeten wir cel-miR-39 als Referenzgen. Dies stellt zwar im eigentlichen Sinne ein exogenes Referenzgen dar, erfüllt jedoch alle erforderlichen Kriterien eines guten Referenzgens und kann in diesem Fall als endogene Referenz eingesetzt werden (Sanders et al., 2012). Durch das Hinzufügen der exakt gleichen Menge cel-miR-39 zu allen Proben (während der Aufreinigung) können Unterschiede in der Isolations- und PCR-Effizienz anhand der Ct-Werte erkannt und verrechnet werden. Dies geschieht durch die Normalisierung aller Zielgen-Ct-Werte gegen ihre cel-miR-39-Ct-Werte. Für die Normalisierung wurden die Ct-Werte in die unten stehende Formel eingesetzt.

$$\frac{\text{Targetgen}}{\text{Referenzgen}} = \text{Gen (normalisiert)}$$

Zudem wurden alle Proben mit einer Kontrolle, deren Ausgangskonzentration bekannt ist, verrechnet. Die Relativierung mit diesem sogenannten Kalibrator gleicht Differenzen zwischen mehreren Läufen aus.

Durch die Normalisierung und Relativierung der Ergebnisse können Unterschiede in der Ausgangskonzentration, Aufreinigungseffizienz, Fehler in der Umschreibung oder unterschiedliche PCR-Effizienzen verringert werden, da diese sowohl im Referenz- als auch Zielgen auftreten würden.

Dies wird in der folgenden Formel ausgedrückt:

$$\frac{\text{Targetgen}_{\text{Probe}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Probe}}} = \text{Ct}$$

$$\frac{\text{Targetgen}_{\text{Kalibrator}}}{\text{Referenzgen}_{\text{Kalibrator}}}$$

Um beurteilen zu können, ob sich die Levels an microRNAs in den Seren von Hodentumorpatienten und gesunden Kontrollen unterscheiden, bedarf es einer Quantifizierung der Ergebnisse. Mit der Absicht, Unterschiede aufzudecken, ist es wichtig das Verhältnis der Gruppen zueinander zu ermitteln, nicht aber die exakte Konzentration. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse mithilfe der Delta-Delta-Ct-Methode relativ quantifiziert (Livak und Schmittgen, 2001).

Nach der Normalisierung und Relativierung der Ct-Werte kann nun der Delta-Ct-Wert errechnet werden.

$$\Delta\text{Ct} = \frac{\text{Ct}_{\text{Zielgen}}}{\text{Ct}_{\text{Referenzgen}}}$$

Anschließend kann durch Subtraktion der Delta-Ct-Werte der Gruppen ‚Patienten‘ und ‚Kontrollen‘ der Delta-Delta-Ct-Wert berechnet werden:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \frac{\Delta\text{Ct}_{\text{Patienten}}}{\Delta\text{Ct}_{\text{Kontrollen}}}$$

Um den Expressionsunterschied der Gruppen in linearen Werten auszudrücken, wird der sogenannten Fold Change ermittelt. Dazu werden die Delta-Delta-Ct-Werte in die unten stehende Formel eingesetzt:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm IBM® SPSS® Statistics in der Version 21. Die Analyse der in der PCR gewonnenen Daten wurde mit SDS Relative Quantification Software V 2.4 und RQ Manager V 2.1.1 durchgeführt.

Zum Vergleich der Entitäten Tumor, gesunde Kontrolle und benigne Befunde wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Ebenso für die Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten. Ein Zusammenhang von HCG und AFP mit den microRNA-Levels wurde mithilfe der Pearson-Korrelation überprüft. Um Spezifität und Sensitivität der potentiellen Tumormarker zu überprüfen, wurden ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Sammlung und Untersuchung der Serumproben erfolgte in zwei Phasen. In der Screening-Phase wurden zunächst 48 Serumproben untersucht (Tab. 7). Zur Durchführung der Validierungsphase wurde ein Kollektiv von weiteren 160 Serumproben analysiert (Tab. 8). Neben den Gruppen ‚Hodentumor‘ und ‚gesunde Kontrolle‘ wurde diese Kohorte um die Gruppe der benignen Befunde ergänzt.

Tab. 7: Klinisch-pathologische Daten der Patienten aus der Screening-Phase

	Hodentumor n = 30	Seminom n = 15	Nicht-Seminom n = 15	gesunde Kontrolle n = 18
Alter				
Mittelwert	34,5	37,1	31,9	28,7
Spannweite	21 - 51	24 - 51	21 - 46	19 - 49
pT-Stadium				
pT1	19 (63,3 %)	9 (60,0 %)	10 (66,7 %)	n.a.
pT2	5 (16,7 %)	3 (30,0 %)	2 (13,3 %)	n.a.
pT3	5 (16,7 %)	2 (13,3 %)	3 (20,0 %)	n.a.
„burned out“	1 (3,3 %)	1 (6,7 %)	0 (0 %)	n.a.
Lugano-Stadium				
Lugano 1	12 (40,0 %)	7 (22,6 %)	5 (33,3 %)	n.a.
Lugano 2	14 (46,7 %)	7 (22,6 %)	7 (46,7 %)	n.a.
Lugano 3	4 (13,3 %)	1 (6,7 %)	3 (20,0 %)	n.a.
IGCCCG-Klassifikation				
good prognosis	12 (40,0 %)	8 (53,3 %)	4 (26,7 %)	n.a.
intermediate prognosis	4 (13,3 %)	0 (0 %)	4 (26,7 %)	n.a.
poor prognosis	2 (6,7 %)	0 (0 %)	2 (13,3 %)	n.a.
nicht anwendbar	12 (40,0 %)	7 (46,7 %)	5 (33,3 %)	n.a.
Tumormarker positiv				
AFP	10 (33,3 %)	1 (1,8 %)	9 (60,0 %)	n.e.
HCG	15 (50,0 %)	5 (30,9 %)	10 (66,7 %)	n.e.
fehlend	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	18 (100 %)

Anmerkung: Das erhöhte AFP-Level bei einem Patienten mit Seminom ist auf eine bekannte chronische Lebererkrankung zurückzuführen.

n.a.: nicht anwendbar; n.e.: nicht erhoben

Tab. 8: Klinisch-pathologische Daten der Patienten aus der Validierungsphase

	Hoden- tumor n = 59	Seminom n = 40	Nicht- Seminom n = 19	gesunde Kontrolle n = 84	benigner Befund n = 17
Alter					
Mittelwert	35,9	38,2	31,1	32,4	31,9
Spannweite	14 - 59	23 - 59	14 - 54	19 - 64	18 - 57
pT-Stadium					
pT1	45 (76,3 %)	31 (77,5 %)	14 (73,7 %)	n.a.	n.a.
pT2	10 (16,9 %)	5 (12,5 %)	5 (26,3 %)	n.a.	n.a.
pT3	2 (3,4 %)	2 (5,0 %)	0 (0 %)	n.a.	n.a.
„burned out“	2 (3,4 %)	2 (5,0 %)	0 (0 %)	n.a.	n.a.
Lugano-Stadium					
Lugano 1	47 (79,7 %)	33 (82,5 %)	14 (73,7 %)	n.a.	n.a.
Lugano 2	9 (15,2 %)	6 (15,0 %)	3 (15,8 %)	n.a.	n.a.
Lugano 3	3 (5,1 %)	1 (2,5 %)	2 (10,5 %)	n.a.	n.a.
IGCCCG-Klassifikation					
good prognosis	8 (13,5 %)	4 (10,0 %)	4 (21,1 %)	n.a.	n.a.
intermediate prognosis	4 (6,8 %)	3 (7,5 %)	1 (5,2 %)	n.a.	n.a.
poor prognosis	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	n.a.	n.a.
nicht anwendbar	47 (79,7 %)	33 (82,5 %)	14 (73,7 %)	n.a.	n.a.
Tumormarker positiv					
AFP	8 (13,6 %)	0 (0 %)	8 (42,1 %)	n.e.	0 (87,5 %)
HCG	22 (37,3 %)	11 (27,5 %)	11 (57,9 %)	n.e.	0 (87,5 %)
fehlend	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	84 (100 %)	2 (11,8 %)

n.a.: nicht anwendbar; n.e.: nicht erhoben

3.2 cel-miR-39 Wiederfindung

Im Vorfeld der Untersuchungen wurde allen Serumproben cel-miR-39 zugefügt. In allen untersuchten Proben konnte cel-miR-39 detektiert werden, sodass aufgrund dessen von der erfolgreichen RNA-Isolation ausgegangen werden kann.

In der Screening-Phase wurde cel-miR-39 im Durchschnitt mit einer Höhe von 22,1 % in den Hodentumorproben detektiert. Die gesunden Kontrollen zeigten eine Wiederfindung von 60,1 % (Abb. 10). In der Validierungsphase lag die Wiederfindungsrate von cel-miR-39 im Durchschnitt bei 35,3 % für Tumorpatienten, 44,3 % für gesunde Kontrollen und 34,2 % für nicht maligne Hodenerkrankungen (Abb. 11).

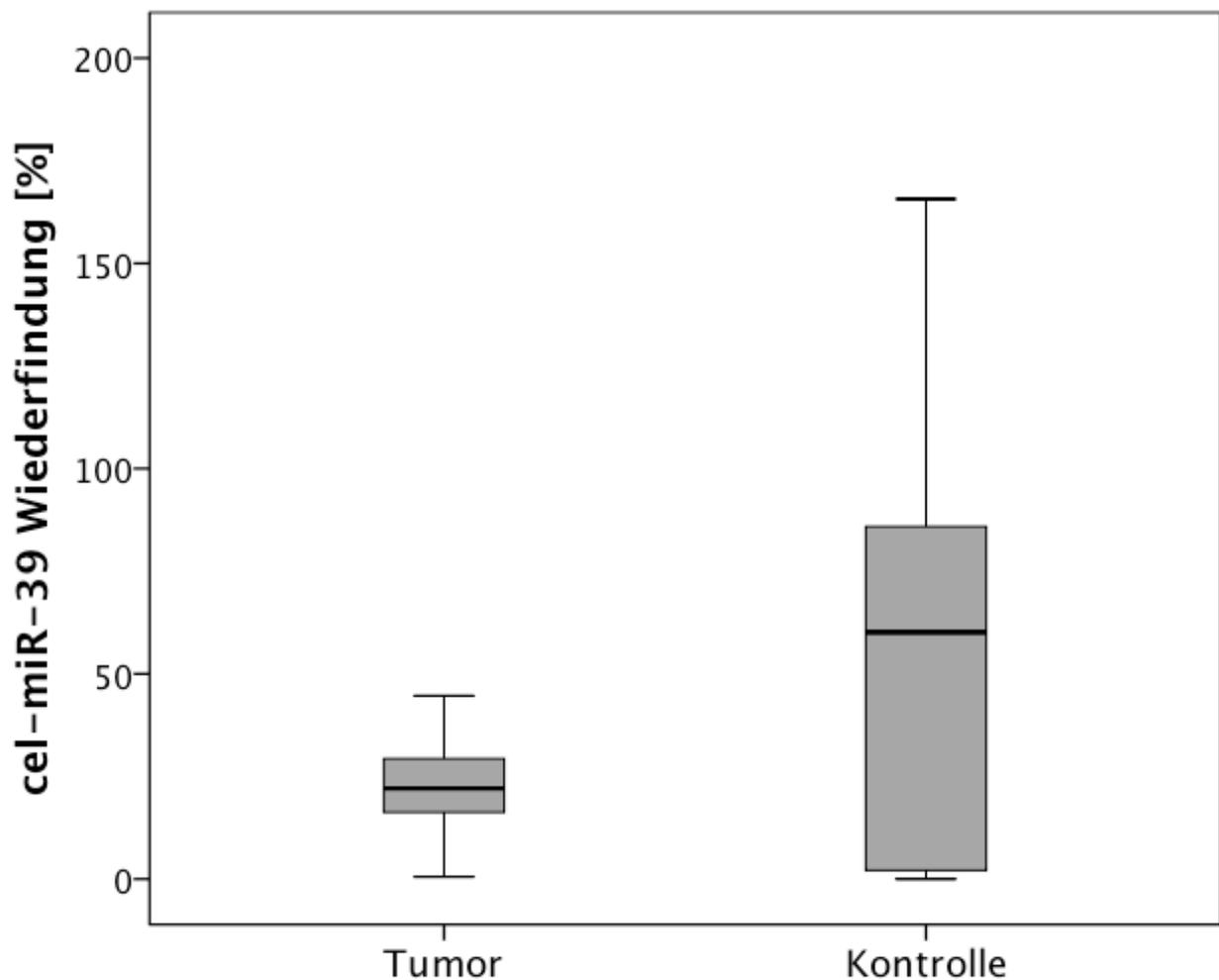


Abb. 10: Wiederfindungsrate von cel-miR-39 in den Serumproben der Screening-Phase unterteilt in die Entitäten Tumor und Kontrolle

