

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Prospektive Isolation, Kultur und Charakterisierung von  
gonadalen Seminomzellen mit Stammzeleigenschaften**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Brenauer, Tamara Maria, geb. Buck**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 28.11.2017

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hodentumoren . . . . .	1
1.1.1 Allgemeines . . . . .	1
1.1.2 Einteilung . . . . .	2
1.2 Keimzelltumoren . . . . .	2
1.2.1 Allgemeines . . . . .	2
1.2.2 Klassifikation . . . . .	3
1.2.3 GCT Typ I bis III . . . . .	4
1.2.4 Diagnose . . . . .	6
1.2.5 Staging . . . . .	7
1.2.6 Therapie . . . . .	8
1.2.7 Chromosomenaberrationen . . . . .	10
1.2.8 Vorläuferzellen und ihre Entwicklung . . . . .	11
1.2.9 Carcinoma in situ . . . . .	12
1.2.10 Das klassische Seminom . . . . .	14
1.3 Zellkultur . . . . .	15
1.4 Seminomzellmarker zur Charakterisierung . . . . .	16
1.5 Bax und Bcl2 als Apoptosemarker . . . . .	20
1.6 Lymphozyten und EBV . . . . .	21
1.7 Fragestellung der vorgelegten Arbeit . . . . .	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Material . . . . .	23
2.2 Methoden . . . . .	24
2.2.1 Dissoziation und Primärkultur . . . . .	24

2.2.2	Medien . . . . .	25
2.2.3	Mediumwechsel . . . . .	29
2.2.4	Split . . . . .	29
2.2.5	Einfrieren zur Lagerung und zur weiteren Charakterisierung	29
2.2.6	Auftauen . . . . .	30
2.2.7	ADSC-Zellen . . . . .	30
2.2.8	Vorbereitung und immunhistochemische Färbung . . . . .	31
2.2.9	Immunhistochemische Färbung der Marker CD20, CD117, D2-40, EBV und PLAP . . . . .	33
2.2.10	Bestimmung der Marker ALPP, Bax, Bcl2, CD45, CKIT, POUF5 und TERT mittels PCR . . . . .	35
2.2.11	cDNA-Umschrieb . . . . .	36
2.2.12	Real-time quantitative PCR . . . . .	37
2.2.13	Benennung der unterschiedlichen Stadien . . . . .	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Primärkultur . . . . .	43
3.2	Überlebenszeit der Zellen . . . . .	43
3.3	Zellverhalten nach Auftauen . . . . .	44
3.4	Tumorzellen auf Feedern . . . . .	46
3.5	Zytospin . . . . .	49
3.6	Zytoblock . . . . .	52
3.7	Real-time quantitative PCR . . . . .	57
3.7.1	Seminommarker ALPP, c-KIT, OCT3/4 und TERT . . . . .	58
3.7.2	Lymphozytenmarker CD45 . . . . .	64
3.7.3	Apoptosemarker Bax und Bcl2 . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Seminomspender . . . . .	74
4.2	Überlebenszeiten der Zellen im Vergleich zu anderen Studien . . .	74
4.3	Einflussgröße Stammzellmedium . . . . .	75
4.3.1	Unterschiede von StemPro und hGSC . . . . .	77
4.4	Histologie der Zellen im Vergleich . . . . .	78
4.5	Kulturmedienabhängige Entwicklung der Zellen . . . . .	79
4.6	Spezifität der herangezogenen Marker . . . . .	80
4.6.1	Seminommarker . . . . .	80
4.6.2	Lymphozytenmarker und EBV . . . . .	81
4.7	Interpretation der Apoptoserate . . . . .	82

