Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Hofmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Untersuchung der MDR1-Expression und ihrer klinischen Relevanz beim Keimzelltumor des Hodens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Meike Seger
aus Dortmund

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 16.09.2008
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: PD Dr. A.J. Schrader
1. Korreferent(en): PD Dr. T. Wündisch

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 4

1.1 Der Hodentumor 6

1.1.1 Inzidenz und Prädispositionsfaktoren des malignen Hodentumors 6

1.1.2 Epidemiologie von Hodentumoren 6

1.1.3 Risikofaktoren von Hodentumoren 8

1.1.3.1 Intratubuläre Keimzellneoplasie 8

1.1.3.2 Kryptorchismus 9

1.1.3.3 Vorausgegangene Hodentumorerkrankung 9

1.1.3.4 Positive Familienanamnese 10

1.1.3.5 HIV-Infektion 11

1.1.3.6 Intrauterine Exposition von Östrogenen 11

1.1.3.7 Mikrolithiasis des Hodens 11

1.1.4 Diagnostik des Primärtumors 12

1.1.5 Klassifikation des malignen Hodentumors 13

1.1.6 Therapie des Primärtumors 21

1.1.6.1 Inguinale Ablatio testis 21

1.1.6.2 Organerhaltende Tumorenukleation des malignen Keimzelltumors 22

1.1.6.3 Therapie der TIN 22

1.1.6.4 Therapie des Seminoms im Klinischen Stadium I 23

1.1.6.5 Therapie des Nichtseminoms im klinischen Stadium I 25

1.1.7 Therapie des metastasierten Keimzelltumors 27

1.1.7.1 Therapie des Seminoms im klinischen Stadium IIA/B 27

1.1.7.2 Therapie des Nichtseminoms im klinischen Stadium IIA/B 28

1.1.8 Therapie des fortgeschrittenen Keimzelltumors 29

1.2 MDR 30

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit 32

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN 33

2.1 Patienten 33

2.1.1 Alter der Patienten bei der RPLA 34

2.2 Methodik 35

2.2.1 Gewinnung der Gewebeschnitte 35

2.2.2 Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern 36

2.2.2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Durchführung 36

2.2.2.2 Das Prinzip der Immunhistochemie 36

2.2.2.3 Verdünnungsreihen und Vorbehandlung 38

2.2.2.4 Antigendemaskierung mittels Dampftopf 38
2.2.2.5 Immunreaktionen 38
2.2.3 Eindecken der gefärbten Präparate 40
2.3 Material 42
2.3.1 Chemikalien und Reagenzien 42
2.4 Primärantikörper/Sekundärantikörper/Substratlösung 43
2.4.1 Geräte 43
2.4.2 Mikroskope 44
2.4.3 Sonstige Materialien 44
2.4.4 Lösungen 45
2.4.5 Statistik 46

3 ERGEBNISSE 47

3.1 Hodentumor (Primärtumor) 47
3.1.1 Histologische Unterteilung nach Seminom/Nichtseminom und Primärtumor mit/ohne Teratomanteil 47
3.1.2 MDR1-Expression 49
3.1.3 Vergleich Histologie und MDR1-Expression der Hodentumore 50
3.2 Retroperitonealen Residualtumormassen nach Chemotherapie 52
3.2.1 Histologie der RPLA: Nekrose, Teratom, vitaler Tumor 52
3.2.2 MDR1 Expression der retroperitonealen Residualtumormassen nach Chemotherapie 53
3.2.3 Vergleich der Histolgie und der MDR1-Expression im RPLA-Resektat 54
3.3 Korrelation zwischen der Histologie des Primärtumors und des RPLA-Resektates 55
3.4 Korrelation der MDR1-Expression des Primärtumors mit der MDR1-Expression der RPLA-Resektate 57
3.5 Korrelation der MDR1-Expression des Primärtumors und des histologischen Ergebnisses des RPLA-Resektates 59
3.6 Korrelationen der MDR1-Expression des Primärtumors mit dem histologischen Ergebnis des RPLA-Resektates unter Berücksichtigung der histologischen Unterteilung des Primärtumors in Seminom beziehungsweise Nichtseminom und Teratom negativ beziehungsweise positiv 61

4 DISKUSSION 64

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 LITERATURVERZEICHNIS 72

7 ANHANG 85

7.1 Abkürzungen 85

7.2 Lebenslauf 87

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung 88

7.4 Danksagungen 89

7.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer 90

1 Einleitung

Nach den aktuellen Leitlinien zur Therapie des Keimzelltumors des Hodens werden heute Patienten mit einem metastasiertem nicht-seminomatösem Tumorleiden überwiegend mit einer Chemotherapie behandelt. Bei dem Verdacht auf Residualtumoren in der Bildgebung ist bei nicht-seminomatösem Primärtumor eine sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLA) indiziert.

Nach wie vor mangelt es an Prognosefaktoren, um das histologische Ergebnis einer sekundären RPLA nach systemischer Chemotherapie beim Keimzelltumor des Hodens sicher vorhersagen zu können. Bekannte Prädiktoren sind die Größe des Primärtumors und die Größe bildgebend darstellbarer Tumorresiduen nach Chemotherapie, der histologische Subtyp sowie die Expression und der Verlauf der Serumtumormarker.

Bei einer sekundären RPLA wird eine Entfernung persistierend vergrößerter Lymphknoten durchgeführt, um potentiell noch vorhandenes vitales Tumorgewebe zu eliminieren. Jedoch lautet das histologische Ergebnis einer RPLA in etwa 30-40% Nekrose, in 30-40% reifes Teratom und lediglich in 10-20% vitaler Tumor [98] [67]. Insofern würde ein Modell oder eine Methode, die in der Lage wäre, mit hoher Wahrscheinlichkeit die Patienten zu selektieren, welche nicht maligne Tumorresiduen aufweisen, vielen Patienten eine unnötige Operation mit der damit verbundenen Morbidität ersparen. In der Vergangenheit haben mehrere Gruppen versucht, solch ein Vorhersagemodell basierend auf diversen vor- und nach Chemotherapie erhobenen Daten sowie präoperativen Parametern zu entwickeln. Jedoch waren alle diese Modelle aufgrund einer falsch negativen Rate von 20-30% und einer Vorhersagegenauigkeit von lediglich 70-80% ohne klinische Relevanz [98]. Das Vorkommen von maturem Teratom und vitalem Tumor nach Chemotherapie scheint abhängig von der Entwicklung einer intrinsischen oder extrinsischen Chemorefrakterität basierend auf speziellen molekularen Mechanismen zu sein. „Multidrug resistance“ (MDR) ist ein bekanntes Phänomen bei vielen

Krebserkrankungen. Ein Mechanismus, welcher verantwortlich für die Entwicklung einer Refraktärität einer Zelle gegen Chemotherapeutika ist, ist die verminderte Akkumulation der Chemotherapeutika in der Zelle, abhängig von der Aktivität eines 170 kDa transmembranständigen Proteins, MDR1 (P-glykoprotein, P-gp, P-170 oder mdr 1 gene product). Die Gruppe um Eid zeigten eine regelmäßige Überexpression von MDR1 in Hodentumoren in fortgeschrittenen Stadien und aggressiven Phenotypen [35, 36, 48].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte MDR1 als molekuarer Marer weiter evaluiert werden, insbesondere in der Hinsicht, ob die MDR1-Expression im Primärtumor das Vorkommen von Nekrose oder vitalem Tumor in den Residualtumormassen nach Chemotherapie beim fortgeschrittenen Keimzelltumor des Hodens voraussagen kann. Damit könnte ein klinisch relevantes Modell entstehen, um die Indikation zur Durchführung einer sekundären RPLA zu verbessern und den betroffenen Patienten potentiell eine unnötige Operation mit der damit verbundenen Morbidität zu ersparen.

1.1 Der Hodentumor

1.1.1 Inzidenz und Prädispositionsfaktoren des malignen Hodentumors

Verglichen mit anderen Krebsarten ist der Hodentumor eine relativ seltene maligne Erkrankung, er betrifft ca. 1-1,5% aller männlichen Krebserkrankungen. In der Altersgruppe zwischen 15 und 35 Jahren ist der Hodentumor jedoch die häufigste Krebsart beim Mann [59]. Das Hodenkarzinom hat sich aufgrund bemerkenswerter Therapiefortschritte seit Ende der 70er Jahre zu dem am besten kurierbaren soliden malignen Neoplasma entwickelt. Vor dieser Zeit hatte der maligne Hodentumor einen Anteil von 11% an den Todesfällen aufgrund maligner Erkrankungen bei Männern im Alter von 25 bis 34 Jahren, die Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug 64% [37]. Aktuell werden in den USA jährlich 400 Todesfälle aufgrund von malignen Hodentumoren erwartet [59]; die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei über 90% für alle testikulären Keimzelltumore und über 95% bei reinen Seminomen [19, 59].

1.1.2 Epidemiologie von Hodentumoren

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Inzidenz von malignen Hodentumoren seit Beginn des 20. Jahrhunderts steigt [57]. Bei einer retrospektiven Untersuchung der Inzidenz von Keimzelltumoren in sechs europäischen Ländern fanden Bergström et al. Unterschiede in dem Inzidenzanstieg zwischen den einzelnen Ländern. In Schweden beispielsweise stieg die Inzidenz um 2,3% jährlich, in Ostdeutschland um 5,2% nach 1945 [14]. In einer neuen Übersichtsarbeit weisen auch

Huyghe,E. et al. auf die kontinuierliche Zunahme dieses Krebsleidens in den letzten 50 Jahren in Europa hin [56]. In der Arbei zeigten sich allerdings ebenso erhebliche nationale Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Hodenkrebses pro 100.000 Einwohner. Während es in Deutschland 10,8 Männer auf 100.00 betrifft sind dies zum Beispiel 13,5 in Norwegen und 9,3 in Schweden. Wie groß die nationalen Unterschiede innerhalb der Europäischen Grenzen sind, zeigen die beiden Länder Portugal (Inzidenz 0,8/100.000) und Tschechien (16/100.000). Seit den 60er Jahren war in den nordeuropäischen Ländern eine Inzidenzzunahme von mindestens 3 bis 5% , in Deutschland und Polen von sogar über 5% pro Jahr zu verzeichnen [56].

In Daten der Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Datenbank des National Cancer Instituts stieg die Inzidenz aller Keimzelltumore amerikanischer Männer zwischen 1973-1978 und 1994-1998 um 44% an (3,35 zu 4,84 pro 100.000 Männer). Die Inzidenz von Seminomen stieg um 62%, die von nichtseminomatösen Keimzelltumoren stieg lediglich um 24% [75]. Die Gründe für den Anstieg der Inzidenz sind unklar, viele verschiedene Hypothesen zur Erklärung sind aufgestellt worden, darunter ein erhöhter Spiegel von Diethylstilbestrol (DES) der Mutter während der Schwangerschaft, vorausgegangene Virusinfektionen oder ein Trauma des Hodens [38, 128]. Insgesamt erbrachte aber keiner dieser Faktoren eine ausreichende Erklärung für den Anstieg der Inzidenzen. Auffallend war, dass der beobachtete Anstieg ausschließlich bei weißen Männern auftrat. Unter Afroamerikanern tritt Hodenkrebs wesentlich seltener auf als bei weißen Amerikanern. Weltweit gesehen haben Afrika und Asien die geringste Inzidenz an malignen Hodentumoren, die höchste Inzidenz sieht man in den skandinavischen Ländern, Deutschland, der Schweiz und Neuseeland [79].

1.1.3 Risikofaktoren von Hodentumoren

Es gibt eine Anzahl von gesicherten Risikofaktoren für das Auftreten von malignen Hodentumoren, zum Beispiel Kryptorchismus, Tumorerkrankung des kontralateralen Hodens, eine familiäre Häufung von Keimzelltumoren bei erstgradigen Verwandten, Infertilität oder Subfertilität und eine HIV Infektion [1, 93]. All diese Faktoren erhöhen das Risiko, ein Carcinoma in situ oder ein invasives Hodenkarzinom zu entwickeln.

1.1.3.1 Intratubuläre Keimzellneoplasie

Vor dem Auftreten eines klinisch manifesten malignen Hodentumors kann man bei erwachsenen Männern eine praemaligne Veränderung der Hoden finden; diese wird testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) oder Carcinoma in situ (Cis) genannt. Diese Abnormität hat man bei 0,4 bis 1,1% der Männer gefunden, welche aufgrund von Infertilität eine Hodenbiopsie erhielten. In 90% des Hodengewebes bei Vorkommen eines Keimzelltumors findet man eine TIN [29]. Bleibt eine TIN unbehandelt, steigt das Risiko der Entwicklung eines invasiven malignen Keimzelltumors auf 50% innerhalb der folgenden fünf Jahre [118]. Ob sich aus einer TIN in allen Fällen ein Keimzelltumor entwickelt bleibt unklar. Sie muss jedoch als Präkanzerose angesehen werden und findet sich zum Zeitpunkt der Ablatio testis bei 5-8% der Patienten im kontralateralen Hoden [29, 66]. Der Stellenwert der diagnostischen kontralateralen Hodenbiopsie wird auch heute noch kontrovers diskutiert. Sowohl der deutsche als auch der europäische Konsensus zur Hodentumorbehandlung sehen es als notwendig an, bei denjenigen Patienten eine kontralaterale Hodenbiopsie durchzuführen, die ein Hodenvolumen < 12 ml aufweisen und jünger als 30 Jahre alt sind, weil in

dieser Patientengruppe das Risiko einer kontralateralen TIN mit 34% deutlich erhöht ist [69, 98].

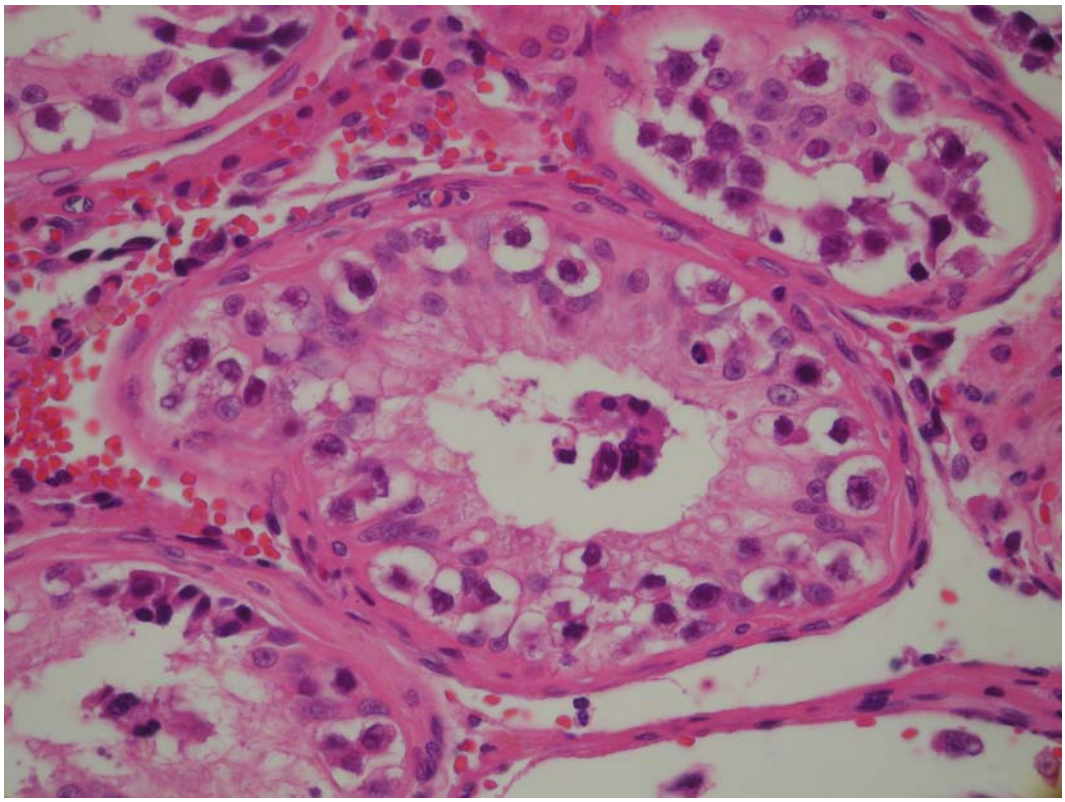

Abb. 1: Histologisches Bild einer TIN (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Ramaswamy, Institut für Pathologie, Marburg)

1.1.3.2 Kryptorchismus

Die Risikoerhöhung für Hodenkrebs bei Männern, die wegen eines Hodenhochstandes (Kryptorchismus) operativ behandelt werden mussten liegt um so höher, je später operiert worden ist [88].

1.1.3.3 Vorausgegangene Hodentumorerkrankung

Ungefähr 5% der Männer mit einem Hodentumor entwickeln einen Keimzelltumor der Gegenseite, die Inzidenz von zweiseitig simultan auftretenen Hodentumoren liegt bei ca. 1% [20, 27]. In einer dänischen

Langzeit-Follow-up-Studie von 2850 Männern mit einem malignen Keimzelltumor des Hodens lag das Risiko der Entwicklung eines Hodentumors der Gegenseite bei 5,2% in 25 Jahren [86]. Das Risiko der Patienten mit initialem nichtseminomatösen Tumoren war höher verglichen mit denen mit Seminomen im Erstbefund (8,4% versus 3,6%). Die 5% Inzidenz eines Zweittumors entspricht der Inzidenz von Cis bei Patienten mit einseitigen Hodentumoren, welche eine Hodenbiopsie des kontralateralen Hodens bei der Orchidektomie erhielten. Dies zeigt eine Studie von 500 Patienten, bei denen der kontralaterale Hoden bei der Orchiektomie biopsiert wurde [118]. 27 von 500 Patienten (5,4%) wiesen ein Carcinoma in situ im kontralateralen Hoden auf, 8 davon erhielten eine Chemotherapie zur Behandlung des primären Tumorleidens. Bei keinem zeigte sich in Kontrollbiopsien eine Veränderung des Cis, wobei auch keiner im Beobachtungszeitraum von 12-88 Monaten einen Hodentumor der Gegenseite entwickelte. Von den restlichen 19 Patienten mit einem Cis entwickelten im Beobachtungszeitraum 7 einen Hodentumor der Gegenseite. Das Risiko lag bei 40% in 3 Jahren und 50% in 5 Jahren. Keiner der 473 Patienten ohne Cis entwickelte einen kontralateralen Hodentumor im Beobachtungszeitraum von 12-96 Monaten. Somit sollte ein kryptorchider Hoden, welcher spontan oder nach entsprechender Behandlung deszendiert ist, lebenslang mittels klinischer Untersuchung und mindestens einmal jährlicher Ultrasonographie des Hodens beobachtet werden, um frühzeitig eine Entartung zu entdecken [15].

1.1.3.4 Positive Familienanamnese

Das relative Risiko, einen malignen Keimzelltumor des Hodens zu entwickeln ist bei Männern mit betroffenen Brüdern oder Söhnen von betroffenen Vätern 6-10 mal höher als das der Normalbevölkerung [41, 49, 52]. Ungefähr 1% bis 2% der erkrankten Männer haben ein Familienmitglied mit derselben Erkrankung [28, 30].

1.1.3.5 HIV-Infektion

Bei HIV infizierten Männern findet man eine erhöhte Inzidenz von Seminomen verglichen mit nicht infizierten Männern. In der „Multicenter AIDS Cohort Study“ war die Rate von Seminomen 21 mal höher verglichen mit der Normalbevölkerung [73].

1.1.3.6 Intrauterine Exposition von Östrogenen

Einige Fallkontrollstudien äußern die Vermutung, dass erhöhte Östrogenspiegel der Mutter während der Schwangerschaft das Risiko für Keimzelltumoren erhöhen. Ein Bericht beschreibt ein 4,9fach erhöhtes Risiko an einem Hodentumor zu erkranken [122].

1.1.3.7 Mikrolithiasis des Hodens

In einer neuen Übersichtsarbeit wurde unlängst auf eine weitere Risikogruppe hingewiesen [77]. Es handelt sich hierbei um Männer, bei denen bei der Ultraschalluntersuchung des Hodens Mikroverkalkungen (Mikrolithiasis) festgestellt wurden. Immerhin zeigten 2 von 100 untersuchten Männern (n= 3.477) Mikroverkalkungen des Hodens. Das Risiko, später an Hodenkrebs zu erkranken, war in dieser Patientengruppe 9fach erhöht. Derartige Mikroverkalkungen des Hodens sind nicht tastbar, sondern nur mittels Ultraschalluntersuchung feststellbar.

1.1.4 Diagnostik des Primärtumors

Der klinische Verdacht auf einen Hodentumor basiert auf einem auffälligen Tastbefund im Sinne einer derben Konsistenz oder höckerigen Oberfläche und einer meist schmerzlosen Vergrößerung des Hodens. Beim primär extragonadal manifestierten Tumorleiden (retroperitoneal, mediastinal, supraclaviculär) kann der klinische Untersuchungsbefund der Gonaden gänzlich oder bis auf eine Atrophie eines oder beider Testes unauffällig sein. Erst die weiterführende Diagnostik gibt Aufschluss über den Primärtumor [70]. Die Anamnese des Patienten sollte gezielte Fragen beinhalten, welche die Risikofaktoren einer Hodentumorerkrankung eruieren (Maldescensus testis, kontralateraler Hodentumor, Verwandte ersten Grades mit Hodentumorerkrankung).

Der klinischen Untersuchung schließt sich die Skrotalsonographie an. Hierbei sollte auf typische intratestikuläre Befunde geachtet werden. Diese sind: multiple echoreiche Areale, Mikrolithiasis, Narben (zum Beispiel bei ausgebrannten Tumoren oder der TIN), typische echoarme oder gemischt echoarme/echoreiche Läsionen, die nur einen Teil des Hodenparenchyms betreffen können und gut abgrenzbar sind, die aber auch den ganzen Hoden durchsetzen können. Zusätzlich ist die Sonographie des kontralateralen Hodens erforderlich, da Tumoren oder eine TIN in rund 5% der Fälle bilateral zu beobachten sind [29, 66].

Darüber hinaus sollte bei Vorliegen eines Hodentumors eine weiterführende Diagnostik mit CT Thorax und -Abdomen erfolgen. Diese ermöglicht eine frühzeitige Erkennung von Lymphknoten- oder Organmetastasen.

Vor Durchführung der Primärtherapie ist die Bestimmung der Tumormarker im Serum (AFP, ß-HCG, LDH) essentiell, ohne dass das Ergebnis der Analyse vor der Primärtherapie abgewartet werden muss. Nur AFP und ß-HCG sind relativ spezifisch für die malignen Keimzelltumore, LDH hingegen ist relevant als unspezifischer Marker für die Abschätzung der Tumorlast und zusammen mit AFP und ß-HCG

Voraussetzung für die Stadieneinteilung und Einteilung der metastasierten Keimzelltumoren in die Prognosegruppen nach IGCCCG [70, 98].
Daneben hat die plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) als tumorsekretorischer Marker eine gewisse Bedeutung erlangt. Da sie jedoch in vielen anderen Zellen vorkommt, besteht keinerlei Spezifität für die Keimzelltumoren. Daher wird die routinemäßige Bestimmung nicht empfohlen.

1.1.5 Klassifikation des malignen Hodentumors

Hodentumore werden in drei Kategorien klassifiziert: Keimzelltumore, Keimstrangtumore und gemischte Keimzell-/ Keimstrangtumore. (siehe Tabelle 1) Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Keimzelltumoren des Hodens.
Die Keimzelltumore betragen ungefähr 95% der Fälle von Hodentumoren bezugnehmend auf die WHO Klassifikation [19]. Sie können sich aus einer dominierenden histologischen Unterart zusammensetzen oder eine Mischung aus verschiedenen Histologien sein. Sie werden in reine Seminome (ohne nichtseminomatöse Anteile) und nicht-seminomatöse Keimzelltumoren (NSGCT) des Hodens unterteilt (Nichtseminome: reifes Teratom, Teratokarzinom, Embryonalkarzinom, Chorionkarzinom, Dottersacktumore), welche sich bezüglich Therapie und Prognose voneinander unterscheiden. Oftmals handelt es sich um so genannte Mischtumore, das heißt, dass der Hodenkrebs aus Anteilen eines Embryonal-, Terato- und/oder Chorionkarzinoms bestehen kann. Etwa 20% der Keimzellumore sind Kombinationstumore aus Seminom und Nichtseminom.