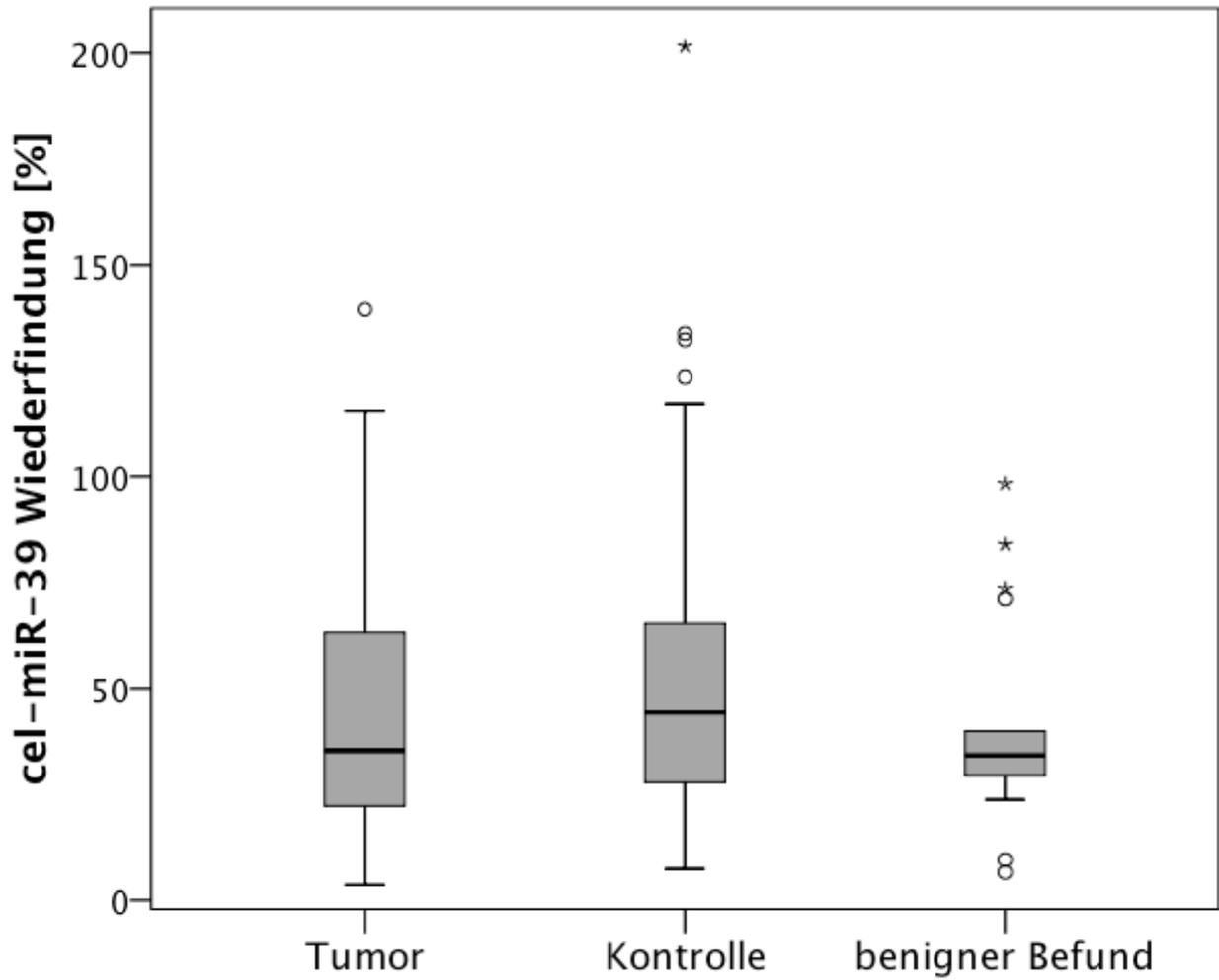


Abb. 11: Wiederfindungsrate von cel-miR-39 in den Serumproben der Validierungsphase unterteilt in die Entitäten Tumor, Kontrolle und benigner Befund; Ausreißer (°), Extremwerte (*)

3.3 Screening-Phase

Ein Screening wurde durchgeführt, um die Expression schon andernorts beschriebener microRNAs bei Hodentumorpatienten zu überprüfen und vielversprechende microRNAs zu identifizieren. In dieser Phase wurden Seren von 30 Hodentumorpatienten (15 Seminome und 15 Nicht-Seminome) und 18 gesunden Kontrollpersonen auf die microRNAs miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p, miR-302a-3p, miR-302b-3p und miR-302c-3p untersucht. In der Gruppe der gesunden Kontrollen wurde in wenigen Proben miR-372-3p (5,6 %) und miR-302c-3p (5,6 %) gefunden. Die restlichen microRNAs waren in den Kontrollproben nicht zu detektieren. Unterteilt in Seminom und Nicht-Seminom konnten in der Gruppe ‚Hodentumor‘ deutlich höhere Mengen der microRNAs nachgewiesen werden. Die Gruppe ‚Seminom‘ zeigte erhöhte Levels von miR-367-3p in 80,0 %, miR-371a-3p in 80,0 %, miR-372-3p in 86,7 % und miR-373-3p in 40,0 % der untersuchten Proben. Die microRNAs des miR-302 Clusters wurden in den Seminom-Proben nicht gefunden. Die Gruppe ‚Nicht-Seminom‘ zeigte miR-367-3p in 86,7 %, miR-371a-3p in 60 %, miR-372-3p in 73,3 % erhöht. MiR-373-3p (26,7 %), miR-302a-3p (26,7 %), miR-302b-3p (13,3 %) und miR-302c-3p (6,7 %) waren in wenigen Proben nachzuweisen (Abb. 12).

Insgesamt zeigten miR-367-3p ($p=0,001$), miR-371a-3p ($p<0,001$) und miR-372-3p ($p<0,001$) hochsignifikant erhöhte Levels in den Seren der Tumorpatienten, wohingegen die restlichen microRNAs (miR-302a-3p, 302b-3p, 302c-3p) keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumor und gesunder Kontrolle erkennen ließen (miR-302a-3p: $p = 0,071$; miR-302b-3p: $p = 0,268$; miR-302c-3p: $p = 0,735$). Bei miR-373-3p ($p = 0,055$) war die Tendenz zu einem erhöhten Level in Tumorproben zu erkennen, sodass diese in die weitere Untersuchung eingeschlossen wurde (Tab. 9).

Abb. 12: Detektion von microRNAs im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren (Unterteilung in Seminom und Nicht-Seminom) und gesunden Kontrollpersonen; graue Markierungen zeigen nachweisbare microRNA an

	Serum Probe	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-302c-3p
gesund	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							
	11							
	12							
	13							
	14							
	15							
	16							
	17							
	18							

	Serum Probe	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-302c-3p
Nicht-Seminom	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							
	11							
	12							
	13							
	14							
	15							

	Serum Probe	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-302c-3p
Seminom	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							
	11							
	12							
	13							
	14							
	15							

Tab. 9: Korrelation zirkulierender microRNAs im Serum von Hodentumorpatienten und gesunden Kontrollen in der Screeningphase

	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-302c-3p
Tumor vs. Gesund	<i>p=0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	p=0,055	p=0,071	p=0,268	p=0,735

Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) sind fett und kursiv gedruckt.

3.4 Validierungsphase

Um die in der Screening-Phase gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden die microRNAs, welche erhöhte Expressionen im Serum von Tumorpatienten zeigten (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p), mithilfe einer größeren Fallzahl untersucht. 160 Serumproben wurden gesammelt. Davon stammten 59 Proben von Patienten mit malignen Hodentumoren (Seminom = 40, Nicht-Seminom = 19), 84 von gesunden Kontrollpersonen und 17 von Patienten mit Hodenbefunden benigner Genese.

3.4.1 Expression der microRNAs

Die Ziel-microRNAs waren in hohen Anteilen in den Tumorproben zu finden: miR-367-3p konnte in 74,6 % ($n = 44$) der Proben detektiert werden, miR-371a-3p in 88,1 % ($n = 52$), miR-372-3p in 91,5 % ($n = 54$) und miR-373-3p in 100 % ($n = 59$). Im Gegensatz dazu fiel die Auffindung der Targets bei den gesunden Kontrollen deutlich geringer aus: miR-367-3p wurde in 16,7 % ($n = 14$) der Proben gefunden, miR-371a-3p in 13,1 % ($n = 11$), miR-372-3p in 39,3 % ($n = 33$). Lediglich miR-373-3p war in fast allen Proben nachweisbar (97,6 % ($n = 82$)). Die Detektion von microRNAs im Serum der Patienten mit benignen Befunden fiel ebenfalls gering aus: miR-367-3p in 11,2 % ($n = 2$), miR-371a-3p in 23,5 % ($n = 4$), miR-372-3p in 41,2 % ($n = 7$). Auch hier fiel miR-373-3p mit einer Expression von 100 % ($n = 17$) auf.

3.4.2 Expression zirkulierender microRNAs in Patienten mit Hodentumor, gesunden Kontrollen und benignen Befunden

Die Tumorproben, die gesunden Kontrollen und die benignen Befunde wurden unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests miteinander verglichen. In der Gegenüberstellung von Tumorproben und gesunden Kontrollen zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) für das Level der Expression aller Ziel-microRNAs (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p). Ebenso stellte sich für alle microRNAs ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) im Vergleich der zirkulierenden microRNAs von Tumor und benignem Befund dar. Die Gegenüberstellung von gesunden Kontrollen und benignen Befunden zeigte ähnliche Levels der Ziel-microRNAs und somit keinen signifikanten Unterschied (für alle $p > 0,3$) (Tab. 10 und Abb. 13 bis 16).