---

4.8	Entstehung von Seminomlinien . . . . .	84
4.8.1	Einordnung der Ergebnisse von Zytospin und Zytoblock . .	84
4.8.2	Seminome, aus denen sich lymphozytoblastische B-Zelllinien entwickelt haben . . . . .	85
4.8.3	Seminomlinie 197_2 . . . . .	87
4.8.4	Weitere Studien in der Diskussion . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>111</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Keimzellentwicklung, Eigenmodifikation nach (Masters and Köberle, 2003),(Nutti et al., 2009),(Oosterhuis and Looijenga, 2005) . . .	11
1.2	Expressionsmuster in TIN, Quelle:(Rajpert-De Meyts et al., 2003) .	20
2.1	Die Temperaturen während einer PCR (eigenes Diagramm) . . . .	40
3.1	Seminomzellen in Kultur . . . . .	45
3.2	Tumor 188 Passage 11 . . . . .	46
3.3	Tumor 188, Passage 12, 100-fach, Film 1 . . . . .	47
3.4	Tumor 188, Passage 12, 100-fach, Film 2 . . . . .	48
3.5	CD20-Färbung Zytospins . . . . .	49
3.6	EBV-Färbung Zytospins . . . . .	50
3.7	CD45-Färbung Zytospins . . . . .	50
3.8	CD117-Färbung Zytospins . . . . .	51
3.9	PLAP-Färbung Zytospins . . . . .	52
3.10	HE-Färbung Zytoblocks . . . . .	53
3.11	CD20-Färbung Zytoblocks . . . . .	54
3.12	EBV-Färbung Zytoblocks . . . . .	55
3.13	CD117-Färbung Zytoblocks . . . . .	56
3.14	D2-40-Färbung Zytoblocks . . . . .	56
3.15	PLAP-Färbung Zytoblocks . . . . .	57
3.16	PLAP gesamt . . . . .	58
3.17	PCR PLAP . . . . .	59
3.18	c-KIT gesamt . . . . .	60
3.19	OCT3/4 gesamt . . . . .	60
3.20	PCR c-KIT . . . . .	62
3.21	PCR OCT3/4 . . . . .	62
3.22	TERT gesamt . . . . .	63
3.23	PCR TERT . . . . .	64
3.24	CD45 gesamt . . . . .	64



---

3.25 PCR CD45 . . . . .	65
3.26 BAX gesamt . . . . .	66
3.27 PCR BAX . . . . .	67
3.28 Bcl2 gesamt . . . . .	68
3.29 PCR Bcl2 . . . . .	69
3.30 Bax/Bcl2 gesamt . . . . .	69
3.31 PCR Bax/Bcl2 . . . . .	70

# Tabellenverzeichnis

1.1	WHO-Klassifikation der Hodentumoren . . . . .	2
1.2	WHO-Klassifikation der Keimzelltumoren . . . . .	4
1.3	Lugano-Klassifikation . . . . .	7
1.4	TNM-Klassifikation . . . . .	8
2.1	Seminomspender . . . . .	24
2.2	Kulturmedium hGSC . . . . .	26
2.3	Kulturmedium StemPro hGSC . . . . .	27
2.4	Kulturmedium RPMI . . . . .	27
2.5	ADSC-Medium . . . . .	31
2.6	Antikörper der immunhistochemischen Färbung . . . . .	33
2.7	cDNA-Umschrieb . . . . .	36
2.8	SYBR-Green-PCR . . . . .	38
2.9	Primer PCR SYBR-Green . . . . .	39
2.10	Taq-Man-PCR . . . . .	41
2.11	Primer PCR Taq-Man . . . . .	41
3.1	Verdopplung der Zellen in Primärkultur . . . . .	43
3.2	Überleben der Zellen in Primärkultur . . . . .	44
3.3	Ergebnisse Überblick . . . . .	72

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ADSC</b>	Adipose tissue derived stem cells
<b>AFP</b>	Alpha-Fetoprotein
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b><math>\beta</math>-HCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CIS</b>	<i>Carcinoma in situ</i>
<b>DES</b>	Diethylstilbestrol
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>ECC</b>	Embryonal carcinoma cell
<b>EGCCCG</b>	European Germ Cell Cancer Consensus Group
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor-Rezeptoren
<b>EORCT</b>	European organization for Research and treatment of cancer
<b>ESC</b>	Embryonal stem cell
<b>FCS</b>	fetal calf serum
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>for</b>	forward
<b>GCT</b>	Germ Cell Tumor
<b>GDNF</b>	Glial cell line-derived neurotrophic factor
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>IGCCCG</b>	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
<b>ITGCNU</b>	Intratubular Germ Cell Neoplasia Unclassified
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>LIF</b>	leukemia inhibiting factor
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>MEM</b>	Minimum essential medium
<b>min</b>	Minuten
<b>MRC</b>	Medical research council

**MRT** Magnetresonanztomogramm  
**μg** Mikrogramm  
**μl** Mikroliter  
**μm** Mikrometer  
**ml** Milliliter  
**MRT** Magnetresonanztomographie  
**NANOG** (von Tír na nÓg, irisch: „Land der ewigen Jugend“)  
**NEAA** Non-essential Amino-Acids  
**OCT 3/4** Octamer binding transcription factor, auch POU5F1  
**PBS** Phosphate buffered saline  
**PGC** Primordial germ cells  
**PLAP** Placenta-alkalische Phosphatase  
**rev** reverse  
**rpm** rounds per minute  
**RPMI** Roswell Park Memorial Institute  
**TGCT** Testicular germ cell tumor  
**TIN** testikuläre intraepitheliale Neoplasie  
**TNM** Tumor Node Metastasis  
**U** Unit  
**UICC** Union international contre le cancer  
**vgl.** vergleiche  
**vs** versus  
**WHO** World-Health-Organization  
**z.B.** zum Beispiel