Tabelle 1: Klassifikation der Hodentumore [19]

Keimzelltumore	
Seminome Klassisch Atypisch Spermatocystisch	Nichtseminomatöse Tumore Embryonalzellcarcinom Teratom Reif/unreif/reif oder unreif mit maligner Transformation Chorioncarcinom Dottersacktumor (Yolk-sac) Gemischte Keimzelltumore
Keimstrangtumore (Sex cord-stromal Tumore) Sertolizelltumor Leydigzelltumor Granulosazelltumor Mischtumore Unklassifizierte Tumore	
Gemischte Keimzell- und stromale Tumore Gonadoblastom	

Tabelle 2: Histologische Einteilung der Keimzelltumoren des Hodens in Seminome und Nicht-Seminome und deren Subtypen (WHO) [78, 126]

Nicht-Seminome	**Seminome**
Teratom - reif - unreif - mit maligner Transformation Embryonalkarzinom mit Teratom Embryonalkarzinom (ECA) Chorionkarzinom (mit oder ohne ECA und/oder Teratom) Dottersacktumor (Yolk-sac-tumor)	-„ klassisch“ - spermatozytisch - atypisch

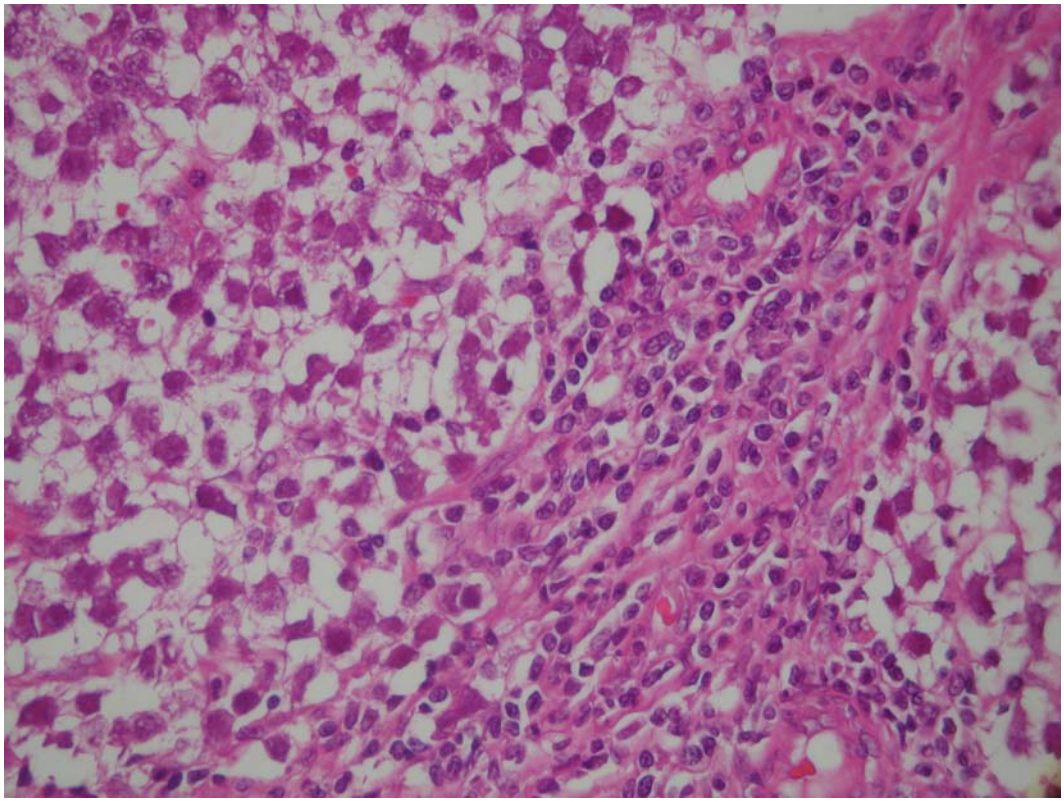

Abb. 2: Histologische Abbildung eines Seminoms

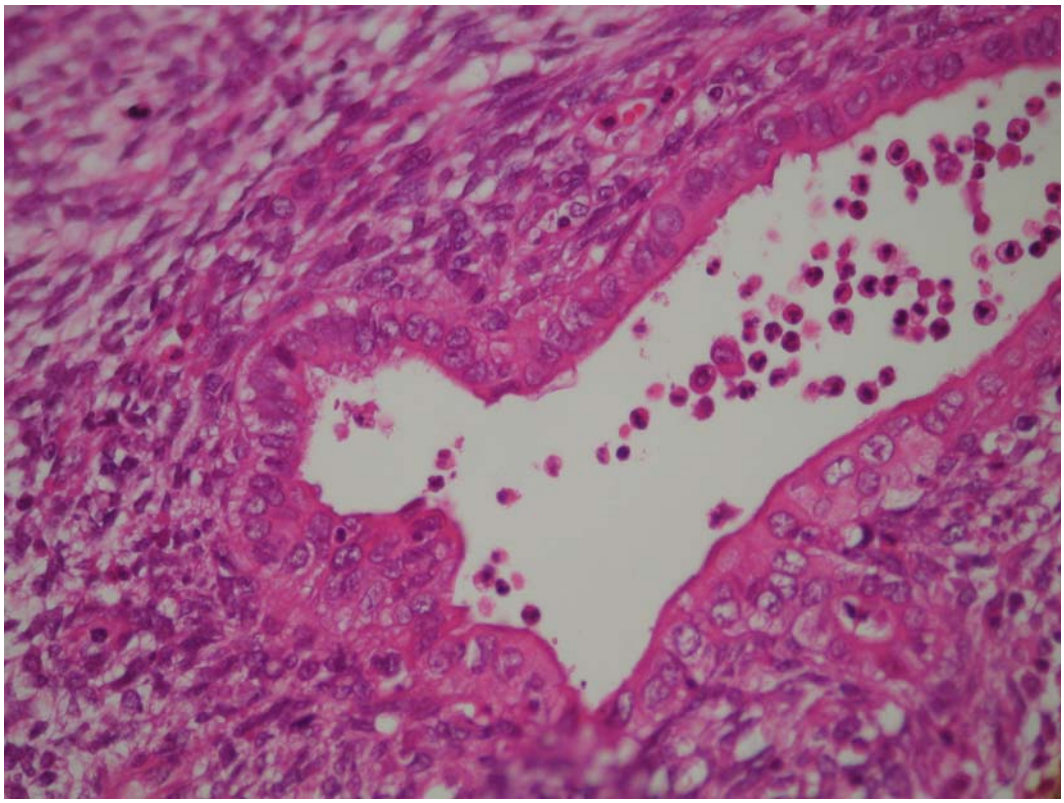

Abb. 3: Histologische Abbildung eines Teratocarcinoms

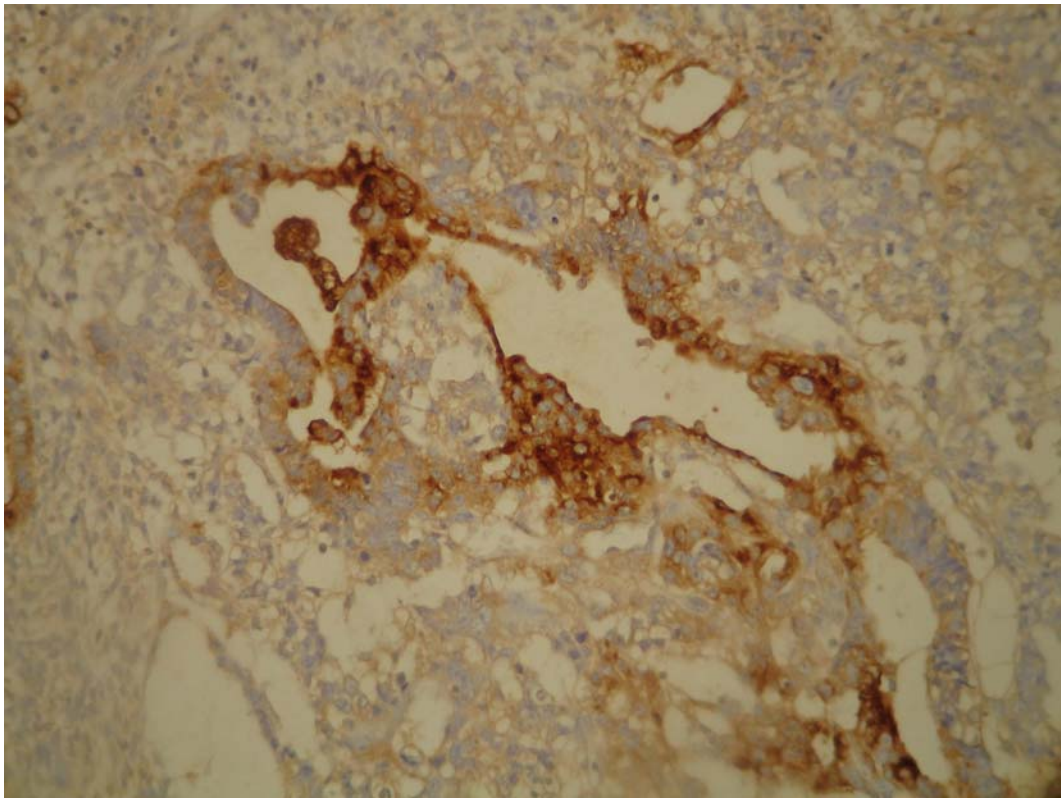

Abb.4: Histologische Abbildung eines Dottersacktumors

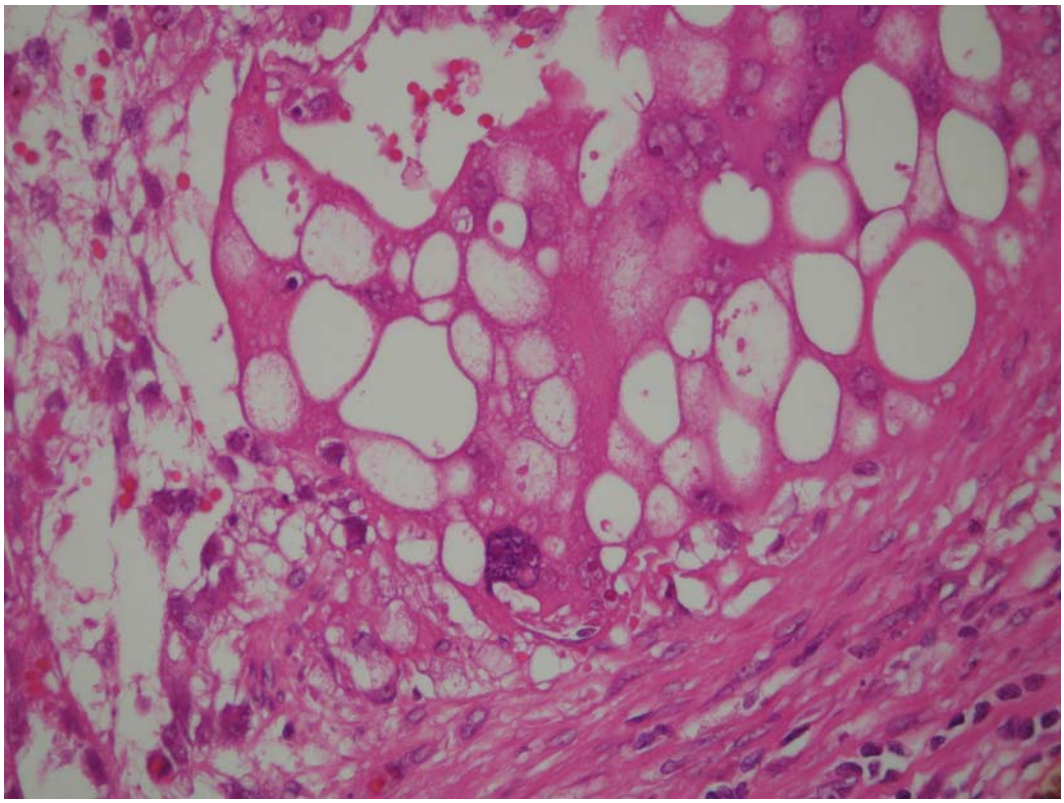

Abb. 5: Histologische Abbildung eines Chorioncarcinoms

(Abbildungen 2-5 zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. Ramaswamy, Institut für Pathologie, Marburg)

Neben der histologischen Einteilung der Keimzelltumore, die wegen unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten und Metastasierungsverhalten der Seminome und Nicht-Seminome von erheblicher Bedeutung für die Prognose und Therapie ist, spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Hierzu gehören sowohl die Festlegung der lokalen Ausdehnung des Primärtumors mit Überschreiten bestimmter Grenzen, als auch die Ermittlung von Tumormarkern.

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgt mittels TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: TNM Klassifikation von Keimzelltumoren des Hodens nach UICC 2002 [115]

pT-Stadium	**beurteilt das primäre lokale Tumorwachstum**
pTx	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Histologisch Narbe im Hoden, kein Primärtumor nachweisbar
pTis	Intratubuläres Wachstum (Carcinoma in situ, TIN)
pT1	Tumor auf den Hoden/Nebenhoden begrenzt ohne Invasion der Lymph-und Blutgefäße
pT2	Tumor auf Hoden/Nebenhoden begrenzt mit/ohne Infiltration der Hodenhüllen und mit Invasion der Lymph-und / oder Blutgefäße
pT3	Tumor infiltriert Samenstrang
pT4	Tumor infiltriert bereits das Skrotum
N	**Befall der regionären Lymphknoten**
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm
N2	Metastase in solitärem Lymphknoten ≥2 cm bis ≤ 5 cm oder in multiplen Lymphknoten ≤ 5 cm
N3	Metastase in Lymphknoten > 5 cm
M	**Fernmetastasen in anderen Organen**
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen in Bild gebenden Verfahren sichtbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Unter Einbeziehung der Histologie ist mit dieser TNM-Klassifikation eine weitere Einteilung nach Prognosekriterien möglich, um die Therapie individuell abzustimmen. Es gibt zahlreiche prognostische Modelle, meist basierend auf den Erfahrungen einzelner Institutionen [16, 18, 55, 96, 120]. In dieser Arbeit wird die Prognoseklassifikation der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) und die Stadieneinteilung nach Lugano verwendet [76], die in Tabelle 4 und 5 dargelegt sind.

Die IGCCCG hat 1997 eine eigene Prognoseklassifikation für fortgeschrittene Stadien entwickelt, aufgeteilt in eine gute, intermediäre und schlechte Prognose getrennt nach Seminomen und Nichtseminomen basierend auf mehreren Faktoren [76].

Tabelle 4: Prognoseklassifikation der IGCCCG von Keimzelltumoren des Hodens. Einteilung nach Histologie, Ausdehnung und Metastasierung des Primärtumors und Konzentration der Tumormarker [58]

	Tumormarker
Prognose gut:	
Nichtseminom (56 % der Fälle , 5-Jahres-Ergebnisse: 89 % progressionsfrei und 92 % Überleben) niedrige Tumormarker sowie keine nichtpulmonalen viszeralen Metastasen	AFP < 1000 ng/ml oder HCG < 5000 IU/l oder LDH < 1,5fach erhöht
Seminom (90% der Fälle, 5 Jahres-Ergebnisse: 82% progressionsfrei, 86% Überleben) keine nichtpulmonalen Metastasen	AFP normal jede ß-HCG-Erhöhung jede LDH-Erhöhung
Prognose mäßig:	
Nichtseminom (28 % der Fälle, 5-Jahre-Ergebnisse: 75% progressionsfrei, 80% Überleben) keine nichtpulmonalen viszeralen Metastasen	AFP 1.000 – 10.000) ng/ml HC G 5.000 – 50.000 IU/l LDH 1,5 – 10fach erhöht
Seminom (10% der Fälle, 5-Jahre-Ergebnisse: 67 % progressionsfrei, 72 % Überleben) nichtpulmonalen Metastasen	AFP normal jede ß-HCG-Erhöhung jede LDH-Erhöhung
Schlechte Prognose:	
Nichtseminom (16 % der Fälle, 5-Jahre-Ergebnisse: 41 % progressionsfrei, 48 % Überleben) mediastinale und/oder nichtpulmonale viszerale Metastasen	AFP > 10.000 ng/ml oder HCG > 50.000 IU/l oder LDH > 10 fach erhöht
Seminom Keine Klassifikation als schlechte Prognose	

Tabelle 5: Einteilung des Tumorstadiums nach der "Lugano Klassifikation“ [37]

Stadium I

Erkrankung nur im Hoden

A = T1

B = T2-4

Stadium II

A = Lymphknoten bis 2 cm

B = Lymphknoten 2 bis 5 cm

C = Lymphknoten 5 bis 10 cm

D = Lymphknoten > 10 cm

Stadium III

A = Lymphknotenmetastasen supradiaphragmal

B = pulmonale Metastasen

C = extrapulmonale viszerale Metastasen

Nach diesen Prognosekriterien kann die Therapie festgelegt werden, (siehe Kapitel 1.1.6).

1.1.6 Therapie des Primärtumors

Grundsätzlich wird versucht zunächst den Primärtumor durch eine Operation zu entfernen. Nach der Orchidektomie und der histologischen Aufarbeitung des Präparates erfolgt in Zusammenhang mit den Staginguntersuchungen, welche die Serumtumormarker AFP, ß-HCG und LDH und ein CT- Thorax und Abdomen enthalten, die Einteilung in die Lugano- und IGCCCG- Klassifikation. Daran adaptiert erfolgt die weitere Therapie.

1.1.6.1 Inguinale Ablatio testis

Der klinische Verdacht auf einen Hodentumor unklarer Dignität sollte durch eine inguinale Freilegung und histologische Sicherung gegebenenfalls mit intraoperativer Schnellschnittuntersuchung bestätigt oder ausgeschlossen werden [39]. Bestätigt sich der Verdacht auf einen malignen Keimzelltumor des Hodens, so erfolgt die hohe inguinale Ablatio testis, bei der der tumortragende Hoden samt Samenstrang am inneren Leistenring in Höhe der peritonealen Umschlagfalte abgesetzt wird. Ductus deferens und Samenstranggefäße werden voneinander getrennt und separat durchtrennt und ligiert. Zeigt sich makroskopisch eine Infiltration der Skrotalwand oder ein perforierendes Wachstum, ist die Operation durch eine Hemiskrotektomie zu erweitern. Eine verzögerte inguinale Ablatio ist den seltenen Fällen vorbehalten, bei denen eine vital bedrohende Metastasierung den umgehenden Beginn einer Polychemotherapie erforderlich macht.

1.1.6.2 Organerhaltende Tumorenukleation des malignen Keimzelltumors

Ein organerhaltendes Vorgehen ist in den Fällen anzustreben, in denen synchron oder metachron ein kontralateraler Hodentumor besteht oder bei den Patienten, die einen Hodentumor in einem Einzelhoden entwickelt haben [101]. Das organerhaltende Vorgehen ist sinnvoll, wenn der Hodentumor sonographisch als solitärer Befund gut abgrenzbar mit einem Durchmesser <2 cm darstellbar ist. Viele Tumoren haben eine Pseudokapsel, die die Resektionskanten markiert. Ist dies nicht der Fall, muss die Enukleation schnellschnittgesteuert erfolgen. Aus dem an das Tumorbett angrenzenden Hodenparenchym sind Proben zu nehmen zur sicheren Feststellung der Tumorfreiheit der Absetzungskante. Da man weiß, dass sich neben dem Enukleat immer TIN findet [98], sollte diese mittelfristig behandelt werden (siehe Kap. 1.1.6.3).

1.1.6.3 Therapie der TIN

Nach Sicherung der Diagnose einer kontralateralen TIN bestehen grundsätzlich drei Therapieoptionen: Ablatio testis, Radiatio des Hodens und Surveillance. Die Standardempfehlung besteht in einer Radiatio des Hodens mit 20 Gy. Diese wird in zehn Sitzungen mit je 2 Gy appliziert, um alle TIN-Zellen zu eradizieren [98].

1.1.6.4 Therapie des Seminoms im Klinischen Stadium I

Das Risiko einer okkulten Metastasierung in die regionären Lymphknoten trotz unauffälliger Bildgebung und nach Orchiektomie normalisierter Tumormarker im Klinischen Stadium I (CS I) beträgt ca. 20% [119], wenn keine adjuvante Therapie erfolgt. Die dennoch nahezu 100-prozentige Heilungsrate kann durch drei Strategien erreicht werden: Surveillance mit regelmäßiger Tumornachsorge in dreimonatigen Intervallen und definitive Therapie nur im Falle eines Rezidivs, adjuvante Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von 20 Gy oder eine adjuvante Mono-Chemotherapie mit Carboplatin mit 2 Zyklen AUC 5 oder optimalerweise einem Zyklus AUC 7 [84].

Als ungünstige Prognosefaktoren für ein Rezidiv konnten eine Tumorgröße von > 4 cm und eine Infiltration des Rete testis herausgearbeitet werden [121]. Patienten mit diesen beiden Faktoren definieren eine Hochrisikogruppe. Sind beide Faktoren vorhanden, liegt das Rezidivrisiko über 30%, sind sie nicht vorhanden, beträgt die Rezidivgefahr lediglich 12%. Patienten mit einem niedrigen Risiko und einer guten Compliance kann eine Surveillance-Strategie empfohlen werden. Der Vorteil der Surveillance ist, dass über 80% der Patienten nach der Orchiektomie außer der Nachsorge keine weitere Therapie benötigen. Nachteilig ist, dass im Rezidivfalle die nachfolgende Therapie mit drei Zyklen Chemotherapie nach dem PEB-Schema intensiver ist und Rückfälle auch erst spät auftreten können [120]. Innerhalb der ersten fünf Nachsorgejahre sind zusätzliche CT-Abdomenuntersuchungen notwendig. Ferner besteht möglicherweise eine höhere psychische Belastung des Patienten aufgrund des erhöhten Rezidivrisikos.

Die adjuvante Radiotherapie ist eine etablierte Therapiemodalität beim Seminom im CS I, die Heilungsrate beträgt 95-98%. Ziel einer adjuvanten Radiotherapie nach durchgeführter Orchiektomie und Zuordnung zum klinischen Stadium I ist die Devitalisierung okkulter Mikrometastasen. Die hohe Wirksamkeit der lokalen perkutanen Radiatio ist begründet im primär

nahezu ausschließlich lymphogenen Ausbreitungsmuster der malignen Keimzelltumore in die lokoregionären paraaortalen/parakavalen Lymphabflussgebiete und in der hohen Strahlensensibilität der Seminomzellen. Die in den bisherigen deutschen Leitlinien empfohlene Dosis von 26 Gy sollte aufgrund aktueller Studienergebnisse auf 20 Gy reduziert werden [70, 84, 98].

Die Vorteile der adjuvanten Radiotherapie sind milde bis moderate mögliche Akutnebenwirkungen, eine geringe Rezidivrate von 3 bis 4%, die Rezidive treten fast ausschließlich außerhalb des Bestrahlungsfeldes auf [43, 60, 61, 64]. Nachteilig ist, dass die Radiotherapie für ca. 80% der Patienten eine Übertherapie bedeutet, da diese auch ohne Therapie rezidivfrei bleiben. Des Weiteren besteht prinzipiell ein Risiko radiogen induzierter Zweitmalignome, allerdings liegen keine Daten über die Höhe des Risikos bei heutiger Radiotherapie mit reduzierten Dosen und Zielvolumina vor.

Durch neueste Studien ist inzwischen abgesichert, dass die adjuvante Radiotherapie ihr Monopol verloren hat und mit als gleichwertig angesehenen alternativen Konzepten nur eine von drei Optionen für das postoperative Vorgehen beim lokal begrenzten Seminom darstellt [8, 84, 98, 121]. Die dritte Alternative sind ist eine systemische Chemotherapie mit Carboplatin [8, 84, 98]. Die Vorteile sind milde bis moderate mögliche Akutnebenwirkungen und es werden auch potentielle Mikrometastasen außerhalb des Bestrahlungsfeldes erfasst. Die Rezidivrate beträgt 3%. Rezidive treten in der Mehrzahl der Fälle im lokoregionären Lymphabflussgebiet auf. Nachteilig ist auch hierbei die Übertherapie von ca. 80% der Patienten, da diese auch ohne adjuvante Chemotherapie rezidivfrei blieben. Potentiell besteht auch das Risiko zytostatikainduzierter Zweitmalignome, wobei keine Daten zur Risikohöhe vorliegen.