Die Möglichkeit, zwischen seminomatösen und nicht-seminomatösen Tumoren zu unterscheiden, bot allein miR-367-3p. Das Expressionslevel dieser microRNA in Hinblick auf die beiden Entitäten ließ eine Unterscheidung auf signifikantem Niveau ($p = 0,004$) zu. Alle anderen microRNAs zeigten sich nicht geeignet zwischen beiden Tumorentitäten zu differenzieren (miR-371a-3p: $p = 0,303$, miR-372-3p: $p = 0,897$, miR-373-3p: $p = 0,359$).

Tab. 10: Korrelation zirkulierender microRNAs im Serum von Hodentumorpatienten, gesunden Kontrollen und benignen Befunden in der Validierungsphase

	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p
Tumor vs. Gesund	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>
Tumor vs. Benigne	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>	<i>$p < 0,001$</i>
Gesund vs. Benigne	$p = 0,577$	$p = 0,340$	$p = 0,992$	$p = 0,758$
Seminom vs. Nicht-Seminom	<i>$p = 0,004$</i>	$p = 0,303$	$p = 0,897$	$p = 0,359$

Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) sind fett und kursiv gedruckt.

Anhand von Boxplots wird das Verhältnis der microRNA-Levels von Tumorpatienten, Kontrollen und benignen Befunden zueinander graphisch dargestellt (Abb. 13 bis 16).

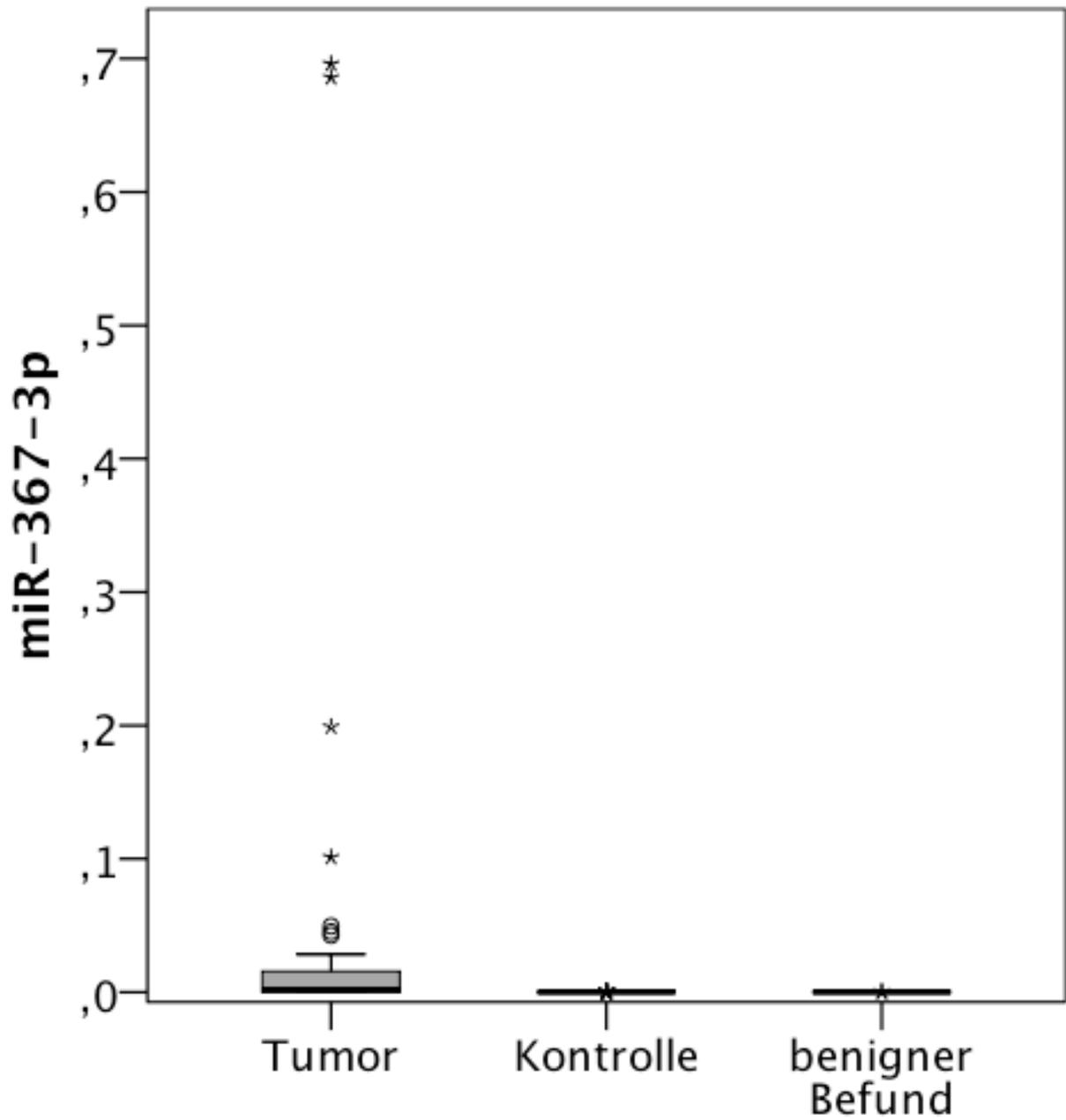


Abb. 13: Relativiertes Level von miR-367-3p im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren, gesunden Kontrollen und benignen Befunden; Ausreißer (°), Extremwerte (*)

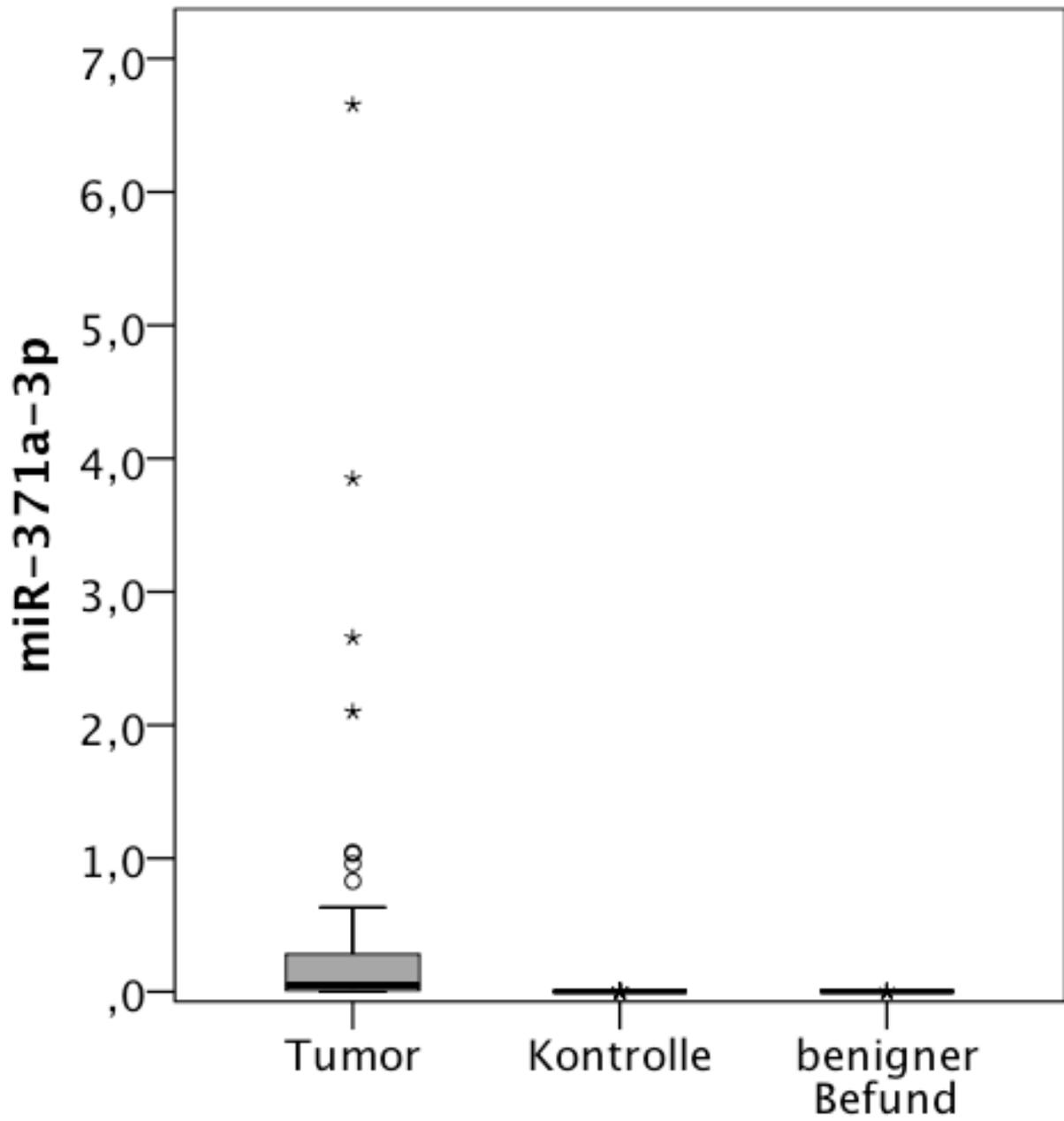


Abb. 14: Relativiertes Level von miR-371a-3p im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren, gesunden Kontrollen und benignen Befunden; Ausreißer (°), Extremwerte (*)

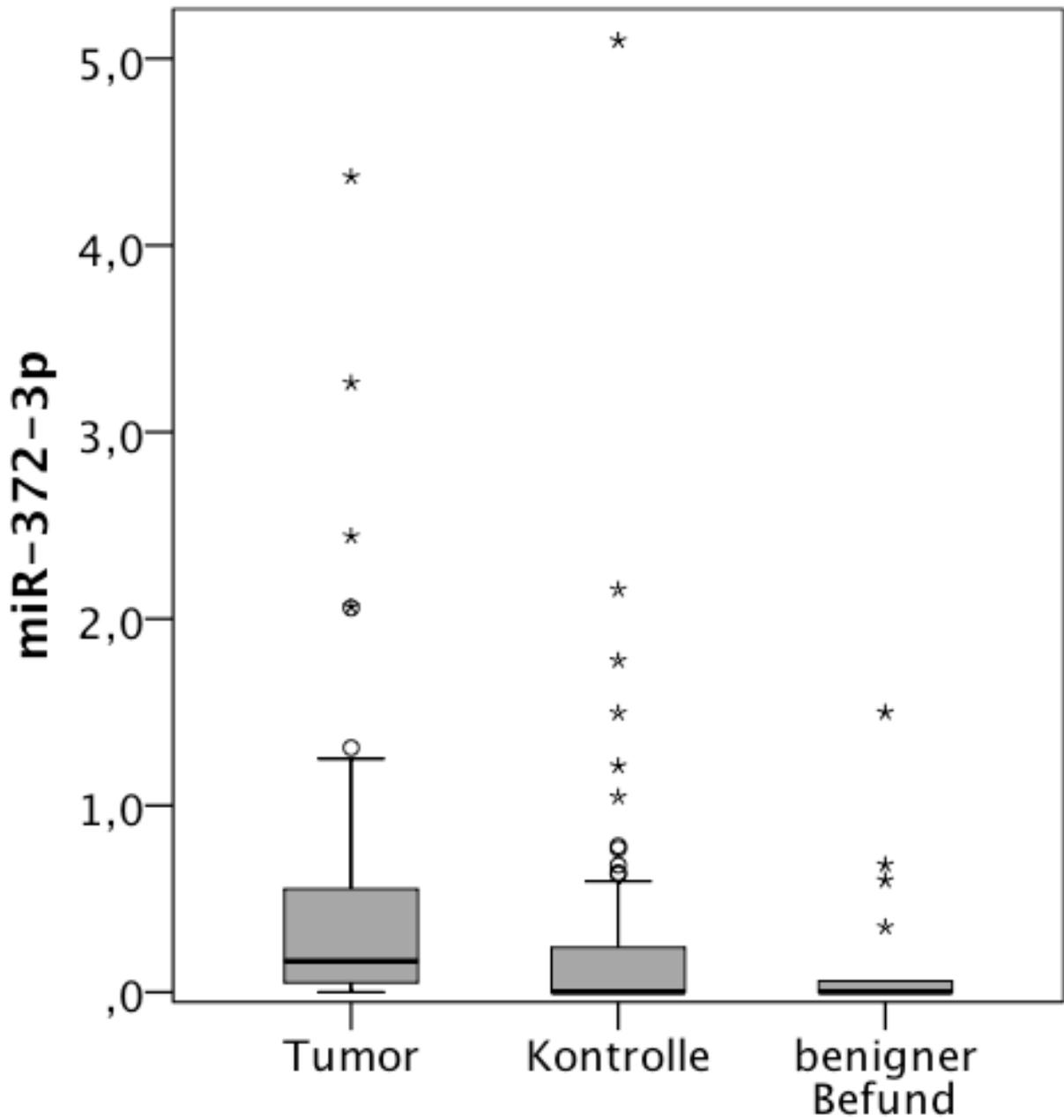


Abb. 15: Relativiertes Level von miR-372-3p im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren, gesunden Kontrollen und benignen Befunden; Ausreißer (°), Extremwerte (*)

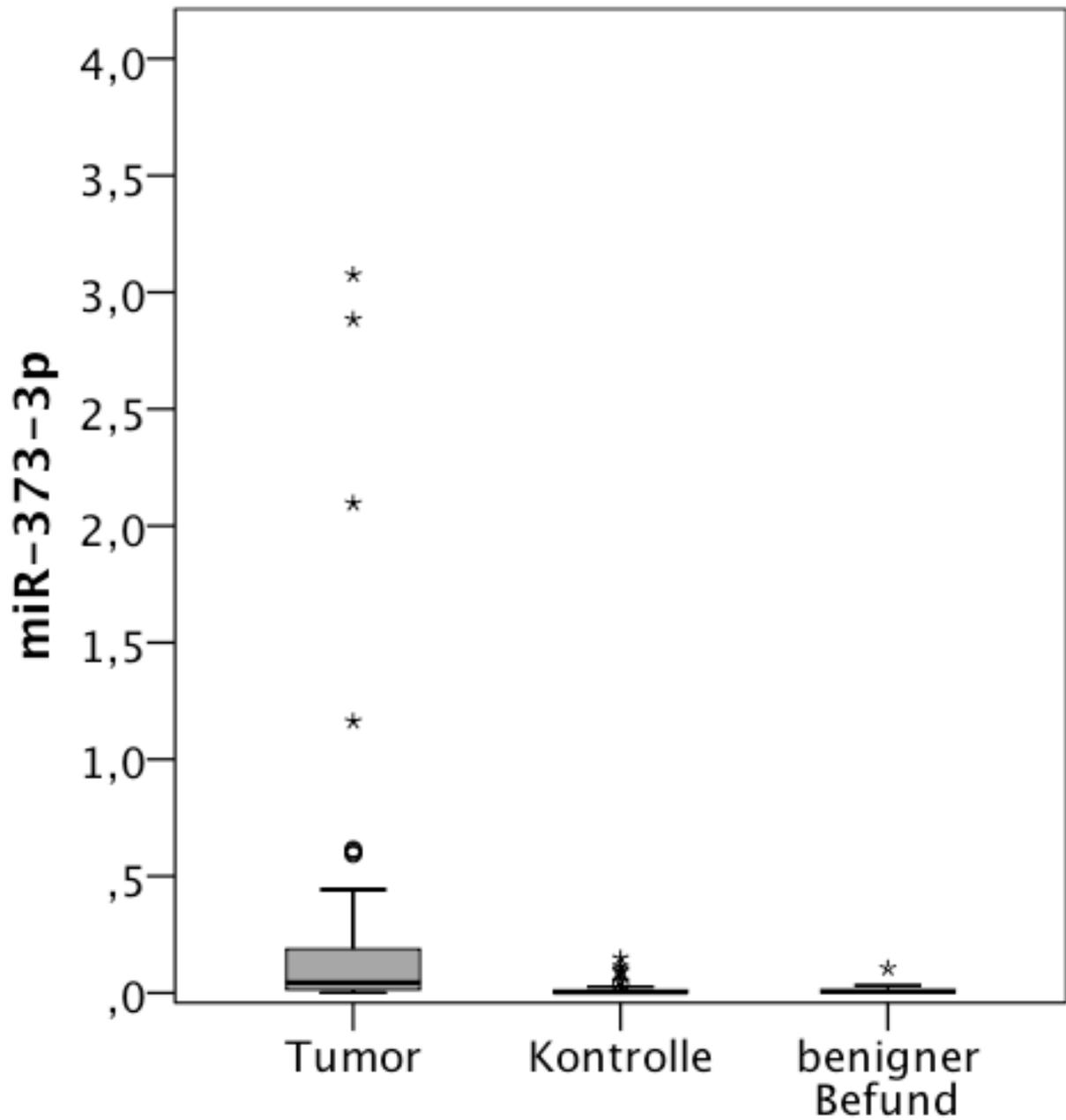


Abb. 16: Relativiertes Level von miR-373-3p im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren, gesunden Kontrollen und benignen Befunden; Ausreißer (°), Extremwerte (*)

Um das diagnostische Vermögen der zirkulierenden microRNAs, also die Sicherheit, Tumor von Gesund zu unterscheiden, einschätzen zu können, wurden Receiver Operating Characteristic-Kurven (ROC) erstellt. Diese Darstellung bestärkt die vorherigen Analysen und zeigt, dass alle vier untersuchten microRNAs in der Lage, sind Tumorproben von gesunden Kontrollen und benignen Befunden klar zu unterscheiden (Abb. 17).

Alle microRNAs weisen eine Sensitivität von über 69 % und eine Spezifität von über 65 % auf. Die beste Trennschärfe zeigt miR-371a-3p mit einer AUC (area under the curve) von 0,929 (95 %-Konfidenzintervall: 0,876 - 0,982), einer Sensitivität von 84,7 % und einer Spezifität von 99,0 % bei einer Schwelle des Serumlevels von 0,0045. Auch miR-367-3p (AUC = 0,847), miR-372-3p (AUC = 0,746) und miR-373-3p (AUC = 0,859) ermöglichen eine Differenzierung von Tumorpatienten und Kontrollen. Die Sensitivitäten dieser drei Marker (miR-367-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) betragen 69,5 %, 91,5 % und 76,3 %, die Spezifitäten 96,0 %, 65,3 % und 80,2 %.

Im Weiteren erfolgt die spezielle Analyse der Untergruppen des Hodentumors aufgeteilt in Seminom und Nicht-Seminom. Hierbei ist in beiden Untergruppen eine sehr genaue Differenzierung von Tumor zu Gesund/Benigne durch die microRNAs möglich. MiR-367-3p (AUC = 0,804 bzw. 0,935) und miR-371a-3p (AUC = 0,924 bzw. 0,940) weisen sehr gute Ergebnisse auf. Besonders auffällig sind die hohen Spezifitäten der beiden microRNAs, die für Seminome bei 94,1 % bzw. 97,0 % und für Nicht-Seminome bei 100 % bzw. 100 % liegen. MiR-367-3p zeigt dabei eine Sensitivität von 65 % für Seminome und 84,2 % für Nicht-Seminome. Bei miR-371a-3p zeigt sich eine Sensitivität von 82,5 % für Seminome und 89,5 % für Nicht-Seminome.

MiR-372-3p weist für beide Entitäten sehr hohe Sensitivitäten auf (Seminom: 90,0 %; Nicht-Seminom: 94,7 %). Die Spezifität liegt für Seminome bei 65,3 % und für Nicht-Seminome bei 66,3 %. MiR-373-3p wiederum zeigt hohe Spezifität in der Unterscheidung zwischen Seminom bzw. Nicht-Seminom und den gesunden Kontrollen (80,2 % bzw. 89,1 %). Auch die Sensitivität von miR-373-3p liegt auf einem hohen Niveau (Seminom: 75,0 %; Nicht-Seminom: 73,7 %) (Tab. 11).

Im Vergleich zu den Tumormarkern HCG und AFP zeigten die microRNAs eine deutlich höhere diagnostische Aussagekraft (AFP: Sensitivität: 13,6 %, AUC = 0,568, 95 %-KI: 0,416-0,719; HCG: Sensitivität: 37,3 %, AUC = 0,686, 95 %-KI: 0,560-0,813).

Tab. 11: Diagnostische Information anhand des Levels zirkulierender microRNAs

	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p
Tumor vs. gesunde/benigne Kontrolle				
AUC	0,847	0,929	0,746	0,859
95 % Konfidenzintervall	0,773-0,920	0,876-0,982	0,669-0,823	0,801-0,917
Sensitivität	69,5 %	84,7 %	91,5 %	76,3 %
Spezifität	96,0 %	99,0 %	65,3 %	80,2 %
threshold	0,0004	0,0045	0,0087	0,0131
Seminom vs. gesunde/benigne Kontrolle				
AUC	0,804	0,924	0,742	0,850
95 % Konfidenzintervall	0,708-0,901	0,858-0,989	0,657-0,826	0,782-0,919
Sensitivität	65,0 %	82,5 %	90,0 %	75,0 %
Spezifität	94,1 %	97,0 %	65,3 %	80,2 %
threshold	0,0003	0,0032	0,0087	0,0131
Nicht-Seminom vs. gesunde/benigne Kontrolle				
AUC	0,935	0,940	0,756	0,878
95 % Konfidenzintervall	0,847-1,000	0,852-1,000	0,662-0,850	0,793-0,964
Sensitivität	84,2 %	89,5 %	94,7 %	73,7 %
Spezifität	100 %	100 %	66,3 %	89,1 %
threshold	0,0008	0,0066	0,0135	0,0228
AUC: area under the curve				