Zusammenfassend kann man eine Surveillance-Strategie bei Patienten mit einem niedrigen Risikoprofil, das heißt mit einem kleinen Tumor und ohne Infiltration des Rete testis, empfehlen. Patienten mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung durch einen großen Primärtumor oder einer

vorliegenden Infiltration des Rete testis sollte man zu einer Radiatio oder carboplatinhaltigen Chemotherapie raten.

1.1.6.5 Therapie des Nichtseminoms im klinischen Stadium I

Auch beim Nichtseminom im CSI sollte bei richtiger Therapie eine Heilungsrate von 99% erreicht werden [92, 106].
Bei einer Surveillance-Strategie liegt das Rezidivrisiko bei 27-30% in einem Beobachtungszeitraum von <20 Jahren [51, 106]. Rezidive treten bei 54-78% der Patienten im Retroperitoneum und in 13-31% in der Lunge auf [33, 84, 106]. Als prognostisch wichtigster Risikofaktor konnte die Gefäßinvasion des testikulären Primärtumors (V1) herausgearbeitet werden. Patienten mit V1 (CS IB) haben ein Risiko von 48% Metastasen zu entwickeln, wohingegen Patienten ohne V1 (CS IA) nur ein Rezidivrisiko von 14-22% aufweisen [5, 51, 65, 85]. Aufgrund dessen wird eine risikoabhängige Therapiestrategie empfohlen.
Patienten mit einem niedrigen Rezidivrisiko (ohne V1, CS IA) kann eine Surveillance-Strategie mit regelmäßigen Computertomographieuntersuchungen von Abdomen und Thorax (Monat 0; 3 und 12) empfohlen werden [95]. 78-86% dieser Patientengruppe benötigen nach der Orchiektomie keine weitere Therapie [51, 65, 85]. Im Falle eines Rezidivs erhalten die betroffenen Patienten eine an ihre IGCCCG-Risikogruppe adaptierte Chemotherapie; die Heilungschancen liegen dann nahe 100%.
Kommt eine Surveillance-Strategie nicht infrage, sollte der Patient 2 Zyklen einer Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin (PEB) erhalten. Gibt es auch hierfür Kontraindikationen, ist die primäre nervschonende retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLA) indiziert [81]. Eine randomisierte Phase III Studie mit einem Zyklus PEB versus einer primären RPLA bei 382 Patienten mit NSKZT im CS I (mit adjuvanter Chemotherapie für die Patienten, welche nach der RPLA im

pathologischen Stadium II waren) zeigte eine signifikant reduzierte Rezidivrate für die Patienten mit Chemotherapie (1,1%) gegenüber einer Rezidivrate von 7,5% bei den Patienten, welche eine primäre RPLA erhielten [6].

Hochrisikopatienten erleiden ohne eine adjuvante Therapie in mehr als 50% der Fälle ein Rezidiv und sollten deshalb adjuvant mit 2 Zyklen PEB chemotherapiert werden [21, 92]. Der Nachteil ist, dass die Hälfte der Patienten, welche PEB erhalten, keine Therapie benötigen und somit unnötigerweise den Nebenwirkungen einer Chemotherapie ausgesetzt sind [42, 90] und möglicherweise ein geringes Risiko von Zweitmalignomen durch die Chemotherapie [17, 112, 113]. Surveillance jedoch bedeutet für die Hochrisikopatienten mit einem Rezidivrisiko von 48% psychischen Stress [44]. Das Rezidiv wird eventuell erst zu einem späteren Zeitpunkt entdeckt und die erforderliche Therapie ist dann intensiver im Vergleich zu einer sofortigen adjuvanten Behandlung. Trotz alledem können >98% der Patienten bei sorgfältig durchgeführter Sutveillance und Chemotherapie im Rezidivfalle geheilt werden [5].

Lehnt der Patient die Surveillancestrategie und die Chemotherapie ab, ist eine nervschonende RPLA indiziert [31, 32, 123]. Patienten, die eine nervschonende RPLA wählen, erhalten diese in 50% der Fälle unnötigerweise [106]. Die akute operative Morbidität beträgt ca. 9% [12]. Es besteht ein 6-8% Risiko einer retrograden Ejakulation [106]. Bei 8-10% der operierten Patienten treten trotzdem Lungenmetastasen und/oder retroperitoneale Rezidive auf. [102]

1.1.7 Therapie des metastasierten Keimzelltumors

Nur etwa 20% aller Patienten mit malignen Keimzelltumoren weisen zum Zeitpunkt der Tumordiagnose vergrößerte lokoregionale Lymphknoten auf und werden definitionsentsprechend dem Stadium II zugeordnet. Von allen Patienten im Stadium II entfallen ca. 70% auf die Stadien IIA und IIB [22].

1.1.7.1 Therapie des Seminoms im klinischen Stadium IIA/B

Die Standardtherapie des Seminoms im klinischen Stadium IIA/B ist die Bestrahlung. Hierbei werden die retroperitonealen paraaortalen und ipsilateralen iliakalen Lymphknoten mit 30 Gy im klinischen Stadium IIA und mit 36 Gy im klinischen Stadium IIB bestrahlt [97]. Vier bis sechs Wochen nach Abschluss der Therapie erfolgt eine Kontrolle mittels CT-Abdomen zur Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie. Die Therapieergebnisse für das Stadium IIA reichen nahe an die für das CS I erzielten heran, das Gesamtüberleben liegt bei fast 100% [22]. Das rezidivfreie Überleben beträgt nach vier Jahren 92,5% im Stadium IIA/B, wobei die Rezidivraten im Stadium IIA bei knapp 5% und im Stadium IIB bei 11% liegen [11].
Patienten, die eine Radiatio ablehnen, sollten eine Chemotherapie mit drei Zyklen PEB oder vier Zyklen Cisplatin und Etoposid (EP) erhalten [10]. Letztgenannte Therapie ist beispielsweise bei vorbestehender Lungenschädigung oder im Fall von Kontraindikationen gegen Bleomycin angezeigt. Eine Mono-Chemotherapie mit Carboplatin scheint ein höheres Rezidivrisiko zu bergen und kann nicht empfohlen werden [68].

1.1.7.2 Therapie des Nichtseminoms im klinischen Stadium IIA/B

Beim nichtseminomatösen Keimzelltumor im klinischen Stadium IIA/B beträgt die Heilungsrate etwa 98% [98].

Bleiben nach Orchiektomie bei Patienten im CS IIA die Tumormarker weiter erhöht, sollte eine primäre Chemotherapie mit 3 Zyklen PEB durchgeführt werden, bei Residualtumoren schließt sich eine sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLA) an [67]. Patienten mit markernegativem Stadium IIA kann man zwei Optionen anbieten: Primäre nervschonende RPLA oder Surveillance.

Patienten ohne nachweisbare Tumormarker aber mit retroperitonealen Lymphknoten von 1-2cm Größe und somit im potentiellen CS IIA stellen ein Problem dar. Einige von Ihnen werden eine gutartige Lymphknotenvergrößerung haben, andere werden Lymphknotenmetastasen aufweisen. Patienten mit reinem Embryonalzellcarcinom im Primärtumor sollten in dem Fall eine primäre Chemotherapie mit drei Zyklen PEB erhalten [67]. Bei Patienten mit reinem Teratom im Primärtumor stehen zwei Optionen zur Verfügung: RPLA oder Surveillance. Mit der RPLA kann das pathologische Stadium direkt verifiziert werden. Wird das CS IIA durch die primäre nervschonende RPLA histopathologisch bestätigt, erhält der Patient zusätzlich zwei Zyklen PEB-Chemotherapie [87]. Bei der Surveillance-Strategie erhält der Patient ein kurzfristiges Follow-up nach 6 Wochen. Wächst die suspekte Läsion in diesem Zeitraum, ist eine Chemotherapie mit 3 Zyklen PEB indiziert [54]. Residualtumore nach Chemotherapie sind komplett zu resezieren [54, 72, 87].

Wenn eine RPLA durchgeführt wird, sollte dies in nerverhaltender Technik geschehen [24, 109]. Unabhängig von dem nervschonenden Vorgehen kommt es auch Abhängig von der Erfahrung des Operateurs zu einem Verlust der antegraden Ejakulation in 5-32% der Fälle [6, 124]. Die operative Morbidität liegt bei 10% [12]. Nach der RPLA findet sich in 12-

13% der Fälle ein pathologisches Stadium I (PS I) [103, 124], in 87-88% bestätigt sich die Diagnose eines PS IIA/B. Für diese Patienten stehen zwei weitere Therapieoptionen zur Verfügung: Surveillance oder adjuvante Chemotherapie [89, 108, 125]. Surveillance hat ein Rezidivrisiko 30-50%, diese Patienten erhalten im Rezidivfall 3-4 Zyklen PEB-Chemotherapie [89, 125]. Die Rezidive treten fast ausschließlich außerhalb des Retroperitoneums auf [109, 125]. Eine adjuvante Chemotherapie nach RPLA im PS II A/B reduziert das Rezidivrisiko auf 0-7%, bedeutet jedoch für 50-70% der Patienten nach RPLA eine Übertherapie mit den damit verbundenen Nebenwirkungen [17, 42]. Die Chemotherapie ist nur für 30% der Patienten im pathologischen Stadium IIA bzw. für 50% im pathologischen Stadium IIB notwendig [124, 125].

1.1.8 Therapie des fortgeschrittenen Keimzelltumors

In diesem Fall wird die IGCCCG Klassifikation zur Stadieneinteilung und die daran gekoppelten Therapieoptionen gewählt. Bei Patienten mit einer „good prognosis“ besteht die Standardtherapie aus drei Zyklen PEB [25, 53].

Für die Gruppe von Patienten mit einer “intermediate prognosis” wird eine Chemotherapie mit vier Zyklen PEB empfohlen, optimalerweise im Rahmen von prospektiven Studien [26].

Auch bei Patienten mit einer “poor prognosis” wird eine Standardtherapie von vier Zyklen PEB empfohlen, alternativ vier Zyklen PEI. [80] Das progressionsfreie Überleben nach fünf Jahren liegt zwischen 45 und 50% mit nachgewiesener Verbesserung der Überlebensraten in den letzten zwei Jahrzehnten [105].

10% der Patienten mit einer fortgeschrittenen Hodentumorerkrankung entwickeln Hirnmetastasen. Das Vorliegen von cerebralen Filiae stellt keine Kontraindikation für eine Chemotherapie dar. Im Falle eines unilokolären Befalls ist die operative Therapie eine Option, gegebenenfalls gefolgt von einer Radiotherapie.

1.2 MDR

Multidrugresistence zeigt sich als Chemorefraktärität bei vielen Tumorpatienten. Einer der dafür verantwortlichen Mechanismen ist eine verminderte Akkumulation von cytotoxischen Substanzen in der Zelle aufgrund der Aktivität eines 170 kDa membranständigen Proteins, MDR1 (p-Glykoprotein, p-gp, p-170 oder MDR 1 Genprodukt) [47].

Das p-Glykoprotein wurde zuerst von Juliano und Ling identifiziert, sie beschrieben es 1976 als ein Oberflächenglykoprotein bei Ovarialzellen von chinesischen Hamstern, welche eine „multidrugresistence“ zeigten. [62]. Weitere Analysen ergaben, dass P-170 ein 170-kDa ATP-abhängiger Effluxtransporter ist und zur Superfamilie der ABC Transporter gehört [9, 127]. Das p-170 Glykoprotein arbeitet als eine energieabhängige Effluxpumpe für strukturell unterschiedliche Stoffe von Ionen bis hin zu Peptiden. P-170 spielt eine Rolle bei der Detoxifikation und dem Schutz des Körpers vor toxischen Stoffen und Metaboliten, indem es diese Komponenten in Galle, Urin und Intestinum sezerniert und so andere Organe, wie das Hirn oder die Hoden vor einer Akkumulation der Toxine schützt [2, 35, 36, 47, 83].

Es wird vermutet, dass der MDR1 Genpolymorphismus einen Effekt auf den Therapieerfolg von Patienten mit maligen Erkrankungen hat. Shen et al. (1986) beschrieben eine „multidrugresistence“ bei menschlichen Kolonkarzinomzellen, die mit einer Vermehrung von spezifischen DNA Sequenzen zusammenhängt, welche den „multidrug resistence locus“ (MDR1) kodieren [104]. Eine gesteigerte Expression von MDR1 und eine Vermehrung der MDR1 Gensequenz fanden sich auch bei menschlichen Leukämie und Ovarialkarzinomzellen. Roninson et al. (1986) zeigte, dass „multidrugresistence“ mit einer Vermehrung von zwei zusammenhängenden DNA-Sequenzen korreliert, MDR1 und MDR2 genannt [94]. Diese Sequenzen konnten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den chinesischen Hamster-mdr-Genen identifiziert werden. MDR1 kodiert für

eine 4.5-kb mRNA und war überexprimiert bei den menschlichen Zelllinien, welche analysiert wurden.

Eid et al. wiesen 1996 eine Überexpression von MDR1 im Keimzelltumor des Hodens nach [35]. Desweiteren zeigten sie eine signifikant positive Korrelation der Überexpression von MDR1 und fortgeschrittenen klinischen Stadien des Keimzelltumors des Hodens, sowie Erkrankungsfällen, welche schlecht auf eine Chemotherapie ansprachen [3, 35, 36].

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bei verschiedenen malignen Erkrankungen findet sich eine Überexpression von MDR, welche im Zusammenhang mit Resistenzentwicklung gegen unterschiedliche Zytostatika gebracht wird und sich daraus eine Chemorefraktärität gegen eine systemische Therapie ergibt.
Das Ziel dieser Arbeit war, den prognostischen Wert einer MDR1 Expression beim malignen Keimzelltumor des Hodens zu untersuchen. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke und den histologischen Subtypen geprüft.

Zusammenfassend sollten folgende Kernfragen im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- Expression von MDR1 im Keimzelltumor des Hodens in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp
- MDR1 Expression in Lymphknotenmetastasen nach Chemotherapie in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp des Primärtumors
- Einfluss der Expression von MDR1 auf das therapeutische Ansprechen
- Einfluss der Chemotherapie auf die histologische Differenzierung von Tumorresiduen
- Einfluss der Primärhistologie auf die Histologie der Tumorresiduen (vitaler Tumor, Teratom, Nekrose)

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In die Untersuchung einbezogen wurden Patienten, welche eine sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie (RPLA) in den Jahren 1988-2003 erhielten. Die Gruppe beinhaltete alle histologischen Subtypen (Seminome, Teratome, Embryonalzellcarcinom Chorioncarcinome, Dottersacktumore und Mischtypen). Es wurden die Präparate der sekundären RPLA und der vorherigen Tumororchiektomie, welche in 75 von 77 Fällen stattgefunden hatte, untersucht.

64 Patienten kamen aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsklinik Marburg, hinzu kamen 13 Patienten aus dem Bundeswehrzentralkrankenhaus in Koblenz. Es wurden insgesamt 53 Hodentumore unterschiedlicher histologischer Klassifikation untersucht. Das Hodentumorgewebe wurde mittels inguinaler Orchiektomie erhalten. Die Lymphknotenpräparate wurden mittels sekundärer retroperitonealer Lymphadenektomie nach vorheriger Chemotherapie gewonnen. Lymphknotenpräparate lagen in 73 Fällen vor.

Da sich einige Patienten in auswärtigen Krankenhäusern der Orchiektomie unterzogen, wurden die Paraffinblöcke des Orchiektomiepräparates angefordert.

In 24 Fällen lag kein Hodentumorpräparat vor, teils, da es sich um einen primären retroperitonealen Tumor handelte (2 Fälle) und keine Orchiektomie erfolgte und teils, weil die Paraffinblöcke des Hodentumors nicht mehr zugänglich waren (22 Fälle). Ebenso lag in 4 Fällen kein retroperitoneales Lymphknotenmaterial zur Untersuchung vor.

Das Tumorstadium, die Histologien und Größenausdehnungen des Hodentumors und der Lymphknotenpräparate, mögliche Metastasen, Ergebnisse von Staging- und Restaginguntersuchungen, durchgeführte Therapien, Informationen über die Chemotherapie und den Verlauf der

Tumormarker β-HCG, AFP und LDH des Patientenkollektivs wurden retrospektiv anhand der Krankenakten ermittelt.

2.1.1 Alter der Patienten bei der RPLA

Die Altersverteilung des Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Primäroperation ist in Tabelle 6 dargestellt. Das Alter variierte zwischen 14-67 Jahren, der Mittelwert war 31 Jahre. Der Großteil der Patienten (41%) war zwischen 21-30 Jahren alt.

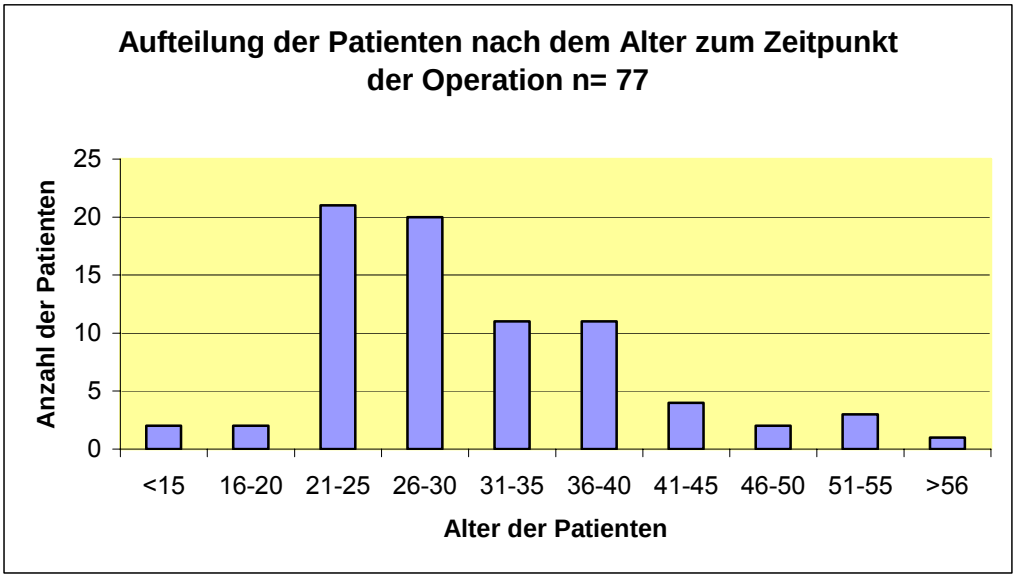

Tabelle 6: Aufteilung der Patienten nach dem Alter zum Zeitpunkt der Operation

2.2 Methodik

Nach primärer Orchiektomie erhielten alle Patienten eine platinbasierte Chemotherapie nach unterschiedlichen Schemata (PEB, PEI, Carboplatin) und unterschiedlicher Anzahl von Zyklen (2-6 Zyklen).
Nach der Chemotherapie erhielten alle 77 Patienten eine retroperitoneale Lymphadenektomie. Die Residualtumormassen wurden histologisch untersucht. Unterschieden wurde nach Nekrose, reifem Teratom und vitalem Tumor (Embryonalzellcarcinom, unreifes Teratom, Seminom, Dottersacktumor).
Die histologischen Präparate des Primärtumors und der RPLA wurden immunhistochemisch untersucht (siehe Kapitel 2.2.2). Anschließend wurden alle gefärbten Präparate von einer einzigen Pathologin begutachtet und die Intensität der MDR-Expression beurteilt. Dabei wurden insgesamt drei Expressionsstärken unterschieden und mit einer Nummer versehen (1 = keine Expression; 2 = wenig bis mittlere Expression; 3 = starke bis sehr starke Expression).

2.2.1 Gewinnung der Gewebeschnitte

Nach Erhalt der Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom 5µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, mit einem feinen Pinsel vom Messerrücken aufgenommen und im vorgewärmten Wasserbad zum Strecken aufgefangen. Dort wurden die Schnitte auf silanisierte Objektträger gezogen; dabei verhindert die Aminopropyl-tri-ethoxy-silan Beschichtung ein Abschwimmen der Paraffinschnitte bei Inkubationen und Spülvorgängen der Objektträger. Nach dem Schneiden wurden die Präparate für einen Tag im Trockenschrank bei 45 °C aufbewahrt.
Nach dem Trocknen wurden die Gewebeschnitte für die im folgenden aufgeführten immunhistochemischen Methoden 3 x 5 min mit Xylol

entparaffiniert, anschließend in der absteigenden Alkoholreihe über jeweils 5 min (2 x 100% EtOH, 2 x 96% EtOH, 1 x 80% EtOH, 1 x 70% EtOH) rehydriert und zum Schluss über 3 min in Aqua dest. der Restalkohol entzogen.
Zur Unterdrückung der endogenen Peroxydaseaktivität und damit zur Vermeidung falsch positiver Befunde wurden die Präparateschnitte für 20 min in eine 3%ige H_2O_2-Lösung bei Raumtemperatur (RT) gebracht. Nach zweimaliger Spülung der Präparate in PBS für jeweils 5 min waren die Gewebeschnitte für die nachfolgenden Behandlungen vorbereitet.

2.2.2 Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern

2.2.2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Durchführung

Alle Inkubationsschritte wurden, falls nicht anders angegeben, während der immunhistochemischen Reaktionen bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Antiseren wurden ständig im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt oder als Aliquots bei -20 °C eingefroren. Es wurde bei allen Inkubationsschritten darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte auf den Objektträgern nicht austrockneten, um Artefakte zu vermeiden.

2.2.2.2 Das Prinzip der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit der indirekten Methode des DAKO EnVision™ Detektionssystems durchgeführt. Dabei erfolgte die spezifische Antigendarstellung in drei Schritten: zu Beginn bindet ein Primärantikörper ein Gewebeantigen, gegen das er gerichtet ist. Nach Auswaschen der ungebundenen überschüssigen Antikörper folgt die Inkubation des Präparates mit einem zweiten Antikörper. Dieser ist gegen den speziesspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet. In dem hier benutzten System ist dieser Sekundärantikörper mit seinem Fc-Teil an

einer zentralen Kohlenwasserstoffkette eines Dextran-Polymers verankert, auf dem zusätzlich zahlreiche Enzyme (Meerrettich-Peroxydasen) lokalisiert sind, die durch ihre große Menge das Farbsignal verstärken (Abb.6).

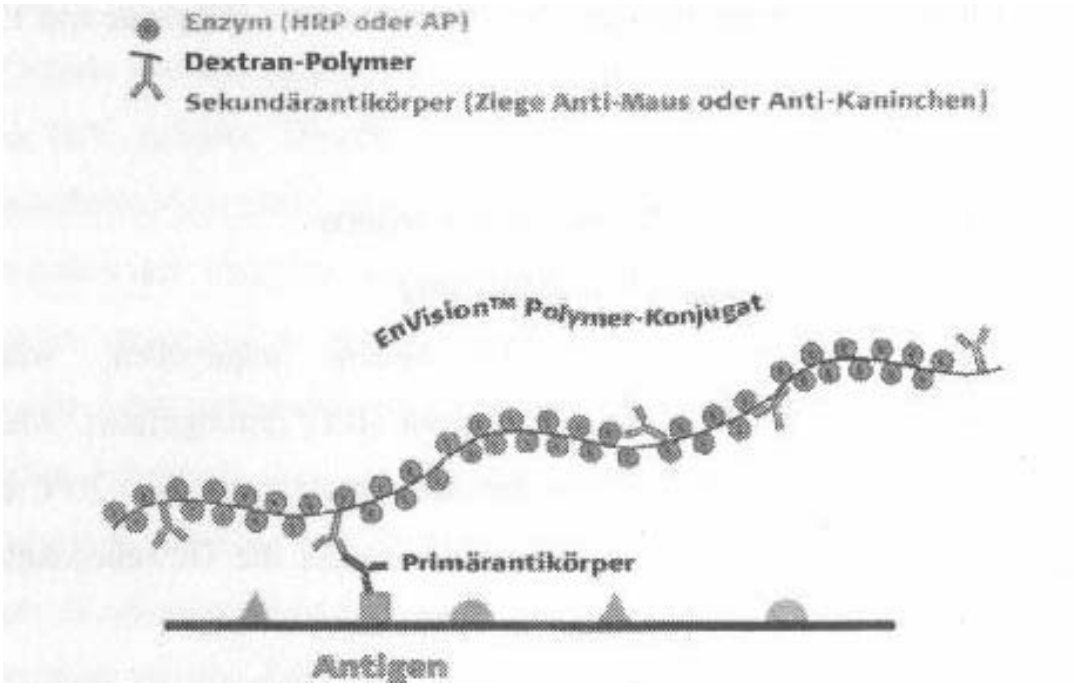

Abb.6: Immunhistochemisches Prinzip zur Darstellung gewebespezifischer Epitope unter Anwendung des DAKO EnVision™ 2-Schritt-Detektionssystems (aus Versuchsvorschrift der Firma DAKO, Hamburg, 2005)

Nichtgebundene Sekundärantikörper werden abgespült. Als letzter Reaktionsschritt wird eine Farblösung aus dem Chromogen 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) und gepufferter Substratlösung zugeführt. Die am Dextranpolymer fixierten Peroxidasen katalysieren hierbei die Oxydation des Elektronendonators DAB zu einem braunen, wasserunlöslichen Farbstoff und führen somit zur Darstellung des vom Primärantkörper erkannten Antigens.