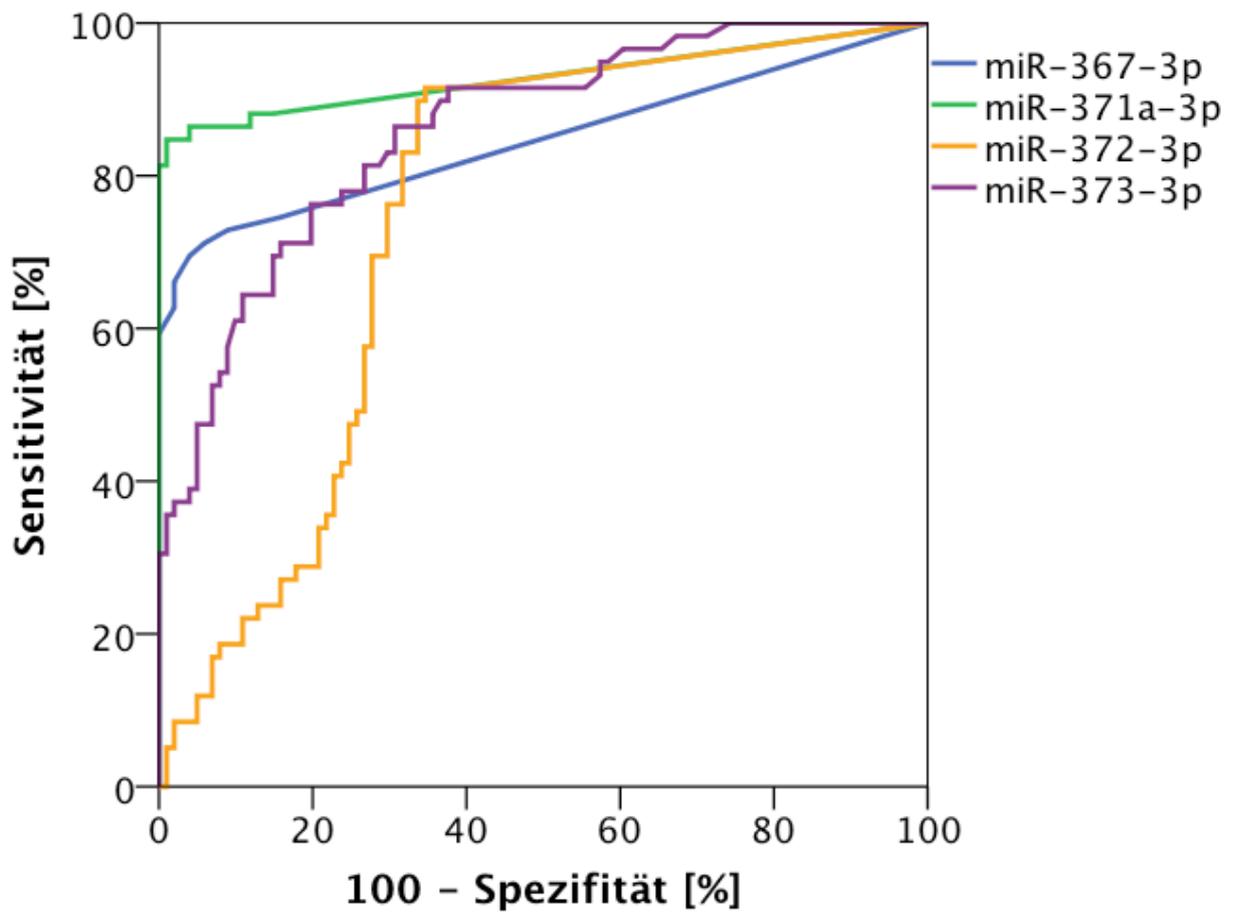


Abb. 17: Receiver Operating Characteristic-Kurve (ROC) zum Differenzierungsvermögen der verschiedenen microRNAs in Bezug auf die Entitäten maligner Tumor, gesunde Kontrolle und benigner Befund: Vergleich der microRNAs 367-3p, 371a-3p, 372-3p und 373-3p hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität.

3.4.3 Korrelation der microRNA-Levels mit dem Tumorstadium

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob zwischen dem Stadium der Tumorerkrankung und dem Level der zirkulierenden microRNAs eine Korrelation besteht. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests wurden die microRNA-Levels mit den Tumorstadien korreliert und auf einen internen Zusammenhang geprüft (Tab. 12). Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden Screeningphase und Validierungsphase in dieser Untersuchung zusammengefasst.

Ein deutlich erhöhtes Level an microRNAs zeigte sich bei Patienten im Tumorstadium pT3. MiR-367-3p, miR-371a-3p und miR-373-3p waren hier im Vergleich zu den Stadien pT1 und pT2 signifikant erhöht (alle $p < 0,05$). Ebenso korrelierte der Metastasierungsgrad des Hodentumors (nach Lugano-Klassifikation) mit erhöhten microRNAs. Hier konnte mittels miR-367-3p, miR-371a-3p und miR-373-3p signifikant zwischen dem Stadium 1 und den Stadien 2 und 3 unterschieden werden ($p < 0,01$). Jedoch gilt zu beachten, dass die Gruppe der Patienten mit Lugano Stadium 3 lediglich sieben Proben (Seminom = 2, Nicht-Seminom = 5) umfasste. Die prognostische Einteilung nach IGCCCG-Klassifikation zeigte keinen Zusammenhang der gemessenen microRNA-Levels mit der Einteilung in die Stadien (alle $p > 0,1$). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Fallzahlen, insbesondere für Patienten mit schlechter Prognose, sehr gering waren ($n = 2$).

Für miR-367-3p konnte eine schwache positive Korrelation mit dem AFP-Niveau ($p = 0,041$; $r = 0,202$) nachgewiesen werden. Die anderen microRNAs zeigten weder eine Korrelation mit AFP noch mit HCG.

Tab. 12: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter mit zirkulierenden microRNA-Levels

	miR-367-3p	miR-371a-3p	miR-372-3p	miR-373-3p
pT-Stadium ¹	<i>p=0,009</i>	<i>p=0,005</i>	<i>p=0,027</i>	<i>p=0,003</i>
pT1 vs. pT2 ²	p=0,252	p=0,333	<i>p=0,017</i>	p=0,098
pT1 vs. pT3 ²	<i>p=0,005</i>	<i>p=0,002</i>	p=0,120	<i>p=0,002</i>
pT2 vs. pT3 ²	<i>p=0,015</i>	<i>p=0,022</i>	p=0,860	<i>p=0,045</i>
klin. Lugano Stadium ¹	<i>p<0,001</i>	<i>p=0,002</i>	p=0,080	<i>p<0,001</i>
Stadium 1 vs. Stadium 2 ²	<i>p<0,001</i>	<i>p=0,012</i>	p=0,111	<i>p=0,002</i>
Stadium 1 vs. Stadium 3 ²	<i>p=0,001</i>	<i>p=0,003</i>	p=0,062	<i>p=0,001</i>
Stadium 2 vs. Stadium 3 ²	p=0,171	p=0,257	p=0,539	p=0,131
IGCCCG Klassifikation ¹	p=0,248	p=0,627	p=0,356	p=0,320
good vs. intermediate prognosis ²	p=0,464	p=0,922	p=0,661	p=0,380
good vs. poor prognosis ²	p=0,127	p=0,383	p=0,156	p=0,326
intermediate vs. poor prognosis ²	p=0,192	p=0,296	p=0,296	p=0,117
AFP ³	<i>p=0,041</i> <i>r=0,202</i>	<i>p=0,078</i> <i>r=0,174</i>	<i>p=0,113</i> <i>r=0,157</i>	<i>p=0,097</i> <i>r=0,164</i>
HCG ³	<i>p=0,834</i> <i>r=-0,021</i>	<i>p=0,814</i> <i>r=-0,023</i>	<i>p=0,692</i> <i>r=-0,039</i>	<i>p=0,806</i> <i>r=-0,024</i>

¹Kruskal-Wallis-Test; ²Mann-Whitney-U-Test; ³Pearson-Korrelationskoeffizient
p<0.05: fett und kursiv hervorgehoben

3.4.4 Prä- und postoperativer Vergleich der microRNA-Levels

Um zu überprüfen, wie sich die microRNA-Levels nach Resektion des malignen Gewebes verhalten und um die tumorspezifische Freisetzung der einzelnen microRNAs zu bekräftigen, wurden präoperative microRNA-Levels mit postoperativen microRNA-Levels verglichen. Die Blutabnahme erfolgte in diesen Fällen vor der Orchiektomie und fünf Tage postoperativ. Betrachtet wurden 9 Patienten (5 Seminom, 4 Nicht-Seminom)

im klinischen Lugano-Stadium 1A, somit ohne bestehende Metastasierung. Bei zwei dieser Patienten wurde zu therapeutischen Zwecken zusätzlich eine retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) (pN0) durchgeführt. Drei Patienten wurden postoperativ der Surveillance-Strategie zugeführt, drei Patienten wurden bestrahlt und ein Patient erhielt eine Chemotherapie mit Cisplatin. Keiner der Patienten erlitt im ermittelten Zeitraum ein Rezidiv.

Für miR-371a-3p konnte bei allen Patienten eine deutliche Abnahme des microRNA-Levels verzeichnet werden. Bei fünf von ihnen sank das Serumlevel sogar unter die Nachweisgrenze. MiR-367-3p zeigte ebenfalls eine postoperative Reduktion des microRNA-Vorkommens. Wiederum bei sechs Patienten konnte postoperativ keine miR-367-3p-Expression nachgewiesen werden. Auch die Levels von miR-372-3p und miR-373-3p lagen postoperativ signifikant niedriger als präoperativ. Jedoch zeigten zwei Patienten einen Anstieg von miR-372-3p und drei Patienten von miR-373-3p (Tab. 13 und Abb. 18).

Tab. 13: Serum-microRNA-Levels prä- und postoperativ bei Patienten mit Hodentumor im Lugano Stadium 1A

Tumor-Subtyp	Therapie	miR-367-3p		miR-371a-3p		miR-372-3p		miR-373-3p	
		prä	post	prä	post	prä	post	prä	post
S	R	0,0000	0,0000	0,0054	0,0038	0,0529	0,0000	0,0163	0,0031
S	C	0,0000	0,0000	0,0075	0,0025	0,7756	0,2240	0,0174	0,2413
S	Sur	0,0003	0,0001	0,0502	0,0000	1,3453	0,5290	0,2629	0,0212
S	R	0,0131	0,0002	1,0449	0,0118	1,3091	0,4621	0,6094	0,0884
S	R	0,0027	0,0000	0,0799	0,0000	0,3258	0,0061	0,0012	0,0012
NS (EC, S)	RLA	0,1012	0,0001	0,6168	0,0000	0,2487	0,0487	0,3396	0,0060
NS (EC, rT)	Sur	0,0008	0,0000	0,0075	0,0002	0,0480	0,4440	0,0020	0,0258
NS (EC, S)	RLA	0,0012	0,0000	0,0216	0,0000	0,0520	0,0000	0,0240	0,0029
NS (EC,DS)	Sur	0,0000	0,0000	0,0035	0,0000	0,0000	0,0392	0,0017	0,0039

prä: präoperativ; post: postoperativ; S: Seminom; NS: Nicht-Seminom; EC: Embryonalkarzinom; rT: reifes Teratom; DS: Dottersacktumor; R: Radiatio; C: Cisplatin; Sur: Surveillance; RLA: Radikale Lymphadenektomie
postoperativer microRNA-Level-Anstieg: fett und kursiv hervorgehoben