Die Enzymreaktion am Sekundärantikörper über das Dextranpolymer erlaubt somit die Verwendung einer niedrigen Antikörperkonzentration mit einer größtmöglichen Empfindlichkeit bei minimaler unspezifischer Hintergrundfärbung.

2.2.2.3 Verdünnungsreihen und Vorbehandlung

Zur Austestung der optimalen Antikörperkonzentration wurden zunächst Verdünnungsreihen erstellt und eine Vorbehandlung des Gewebes im Dampftopf vorgenommen.

Primär-antikörper	Art	Spezies	Verdünnung Primär-antikörper	Sekundär-antikörper
MDR (G-1) IgG	monoklonal	Maus	1:100/ 1:250	Anti-Maus

Tab.7: Verdünnung der Antikörper

Die angegebenen Verdünnungen wurden aus dem Konzentrat des Antikörpers und der entsprechenden Zugabe von Diluent-Flüssigkeit (Firma DAKO, Hamburg, Deutschland) hergestellt.

2.2.2.4 Antigendemaskierung mittels Dampftopf

Die entparaffinierten und mit H_2O_2 geblockten Schnitte wurden in eine Küvette mit Target Retrieval Solution gestellt und 30 min bei 94°C im Dampftopf gekocht. Dadurch konnte eine Wiederherstellung und Demakierung der Epitope erzielt werden. Die Schnitte wurden dann 20 min zum Abkühlen in dieser Küvette belassen und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Nun waren die Schnitte für die Immunreaktion präpariert.

2.2.2.5 Immunreaktionen

Alle Präparate wurden zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen der Antikörper an das Gewebe und zur Vermeidung elektrostatischer Wechselwirkungen mit frisch angesetzter 2%iger Magermilchlösung für 20

min abgesättigt. Für alle anschließenden Inkubationen wurde eine mit befeuchtetem Filterpapier ausgelegte Kammer verwendet, um eine Verdunstung zu vermeiden. Es wurde darauf geachtet, dass die Lösungen die Gewebeareale vollständig bedeckten.

Der Primärantikörper wurde mit Antikörper-Diluent auf die jeweilige Konzentration verdünnt und die Schnitte wurden für 60 min bei RT inkubiert. Bei allen Versuchen wurden die Schnitte der Negativkontrolle statt mit dem Primärantikörper mit PBS inkubiert. Danach erfolgten die obligatorischen Waschschritte der Präparate für 3 x 5 min in PBS. Anschließend wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper für 60 min inkubiert. Dabei handelte es sich um das Peroxydase-markierte EnVision Polymer, welches gegen Maus gerichtet war. Nach erneuter Spülung in PBS (dreimal für jeweils 5 min) erfolgte die Farbreaktion. Dazu wurde eine frische DAB-Lösung hergestellt, die 3-10 min im Dunkeln auf das Gewebe einwirkte. Um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde das Präparat während des Färbevorgangs alle 3 min mikroskopisch kontrolliert und die Farbintensität eingeschätzt. Das DAB wird während der Reaktion mittels H_2O_2 und der Peroxydase in saurem Milieu zu einem braunen Farbstoff umgesetzt. Die DAB-Färbung bietet den Vorteil einer lang anhaltenden Gewebemarkierung und die damit verbundene gute Asservierung der Präparate.

Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde eine zweimalige Spülung für jeweils 5 min mit PBS vorgenommen. Um eine Abgrenzung zwischen DAB-positiven und DAB-negativen Zellen vornehmen zu können, wurde eine Gegenfärbung der Präparate mit Hämatoxylin durchgeführt. Dazu wurden die Präparate 30-60 sec in Mayer`s sauren Hämalaun (1:5 verdünnt) getaucht und der überschüssige blaue Farbstoff mit Aqua dest. abgespült. Es folgte die Stabilisierung des Farbstoffs für drei Minuten in Leitungswasser.

2.2.3 Eindecken der gefärbten Präparate

Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Präparate zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 100%) jeweils 5 min entwässert, anschließend 10 min in Xylol entalkoholisiert und schließlich kurz in Karboxy-Xylol eingetaucht. Zum Eindecken wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen dickflüssigem Entellan versehen und vorsichtig unter Ausschluss von Luftblasen dem Objekt aufgelegt.

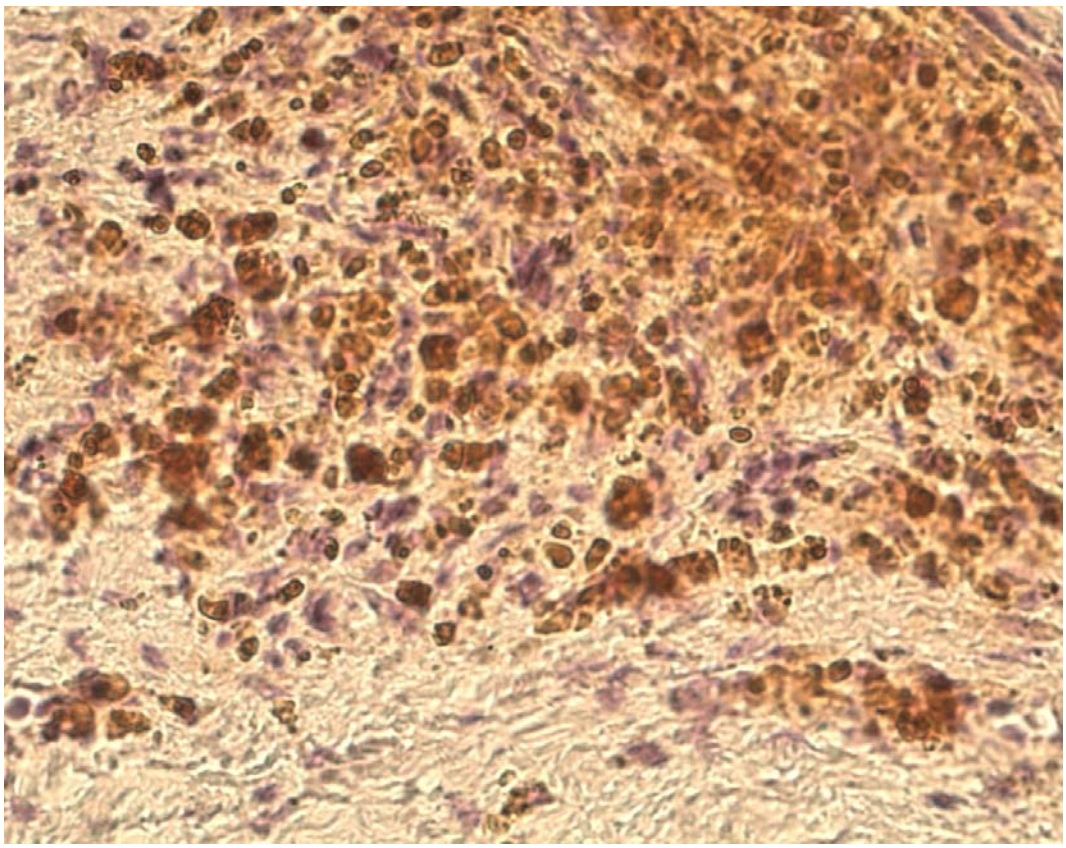

Abb.7: Immunhistochemische Färbung eines RPLA-Präparates (histologisch reifes Teratom), Expressionsstärke 2

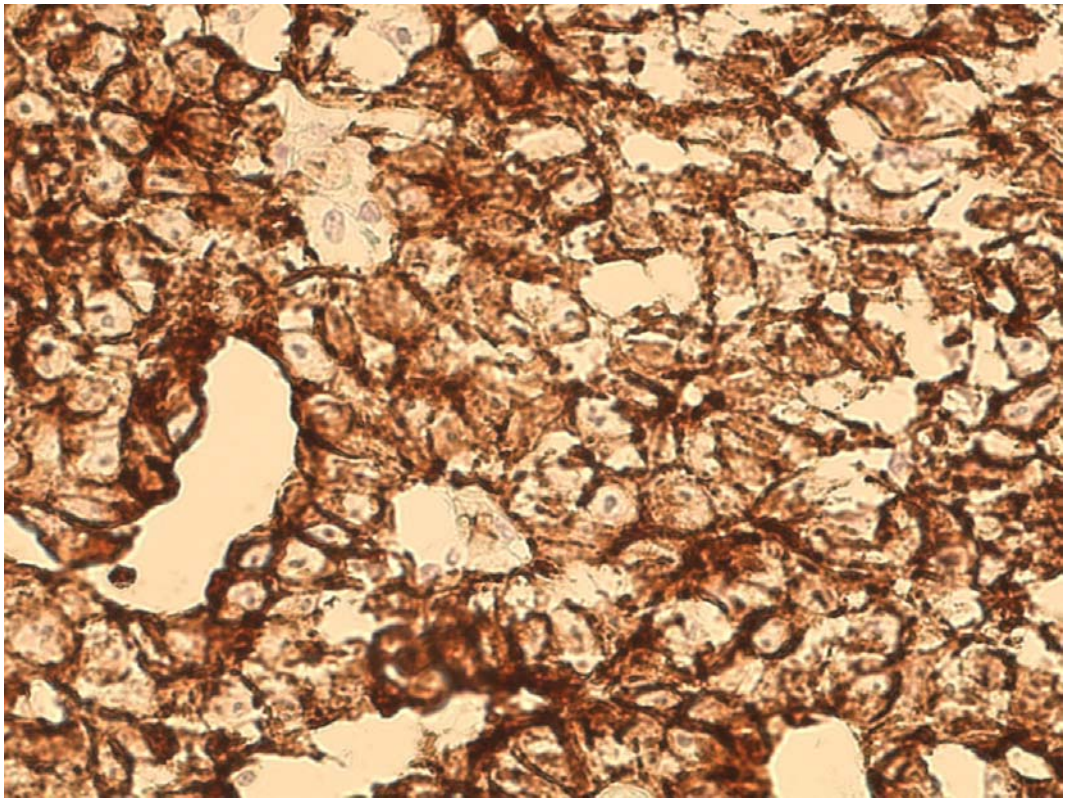

Abb.8: Immunhistochemische Färbung eines Hodentumorpräparates (Seminom, Embrionalzellcarcinom), Expressionssträrke 3

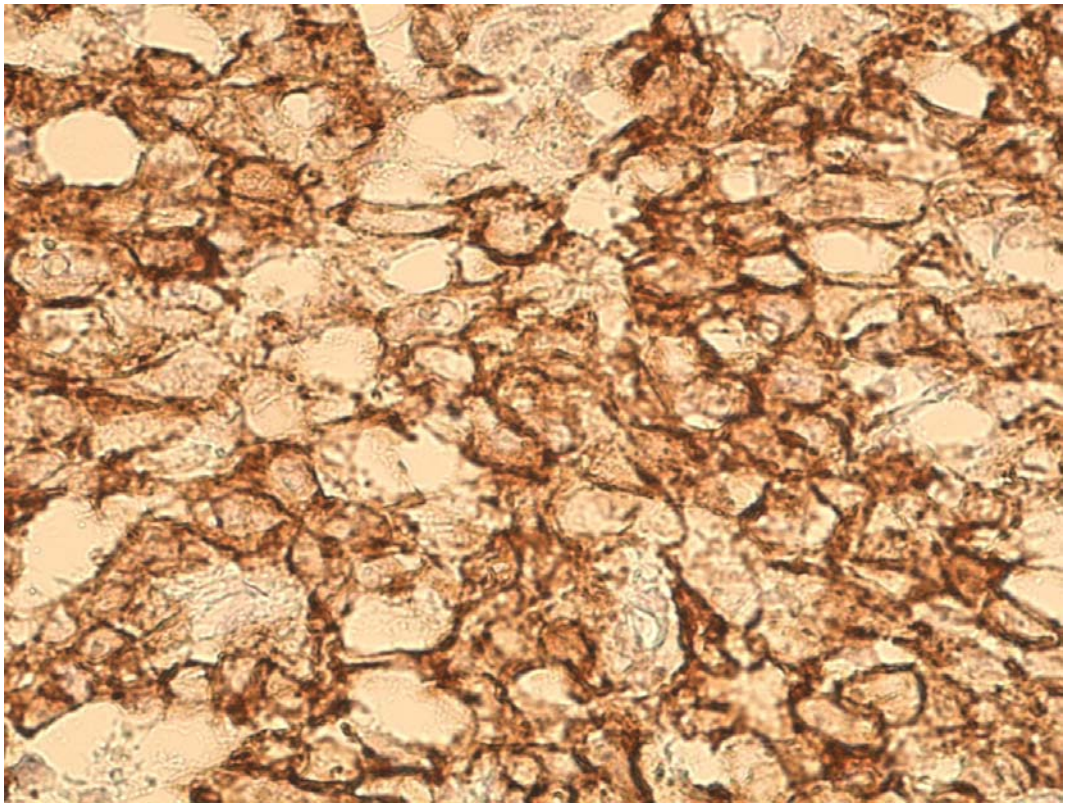

Abb.9: Immunhistochemische Färbung eines RPLA-Präparates (histologisch reifes Teratom und vitaler Tumor), Expressionstärke 2

2.3 Material

2.3.1 Chemikalien und Reagenzien

10x Tris-Puffer pH 7,4	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol vergällt, 100/ 96/ 80/ 70%	Apotheke Uniklinikum, Marburg
Diluent	DAKO Cytomation, Hamburg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka BioChemika, Buchs, CH
Mayer`s Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Target Retrieval Solution pH 6,1	DAKO Cytomation, Hamburg
Wasserstoffperoxid (30% H_2O_2)	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Entionisiertes, steriles und analysenreines Wasser wurde hergestellt mit Hilfe einer Reinstwasseranlage der Firma Sartorius (Göttingen). Dabei sind die Reinstwassersysteme arium 611UF und 611VF so hintereinander geschaltet, dass eine UV-Oxidationskammer und ein Ultrasterilfilter (Firma Sartorius, Göttingen, Deutschland) integriert werden können.

2.4 Primärantikörper/Sekundärantikörper/Substratlösung

Als Primärantikörper diente ein spezifischer monoklonaler Maus IgG Antikörper, Mdr (G-1), der gegen Epitope der humanen Mdr gerichtet ist.

Folgender Sekundärantikörper wurde verwendet:
Anti-Maus EnVision labeled Polymer: DAKO Cytomation, Hamburg

Die EnVision markierte Polymere wurden nicht mit der Diluent- Flüssigkeit verdünnt, sondern direkt zur Inkubation auf die Gewebeschnitte gegeben. Sie sind mit Meerrettich-Peroxidase ausgestattet, die die Farbreaktion katalysiert. Die Versuchskonzentrationen wurden durch Verdünnung der Primärantikörperlösung mit Antikörper Diluent (DAKO) erreicht.
Als Farbindikatorlösung wurde DAB (3,3`-Diaminobenzidin)-Chromogen, flüssig, der Firma DAKO (Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.4.1 Geräte

Analysenfeinwaage	Sartorius Kern
Begasungsbrutschrank HERA cell	Kendro, Hanau
Brutschrank, begasbar	Memmert, Schwabach
Dampftopf Multi-Gourmet F510	Braun, Kronberg
Mikrotom 1515	Ernst Leitz, Wetzlar
Pipettensatz	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, gestopft/ungestopft	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen, steril	Greiner, Frickenhausen
Standard-pH-Meter PHM 210	Meterlab, Kopenhagen
Wasserbad (tissue flotation bath 45)	Otto Kobe, Marburg

Das Plastikverbrauchsmaterial, die Glasware und die Pipettenspitzen wurden trotz steriler Verpackung vor Gebrauch bei 120°C und circa 1 bar Überdruck für mindestens 15 min autoklaviert.

2.4.2 Mikroskope

1.) Axiovert 200 mit AxioCam MRc (Farbversion) Carl Zeiss Vision, München
und Computersoftware MRGrab 1.0

2.) Photo-Lichtmikroskop III, binokular Carl Zeiss, München
Halogendurchlicht 6V 10W
3.) Arbeits- und Forschungsmikroskop Carl Zeiss, München
Standard RA

2.4.3 Sonstige Materialien

Coplin-Gefäße	Kay & Company
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Entellan ®	Merck, Darmstadt
Geeichte Glaskolben (Duran Jenaglas®)	Schott, Mainz
Glasküvetten	
Mikrotom Wechselklingen	Leitz, Wetzlar/ Leica, Nussloch
Präzisionswischtücher Kimwipes®Lite	Kimberly Clark
Superfrost® Plus Objektträger (silanisiert)	Menzel-Gläser, Braunschweig

2.4.4 Lösungen

10x PBS pH 7,0	Roche Diagnostics, Mannheim
(phosphate buffered saline) 0,01 M KH_2PO_4 0,1 M Na_2HPO_4 1,37 M NaCl 0,027 M KCl	
10x Target Retrieval Solution	
2% Magermilchlösung PBS	Magermilchpulver in 1x
3%ige H_2O_2-Lösung PBS	10ml H_2O_2 (30%) in 90ml
DAB-Farblösung	20µl DAB Chromogen Konzentrat 1ml Substrat- Lösungspuffer
Saures Hämatoxylin nach Mayer:	1,0g Hämatoxylin 0,2g $NaJO_3$ 50,0g Kalialaun 50,0g Chloralhydrat 1,0g Zitronensäure

2.4.5 Statistik

Die Datenanalyse erfolgte mittels SPSS, Version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). Der Zusammenhang zwischen klinisch pathologischen Charakteristika und der MDR1 Expression wurde mittels χ^2 Analyse und dem Fisher-exact-test untersucht, wobei $p < 0,05$ als signifikant eingestuft wurde. Die MDR1 Expressionsstärke vor und nach Chemotherapie wurde vergleichend mit dem Wilcoxon Test untersucht.

3 Ergebnisse

Zunächst werden im Folgenden die Untersuchungsergebnisse des Materials vom Primärtumor und der RPLA getrennt behandelt (siehe Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2). Es wurden jeweils zunächst die klassische Histologie mit Einteilung in Seminom/Nichtseminom beziehungsweise mit/ohne Teratomanteilen vorgenommen und dann eine MDR1 Färbung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Korrelation der gewonnenen Daten.

3.1 Hodentumor (Primärtumor)

3.1.1 Histologische Unterteilung nach Seminom/Nichtseminom und Primärtumor mit/ohne Teratomanteil

Von 77 untersuchten Patienten wurden 72 aussagekräftige histologische Befunde generiert, die die Zuordnung zum histologischen Subtyp des Primärtumors des Hodens in Seminom/Nichtseminom bzw. mit/ohne Teratomanteilen ermöglichte. Davon hatten 17 (23,6%) Patienten ein reines Seminom des Hodens, bei 55 (76,4%) Patienten lag ein NSGCT vor (siehe Abbildung 7). Da Teratome nicht chemosensibel sind [67, 98] unterschieden wir die NSGCT nach Tumoren mit und ohne Teratomanteilen. 30 Patienten (39%) hatten Teratomanteile im Primärtumor (siehe Abbildung 8).

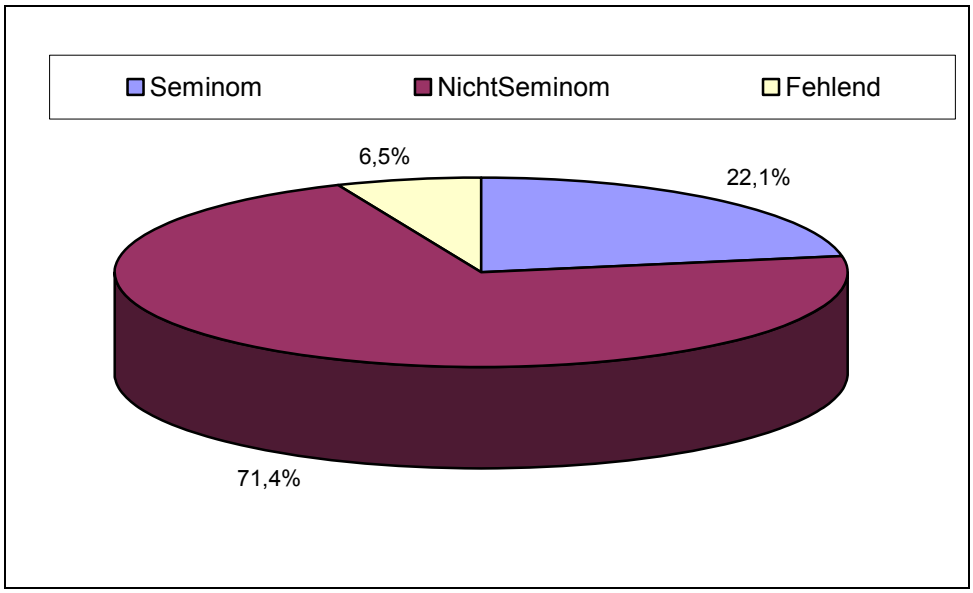

Abbildung 7: Aufteilung der histologischen Klassen nach Seminom/Nichtseminom (NSGCT) des primären Hodentumors (n=77)

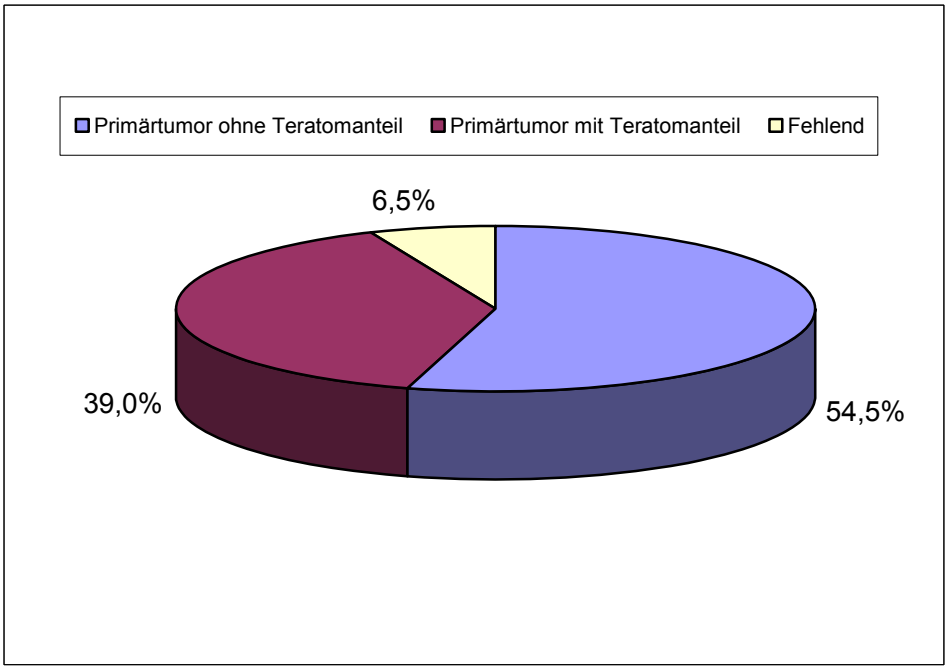

Abbildung 8 : Anteile von Primärtumoren mit Teratomanteil (n=77)

3.1.2 MDR1-Expression

Eine immunhistochemische Färbung zur MDR1 Expression konnte in 47 von 77 Primärtumorproben (61%) durchgeführt werden. Die Beurteilung der 47 auswertbaren Proben erfolgte mittels semiquantitativer Analyse (siehe Kapitel 2.2 und Kapitel 2.4.5). Danach ließ sich bei 24 (51,1%) dieser Patienten im Hodentumor kein MDR1 darstellen. Bei den Patienten mit MDR1 Expression im Tumor hatten 5 (10,6%) eine schwache bis mittlere Anfärbung und 18 (38,3%) zeigten eine starke Expression.

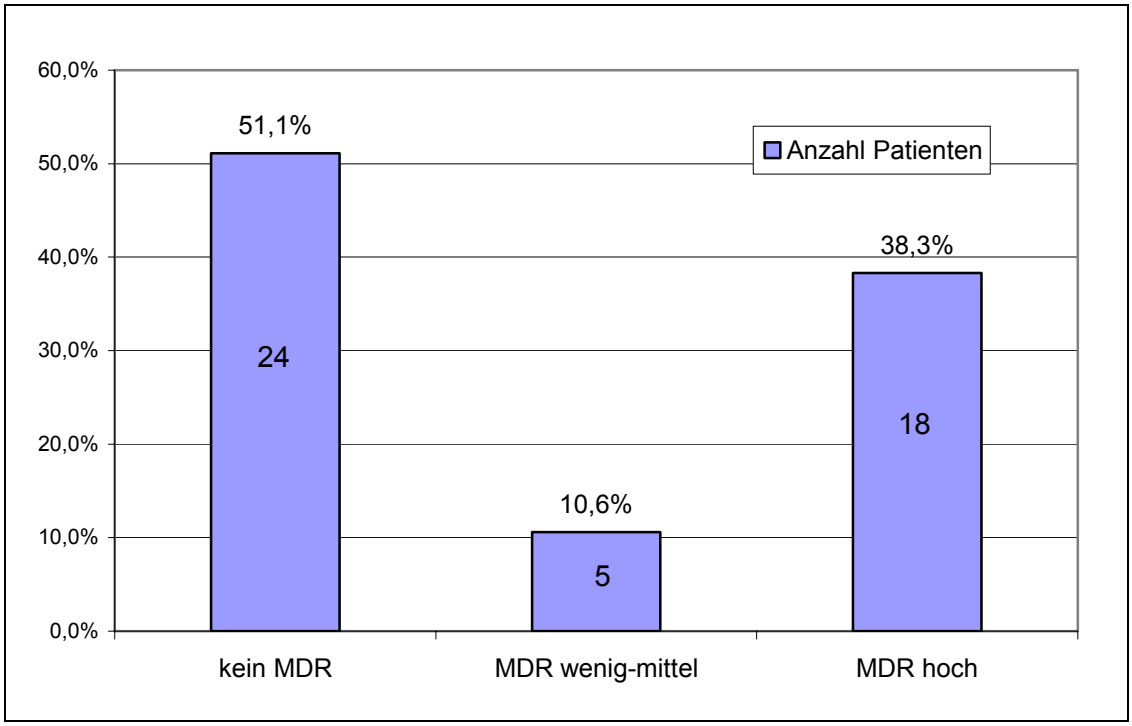

Abbildung 1: Anteile der Patienten mit auswertbaren MDR gefärbten Primärtumoren nach Intensität der MDR1 Expression (n=47)

3.1.3 Vergleich Histologie und MDR1-Expression der Hodentumore

In der Gruppe der Patienten, die auswertbare MDR1 Expressionsdaten lieferten (n=47), zeigten die rein seminomatösen Hodentumore (n=17) keinerlei Expression von MDR1.

Im Gegensatz dazu wiesen innerhalb der auswertbaren 30 Patienten mit NSGCT 5 Patienten (16,7%) eine schwache bis mittlere MDR1 Expression und 18 Patienten (60,0%) eine starke MDR1 Expression auf. Bei lediglich 7 der NSGCT Patienten konnte keine MDR1 Expression dargestellt werden. Somit wurde MDR1 signifikanter in NSGCT als bei reinen Seminomen nachgewiesen ($p < 0{,}001$, Fisher`s exact test, siehe Abbildung 2).

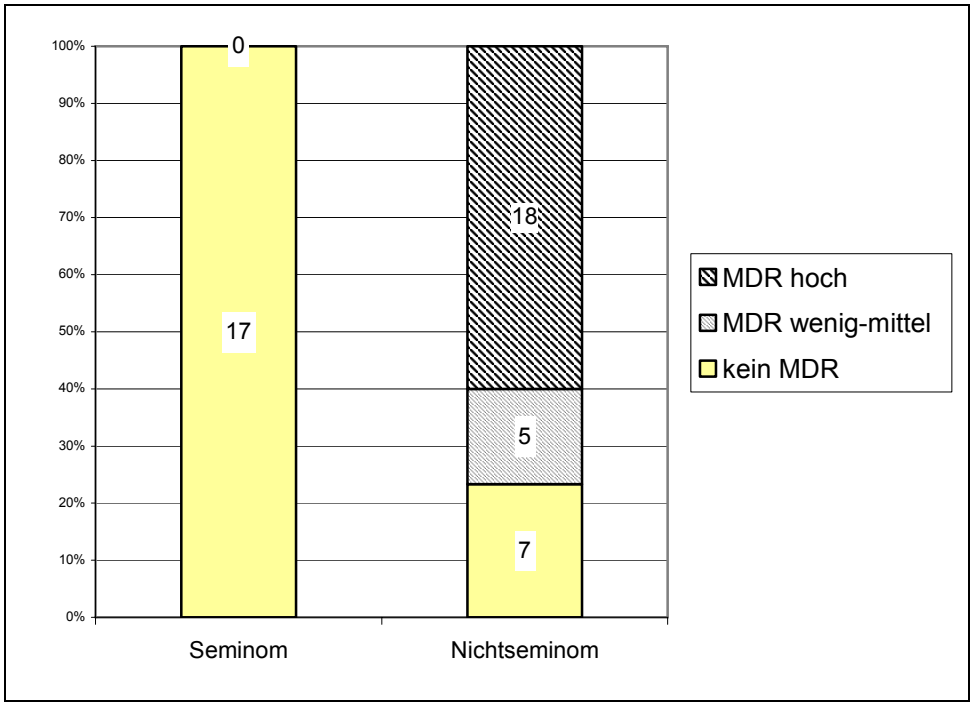

Abbildung 2: Expression von MDR1 bei Seminom- und Nichtseminom Primärtumoren (Seminom n=17; Nichtseminom n=30)

Darüber hinaus zeigten Hodentumore mit Teratomanteilen häufiger eine MDR1 Expression (15/18, 83,3%) verglichen mit Hodentumoren ohne

Teratomanteile (8/29, 27,6%). Auch dieser Zusammenhang war statistisch signifikant (p < 0,001, Fisher`s exact test; siehe Abbildung 3).

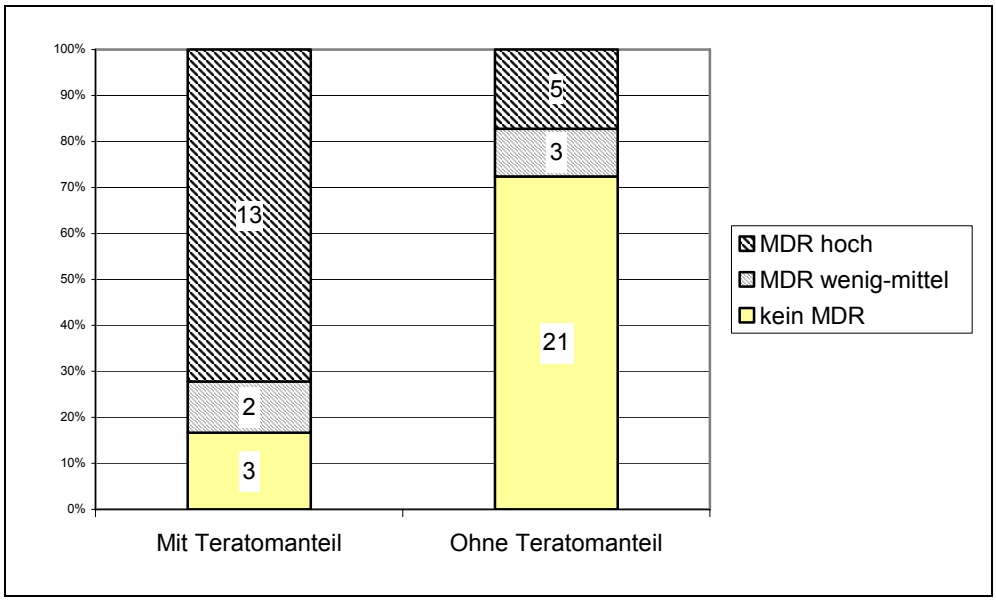

Abbildung 3: Expression von MDR1 bei Primärtumoren mit und ohne Teratomanteil (mit Teratomanteil n=18; ohne Teratomanteil n=29)

Zusammenfassend ergab sich, dass bei allen 17 Patienten, die ein reines Seminom aufwiesen, keine MDR1 Expression nachweisbar war. Weiterhin zeigte sich, dass bei den 18 Patienten mit Teratomanteilen im Primärtumor MDR1 sehr häufig (83%) exprimiert wurde.

3.2 Retroperitonealen Residualtumormassen nach Chemotherapie

3.2.1 Histologie der RPLA: Nekrose, Teratom, vitaler Tumor

Von 77 untersuchten Patienten waren alle histologischen Befunde verwertbar. Bei der Mehrzahl der 77 Patienten wurde nekrotisches Gewebe identifiziert (n=44, 57,1%). Ein Teratom wurde bei 23,4% (n=18) der Patienten detektiert und bei 15 Patienten (19,5%) fand sich vitales nicht teratomatöses Tumorgewebe (siehe Abbildung 4).

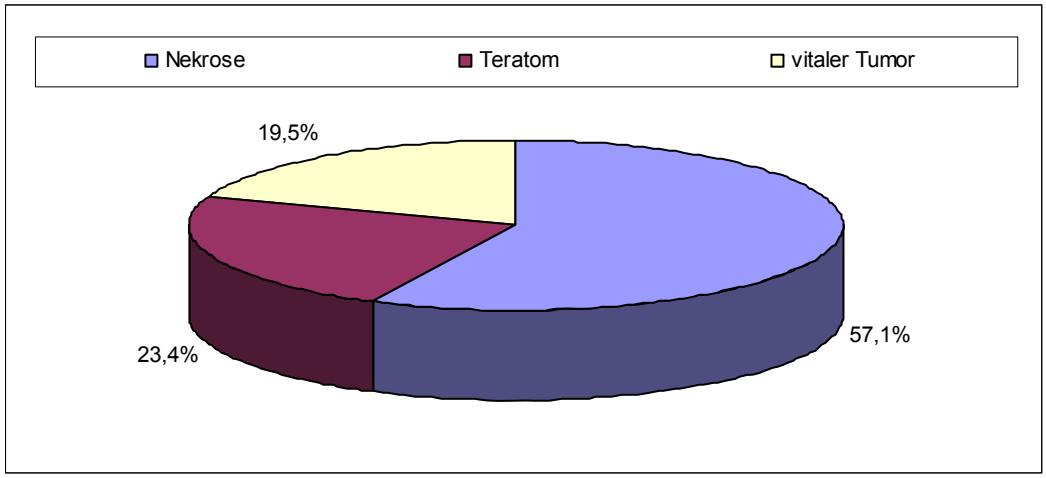

Abbildung 4: Verteilung der histologischen Befunde im retroperitonealen Residualtumor in % der Patienten (n=77)

3.2.2 MDR1 Expression der retroperitonealen Residualtumormassen nach Chemotherapie

Die MDR1 Expression wurde mittels immunhistochemischer Färbung in 77 Präparaten der RPLA dargestellt. 73 Präparate zeigten ein auswertbares Resultat.

Betrachtet man die Präparate der RPLA nach Chemotherapie, sah man ein schwache bis mittlere Expression von MDR1 bei 18 (24,7%) bzw. eine starke Expression bei 8 (11%) von 73 auswertbaren Patienten (Abbildung 5).

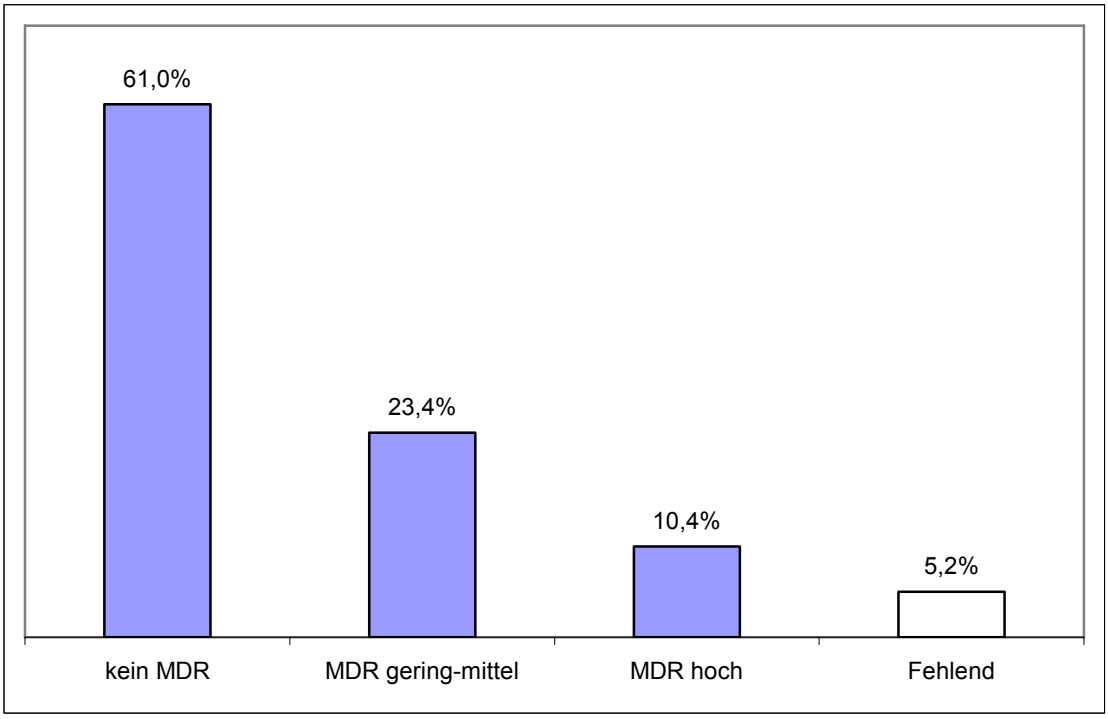

Abbildung 5: Intensität der MDR-1 Expression in RPLA Resektaten (n=77)

3.2.3 Vergleich der Histolgie und der MDR1-Expression im RPLA-Resektat

Zunächst sah man, dass in Proben mit dem histologischen Befund Nekrose (n= 44) keine spezifische Expression von MDR1 darstellbar war. Es zeigte sich weiterhin kein Unterschied in der MDR1 Expression zwischen den Histologien mit vitalem (nicht teratomatös differenzierten) Tumor (12/14) oder reifen Teratom (14/15; p = 0,75, Fisher`s exact test). Insgesamt wurde in der Mehrzahl der nicht nekrotischen Präparate eine MDR1 Expression detektiert (Abbildung 6).

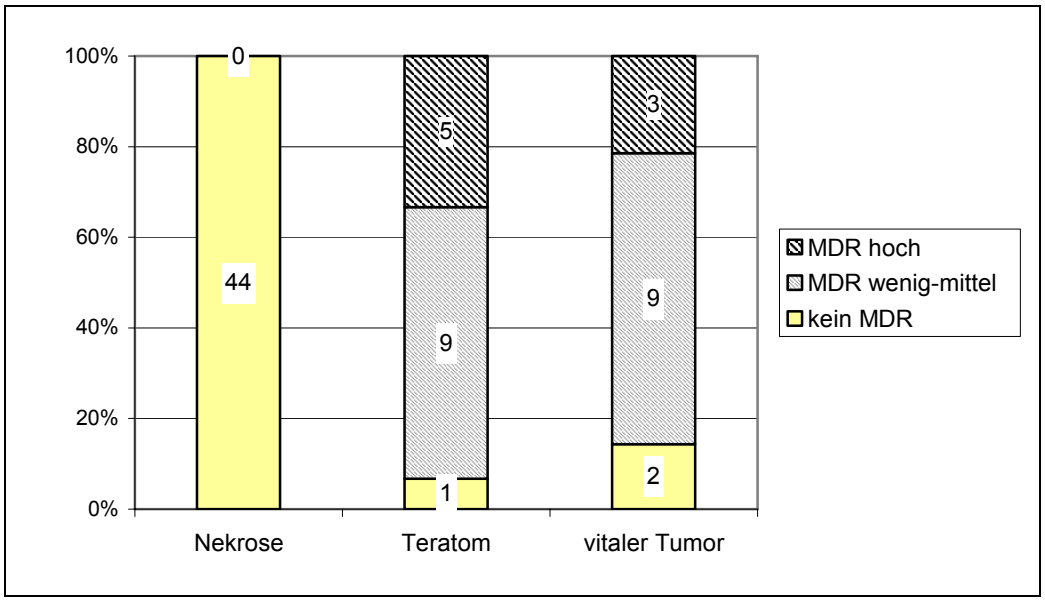

Abbildung 6: MDR1 Expression nach histologischem Befund der RPLA-Resektate (n=73)

3.3 Korrelation zwischen der Histologie des Primärtumors und des RPLA-Resektates

Bei der Untersuchung der RPLA-Resektate wurde nach der histologischen Einteilung festgestellt, dass von den 17 Patienten mit einem reinen Seminom nur 2 (11,8%) ein Teratom und ein Patient (5,9%) einen anderen vitalen Residualtumor hatte, bei 14 Patienten lag histologisch eine Nekrose vor (siehe Abbildung 7).

Von den 55 Patienten mit einem NSGCT hatten 15 Patienten (27,3%) Teratom und 14 Patienten (25,5%) vitalen Tumor in den resizierten Tumorresiduen. Damit ließ sich ein signifikanter Unterschied bezüglich des Nachweises von Residualtumoren beim Seminom/Nichtseminom darstellen (p= 0,048; Fishers exact test; siehe Abbildung 7).

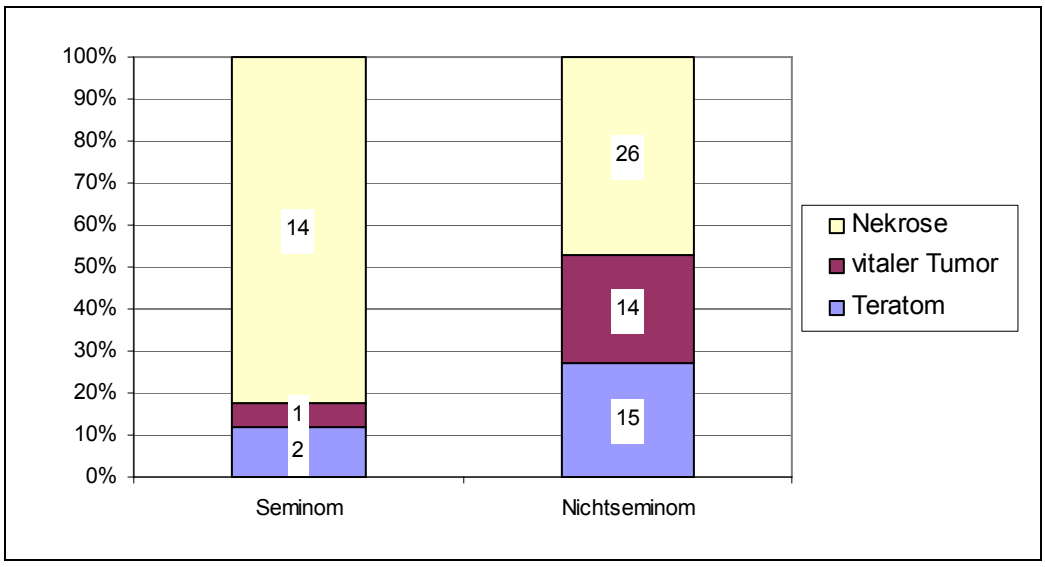

Abbildung 7: Histologische Befunde der RPLA nach histologischer Einteilung des Primärtumors in Seminom/Nichtseminom (n=72; für Seminom n=17; für Nichtseminom n=55)

Betrachtet man die histologischen Subtypen der NSGCT fällt auf, dass Patienten mit Teratomkomponenten im Primärtumor des Hodens (n=30) im Vergleich zu allen ohne Teratomanteilen (n= 42) eine signifikantere Korrelation mit dem histologischen Ergebnis der RPLA hatten. In der RPLA fand sich ein Teratom bei 40% der Patienten, welche bereits im

Primärtumor Teratomanteile hatten, bei 30% fand sich vitaler Tumor. Vergleichsweise fand sich in 11,9% der Präparate der Patienten ohne Teratomanteile im Primärtumor ein Teratom in der RPLA und in 14,3% eine andere vitale Tumorentität (p= 0,003; Fishers exact test). Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 8 dargestellt.

Schlussfolgernd lässt sich folglich über die histologische Zusammensetzung beziehungsweise Differenzierung des Primärtumors des Hodens eine wahrscheinliche Zusammensetzung der Residualtumormassen nach Chemotherapie voraussagen.

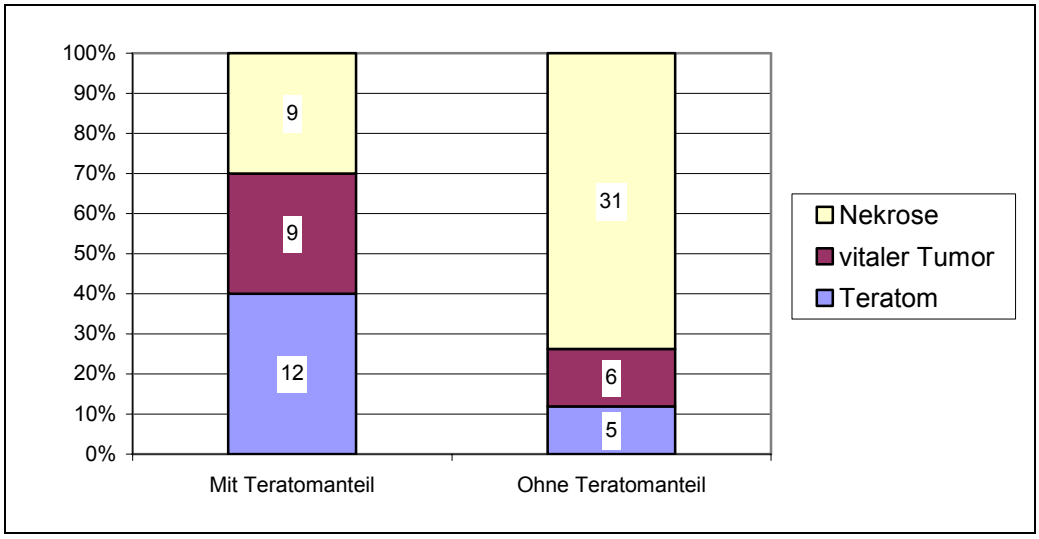

Abbildung 8: Histologische Befunde der RPLA-Resektate nach histologischer Einteilung des Primärtumors in mit und ohne Teratomanteil (n=72; für mit Teratom n=30; für ohne Teratomanteil n=42)

3.4 Korrelation der MDR1-Expression des Primärtumors mit der MDR1-Expression der RPLA-Resektate

Bei Betrachtung der Präparate der 47 Patienten, bei denen sowohl histologische Schnitte des Primärtumors als auch des RPLA Präparats vorhanden waren, um immunhistochemische Färbungen auf MDR1-Expression durchzuführen, zeigt sich die signifikante Tendenz, dass die mittlere Expressionsstärke durch die Chemotherapie insgesamt abnimmt (Abbildung 10).