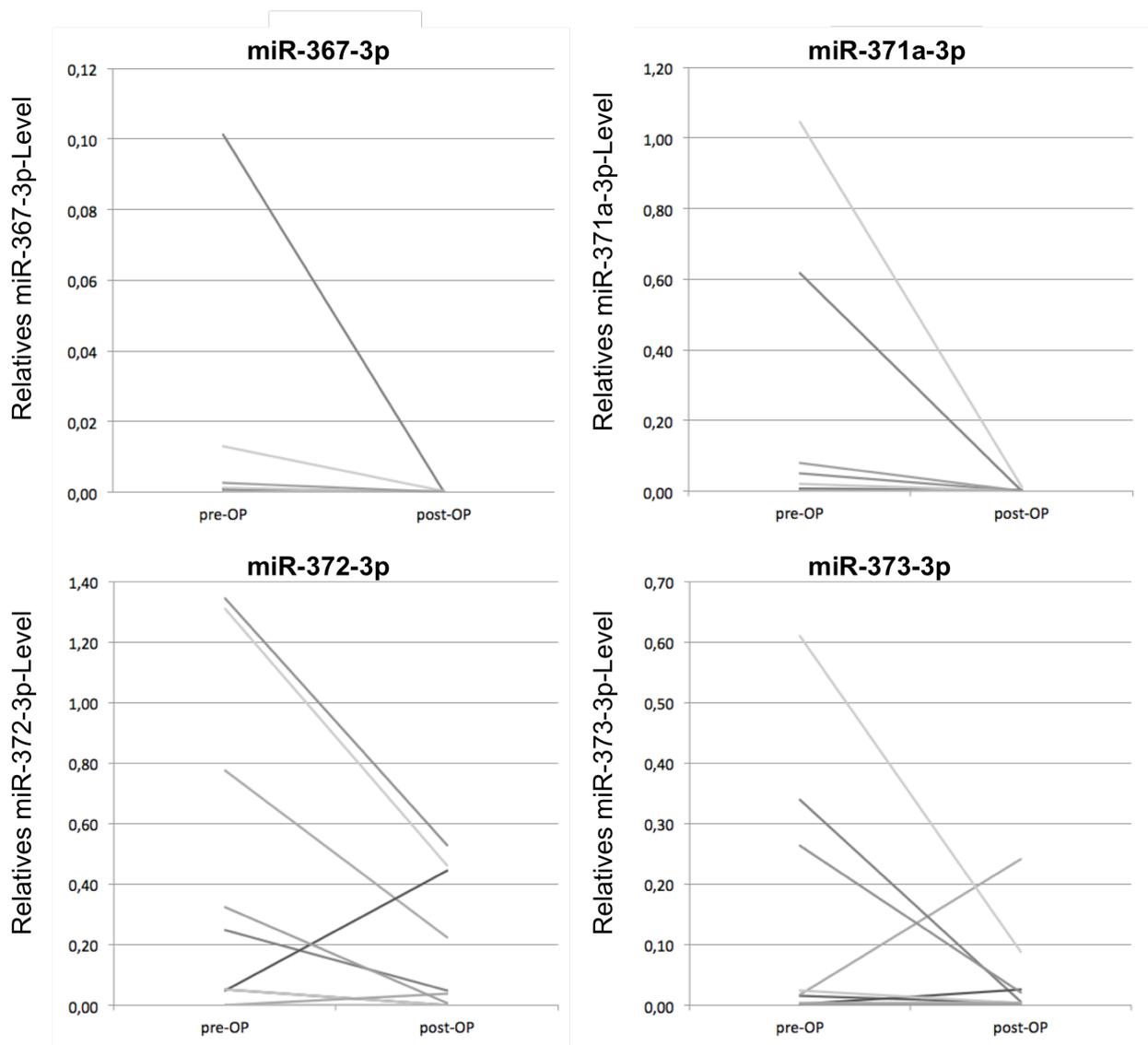


Abb. 18: Verlauf der microRNA-Levels von miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p im Serum von Hodentumorpatienten präoperativ bis fünf Tage postoperativ nach Orchiektomie

4. Diskussion

Der Anstieg der Inzidenz von Hodentumoren in den letzten Jahren zieht auch den Bedarf an präzisen diagnostischen Möglichkeiten nach sich. Nach wie vor hängen die Prognose und Heilungschance dieser Erkrankung von einer frühen Diagnosesicherung und Therapie ab. Trotz guter Therapiemöglichkeiten und der geringen Sterblichkeit durch Hodentumoren ist es von großer Bedeutung, den Zeitpunkt der Diagnosestellung weiter zu optimieren. Die Toxizität der Chemotherapie mit dem Risiko kardiovaskulärer und gastrointestinaler Folgeerkrankungen, Bildung von Sekundär-Malignomen und Infertilität sind mögliche schwerwiegende Nebenwirkungen der Therapie. Die rechtzeitige Diagnose im frühen Stadium der Erkrankung könnte für viele junge Männer eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität nach Therapieende bedeuten. Zum Zweck der Früherkennung bedarf es zuverlässiger und sensitiver Tumormarker. Eine ebenso große Rolle spielen verlässliche Biomarker in der postoperativen Nachsorge und frühzeitigen Erkennung von Metastasen. Die Optimierung des Follow-Ups könnte die 5-JÜR (5-Jahres-Überlebensrate) weiter anheben.

Die heute verwendeten Tumormarker (HCG, AFP, LDH, hPLAP) für das Hodenkarzinom stellen zwar eine gute Unterstützung der Diagnosesicherung dar, weisen jedoch deutliche Schwächen durch geringe Sensitivitäten auf und werden daher vorzugsweise in der Verlaufskontrolle und zur Risikostratifikation im Rahmen der Stadieneinteilung eingesetzt. Zu beachten gilt, dass lediglich 60 % aller Hodentumorpatienten jene herkömmlichen Tumormarker exprimieren (Belge et al., 2012). Auch die unterschiedliche Spezifität in Bezug auf die verschiedenen Tumorsubtypen schränkt den Einsatz dieser Tumormarker ein. So ist AFP ausschließlich bei Nicht-Seminomen, insbesondere Dottersacktumoren als Serummarker zu finden. HCG zeigt erhöhte Werte vornehmlich bei Chorionkarzinomen (Murray und Coleman, 2012). Eingeschränkt wird die Spezifität weiterhin durch den Einfluss anderer Erkrankungen und Veränderungen des Körpers auf die bekannten Tumormarker AFP, HCG, LDH und hPLAP (Neumann et al., 2011).

MicroRNAs qualifizieren sich für die Funktion als neue Tumormarker durch ihre hohe Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur und pH-Wert, ihre Resistenz gegenüber RNasen und die unkomplizierte und nicht-invasive Möglichkeit der Materialgewinnung (Mitchell et al., 2008). Die hohe Sensitivität und Spezifität der

microRNAs machen sie zu ausgezeichneten Diagnosemarkern und zuverlässigen Verlaufsparemtern. Darüber hinaus zeigen sie eine hohe Tumorspezifität, welche u.a. große Bedeutung in der Ursprungssuche bei CUP (cancer of unknown primary) haben könnte (Lu et al., 2005). In Zukunft wäre auch ein Einsatz zu therapeutischen Zwecken denkbar (Setoyama et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, bestimmte microRNAs (miR-371a-3p – 373-3p Cluster, miR-302-3p/367-3p Cluster) aus dem Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren auf ihre Qualität als Biomarker zu untersuchen und ihr diagnostisches und prognostisches Vermögen zu beurteilen.

4.1 Screeningphase

In der Screening-Phase der vorliegenden Studie wurden zunächst diejenigen microRNAs betrachtet, deren Zusammenhang mit Hodentumoren in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte. Gillis et al. (2007), Palmer et al. (2010) und Murray et al. (2011) konstatierten microRNAs des Cluster miR-302-3p/367-3p als taugliche Biomarker für Hodenkarzinome. Voorhoeve et al. (2006) sahen hingegen keinen Zusammenhang mit malignen Neoplasien des Hodens für das Cluster miR-302-3p. Dieses Resultat konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da kein erhöhtes Vorkommen der microRNAs 302a-3p - 302c-3p im Serum von Patienten mit testikulären Malignomen gefunden werden konnte. In den Untersuchungen zeigten sie keine Signifikanzen in Bezug auf die Differenzierung von Hodentumor-Serum und Serum gesunder Kontrollen. Aus demselben Cluster wiesen jedoch miR-367-3p genauso wie miR-371a-3p und miR-372-3p aus dem miR-371a-3p – 373-3p Cluster sehr hohe Signifikanzen ($p = 0,001$) in der Unterscheidung von Hodentumor und gesunden Kontrollen auf.

MiR-373-3p zeigte ein Differenzierungsvermögen nahe des 5 %-Signifikanzniveaus ($p = 0,065$), konnte jedoch nicht signifikant zwischen Tumor und gesund unterscheiden. Zur weiteren Validierung dieses Ergebnisses und aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eignung als Biomarker wurde miR-373-3p in die Validierungsphase

aufgenommen (Dieckmann et al., 2012; Gillis et al., 2007; Palmer et al., 2010; Voorhoeve et al., 2006).

4.2 Validierungsphase

In ihrer Zusammenfassung der bisher veröffentlichten Ergebnisse zur Erforschung von microRNAs als Biomarker für maligne Hodentumoren wiesen Murray und Coleman (2012) auf die Notwendigkeit größerer Fallzahluntersuchungen hin. Die Validierungsphase der vorliegenden Arbeit umfasst mit 160 Proben eine deutlich größere Kohorte, als vorangegangene Arbeitsgruppen bis dato untersucht haben. Insbesondere die Gruppe der gesunden Kontrollen weist mit 84 Proben einen bedeutend größeren Umfang auf. Anders als in vorherigen Untersuchungen konnten weitere wichtige Erkenntnisse durch den Zusatz der Gruppe ‚benigne Hodenbefunde‘ gewonnen werden. Das Fundament der vorliegenden Ergebnisse ist somit sehr breit angelegt und durch den größeren Stichprobenumfang kann eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse erzielt werden. Darüber hinaus wurden bisher nicht untersuchte Fragestellungen ergänzt.

Die untersuchten microRNAs miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p konnten im Vergleich zu dem Serum gesunder Kontrollen im Serum von Hodentumor-Patienten in höherem Aufkommen hochsignifikant nachgewiesen werden (alle $p < 0,001$). Diese Zahlen deuten bereits an, dass die Ziel-microRNAs, wie aufgrund anderer Arbeiten erwartet (Dieckmann et al., 2012; Gillis et al., 2013), spezifisch für das Vorliegen von Hodentumoren sind. Auch die Gegenüberstellung von malignen und benignen Befunden des Hodens erbrachte signifikante Unterschiede im Level der microRNAs und zeigte die sehr gute Differenzierungsfähigkeit aller untersuchten microRNAs (alle $p < 0,001$). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass entsprechende microRNAs ausschließlich von maligne entartetem Hodengewebe sezerniert werden.

Eine Ausnahme bildete die miR-373-3p, die sowohl im Serum von Patienten mit Malignomen als auch im Serum von Gesunden und Patienten mit benignen

Hodenbefunden zu beinahe 100 % nachweisbar war. Dieser Umstand bedeutet jedoch keineswegs die unterlegene Qualität als Biomarker dieser microRNA. Denn trotz des ubiquitären Vorkommens dieser microRNA in allen Seren ist die Differenz des Levels zwischen den drei Entitäten ausschlaggebend für die Beurteilung der microRNAs als potentieller Tumormarker. Die Differenz des Serumlevels der microRNAs zwischen malignen und benignen/gesunden Proben lag auch für miR-373-3p im hochsignifikanten Bereich ($p < 0,001$). Durch den Einsatz der Delta-Delta-Ct-Methode wurden relative und nicht absolute Zahlen der microRNAs im Serum verglichen (Livak und Schmittgen, 2001).