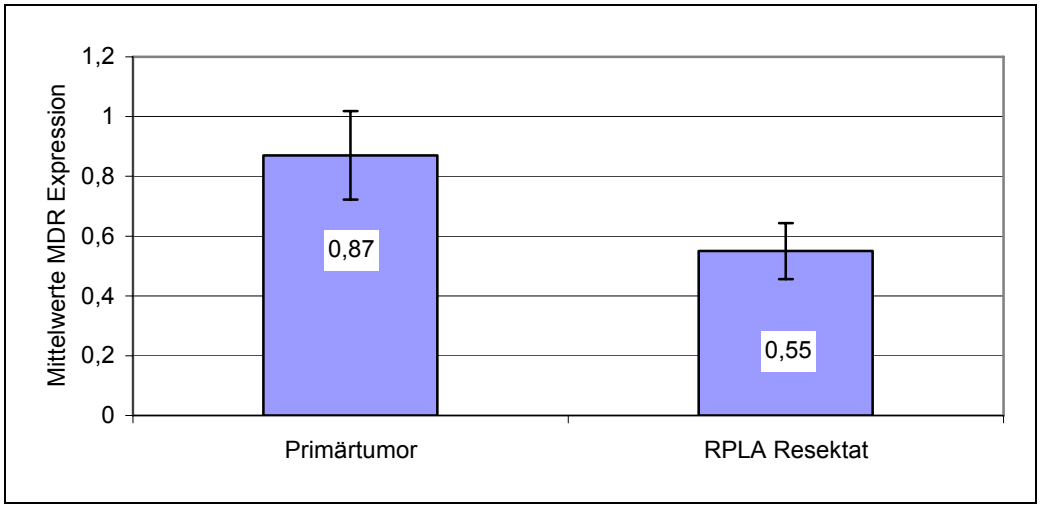

Abbildung 9: Mittlere MDR1-Expression in den untersuchten Resektaten mit Standardfehler des Mittelwertes (n= 47; Korrelation 0,513)

Bei den 47 Patienten fand sich in 8,5% (4 Patienten) eine Zunahme der Expressionsstärke, bei 59,6% (28 Patienten) blieb sie gleich und bei 31,9% (15 Patienten) nahm sie ab (Wilcoxon test, p = 0,018 bei zweiseitiger Signifikanzprüfung, siehe Abbildung 10).

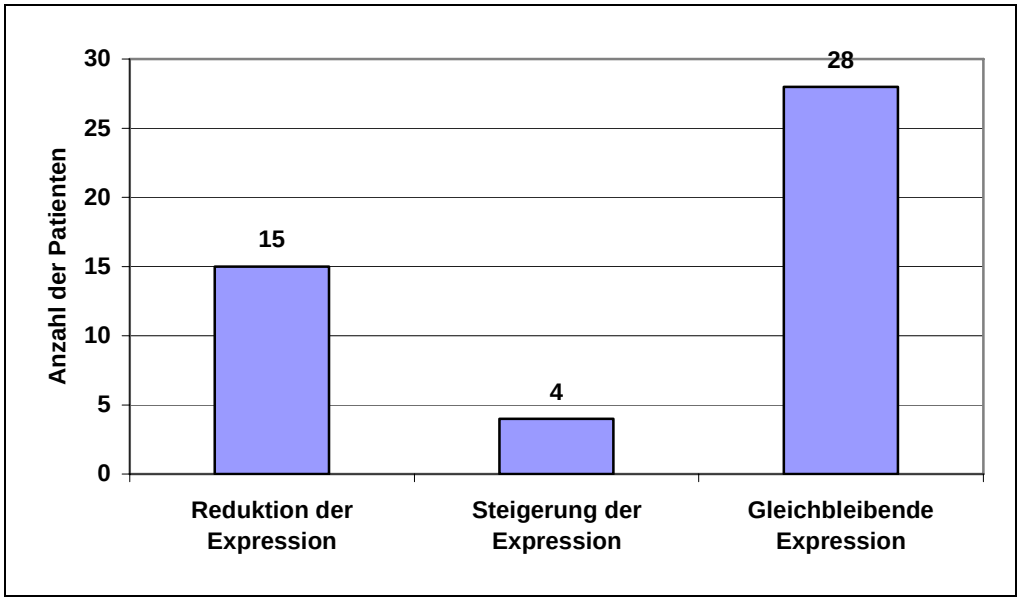

Abbildung 10: Entwicklung der Expressionsstärke von MDR1 vom Primärtumor zum RPLA-Resektat (n=47, bei zweiseitigem Signifikanztest p=0,018)

3.5 Korrelation der MDR1-Expression des Primärtumors und des histologischen Ergebnisses des RPLA-Resektates

Abbildung 11 und 12 zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der MDR1 Expressionsstärke im primären Hodentumorpräparat und dem histologischen Ergebnis des RPLA-Resektates nach Chemotherapie bestehen könnte. Patienten, bei denen der primäre Hodentumor ein positives immunhistochemisches Ergebnis für MDR1 zeigte (n= 23 mit mittlerer oder hoher Expression) hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine retroperitoneale Tumorpersistenz nach Chemotherapie im Sinne von reifen Teratom oder vitalem Tumorgewebe (17 von 23 Patienten oder 73,9%). Bei Patienten mit MDR1 negativem Primärtumor (n= 24) lag die Wahrscheinlichkeit für einen Tumornachweis im Rahmen der RPLA nur bei 20,8% (5 von 24 Patienten; p = 0,003, Fisher`s exact test).

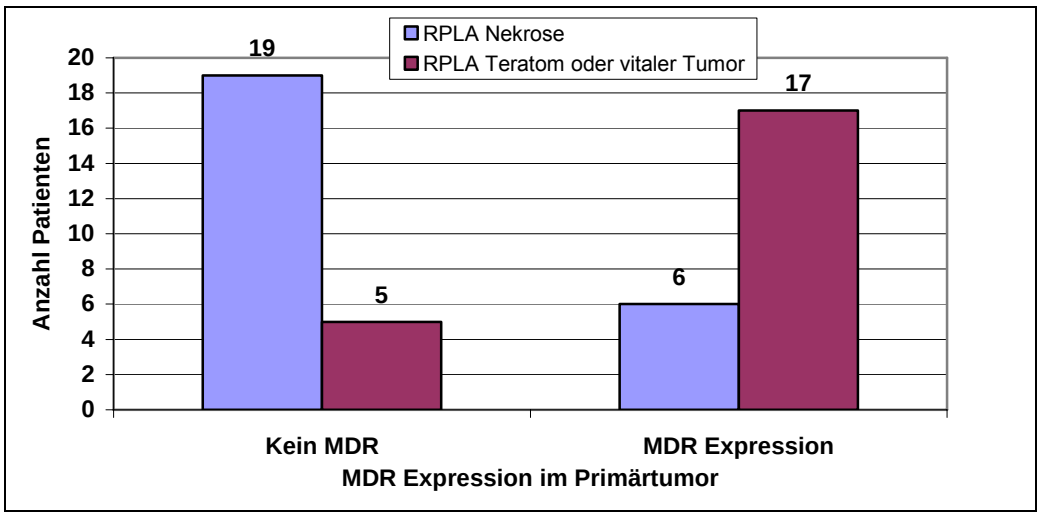

Abbildung 111: Zusammenfassung des histologischen Befundes der RPLA Resektate aufgeschlüsselt nach MDR1 Expression im Primärtumor (n=47)

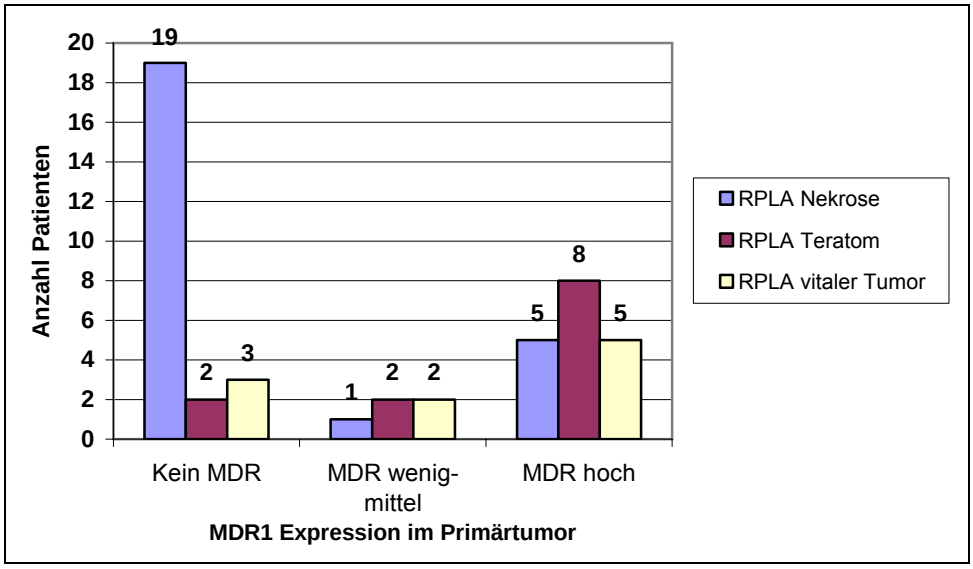

Abbildung 122: Histologischer Befund der RPLA-Resektate aufgeschlüsselt nach MDR1 Expressionsstärke im Primärtumor (n=47, Signifikanz p=0,003 für Patienten ohne MDR1 Expression)

Zusammenfassend fand sich bei einem rein seminomatösen Primärtumor des Hodens in dem retroperitonealem Residualtumorresektat in den meisten Fällen histologisch eine Nekrose/Fibrose. Auch Primärtumore ohne Teratomanteile im Hodentumor ergaben histologisch in den retroperitonealen Residualtumormassen vermehrt Nekrose/Fibrose (siehe Kapitel 3.3).

Vergleicht man die MDR1-Expressionsstärke des Primärtumors und der retroperitonealen Residualtumorresektate findet sich überwiegend ein gleich bleibender Befund, falls sich eine Änderung der Expressionsstärke zeigt, so ist diese eher abnehmend (siehe Kapitel 3.4).

Zeigt sich im Primärtumor des Hodens eine geringe MDR1-Expressionsstärke, so findet sich in der Histologie der retroperitonealen Residualtumorresektate eher Nekrose. Im Gegensatz dazu sieht man bei starker MDR1-Expression des Primärtumors vermehrt persistierenden vitalen Tumor in den retroperitonealen Residualtumoren (siehe Kapitel 3.5).

3.6 Korrelationen der MDR1-Expression des Primärtumors mit dem histologischen Ergebnis des RPLA-Resektates unter Berücksichtigung der histologischen Unterteilung des Primärtumors in Seminom beziehungsweise Nichtseminom und Teratom negativ beziehungsweise positiv

Wir konnten darstellen, dass die MDR1-Expression des Primärtumors signifikant mit den histologischen Subtyp des Primärtumors zusammenhängt (siehe Kapitel 3.1.3). Die MDR1-Expression des Primärtumors korreliert ebenso mit den histologischen Befunden der RPLA Resektate (siehe Kapitel 3.3). Deswegen wurde ferner evaluiert, ob MDR1 im Primärtumor unabhängig vom histologischen Befund im Primärtumor als Marker dienen kann, um vorauszusagen, ob es nach Chemotherapie persistierende Residualtumormassen in den retroperitonealen Lymphknoten gibt.

Es stellte sich heraus, dass die MDR1-Expression im Primärtumor alleine kein statistisches Signifikanzniveau als unabhängiger Marker für vitale Residualtumormassen erreichte, da seine Expression stark von dem histologischen Subtyp des Primärtumors abhängig war beziehungsweise mit diesem korrelierte.

Unter Berücksichtigung der histologischen Differenzierung nach Seminom beziehungsweise Nichtseminom erwies sich die MDR1-Expression nicht mehr als signifikanter individueller Prädiktor für das Vorliegen vitaler Residualtumore ($p > 0,16$; Fisher`s exact test; $n=30$). Eine Darstellung der drei korrelierten Faktoren zeigt die Abbildung 13.

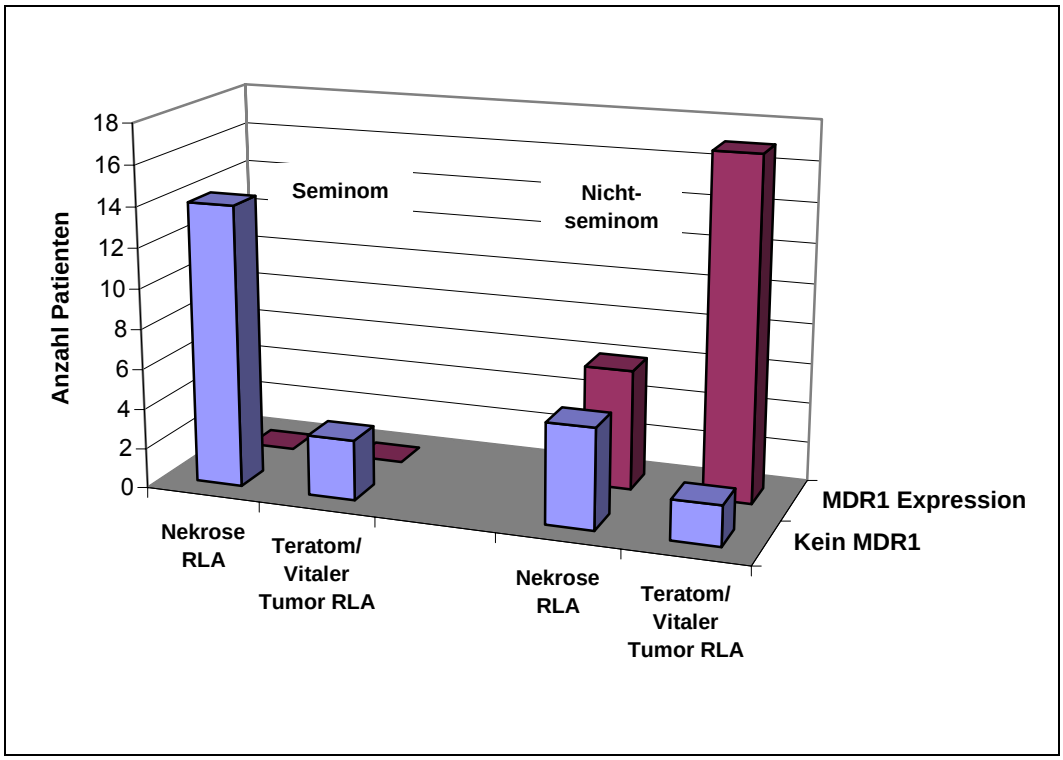

Abbildung 13: MDR1 Expression des Primärtumors in Korrelation zu der Histologie des RPLA-Resektates unter Einbeziehung der Primärtumorhistologie nach Seminom/Nichtseminom (n=47, davon 17 Seminome und 30 Nichtseminome)

Wie zusammenfassend in Abbildung 14 dargestellt ergab sich für die Einteilung in Primärtumore mit Teratomanteilen eine Signifikanzniveau für MDR1 als Prognosemarker von p=0,195 (n=29) und ohne Teratomanteile von p=0,229 (Fisher`s exact test, zweiseitig; n=18). Unter Berücksichtigung der histologischen Differenzierung mit/ohne Teratomanteile erwies sich die MDR1-Expression also nicht mehr als signifikanter individueller Prädiktor für das Vorliegen von vitalem Residualtumor.

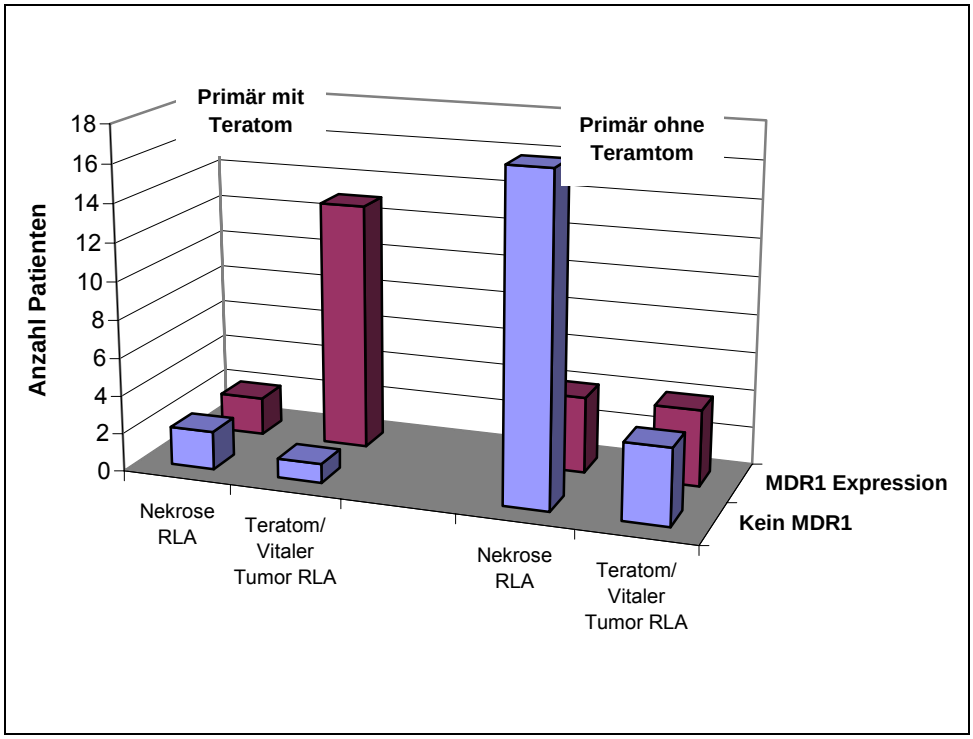

Abbildung 14: MDR1 Expression des Primärtumors in Korrelation zu der Histologie der RPLA-Resektate unter Einbeziehung der Primärtumorhistologie nach Primärtumor mit und ohne Teratomanteil (n=47, davon 18 mit Teratomanteil und 29 ohne Teratomanteil)

.

4 Diskussion

Das Multidrug Resistence Genprodukt MDR1 gehört zur Superfamilie der ATP bindenden Transportproteine, deren Funktion die Ausschleusung von Ionen, Spurenelementen, Lipiden, Aminosäuren, Proteinen, Peptiden und insbesondere cytotoxischen Stoffen aus den exprimierenden Zellen beinhaltet [62, 107, 114]. Bei zahlreichen malignen Tumorarten des Menschen wie zum Beispiel Leukämieformen oder beim malignen Melanom ist die Höhe der MDR1-Expression ein wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor, welcher Einfluss auf das Ansprechen auf eine systemische Chemotherapie haben kann [71, 74]. Aktuelle Untersuchungen bei hämatologischen und soliden Tumorerkrankungen ergaben viel versprechende Ergebnisse bezüglich einer prolongierten Remissionsphase und einer verbesserten Gesamtüberlebensrate bei einer Kombinationstherapie aus MDR1-Inhibitoren und systemisch wirkender Chemotherapeutika [74, 111].

Im Allgemeinen reagieren Keimzelltumore des Hodens sehr sensibel auf eine systemische Chemotherapie. Jedoch zeigen insbesondere Patienten mit einem NSGCT im klinischen Stadium $\geq$ IIB, besonders diejenigen mit Teratomanteilen im Primärtumor des Hodens, häufig persistierende retroperitoneale Tumormassen, welche nach initialer systemischer Chemotherapie operativ mittels retroperionealer Lymphadenektomie entfernt werden müssen, um einen therapeutischen Erfolg belegen und gegebenenfalls erreichen zu können [98, 100].

Die vorliegende Arbeit untersuchte die prognostische Aussagekraft der immunhistochemischen Expression von MDR1, um das Vorkommen beziehungsweise die Abwesenheit von vitalem Tumor oder reifem Teratom in den retroperitonealen Tumorresiduen nach systemischer Chemotherapie vorhersagen zu können. Sie sollte zeigen, ob die MDR1-Expression im Hodentumorpräparat als unabhängiger Marker für die

Prognose von vitalem retroperitonealen Residualtumorgewebe und somit potentiell Chemorefraktärität dienen kann. Die Untersuchung wurde kombiniert mit bereits anerkannten klinischen und pathohistologischen Parametern.

Zusammengefasst benötigen Patienten mit einem fortgeschrittenem Keimzelltumor des Hodens, welche nach der Chemotherapie eine komplette Remission erreicht haben (negative Tumormarker und Residualtumormassen < 1 cm), laut den EGCCCG Richtlinien keine sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie [98]. Jedoch wurde diese Erkenntnis durch Oldenburg et al. und anderen relativiert, die zeigten, dass vitaler Tumor oder ein Teratom auch bei Patienten mit einer Residualtumorgröße < 1 cm vorkommt und die somit die sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie bei allen Patienten mit einem nichtseminomatösen Keimzelltumor und Residualtumornachweisen unabhängig von der Größe empfehlen [7, 50, 83].

Bei Betrachtung aller Patienten mit nichtseminomatösem Keimzelltumor des Hodens zeigen etwa 30% Residualtumormassen > 1 cm, welche entfernt werden müssen, da bislang weder ein bildgebendes Verfahren noch ein Prognosemodell sicher die Histologie des Residualtumors voraussagen kann [7, 110, 116, 117]. Alle bislang veröffentlichten existierenden Prognoseverfahren können das Vorkommen von Nekrose mit einer Wahrscheinlichkeit von maximal 75% vorhersagen. In den resezierten retroperitonealen Residualtumormassen findet sich histologisch in etwa 50% Nekrose, in 35% reifes Teratom und in 15% sonstiger, zum Teil hochproliferativer vitaler Tumor [7, 83, 98] [50]. Bei den hier untersuchten 77 Patienten zeigte sich in 57,1% Nekrose (44/77), 23,4% reifes Teratom (18/77) und 19,5% vitaler Tumor (15/77) im RPLA-Resektat. Somit wurden in unserem Patientenkollektiv letztlich 57,1% aller Patienten durch die retroperitoneale Lymphadenektomie übertherapiert.

Die sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie nach systemischer Chemotherapie hat verglichen mit einer primären retroperitonealen Lymphadenektomie eine höhere Mortalität, es kommt aufgrund von Tumorinfiltrationen häufiger zu einer notwendigen Resektion von Nachbarorganen oder infolge der Operation zu einem Verlust der Ejakulation aufgrund der Läsion von sympathischen Nervenfasern [50]. Da ein Großteil dieser Patienten Langzeitüberlebende sein werden, ist der Erhalt der Lebensqualität durch eine Reduktion der Behandlung ohne Verlust der therapeutischen Effektivität ein wichtiges Ziel.

Entsprechend früheren Vorhersagemodellen identifizierten wir das Vorkommen von reifem Teratom im Primärtumor des Hodens als signifikanten prognostischen Risikofaktor für das Vorkommen von reifem Teratom und/oder vitalem Tumor im Resektionspräparat der sekundären retroperitonealen Lymphadenektomie [7, 110, 116, 117]. Steyerberg et al. versuchten 1995 ein statistisches Modell zur Vorhersage der Histologie (Nekrose, Teratom oder vitaler Tumor) der retroperitonealen Metastasen nichtseminomatöser Keimzelltumore nach systemischer Chemotherapie zu erstellen. Dafür wurden Daten aus 6 Studiengruppen ausgewertet (556 Patienten). Dabei fanden sie unter anderem heraus, dass die Abwesenheit von Teratomanteilen im Primärtumor des Hodens ein Prädiktor von Nekrose ist [110]. Auch in dem von Vergouwe et al. entwickeltem Vorhersagemodell zum wahrscheinlichen Vorkommen von Nekrose/Fibrose in den retroperitonealen Residualtumormassen im Gegensatz zu Teratom und vitalem Tumor zeigte sich das Vorkommen von Teratomanteilen im primären Hodentumor als prognostischer Risikofaktor [116, 117]. Die vorliegende Arbeit konnte diese Daten bestätigen: Bei den nichtseminomatösen Keimzelltumoren des Hodens mit Teratomanteilen fand sich in 40% auch ein reifes Teratom in der retroperitonealen Lymphadenektomie gegenüber 11,9% bei den nichtseminomatösen Keimzelltumoren ohne Teratomanteil im Hodentumor, vitaler Tumor war bei 30% versus 14,3% nachweisbar.

Bei den hier untersuchten Patienten fand sich die häufigste und stärkste Expression von MDR1 bei nichtseminomatösen Keimzelltumoren des Hodens mit Teratomanteilen, wohingegen reine Seminome keinerlei MDR1-Expression zeigten. Diese Erkenntnis entspricht früheren Studien von Eid et al. und Katagiri et al. [35, 36, 63]. Die erstgenannte Gruppe identifizierte eine MDR1-Expression bei 2 (8%) von 25 seminomatösen und bei 23 (46%) von 50 nichtseminomatösen Keimzelltumoren des Hodens. Im Gegensatz zu Katagiri et al. postulierten sie eine potentielle positive Korrelation zwischen der MDR1-Expression und dem Tumorstadium [35, 36, 63] und zu einem progressiven malignen Phenotyp [36].