Aufgrund unterschiedlicher resultierender Therapiestrategien ist es von Bedeutung, ein Malignom des Hodens hinsichtlich seines histologischen Ursprungs differenzieren zu können. Bis dato ist diese Unterscheidung im Zusammenhang mit microRNAs lediglich von einer Arbeitsgruppe untersucht worden. Murray et al. (2010) konstatierten die unterschiedliche Expression des Clusters miR-302-3p/367-3p in Seminomen und Dottersacktumoren.

Diese Feststellung stützend stach auch in den vorliegenden Untersuchungen die miR-367-3p in Bezug auf die Prüfung des Differenzierungsvermögens der histologischen Subtypen deutlich hervor. Dieser potentielle Biomarker zeigte sich in der Lage, Seminome von Nicht-Seminomen anhand seines Levels im Serum zu unterscheiden ($p < 0,001$). Die anderen untersuchten microRNAs konnten dieses diagnostische Vermögen nicht vorweisen und erwiesen sich demnach als nicht geeignet für die Fragestellung nach dem Subtyp des Hodentumors.

Die Spezifitäten und Sensitivitäten der untersuchten microRNAs hinsichtlich der Differenzierung von Malignompatienten und gesunden Kontrollen bzw. benignen Befunden erzielten sehr gute Ergebnisse. Insbesondere miR-371a-3p erwies sich als exakter Biomarker. MiR-371a-3p konnte mit einer Spezifität von 99,0 % gesunde Kontrollen als gesund erkennen und gleichzeitig Hodentumorpatienten mit einer Sensitivität von 84,7 % herausfiltern. Auch miR-367-3p zeigte eine sehr hohe Spezifität. Mit 96,0 % konnte auch dieser Marker zuverlässig Gesunde als gesund identifizieren. Die höchste Sensitivität der Ziel-microRNAs demonstrierte miR-372-3p mit 91,5 %.

Insgesamt erwiesen sich alle untersuchten microRNAs als überdurchschnittlich spezifisch und sensitiv bei der Erkennung von Hodentumoren. Somit präsentieren sie eine deutliche Überlegenheit gegenüber den herkömmlichen Tumormarkern AFP und HCG. AFP zeigte eine Sensitivität von 13,6 % (AUC = 0,568, 95 %-KI: 0,416-0,719), HCG erreichte eine Sensitivität von 37,3 % (AUC = 0,686, 95 %-KI: 0,560-0,813).

Die sich aus Spezifität und Sensitivität ergebende AUC (area under the curve) veranschaulicht oben genannte Ergebnisse. Die AUC-Werte aller vier microRNAs liegen nahe 1. Mit einer AUC von 0,929 sticht insbesondere miR-371a-3p als sehr guter Tumormarker hervor. Die Qualität dieser microRNA zeigt sich deutlich auch in der Gegenüberstellung der beiden Subtypen des Hodenkarzioms zu den gesunden Kontrollen und benignen Befunden. Für die Klasse der Seminome erreicht miR-371a-3p eine bemerkenswert gute Spezifität und Sensitivität (97,0 %/ 82,5 %). Auch in der Betrachtung des Subtyps Nicht-Seminom weist miR-371a-3p sehr hohe Ergebnisse auf (100 %/ 89,5 %). Für beide Kategorien liegt die AUC in exzellenten Bereichen, womit die hervorragende Qualität dieser microRNA als Biomarker unterstrichen wird.

Ähnlich gute Ergebnisse erzielte miR-367-3p. Sehr gute Spezifität und Sensitivität, ebenso wie ein hohes Maß an Differenzierungsvermögen wird in einer hohen AUC ausgedrückt (AUC = 0,847). Wie zuvor schon anhand der p-Werte zu erkennen war, beweist miR-367-3p auch hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität die Fähigkeit, beide Tumor-Subtypen präzise zu unterscheiden und sie mit eindrucksvoller Genauigkeit von gesunden Kontrollen und benignen Befunden abzugrenzen (Seminom: Spez. = 94,1 %, Sens. = 65,0 %, AUC = 0,804; Nicht-Seminom: Spez. = 100 %, Sens. = 84,2 %, AUC = 0,935).

Zwar nicht ganz an die Qualität der microRNA 367-3p und 371a-3p heranreichend, aber dennoch mit zuverlässig guten Ergebnissen, präsentieren sich miR-372-3p und miR-373-3p. Beide beweisen die Fähigkeit mit guter Spezifität und Sensitivität das Serum der Patienten mit malignen Neoplasien des Hodens von dem Gesunder und Patienten mit benignen Hodenbefunden zu unterscheiden.

Ein Faktum von großer Bedeutung ist die Stadieneinteilung und die Unterscheidung von lokal begrenzten Tumoren und solchen mit Metastasen bzw. das Erkennen von Metastasen im Zuge der Nachsorgeuntersuchung.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigten sich drei der vier microRNAs in der Lage, maligne Tumoren in den pathologischen Stadien pT1 und pT2 von denen im Stadium pT3 abzugrenzen. MiR-367-3p, miR-371a-3p und miR-373-3p konnten mit hoher Signifikanz die lokal auf den Hoden beschränkten Tumoren von denen unterscheiden, die bereits auf das umliegende Gewebe übergetreten waren ($p < 0,05$). In Betrachtung der Klassifikation nach Lugano erwiesen sich selbige microRNAs geeignet, Stadium 1 von den Stadien 2 und 3 hochsignifikant zu differenzieren ($p < 0,01$).

Die aufgeführten Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung der geringen Anzahl von Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien betrachtet und bewertet werden.

In Hinblick auf die prognostische Einteilung nach IGCCCG konnte kein Zusammenhang zu den untersuchten microRNA-Levels festgestellt werden.

Interessant erschien der Vergleich von microRNA-Levels, die fünf Tage postoperativ erhoben wurden, im Vergleich zu denen unmittelbar vor der therapeutischen Orchiectomie bei Patienten mit malignen Hodenkarzinomen. Alle in dieser Gruppe untersuchten Patienten befanden sich im Lugano Stadium 1A. Dies bedeutet, dass das Malignom auf den Hoden beschränkt war und keine Metastasen nachgewiesen werden konnten.

Murray et al. (2011) hatten am Beispiel eines vier Jahre alten Jungen mit malignem Keimzelltumor das Absinken der Expression von miR-371a-3p – 373-3p unter Therapie feststellen können. Auch Belge et al. (2012) untersuchten das Serum von elf Patienten mit malignen Hodentumoren im klinischen Stadium 1 prä- und postoperativ und zeigten ebenfalls den postoperativen Abfall des Levels von miR-371a-3p – 373-3p.

Überaus zufriedenstellende Ergebnisse konnten bei dieser Untersuchung für die miR-371a-3p erhoben werden. Die Levels der microRNAs aller neun Patienten sanken postoperativ deutlich ab. Bei der Hälfte der Patienten fiel das Level von miR-371a-3p sogar unter die Nachweisgrenze. Auch Dieckmann et al. hatten 2012 miR-371a-3p als vielversprechenden Marker im postoperativen Verlauf bezeichnet.

Ähnlich präsentierte sich miR-367-3p, deren Level ebenfalls bei allen Patienten nach dem chirurgischen Eingriff abfiel. Auch hier konnte bei sechs der neun Patienten postoperativ keine miR-367-3p im Serum nachgewiesen werden. Die Tendenz der microRNAs 372-3p und 373-3p ging gleichermaßen in Richtung eines postoperativen

Abfalls im Serumlevel, jedoch fiel die Qualität unter der von miR-367-3p und miR-371a-3p ab.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass microRNAs eine sehr kurze Halbwertszeit im Serum von betroffenen Patienten aufweisen (max. fünf Tage) und sich somit hervorragend zur Verlaufskontrolle eignen. Auch die Organ- und Tumorspezifität der einzelnen microRNAs erscheint hierdurch bewiesen. In einer Studie zu plazentären microRNAs im mütterlichen Plasma konnten Chim et al. ebenfalls sehr hohe Clearanceraten für microRNAs nachweisen. Präpartal wurden vier microRNAs in erhöhter Konzentration im Plasma gemessen. Schon 24 Stunden post partum fielen die Werte unter die Nachweisgrenze ab. Eine derart kurze Halbwertszeit der microRNAs dient einer sensiblen Nachsorge und lässt den Therapieerfolg unverzüglich überprüfen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass das Cluster miR-371a-3p – 373-3p und die microRNA miR-367-3p großes Potential in der Diagnosestellung, Stadieneinschätzung und im Therapiemonitoring von Malignomen des Hodens besitzen. Alle vier untersuchten microRNAs weisen sehr gute Ergebnisse in Hinblick auf Spezifität und Sensitivität auf und übertreffen die herkömmlichen Tumormarker in ihrer Genauigkeit, der Einschätzung des Tumorstadiums und der Früherkennung von Metastasen. In Bezug auf die histologische Einteilung von malignen Hodentumoren ist miR-367-3p hervorzuheben. Als meist versprechender Biomarker, sowohl in der diagnostischen Funktion als auch in der postoperativen Nachsorge und Monitoring, erscheint miR-371a-3p. MiR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p und miR-367-3p zusammengenommen, könnten in Zukunft die bisherigen Hodentumormarker AFP, HCG und LDH mit deutlicher Überlegenheit ablösen. Als „liquid biopsy“ könnten die microRNAs bei unklaren Hodenbefunden Klarheit schaffen und so in einigen Fällen eine chirurgische Intervention umgänglich machen.

Während der Arbeit an der vorliegenden Dissertation ist ein Paper zu selbigem Thema erschienen. Gillis et al. (2013) gelangen in ihren Untersuchungen zu ähnlichen Erkenntnissen und stützen die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse. Anzumerken ist, dass auch diese Arbeitsgruppe eine Gruppe benigner Hodentumoren untersuchte. Genauso wie in den vorliegenden Ergebnissen, konnten Gillis et al. keine erhöhte

Exprimierung der microRNAs im Serum benigner Hodenbefunde finden. MiR-371a-3p – 373-3p und miR-367-3p zusammengenommen erzielten eine Sensitivität von 98 % (Gillis et al., 2013). Somit bestätigen diese Ergebnisse die in meiner Promotionsarbeit gewonnene Erkenntnis der Überlegenheit der genannten microRNAs im Vergleich zu den bekannten Tumormarkern HCG und AFP. Den postoperativen Verlauf der microRNA-Levels betrachtend, wird ebenfalls ein deutlicher Rückgang verzeichnet. Wie in der vorliegenden Arbeit besprochen, konstatieren auch Gillis et al. die große Bedeutung der microRNAs 367-3p, 371a-3p, 372-3p und 373-3p in Hinblick auf die Diagnostik und Nachsorge von Hodentumorpatienten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die microRNAs miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p und miR-373-3p auf ihre diagnostische und prognostische Validität als Biomarker bei Patienten mit Hodentumoren zu prüfen und im Vergleich zu den herkömmlichen Tumormarkern AFP, HCG, LDH und hPLAP zu betrachten. Die genannten microRNAs wurden ausgewählt, da sie schon in anderen Studien positiv in Hinblick auf ihre Expression im Serum von Patienten mit malignen Hodenkarzinomen aufgefallen waren. Eine hohe Sensitivität und Spezifität könnte große Fortschritte in der Diagnostik und dem postoperativen Monitoring sowie der Nachsorge von Hodentumorpatienten bedeuten. Insbesondere für die Gruppe der markernegativen Hodentumorpatienten stellen die microRNAs eine neue Chance der besseren Diagnostik und vor allem Nachsorge dar. Ebenso wichtig sind gute Biomarker für Patienten mit Seminom, da diese Tumoren kein AFP exprimieren und somit die Auswahl an Tumormarkern sehr reduziert ist.