Patienten ohne MDR1-Expression im primärem Hodentumor und in den retroperitonealen Tumorresiduen (n=19/24) zeigten in der vorliegenden Untersuchung in 79,2% histologisch eine Nekrose. Das Nichtvorkommen einer MDR1-Expression im Hodentumorpräparat war der beste singuläre Parameter um das Vorkommen von Nekrose im Residualtumorgewebe vorherzusagen.
Bei der Evaluierung des potentiellen Vorhersagewert der MDR1-Expression des Hodentumorgewebes für vitalen Tumor in den retroperitonealen Residualtumormassen nach Chemotherapie konnten wir mittels univarianter Analyse zeigen, dass die MDR1-Expression signifikant mit positiven retroperitonealen Lymphadenektomiepräparaten zusammenhing. Eine MDR1-Expression im Primärtumor korreliert signifikant mit dem histologischen Ergebnis von marturem Teratom beziehungsweise vitalem Tumor im retroperitonealem Residualtumorpräparat. Patienten mit negativer MDR1-Expression im primären Hodentumor zeigten in 20,8% einen positiven vitalen Residualtumor. Patienten mit MDR1 positiven Befund im Hodentumorpräparat hingegen hatten in 73,9% positives vitales retroperitoneales Residualtumorgewebe.

In dieser Untersuchung korrelierte die Stärke der MDR1-Expression signifikant abhängig mit einem nichtseminomatösen Tumorsubtyp. Demzufolge wurde untersucht, ob MDR1 auch als vom Tumorsubtyp unabhängiger Marker für positives retroperitoneales Residualtumorgewebe nach Chemotherapie dienen kann. Es zeigte sich, dass die MDR1-Expression allein als unabhängiger individueller Marker kein statistisches Signifikanzniveau erreichte, obwohl sich ein positiver statistischer Trend zeigte.
In dem von Vergouwe et al. entwickeltem Vorhersagemodell werden die Faktoren Histologie des Primärtumors, Höhe der Tumormarker (Alpha-Fetoprotein, humanes Choriongonadotropin und Laktatdehydrogenase) vor Chemotherapie, Größe der retroperitonealen Residualtumormassen und deren Größenabnahme als Marker zur Vorhersage von Nekrose/Fibrose versus Teratom oder vitalem Tumor herangezogen. Sie schlossen eine negative MDR1-Expression in dieses bereits bestehende Prognosemodelle ein und konnten so die Vorhersagewahrscheinlichkeit von vitalem Tumor oder reifem Teratom im Residualtumorgewebe verbessern [117].

Mehrere Autoren zeigten anhand von MDR1 exprimierenden hämatologischen Erkrankungen (AML, CLL, multiples Myelom) und soliden malignen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Mammacarcinom, malignen Ovarialtumoren, malignen Tumoren des ZNS und Osteosarkomen, dass die MDR1-Expression durch eine systemische Chemotherapie in überlebenden Zellen zunahm [13, 111]. Baran et al. zeigten 2006, dass humane akute myeolische Leukämiezellen, die primär kein MDR1 exprimierten, nach Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Vincristin eine MDR1 Expression aufwiesen. Die Expressionstärke korrelierte mit der Konzentrationsstärke der Vincristinlösung [13]. Takara beschreibt, dass die Überexpression von MDR1 durch eine gesteigerte Aktivität von Transporterproteinen zu einer Chemorefraktärität führt [111].

Dahingegen lassen unsere Ergebnisse eine andere Art der Regulierung bei den Keimzelltumoren des Hodens vermuten. Bei den 47 Patienten, von denen sowohl Präparate des Hodentumors als auch der sekundären retroperitonealen Lymphadenektomie für die immunhistochemische Färbung vorlagen, sah man eine vermehrte Expression nach platinbasierter Chemotherapie nur bei 4 von 47 Patienten (8,5%). Dahingegen zeigte sich keine signifikante Änderung bei 28/47 Patienten (59,6%), einen Expressionsrückgang wiesen 15 (31,9%) der 47 Probenpaare auf. Im Gegensatz zu den meisten der malignen Tumore, die eine gesteigerte MDR1-Expression nach systemischer Chemotherapie zeigen, ist der Keimzelltumor des Hodens jedoch sehr chemosensitiv. Dies könnte die andersartige von uns dargestellte MDR1-Expressionsregulation beim Hodentumor mit erklären.

Zusammenfassend wurde MDR1 häufig in nichtseminomatösen Keimzelltumoren exprimiert, jedoch nicht in reinen Seminomen. Sowohl die MDR1-Expression als auch der histologische Subtyp korrelierten mit dem Vorliegen vitaler retroperitonealer Residualtumormassen nach Chemotherapie. Jedoch erwies sich die MDR1-Expression nicht als von der Histologie unabhängiger Marker zur Voraussage von vitalem retroperitonealen Resttumorgewebe. Somit ist eine routinemäßige immunhistochemische Färbung von Keimzelltumorpräparaten des Hodens zur Bestimmung der MDR1-Expression in der klinischen Routine nicht notwendig oder klinisch sinnvoll. Da sich jedoch ein positiver statistischer Trend zur Signifikanz zeigte, sollte die Untersuchungen von MDR1 an einem größeren Patientenkollektiv bestehend aus Patienten mit Nichtseminomen fortgeführt werden. Die MDR1-Expression könnte zusammen mit anderen existierenden Vorhersagemodellen einen prognostischen Wert für den nichtseminomatösen metastasierten Keimzelltumor des Hodens erreichen.

5 Zusammenfassung

MDR1 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches als eine energieabhängige Effluxpumpe für diverse Substanzen fungiert. Seine Expression in Tumorzellen wurde vielfach mit einer Chemorefraktärität in Zusammenhang gebracht. Ziel dieser Arbeit war es, die Signifikanz der MDR1-Expression zur Voraussage von Nekrose/Fibrose, Teratom oder höher proliferativem vitalem Tumor in den retroperitonealen Residualtumoren nach systemischer Chemotherapie zu evaluieren. Es wurde untersucht, ob die MDR1-Expressionsstärke vor und nach systemischer Chemotherapie mit einem spezifischen Tumorsubtyp korreliert oder durch die zytotoxische Chemotherapie beeinflusst wird.

Bei 72 der untersuchten 77 Patienten lagen Proben des Primärtumors vor, davon hatten 17 (23,6%) ein Seminom und 55 (76,4%) einen nichtseminomatösen Keimzelltumor des Hodens. Von den 55 Patienten mit einem nichtseminomatösen Keimzelltumor wiesen 30 (16,5%) Teratomanteile im Primärtumor auf. Nach Orchiektomie und Chemotherapie erhielten alle 77 Patienten eine sekundäre retroperitoneale Lymphadenektomie. Histologisch wiesen 44 (57,1%) Patienten reine Nekrose auf, in 18 (23,4%) Fällen fand sich reifes Teratom und bei 15 (19,5%) Patienten vitaler Tumor. Bei den 17 Patienten mit reinem Seminom im Hodentumor fand sich nur bei 2 (11,8%) Patienten reifes Teratom und bei einem (5,9%) vitaler aktiver Tumor in den retroperitonealen Tumorresiduen. Im Gegensatz dazu wiesen von den 55 Patienten mit einem nichtseminomatösen Keimzelltumor 15 (27,3%) reifes Teratom und 14 (25,5%) aktive Tumoranteile auf. Bei den Keimzelltumoren des Hodens mit Teratomanteilen im Primärtumor fand sich in 40% auch ein reifes Teratom in der retroperitonealen Lymphadenektomie gegenüber 11,9% der nichtseminomatösen Keimzelltumore ohne Teratomanteil im Hodentumor, vitaler Tumor war bei 30% versus 14,3% nachweisbar.

Die MDR1-Expression wurde mittels Immunhistochemie bei 47 primären Hodentumorproben und 77 Proben der retroperitonealen Lymphadenektomie nach Chemotherapie untersucht. Die Analyse zeigte

bei 24 (51,1%) Patienten keinen Nachweis einer MDR1-Expression im Primärtumor. Bei 5 (10,6%) Patienten fand sich eine schwache bis mittlere und bei 18 (38,3%) eine starke MDR1-Expression. Bei keinem Seminom ließ sich eine MDR1-Expression darstellen. Im Gegensatz dazu zeigten 5 (16,7%) der 30 Patienten mit nichtseminomatösem Keimzelltumor eine schwache bis mittlere und 18 (60,0%) Patienten eine starke MDR1-Expression. Hodentumore mit Teratomanteilen wiesen eine stärkere MDR1-Expression auf (15/18, 83,3%), Hodentumore ohne Teratomanteile eine deutlich geringere (8/29; 27,6%).

Bei 73 Patienten wurden die retroperitonealen Resektate nach Chemotherapie immunhistochemisch untersucht. Es zeigten sich bei 18 (24,7%) eine schwache bis mittlere und bei 8 (11%) eine starke MDR1-Expression. Es konnte kein Unterschied zwischen den Expressionsstärken von vitalem geringdifferenziertem Tumor (12/14) oder reifem Teratom (14/15) festgestellt werden. Gewebeproben mit Nekrose (n=47) wiesen keine MDR1-Expression auf. Wir konnten eine signifikante Korrelation zwischen der MDR1-Expressionsstärke im primären Hodentumor und dem histologischen Ergebnis der retroperitonealen Lymphadenektomie zeigen. Bei Patienten mit einem MDR1 exprimierenden Primärtumor war die Wahrscheinlichkeit für persistierende retroperitoneale Residualtumore in der univariaten Analyse signifikant höher als bei Patienten mit MDR1 negativem Primärtumor (n=24; 73,9% versus 20,8%). Bei den Patienten, von denen sowohl Gewebe des Primärtumors als auch der retroperitonealen Tumorresektate immunhistochemisch untersucht werden konnte, war die durchschnittliche MDR1-Expressionsstärke in dem retroperitonealen Tumorgewebe tendenziell niedriger verglichen mit dem Primärtumor. Die MDR1-Expressionsstärke war jedoch signifikant mit der Histologie des Tumors assoziiert, so dass in der multivariaten Analyse die MDR1-Expression keine statistische Signifikanz als unabhängiger Marker für vitalen retroperitonealen Residualtumor erreichte.

6 Summary: Clinical Impact of MDR1-Expression in Testicular Germ Cell Cancer

The multidrug resistance protein 1 (MDR1, P-gp, p-170) is a membrane glycoprotein that acts as an energy-dependent drug efflux pump. In various malignancies its expression is associated with resistance to diverse cytostatic drugs, and therefore predicts resistance to systemic treatment. The aim of this study was to investigate the prognostic value of MDR1 expression in primary tumour tissue to predict necrosis or viable cancer in residual tumour masses after systemic chemotherapy for advanced tescticular germ cell cancer.

Out of 77 patients, histopathological characteristics of primary testicular cancer specimens and retroperitoneal lymph node dissection (RPLND) samples following chemotherapy were available from 72 and all 77 patients, respectively, 17 (23,6%) with seminoma and 55 (76,4%) with non-seminoma. Out of the 55 patients with non-seminoma 30 (16,5%) showed mature teratoma in the primary tumour of the testis. Moreover, MDR1expression was determined by immunohistochemistry in 47 primary tumours and corresponding 73 RPLND sections. Regarding the pimary tumour we found no MDR1-expression in 24 (51,1%) patients, weak/intermediate expression of MDR1 was found in 5 (10,6%) and strong MDR1-expresson in 18 (38,3%) patients, respectively. Out of the 73 RPLND sections 18 (24,7%) showed a weak/intermediate MDR1-expression and 8 (11%) a strong MDR1-expresion, respectively. Sections containing necrosis showed no MDR1-expression at all.

After chemotherapy and subsequent RPLND, the examination of residual tumour masses revealed that mature teratoma and active viable tumour were predominantly found in patients with non-seminoma (NSGCT; p=0.048), especially in those with containing mature teratoma (p=0.001). Moreover, using univariate analysis the expression of MDR1 in the primary testicular tumour predicted viable tumour / teratoma residues in RPLND sections (p=0.003). However, in multivariate analysis including the tumours' histological subtype, MDR1 expression alone failed to reach statistical significance as an independent prognostic marker for residual vital tumour (p≥0.16).

With the limited number of patients given, the correlation between MDR1 expression in primary testis cancer and active residual retroperitoneal disease after chemotherapy failed to reach statistical significance as in independent marker. Therefore, up to now routine MDR1 staining of testicular germ cell cancer samples should not be performed in clinical practice. However, as there was a clear trend, a larger number of patients suffering from metastatic non-seminomas shoud be studied, as MDR1 expression might have significant prognostic value in this particular subgroup of patients.

7 Literaturverzeichnis

1. *Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise. United Kingdom Testicular Cancer Study Group.* Bmj, 1994. **308**(6941): p. 1393-9.
2. *Guidelines on the management of adult testicular cancer.* Clin Oncol (R Coll Radiol). 2000. **12**(5): p. S173-210.
3. *Guidelines on the management of adult testicular cancer.* Clin Oncol (R Coll Radiol), 2000. **12**: p. 173-210.
4. *Timing of elective surgery on the genitalia of male children with particular reference to the risks, benefits, and psychological effects of surgery and anesthesia. American Academy of Pediatrics.* Pediatrics, 1996. **97**(4): p. 590-4.
5. Albers P, S.R., Kliesch S, et al., *Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group trial.* J Clin Oncol, 2003(21): p. 1505-12.
6. Albers P, S.R., Krege S, et al., *One course of adjuvant PEB chemotherapy versus retroperitoneal lymph node dissection in patients with stage I non-seminomatous germ-cell tumors (NSGCT): results of the German Prospective Multicenter Trial (Association of Urological Oncology [AUO]/German Testicular Cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(No. 18S (June 20 suppl)): p. 4512.
7. Albers, P., L. Weissbach, S. Krege, S. Kliesch, M. Hartmann, A. Heidenreich, P. Walz, M. Kuczyk, and R. Fimmers, *Prediction of necrosis after chemotherapy of advanced germ cell tumors: results of a prospective multicenter trial of the German Testicular Cancer Study Group.* J Urol, 2004. **171**(5): p. 1835-8.
8. Aparicio, J., X. Garcia del Muro, P. Maroto, L. Paz-Ares, E. Alba, A. Saenz, J. Terrasa, A. Barnadas, D. Almenar, J.A. Arranz, M. Sanchez, A. Fernandez, J. Sastre, J. Carles, J. Dorca, J. Guma, A.L. Yuste, and J.R. Germa, *Multicenter study evaluating a dual policy of postorchiectomy surveillance and selective adjuvant single-agent carboplatin for patients with clinical stage I seminoma.* Ann Oncol, 2003. **14**(6): p. 867-72.
9. Aprikian, A.G., H.W. Herr, D.F. Bajorin, and G.J. Bosl, *Resection of postchemotherapy residual masses and limited retroperitoneal lymphadenectomy in patients with metastatic testicular nonseminomatous germ cell tumors.* Cancer, 1994. **74**(4): p. 1329-34.
10. Arranz Arija, J.A., X. Garcia del Muro, J. Guma, J. Aparicio, R. Salazar, A. Saenz, J. Carles, M. Sanchez, and J.R. Germa-Lluch, *E400P in advanced seminoma of good prognosis according to the international germ cell cancer collaborative group (IGCCCG)*

classification: the Spanish Germ Cell Cancer Group experience. Ann Oncol, 2001. **12**(4): p. 487-91.
11. Bamberg, M., H. Schmidberger, C. Meisner, J. Classen, R. Souchon, S. Weinknecht, J. Schorcht, F. Walter, R. Engenhart-Cabillic, U. Schulz, H. Born, and M. Flink, *Radiotherapy for stages I and IIA/B testicular seminoma.* Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 823-7.
12. Baniel, J., R.S. Foster, R.G. Rowland, R. Bihrle, and J.P. Donohue, *Complications of primary retroperitoneal lymph node dissection.* J Urol, 1994. **152**(2 Pt 1): p. 424-7.
13. Baran, Y., U. Gunduz, and A. Ural, *Cross-resistance to cytosine arabinoside in human acute myeloid leukemia cells selected for resitance to vincristine.* Exp Oncol, 2006. **28**: p. 163-5.
14. Bergstrom, R., H.O. Adami, M. Mohner, W. Zatonski, H. Storm, A. Ekbom, S. Tretli, L. Teppo, O. Akre, and T. Hakulinen, *Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon.* J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(11): p. 727-33.
15. Berkmen, F.A., H., *Germinal cell tumors of the testis in cryptorchids.* J Exp Clin Cancer Res, 1998. **17**(4): p. 409-12.
16. Birch, R., S. Williams, A. Cone, L. Einhorn, P. Roark, S. Turner, and F.A. Greco, *Prognostic factors for favorable outcome in disseminated germ cell tumors.* J Clin Oncol, 1986. **4**(3): p. 400-7.
17. Bokemeyer, C. and H.J. Schmoll, *Secondary neoplasms following treatment of malignant germ cell tumors.* J Clin Oncol, 1993. **11**(9): p. 1703-9.
18. Bosl, G.J., N.L. Geller, C. Cirrincione, N.J. Vogelzang, B.J. Kennedy, W.F. Whitmore, Jr., D. Vugrin, H. Scher, J. Nisselbaum, and R.B. Golbey, *Multivariate analysis of prognostic variables in patients with metastatic testicular cancer.* Cancer Res, 1983. **43**(7): p. 3403-7.
19. Bosl, G.J. and R.J. Motzer, *Testicular germ-cell cancer.* N Engl J Med, 1997. **337**(4): p. 242-53.
20. Che, M., P. Tamboli, J.Y. Ro, D.S. Park, J.S. Ro, R.J. Amato, and A.G. Ayala, *Bilateral testicular germ cell tumors: twenty-year experience at M. D. Anderson Cancer Center.* Cancer, 2002. **95**(6): p. 1228-33.
21. Chevreau C, M.C., Soulie´ M, et al., *Long-term efficacy of two cycles of BEP regimen in high-risk stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors with embryonal carcinoma and/or vascular invasion.* Eur Urol, 2004(46): p. 209-15.
22. Classen, J., K. Dieckmann, M. Bamberg, R. Souchon, S. Kliesch, M. Kuehn, and V. Loy, *Radiotherapy with 16 Gy may fail to eradicate testicular intraepithelial neoplasia: preliminary communication of a dose-reduction trial of the German Testicular Cancer Study Group.* Br J Cancer, 2003. **88**(6): p. 828-31.
23. Coughlin, M.T., M.F. Bellinger, and P.A. Lee, *Age at unilateral orchiopexy: effect on hormone levels and sperm count in adulthood.* J Urol, 1999. **162**(3 Pt 2): p. 986-8; discussion 989.

24. de Bruin MJFM, O.G., Debruyne FM., *Nervesparing retroperitoneal lymphadenectomy for low stage testicular cancer.* Br J Urol, 1993(71): p. 336-9.
25. de Wit, R., G. Stoter, S.B. Kaye, D.T. Sleijfer, W.G. Jones, W.W. ten Bokkel Huinink, L.A. Rea, L. Collette, and R. Sylvester, *Importance of bleomycin in combination chemotherapy for good-prognosis testicular nonseminoma: a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group.* J Clin Oncol, 1997. **15**(5): p. 1837-43.
26. de Wit, R., G. Stoter, D.T. Sleijfer, J.P. Neijt, W.W. ten Bokkel Huinink, L. de Prijck, L. Collette, and R. Sylvester, *Four cycles of BEP vs four cycles of VIP in patients with intermediate-prognosis metastatic testicular non-seminoma: a randomized study of the EORTC Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer.* Br J Cancer, 1998. **78**(6): p. 828-32.
27. Dieckmann, K.P., V. Loy, and P. Buttner, *Prevalence of bilateral testicular germ cell tumours and early detection based on contralateral testicular intra-epithelial neoplasia.* Br J Urol, 1993. **71**(3): p. 340-5.
28. Dieckmann, K.P. and U. Pichlmeier, *The prevalence of familial testicular cancer: an analysis of two patient populations and a review of the literature.* Cancer, 1997. **80**(10): p. 1954-60.
29. Dieckmann, K.P. and N.E. Skakkebaek, *Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features.* Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 815-22.
30. Dong, C., I. Lonnstedt, and K. Hemminki, *Familial testicular cancer and second primary cancers in testicular cancer patients by histological type.* Eur J Cancer, 2001. **37**(15): p. 1878-85.
31. Donohue, J.P., R.S. Foster, R.G. Rowland, R. Bihrle, J. Jones, and G. Geier, *Nerve-sparing retroperitoneal lymphadenectomy with preservation of ejaculation.* J Urol, 1990. **144**(2 Pt 1): p. 287-91; discussion 291-2.
32. Donohue, J.P., J.A. Thornhill, R.S. Foster, R. Bihrle, R.G. Rowland, and L.H. Einhorn, *The role of retroperitoneal lymphadenectomy in clinical stage B testis cancer: the Indiana University experience (1965 to 1989).* J Urol, 1995. **153**(1): p. 85-9.
33. Donohue, J.P., J.A. Thornhill, R.S. Foster, R.G. Rowland, and R. Bihrle, *Retroperitoneal lymphadenectomy for clinical stage A testis cancer (1965 to 1989): modifications of technique and impact on ejaculation.* J Urol, 1993. **149**(2): p. 237-43.
34. Dow, J.A. and F.K. Mostofi, *Testicular tumors following orchiopexy.* South Med J, 1967. **60**(2): p. 193-5.
35. Eid, H., I. Bodrogi, B. Csokay, E. Olah, and M. Bak, *Multidrug resistance of testis cancers: the study of clinical relevance of P-glycoprotein expression.* Anticancer Res., 1996. **16**(6B): p. 3447-52.

36. Eid, H., L. Geczi, A. Magori, I. Bodrogi, E. Institoris, and M. Bak, *Drug resistance and sensitivity of germ cell testicular tumors: evaluation of clinical relevance of MDR1/Pgp, p53, and metallothionein (MT) proteins.* Anticancer Res., 1998. **18**(4C): p. 3059-64.
37. Einhorn, L.H., *Treatment of testicular cancer: a new and improved model.* J Clin Oncol, 1990. **8**(11): p. 1777-81.
38. Ekbom, A., L. Richiardi, O. Akre, S.M. Montgomery, and P. Sparen, *Age at immigration and duration of stay in relation to risk for testicular cancer among Finnish immigrants in Sweden.* J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(16): p. 1238-40.
39. Elert, A., P. Olbert, A. Hegele, P. Barth, R. Hofmann, and A. Heidenreich, *Accuracy of frozen section examination of testicular tumors of uncertain origin.* Eur Urol, 2002. **41**(3): p. 290-3.
40. Farrer, J.H., A.H. Walker, and J. Rajfer, *Management of the postpubertal cryptorchid testis: a statistical review.* J Urol, 1985. **134**(6): p. 1071-6.
41. Forman, D., R.T. Oliver, A.R. Brett, S.G. Marsh, J.H. Moses, J.G. Bodmer, C.E. Chilvers, and M.C. Pike, *Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis.* Br J Cancer, 1992. **65**(2): p. 255-62.
42. Fossa SD, A.N., Winderen M, et al., *Long-term renal function after treatment for malignant germ-cell tumours.* Ann Oncol, 2002(13): p. 187-9.
43. Fossa, S.D., A. Horwich, J.M. Russell, J.T. Roberts, M.H. Cullen, N.J. Hodson, W.G. Jones, H. Yosef, G.M. Duchesne, J.R. Owen, E.J. Grosch, A.D. Chetiyawardana, N.S. Reed, B. Widmer, and S.P. Stenning, *Optimal planning target volume for stage I testicular seminoma: A Medical Research Council randomized trial. Medical Research Council Testicular Tumor Working Group.* J Clin Oncol, 1999. **17**(4): p. 1146.
44. Fossa SD, M.C., Serbuti S., *Patients' and doctors' perception of long-term morbidity in patients with testicular cancer clinical stage I.* Support Care Cancer, 1996(4): p. 118-28.
45. Gill, B. and S. Kogan, *Cryptorchidism. Current concepts.* Pediatr Clin North Am, 1997. **44**(5): p. 1211-27.
46. Giwercman, A., J. Grindsted, B. Hansen, O.M. Jensen, and N.E. Skakkebaek, *Testicular cancer risk in boys with maldescended testis: a cohort study.* J Urol, 1987. **138**(5): p. 1214-6.
47. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.* Annu Rev Biochem., 1993. **62**: p. 385-427.
48. Gottesman, M.M. and I. Pastan, *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.* Ann Rev Biochem, 2003. **62**: p. 385-90.
49. Han, S. and R.E. Peschel, *Father-son testicular tumors: evidence for genetic anticipation? A case report and review of the literature.* Cancer, 2000. **88**(10): p. 2319-25.

50. Heidenreich, A., M. Seger, A. Schrader, R. Hofmann, U.H. Engelmann, and J. Beyer, *Surgical considerations in residual tumor resection following chemotherapy for advanced testicular cancer.* Eur Urol Suppl, 2003. **2**(161): p. 632.
51. Heidenreich A, S.N., Sesterhenn IA, et al., *Immunohistochemical expression of Ki-67 to predict lymph node involvement in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors.* J Urol, 1997(158): p. 620-5.
52. Heimdal, K., H. Olsson, S. Tretli, P. Flodgren, A.L. Borresen, and S.D. Fossa, *Familial testicular cancer in Norway and southern Sweden.* Br J Cancer, 1996. **73**(7): p. 964-9.
53. Horwich, A., D.T. Sleijfer, S.D. Fossa, S.B. Kaye, R.T. Oliver, M.H. Cullen, G.M. Mead, R. de Wit, P.H. de Mulder, D.P. Dearnaley, P.A. Cook, R.J. Sylvester, and S.P. Stenning, *Randomized trial of bleomycin, etoposide, and cisplatin compared with bleomycin, etoposide, and carboplatin in good-prognosis metastatic nonseminomatous germ cell cancer: a Multiinstitutional Medical Research Council/European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial.* J Clin Oncol, 1997. **15**(5): p. 1844-52.
54. Horwich, A. and S. Stenning, *Initial chemotherapy for stage II testicular non-seminoma.* World J Urol, 1994. **12**(3): p. 148-50.
55. Hoskin, P., S. Dilly, D. Easton, A. Horwich, W. Hendry, and M.J. Peckham, *Prognostic factors in stage I non-seminomatous germ-cell testicular tumors managed by orchiectomy and surveillance: implications for adjuvant chemotherapy.* J Clin Oncol, 1986. **4**(7): p. 1031-6.
56. Huyghe, E., *Testicular Cancer Variations in Time and Space in Europe.* Eur Urol, 2007. **51**: p. 621-628.
57. Huyghe, E., T. Matsuda, and P. Thonneau, *Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review.* J Urol, 2003. **170**(1): p. 5-11.
58. IGCCCG, *International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group.* J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 594-603.
59. Jemal, A., R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, and M.J. Thun, *Cancer statistics, 2004.* CA Cancer J Clin, 2004. **54**(1): p. 8-29.
60. Jones, C.U., S.A. Rosenthal, and G.C. Chang, *Is pelvic RT necessary in the treatment of stage I seminoma?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **42**(Suppl 1): p. 2117.
61. Jones, W.G., S.D. Fossa, and G.M. Mead, *A randomised trial of two radiotherapy schedules in the adjuvant treatment of stage I seminoma.* Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl.6**: p. 157.
62. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.* Biochim Biophys Acta., 1976. **455**(1): p. 152-62.

63. Katagiri, A., Y. Tomita, T. Nishiyama, M. Kimura, and S. Sato, *Immunohistochemical detection of P-glycoprotein and GSTP1-1 in testis cancer.* Br J Cancer., 1993. **68**(1): p. 125-9.
64. Kiricuta, I.C., J. Sauer, and W. Bohndorf, *Omission of the pelvic irradiation in stage I testicular seminoma: a study of postorchiectomy paraaortic radiotherapy.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **35**(2): p. 293-8.
65. Klepp O, D.O., Flodgren P, et al., *Risk-adapted treatment of clinical stage I non-seminoma testis cancer.* Eur J Cancer, 1997(33): p. 1038-44.
66. Kliesch, S., T. Thomaidis, B. Schutte, G. Puhse, B. Kater, S. Roth, and M. Bergmann, *Update on the diagnostic safety for detection of testicular intraepithelial neoplasia (TIN).* Apmis, 2003. **111**(1): p. 70-4; discussion 75.
67. Krege, S., *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.* Eur Urol, 2008. **53**(3): p. 478-513.
68. Krege S, B.C., Baschek R, et al., *Single-agent carboplatin for CS II-A/B testicular seminoma. A phase II study of the German Testicular Cancer Study Group (GTCSG).* Ann Oncol, 2006(17): p. 276-80.
69. Krege, S., H.J. Schmoll, and R. Souchon, *[Interdisciplinary consensus in diagnosis and therapy of testicular tumors. Results of an update conference founded on evidence-based medicine (EBM)].* Urologe A, 2001. **40**(2): p. 137-47.
70. Krege, S., R. Souchon, and H.J. Schmoll, *Interdisciplinary consensus on diagnosis and treatment of testicular germ cell tumors: result of an update conference on evidence-based medicine (EBM).* Eur Urol, 2001. **40**(4): p. 372-91.
71. Labialle, S., G. Dayan, M. Michaud, S. Barakat, D. Rigal, and L.G. Baggetto, *Gene therapy of the typical multidrug resistance phenotype of cancers: a new hope?* Semin Oncol., 2005. **32**(6): p. 583-90.
72. Logothetis CJ, S.M., Selig DE, et al., *Primary chemotherapy followed by a selective retroperitoneal lymphadenectomy in the management of clinical stage II testicular carcinoma: a preliminary report.* J Urol, 1985(134): p. 1127-30.
73. Lyter, D.W., J. Bryant, R. Thackeray, C.R. Rinaldo, and L.A. Kingsley, *Incidence of human immunodeficiency virus-related and nonrelated malignancies in a large cohort of homosexual men.* J Clin Oncol, 1995. **13**(10): p. 2540-6.
74. Mahadevan, D. and N. Shirahatti, *Strategies for targeting the multidrug resistance-1 (MDR1)/P-gp transporter in human malignancies.* Curr Cancer Drug Targets., 2005. **5**(6): p. 445-55.
75. McGlynn, K.A., S.S. Devesa, A.J. Sigurdson, L.M. Brown, L. Tsao, and R.E. Tarone, *Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States.* Cancer, 2003. **97**(1): p. 63-70.

76. Mead, G.M. and S.P. Stenning, *The International Germ Cell Consensus Classification: a new prognostic factor-based staging classification for metastatic germ cell tumours.* Clin Oncol (R Coll Radiol), 1997. **9**(4): p. 207-9.
77. Miller, K., *Testicular calcification and microlithiasis: association with primary intratesticular malignancy in 3.477 patients.* Eur Radiol, 2007. **17**: p. 363-369.
78. Mostofi, F.K. and I.A. Sesterhenn, *Pathology of germ cell tumors of testes.* Prog Clin Biol Res, 1985. **203**: p. 1-34.
79. Nichols, C.R., *Testicular cancer.* Curr Probl Cancer, 1998. **22**(4): p. 187-274.
80. Nichols, C.R., P.J. Catalano, E.D. Crawford, N.J. Vogelzang, L.H. Einhorn, and P.J. Loehrer, *Randomized comparison of cisplatin and etoposide and either bleomycin or ifosfamide in treatment of advanced disseminated germ cell tumors: an Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Cancer and Leukemia Group B Study.* J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1287-93.
81. Nicolai N, M.R., Artusi R, et al., *A simple model for predicting nodal metastases in patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors undergoing retroperitoneal lymph node dissection only.* J Urol, 2004(171): p. 172-6.
82. Oh, J., J. Landman, A. Evers, Y. Yan, and A.S. Kibel, *Management of the postpubertal patient with cryptorchidism: an updated analysis.* J Urol, 2002. **167**(3): p. 1329-33.
83. Oldenburg, J., G.C. Alfsen, H.H. Lien, N. Aass, H. Waehre, and S.D. Fossa, *Postchemotherapy retroperitoneal surgery remains necessary in patients with nonseminomatous testicular cancer and minimal residual tumor masses.* J Clin Oncol., 2003. **21**(17): p. 3310-7.
84. Oliver, R.T., J. Ong, J. Shamash, R. Ravi, V. Nagund, P. Harper, M.J. Ostrowski, B. Sizer, J. Levay, A. Robinson, D.E. Neal, and M. Williams, *Long-term follow-up of Anglian Germ Cell Cancer Group surveillance versus patients with Stage 1 nonseminoma treated with adjuvant chemotherapy.* Urology, 2004. **63**(3): p. 556-61.
85. Ondrus D, M.J., Belan V, et al., *Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors: rationale for different risk-adapted treatment.* Eur Urol, 1998(33): p. 562-6.
86. Osterlind, A., J.G. Berthelsen, N. Abildgaard, S.O. Hansen, H. Hjalgrim, B. Johansen, J. Munck-Hansen, and L.H. Rasmussen, *Risk of bilateral testicular germ cell cancer in Denmark: 1960-1984.* J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(19): p. 1391-5.
87. Peckham MJ, H.W., *Clinical stage II non-seminatous germ cell testicular tumors. Results of management by primary chemotherapy.* Br J Urol, 1985(57): p. 763-8.
88. Petterson, A., *Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer.* N Engl J Med, 2007. **356**: p. 1835-1841.

89. Pizzocaro G, M.S., *No adjuvant chemotherapy in selected patients with pathological stage II nonseminomatous germ cell tumors of the testis.* J Urol, 1994. **131**: p. 677-80.
90. Pont, J., W. Albrecht, G. Postner, F. Sellner, K. Angel, and W. Holtl, *Adjuvant chemotherapy for high-risk clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell cancer: long-term results of a prospective trial.* J Clin Oncol, 1996. **14**(2): p. 441-8.
91. Pottern, L.M., L.M. Brown, R.N. Hoover, N. Javadpour, K.J. O'Connell, R.E. Stutzman, and W.A. Blattner, *Testicular cancer risk among young men: role of cryptorchidism and inguinal hernia.* J Natl Cancer Inst, 1985. **74**(2): p. 377-81.
92. Read G, S.S., Cullen MH, et al., *Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. Medical Research Council Testicular Tumors Working Party.* J Clin Oncol, 1992. **10**: p. 1762–8.
93. Richiardi, L., O. Akre, S.M. Montgomery, M. Lambe, U. Kvist, and A. Ekbom, *Fecundity and twinning rates as measures of fertility before diagnosis of germ-cell testicular cancer.* J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(2): p. 145-7.
94. Roninson IB, C.J., Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I., *Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1986. **83(12):**: p. 4538-42.
95. Rustin GJ, M.G., Sally P, et al., *Randomized trial of two or five computed tomography scans in the surveillance of patients with stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: Medical Research Council Trial TE08. ISRCTN56475197 – The National Cancer Research Institute Testis Cancer Clinical Studies Group.* J Clin Oncol, 2007(10): p. 1310-5.
96. Samuels, M.L., D.E. Johnson, and P.Y. Holoye, *Continuous intravenous bleomycin (NSC-125066) therapy with vinblastine (NSC-49842) in stage III testicular neoplasia.* Cancer Chemother Rep, 1975. **59**(3): p. 563-70.
97. Schmidberger, H., M. Bamberg, C. Meisner, J. Classen, C. Winkler, M. Hartmann, R. Templin, T. Wiegel, W. Dornoff, D. Ross, H.J. Thiel, C. Martini, and W. Haase, *Radiotherapy in stage IIA and IIB testicular seminoma with reduced portals: a prospective multicenter study.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **39**(2): p. 321-6.
98. Schmoll, H.J., R. Souchon, S. Krege, P. Albers, J. Beyer, C. Kollmannsberger, S.D. Fossa, N.E. Skakkebaek, R. de Wit, K. Fizazi, J.P. Droz, G. Pizzocaro, G. Daugaard, P.H. de Mulder, A. Horwich, T. Oliver, R. Huddart, G. Rosti, L. Paz Ares, O. Pont, J.T. Hartmann, N. Aass, F. Algaba, M. Bamberg, I. Bodrogi, C. Bokemeyer, J. Classen, S. Clemm, S. Culine, M. de Wit, H.G. Derigs, K.P. Dieckmann, M. Flasshove, X. Garcia del Muro, A. Gerl, J.R. Germa-Lluch, M. Hartmann, A. Heidenreich, W. Hoeltl, J. Joffe, W. Jones, G. Kaiser, O. Klepp, S. Kliesch, L. Kisbenedek, K.U. Koehrmann, M. Kuczyk, M.P. Laguna, O. Leiva, V. Loy, M.D.

Mason, G.M. Mead, R.P. Mueller, N. Nicolai, G.O. Oosterhof, T. Pottek, O. Rick, H. Schmidberger, F. Sedlmayer, W. Siegert, U. Studer, S. Tjulandin, H. von der Maase, P. Walz, S. Weinknecht, L. Weissbach, E. Winter, and C. Wittekind, *European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG).* Ann Oncol, 2004. **15**(9): p. 1377-99.

99. Schottenfeld, D., M.E. Warshauer, S. Sherlock, A.G. Zauber, M. Leder, and R. Payne, *The epidemiology of testicular cancer in young adults.* Am J Epidemiol, 1980. **112**(2): p. 232-46.
100. Schrader, A.J., C.H. Ohlmann, S. Rossmanith, R. Hofmann, and A. Heidenreich, *Impact of evidence-based interdisciplinary guidelines on testis cancer management.* Cancer., 2006. **106**(2): p. 313-9.
101. Sedlmayer, F., W. Holtl, W. Kozak, R. Hawliczek, F. Gebhart, E. Gerber, H. Joos, W. Albrecht, K. Pummer, and H.D. Kogelnik, *Radiotherapy of testicular intraepithelial neoplasia (TIN): a novel treatment regimen for a rare disease.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(4): p. 909-13.
102. Shahir, S., R.S. Foster, and M.A. Jewett, *Optimizing follow up for early stage non seminomatous testicular cancer.* J Urol, 1996. **155**(Suppl. 327a): p. abstract 67.
103. Sheinfeld J, M.R., Rabbani F, et al., *Incidence and clinical outcome of patients with teratoma in the retroperitoneum following primary retroperitoneal lymph node dissection for clinical stages I and II A nonseminomatous germ cel tumors.* J Urol, 2003(170): p. 1159-62.
104. Shen DW, C.C., Hwang J, Cornwell M, Richert N, Ishii S, Pastan I, Gottesman MM., *Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins.* J Biol Chem., 1986. **261(17)**: p. 7762-70.
105. Sonneveld, D.J., H.J. Hoekstra, W.T. van der Graaf, W.J. Sluiter, N.H. Mulder, P.H. Willemse, H.S. Koops, and D.T. Sleijfer, *Improved long term survival of patients with metastatic nonseminomatous testicular germ cell carcinoma in relation to prognostic classification systems during the cisplatin era.* Cancer, 2001. **91**(7): p. 1304-15.
106. Spermon JR, R.T., van der Poel HG, et al., *Comparison of surveillance and retroperitoneal lymph node dissection in stage I nonseminomatous germ cell tumors.* Urology, 2002(59): p. 923–9.
107. Stefkova, J., R. Poledne, and J.A. Hubacek, *ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases.* Physiol Res., 2004. **53**(3): p. 235-43.
108. Steiner H, M.T., Gozzi C, et al., *Two cycles of cisplatinbased chemotherapy for low-volume retroperitoneal stage II nonseminomatous germ cell tumours.* BJU Int., 2006. **98**: p. 1349-63.
109. Stephenson AJ, B.G., Motzer RJ, et al., *Retroperitoneal lymph node dissection for nonseminomatous germ cell testicular cancer: impact*

of patient selection factors on outcome. J Clin Oncol, 2005. **23**: p. 2781-8.
110. Steyerberg, E.W., H.J. Keizer, S.D. Fossa, D.T. Sleijfer, G.C. Toner, H. Schraffordt Koops, P.F. Mulders, J.E. Messemer, K. Ney, J.P. Donohue, and et al., *Prediction of residual retroperitoneal mass histology after chemotherapy for metastatic nonseminomatous germ cell tumor: multivariate analysis of individual patient data from six study groups.* J Clin Oncol., 1995. **13**(5): p. 1177-87.
111. Takara, K., T. Sakaeda, and K. Okumura, *An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy.* Curr Pharm Des., 2006. **12**(3): p. 273-86.
112. Travis L, A.M., Holowarty E, et al., *Risk of leukemia following radiotherapy and chemotherapy for testicular cancer.* Proc Am Soc Clin Oncol, 1999(18): p. 308a (abstract no. 1185).
113. Travis, L.B., R.E. Curtis, H. Storm, P. Hall, E. Holowaty, F.E. Van Leeuwen, B.A. Kohler, E. Pukkala, C.F. Lynch, M. Andersson, K. Bergfeldt, E.A. Clarke, T. Wiklund, G. Stoter, M. Gospodarowicz, J. Sturgeon, J.F. Fraumeni, Jr., and J.D. Boice, Jr., *Risk of second malignant neoplasms among long-term survivors of testicular cancer.* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(19): p. 1429-39.
114. Ueda, K., D.P. Clark, C.J. Chen, I.B. Roninson, M.M. Gottesman, and I. Pastan, *The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation.* J Biol Chem., 1987. **262**(2): p. 505-8.
115. UICC, *TNM Classification für testicular cancer.* 2002. **sixth edition**.
116. Vergouwe, Y., E.W. Steyerberg, R. de Wit, J.T. Roberts, H.J. Keizer, L. Collette, S.P. Stenning, and J.D. Habbema, *External validity of a prediction rule for residual mass histology in testicular cancer: an evaluation for good prognosis patients.* Br J Cancer., 2003. **88**(6): p. 843-7.
117. Vergouwe, Y., E.W. Steyerberg, R.S. Foster, D.T. Sleijfer, S.D. Fossa, A. Gerl, R. de Wit, J.T. Roberts, and J.D. Habbema, *Predicting retroperitoneal histology in postchemotherapy testicular germ cell cancer: a model update and multicentre validation with more than 1000 patients.* Eur Urol., 2007. **51**(2): p. 424-32. Epub 2006 Jul 14.
118. von der Maase, H., M. Rorth, S. Walbom-Jorgensen, B.L. Sorensen, I.S. Christophersen, T. Hald, G.K. Jacobsen, J.G. Berthelsen, and N.E. Skakkebaek, *Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients.* Br Med J (Clin Res Ed), 1986. **293**(6559): p. 1398-401.
119. Warde, P., M.K. Gospodarowicz, D. Banerjee, T. Panzarella, L. Sugar, C.N. Catton, J.F. Sturgeon, M. Moore, and M.A. Jewett, *Prognostic factors for relapse in stage I testicular seminoma treated with surveillance.* J Urol, 1997. **157**(5): p. 1705-9; discussion 1709-10.

120. Warde, P., M.K. Gospodarowicz, T. Panzarella, C.N. Catton, J.F. Sturgeon, M. Moore, P. Goodman, and M.A. Jewett, *Stage I testicular seminoma: results of adjuvant irradiation and surveillance.* J Clin Oncol, 1995. **13**(9): p. 2255-62.
121. Warde, P., L. Specht, A. Horwich, T. Oliver, T. Panzarella, M. Gospodarowicz, and H. von der Maase, *Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis.* J Clin Oncol, 2002. **20**(22): p. 4448-52.
122. Weir, H.K., L.D. Marrett, N. Kreiger, G.A. Darlington, and L. Sugar, *Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer.* Int J Cancer, 2000. **87**(3): p. 438-43.
123. Weissbach, L., E.A. Boedefeld, and B. Horstmann-Dubral, *Surgical treatment of stage-I non-seminomatous germ cell testis tumor. Final results of a prospective multicenter trial 1982-1987. Testicular Tumor Study Group.* Eur Urol, 1990. **17**(2): p. 97-106.
124. Weissbach, L., R. Bussar-Maatz, H. Flechtner, U. Pichlmeier, M. Hartmann, and L. Keller, *RPLND or primary chemotherapy in clinical stage IIA/B nonseminomatous germ cell tumors? Results of a prospective multicenter trial including quality of life assessment.* Eur Urol, 2000. **37**(5): p. 582-94.
125. Williams, S.D., D.M. Stablein, L.H. Einhorn, F.M. Muggia, R.B. Weiss, J.P. Donohue, D.F. Paulson, K.W. Brunner, E.M. Jacobs, J.T. Spaulding, and et al., *Immediate adjuvant chemotherapy versus observation with treatment at relapse in pathological stage II testicular cancer.* N Engl J Med, 1987. **317**(23): p. 1433-8.
126. Wittekind, C. and V. Loy, *[Pathology and pathomorphologic diagnosis of germ cell tumors of the testis].* Pathologe, 2001. **22**(5): p. 316-25.
127. Wood, D.P., Jr., H.W. Herr, G. Heller, V. Vlamis, P.C. Sogani, R.J. Motzer, W.R. Fair, and G.J. Bosl, *Distribution of retroperitoneal metastases after chemotherapy in patients with nonseminomatous germ cell tumors.* J Urol., 1992. **148**(6): p. 1812-5; discussion 1815-6.
128. Zheng, T., T.R. Holford, Z. Ma, B.A. Ward, J. Flannery, and P. Boyle, *Continuing increase in incidence of germ-cell testis cancer in young adults: experience from Connecticut, USA, 1935-1992.* Int J Cancer, 1996. **65**(6): p. 723-9.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A.bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Feto-Protein
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Carcinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Cis	Carcinoma in situ
cm	Centimeter
DAB	
DES	Diethylstilbestrol
ECA	Embryonalzellcarcinom
EtOH	Alkohol
g	Gramm
Gy	Grey
h	Stunde(n)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheiten
IGCCCG	“International germ cell cancer collerabative group”
IHC	Immunhistochemie
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NSGCT	Nichtseminomatöse Keimzelltumore
PBS	„Phosphate buffered saline“
PEB	Cisplatin/Etoposid/Bleomycin
PEI	Cisplatin/Etoposid/Iphosphamid
prim.	primär
RPLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
Tab.	Tabelle
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

8.2 Lebenslauf

Name:	Seger, Meike
Geboren:	13.12.1972 in Dortmund
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Ausbildung und Examina

1979-1983	Gemeinschaftsgrundschule Westhofen
1983-1992	Ruhrtalgymnasium Schwerte (Ruhr)
1992	Allgemeine Hochschulreife
1992-1993	Freiwilliges Soziales Jahr
1993-1994	Pflegepraktikum, Marienkrankenhaus Schwerte mit anschließender Aushilfstätigkeit
1994	Immatrikulation Philipps-Universität Marburg
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	1. Staatsexamen
2000	2. Staatsexamen
2000-2001	Praktisches Jahr
2001	3. Staatsexamen
2002-2003	Ärztin im Praktikum, Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg
2003	Approbation
2003-2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg
2007	Fachärztin für Urologie

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Untersuchung der MDR1-Expression und ihrer klinischen Relevanz beim Keimzelltumor des Hodens

in der Klinik für Urologie und Kinderurologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. R. Hofmann der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. A.J. Schrader ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Exp Oncol 2007; 29, 3, 212-216: AJ Schrader, M Seger, L Konrad, P Olbert, A Hegele, R Hofmann, A Heidenreich: Clinical impact of MDR1-expression in testicular germ cell cancer.

Marburg, den

Meike Seger

8.4 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme in die Klinik für Urologie und Kinderurologie und das Überlassen des Laborplatzes.

Ferner möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. A. Heidenreich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas bedanken. Durch die Arbeit habe ich mir moderne Methoden der Immunhistochemie erarbeiten können und Einblick in ein faszinierendes, aktuelles Gebiet der Tumorbiologie erhalten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Andres J. Schrader für die wertvollen thematischen Anregungen während und nach Durchführung der vorliegenden Arbeit sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Hilfe nach dem Wechsel von Prof. Heidenreich nach Köln.

Frau Dr. med. M. Rössler, Institut für Pathologie Marburg, möchte ich für die geduldige Ansicht und Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte danken. Diese Sitzungen waren äußerst lehrreich und interessant. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Ramaswamy, Institut für Pathologie Marburg, welche die Bilder 1-5 dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Frau Renate Nottelmann möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die immunhistochemischen Techniken und die Betreuung während der Durchführung der Experimente danken. Ihr Einsatz war für den Fortgang der Arbeit von großem Wert.
Mit Freude denke ich an die Zeit im urologischen Labor zurück; die Hilfestellungen, Unterstützung und vielen netten Gespräche mit Frau Renate Nottelmann und Frau Heidrun Brandt sowie die wissenschaftlichen Anregungen von PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad.

Frau Dr. rer. physiol. Sandra Diederich und Frau Dr. med. Christina Mayer danke ich für ihre persönliche Unterstützung und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich danken, die mich immer wieder während des Studiums sowie der Promotion motiviert und unterstützt haben.

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Barth, Baum, Beyer, Christiansen, Czubayko, Daume, Daut, Engel, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Hüwel, Jungclas, Kaffarnik, Kern, Klenk, Klose, Kretschmer, Krieg, Labitzke, Lang, Lange, Lennartz, Lippert, Lorenz, Mennel, Moll, Oertel, Pfab, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schüffel, Schulz, Schulze, Seitz, Seyberth, Simon, Slenzka, Steiniger, Sundermeyer, Thomas, v. Wichert, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Zielke