Mit der Untersuchung von 48 Serumproben in der Screening-Phase und weiteren 160 in der Validierungsphase wurde dieser Fragestellung nachgegangen. Das Serum stammte von 89 Patienten mit malignem Hodentumor, 17 Patienten mit benignen Hodenbefunden und 102 gesunden Kontrollpersonen. Aus den gewonnenen Serumproben wurde die RNA isoliert, mittels quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht und somit das Level der jeweiligen microRNA im Serum ermittelt.

Nach Abschluss der Screening-Phase stellten sich miR-302a-3p, miR-302b-3p und miR-302c-3p als nicht aussagekräftig in Hinblick auf die Fragestellung als Biomarker heraus, sodass sie in folgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt wurden.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten die Levels von miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p und miR-373-3p signifikant erhöht im Serum von Patienten mit malignen Hodentumoren im Vergleich zum Serum der gesunden Kontrollpersonen ebenso wie dem der Patienten mit benignen Hodenerkrankungen. Insbesondere miR-371a-3p ermöglichte eine Identifikation der Patienten mit malignen Hodentumoren mit hoher Sensitivität (84,7%) und Spezifität (99%). Somit zeigte sich diese microRNA den herkömmlichen Tumormarkern Alpha-Fetoprotein (AFP) und humanes Choriongonadotropin (HCG) deutlich überlegen. Weiterhin präsentierte miR-367-3p

erhöhte Levels im Serum von Patienten mit Seminomen im Gegensatz zu denen mit Nicht-Seminomen. Bei Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium und mit Metastasierung waren die Levels von miR-367-3p, miR-371a-3p und miR-373-3p erhöht. Bei neun Patienten mit Tumoren im Lugano-Stadium 1A fielen die Serum-Levels der microRNAs fünf Tage nach Orchiektomie deutlich ab, was auf die Tumorspezifität der microRNAs hinweist.

Schließlich lässt sich sagen, dass mithilfe von Serum-microRNA-Levels, vornehmlich miR-371a-3p, eine exakte Identifikation von Patienten mit malignen Hodentumoren möglich ist und die diagnostische Kompetenz der klassischen Tumormarker HCG und AFP übertroffen werden kann. Insbesondere im Hinblick auf die Therapieüberwachung und die postoperative Nachsorge von Hodentumorpatienten ergeben sich durch diese Erkenntnisse vielversprechende Möglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP; European Association of Urology. [EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update. European Association of Urology]. *Actas Urol Esp* 2012; 36: 127-145

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297

Belge G, Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Bullerdiek J. Serum levels of microRNAs miR-371a-3: a novel class of serum biomarkers for testicular germ cell tumors? *Eur Urol* 2012; 61:1068-1069

Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, Kuner R, Sültmann H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011; 128: 608-616

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006

Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 2012; 3: 28-37

Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1351-1358

Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 704-714

Dieckmann KP, Claßen J, Loy V. Präkanzerose der Hodentumoren: Testikuläre intraepitheliale Neoplasie. *Dtsch Arztebl* 2005; 102: A 3106–3109

Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Flor I, Löning T, Bullerdiek J, Belge G. MicroRNAs miR-371a-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2012; 107: 1754-1760

Dietrich D, Meller S, Uhl B, Ralla B, Stephan C, Jung K, Ellinger J, Kristiansen G. Nucleic acid-based tissue biomarkers of urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 1-27

Doherty AP, Bower M, Christmas TJ. The role of tumour markers in the diagnosis and treatment of testicular germ cell cancers. *Br J Urol* 1997; 79: 247-252

Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3627-3632

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269

Feldman DR, Bosl GJ, Sheinfeld J, Motzer RJ. Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA* 2008; 299: 672-684

Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal Biochem* 2012; 428: 44-53

Gilligan TD, Seidenfeld J, Basch EM, Einhorn LH, Fancher T, Smith DC, Stephenson AJ, Vaughn DJ, Cosby R, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline on uses of serum tumor markers in adult males with germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3388-3404

Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Sun Y, Chen C, Guenther S, Sherlock J, Veltman I, Baeten J, van der Spek PJ, de Alarcon P, Looijenga LH. High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J Pathol* 2007; 213: 319-328

Gillis AJ, Rijlaarsdam MA, Eini R, Dorssers LC, Biermann K, Murray MJ, Nicholson JC, Coleman N, Dieckmann KP, Belge G, Bullerdiek J, Xu T, Bernard N, Looijenga LH. Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle. *Mol Oncol* 2013; 7: 1083-1092

Haag P, Hanhart N, Müller M. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Breisach : Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2012/13

Hautmann H, Huland H. *Urologie*. Berlin – Heidelberg – New York: Springer, 2006

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 19075-19080

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 251: 499-505

Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 2010; 3: 109-113

Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1721-1726

Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-126

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694

Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 2003; 170: 5-11

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070

Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Cavallin-Ståhl E, Classen J, Clemm C, Cohn-Cedermark G, Culine S, Daugaard G, De Mulder PH, De Santis M, de Wit M, de Wit R, Derigs HG, Dieckmann KP, Dieing A, Droz JP, Fenner M, Fizazi K, Flechon A, Fosså SD, del Muro XG, Gauler

T, Geczi L, Gerl A, Germa-Lluch JR, Gillessen S, Hartmann JT, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Horwich A, Huddart R, Jewett M, Joffe J, Jones WG, Kisbenedek L, Klepp O, Kliesch S, Koehrmann KU, Kollmannsberger C, Kuczyk M, Laguna P, Galvis OL, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller R, Nichols C, Nicolai N, Oliver T, Ondrus D, Oosterhof GO, Ares LP, Pizzocaro G, Pont J, Potttek T, Powles T, Rick O, Rosti G, Salvioni R, Scheiderbauer J, Schmelz HU, Schmidberger H, Schmoll HJ, Schrader M, Sedlmayer F, Skakkebaek NE, Sohaib A, Tjulandin S, Warde P, Weinknecht S, Weissbach L, Wittekind C, Winter E, Wood L, von der Maase H. 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* 2008; 53: 478-496

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672-675

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838

Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011; 77: 1265.e9-16

Manski D, 2013: Hodentumoren (Keimzelltumoren).

<http://www.urologielehrbuch.de/hodentumoren.html> (Zugriffsdatum: 27.08.2013)

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 167-169

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518

Murray MJ, Coleman N. Testicular cancer: a new generation of biomarkers for malignant germ cell tumours. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 298-300

Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. Identification of microRNAs from the miR-371a~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 119-125

Murray MJ, Saini HK, van Dongen S, Palmer RD, Muralidhar B, Pett MR, Piipari M, Thornton CM, Nicholson JC, Enright AJ, Coleman N. The two most common histological subtypes of malignant germ cell tumour are distinguished by global microRNA profiles, associated with differential transcription factor expression. *Mol Cancer* 2010; 9: 290

Neumann A, Keller T, Jocham D, Doehn C. Die humane plazentare alkalische Phosphatase (hPLAP) ist der am häufigsten erhöhte Serummarker beim Hodentumor. *Aktuel Urol* 2011; 42: 311–315

Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381

Palmer RD, Murray MJ, Saini HK, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Muralidhar B, Pett MR, Thornton CM, Nicholson JC, Enright AJ, Coleman N; Children's Cancer and

Leukaemia Group. Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. *Cancer Res* 2010; 70: 2911-2923

Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* 2009; 58: 1546-1554

Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10: 42-46

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 55-59

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Berlin: 2012; 84-87

Sanders I, Holdenrieder S, Walgenbach-Brünagel G, von Ruecker A, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2012; 19: 1017-1025

Scheffer AR, Holdenrieder S, Kristiansen G, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? *World J Urol* 2014; 32: 353-358

Schmelz HU. *Facharztwissen Urologie: differenzierte Diagnostik und Therapie*. Heidelberg: Springer, 2010

Setoyama T, Ling H, Natsugoe S, Calin GA. Non-coding RNAs for medical practice in oncology. *Keio J Med* 2011; 60: 106-113

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-1476

Stang A, Katalinic A, Dieckmann KP, Pritzkeleit R, Stabenow R; Network of German Cancer Registries (GEKID). A novel approach to estimate the German-wide incidence of testicular cancer. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 13-19

Taylor DD, Gercel-Taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* 2013; 4: 1-12

Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ. "Membrane-associated" immunoglobulins in cyst and ascites fluids of ovarian cancer patients. *Am J Reprod Immunol* 1983; 3: 7-11

Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; 102: 1174-1179

Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124: 1169-1181

Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2: 807-813

Weinstein MH, Hirsch MS, 2012: Anatomy and pathology of testicular tumors. [http://www.uptodate.com/contents/anatomy-and-pathology-of-testicular-tumors?detectedLanguage=en&source=search_result&translation=seminoma&search=seminoma&selectedTitle=8 %7E35&provider=noProvider](http://www.uptodate.com/contents/anatomy-and-pathology-of-testicular-tumors?detectedLanguage=en&source=search_result&translation=seminoma&search=seminoma&selectedTitle=8%7E35&provider=noProvider) (Zugriffsdatum: 03.09.2013)

Winter E, Kliesch S, Souchon R, de Witt, M. Diagnostik des Hodentumors. Dtsch Arztebl 2005; 102: A3021-3025

Wittmann J, Jäck HM. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. Biochim Biophys Acta 2010; 1806: 200-207

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brünagel G, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. PLoS One 2011; 6: e25787

Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers 2009; 14: 529-538

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol 2007; 302: 1-12

Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. BMC Res Notes 2009; 2: 89

7. Danksagung

Bei Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Jörg Ellinger für die angenehme Zusammenarbeit und die kompetente, jederzeit zügige und freundliche Hilfestellung bei Fragen und Problemen.

Dr. Isabella Syring danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation bei der Fertigstellung der Arbeit, ihren Optimismus und die dadurch beste Betreuung, die man sich wünschen kann.

Ein großes Dankeschön gilt Doris Schmidt, die mir mit großem Fachwissen und ewiger Geduld bei der Arbeit im Labor zur Seite gestanden hat und jederzeit neue Ideen zur Problembehebung hatte.

Vielen Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich all die Zeit ermutigt und unterstützt haben.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen und Preise

10/2014: Auszeichnung im Rahmen des Nachwuchsförderungspreises "Die Besten für die Urologie" durch die Deutsche Gesellschaft für Urologie anlässlich des 66. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Düsseldorf

07/2014: Veröffentlichung des Papers: Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers. *JUrol* 2014. pii: S0022-5347: 03957-3. doi: 10.1016/j.juro.2014.07.010

09/2013: Vortrag beim 65. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 25. - 28. September 2013, Dresden: „Zirkulierende microRNAs (miR-320a, miR-302b, miR-302c, miR-371, miR-372, miR373) als Biomarker im Serum von Hodentumor-Patienten“. Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Müller S, Ellinger J

04/2013: Posterpreis beim 59. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie, 11.-12. April 2013, Düsseldorf: "Zirkulierende microRNAs (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-371, miR-372, miR373) als Biomarker im Serum von Hodentumor-Patienten"; Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Müller SC, Ellinger J (2013)