Anmerkung: Die Abkürzungen der Puffer RW1, RPE und RLT sind Teile des „RNeasy“-Extraktionskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) Die genaue Zusammensetzung sowie Bedeutung der Abkürzungen ist nicht bekannt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hodentumoren

### 1.1.1 Allgemeines

Hodentumoren sind bei 20 bis 34-jährigen Männern die am häufigsten festgestellte maligne Entartung. Insgesamt machen sie zwar nur 2% der malignen Tumoren bei Männern aus (Motzer et al., 2012), verschiedene Studien belegen aber, dass sich die Inzidenz dieser Tumorart in den vergangenen 40 Jahren weltweit verdoppelt hat (Huyghe et al., 2003).

Außer Kryptorchismus sind keine anderen Risikofaktoren für Hodentumoren allgemein anerkannt. Als Grund für die steigende Inzidenz sind die bessere Diagnostik, Häufung des testikulären Dysgenese-Syndroms (Sonne et al., 2008) und Umweltfaktoren wie exogen zugeführte Hormone während der Gestation in der Diskussion. Die These der genetischen Einflüsse auf Hodentumoren wird unterstützt durch ethnische sowie geographische Verteilungsmuster der Inzidenz: Hodentumoren kommen relativ häufig in Europa und Nordamerika vor, dagegen seltener in Asien und Afrika. Europaweit ist die Inzidenz am höchsten in Skandinavien und am niedrigsten in Ungarn und den mediterranen Ländern (Tannenbaum and Madden, 2006).

In Deutschland beträgt die Inzidenz von Hodentumoren aktuell etwa 1-3 aus 100.000 Einwohnern (Stang et al., 2009). Jährlich nimmt sie dabei um ca. 5% zu (Adami et al., 1994).

Allein im Jahr 2012 wurde erwartet, dass 8590 neue Fälle von Hodentumoren in den USA diagnostiziert werden (Siegel et al., 2012).

### 1.1.2 Einteilung

Hodentumoren haben eine dreigipflige Altersverteilung: der erste Gipfel liegt bei den unter 5-jährigen mit den embryonalen Karzinomen, der zweite Gipfel, der auch der höchste ist, bei den 15-34-jährigen mit Seminom und Nicht-Seminom und der dritte mit dem spermatozytischen Seminom bei über 60 Jahren (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Hodentumoren werden nach der World-Health-Organization (WHO) histologisch in die in Tabelle 1.1 angezeigten Untergruppen geteilt (modifiziert):

---

Tabelle 1.1: WHO-Klassifikation der Hodentumoren

---

1. Keimzelltumoren
2. Keimleistentumoren
3. Tumoren, die sowohl Keimzell- als auch Keimleisten-Stroma enthalten
4. Gemischtzellige Tumoren
5. Tumoren des lymphatischen oder blutbildenden Systems
6. Tumoren der Sammelrohre und des Rete
7. Tumoren von umgebenden Strukturen des Hodens
8. Tumoren der Tunica, des Nebenhodens, des Samenstranges und anderen anhängenden Strukturen des Hodens
9. Sekundärtumoren des Hoden

---

Quelle:(Mills et al., 2009)

---

## 1.2 Keimzelltumoren

### 1.2.1 Allgemeines

Keimzelltumoren haben mit 95% den größten Anteil an den Hodentumoren (Motzer et al., 2012). (Siehe Untergruppe 1 in Tabelle 1.1). Sie sind die häufigsten

soliden Tumoren der Männer im Alter zwischen 15 und 34. Jährlich steigt ihre Inzidenz um 2-5% an, das gilt sowohl für Seminome, als auch für Nicht-Seminome, was auf eine ähnliche Ätiologie schließen lässt (Richiardi et al., 2004).

Keimzelltumoren können an den unterschiedlichsten Orten im Körper auftreten (siehe Kapitel 1.2.8), dabei ist die häufigste Lokalisation testikulär. Die Inzidenz speziell für diese Untergruppe beträgt 6-7/100 000. Sie stellen 60% aller malignen Neoplasien im Alter von 15-34 Jahren dar (Nuti et al., 2009).

Für die Entwicklung von Keimzelltumoren stehen einige Risikofaktoren zusätzlich zum Kryptorchismus in der Diskussion, wie zum Beispiel ein Keimzelltumor in der Anamnese, positive Familienanamnese und Hodenfehlbildung (Motzer et al., 2012).

Das klinische Erscheinungsbild und der Verlauf dieser Tumorentität ist abhängig von Faktoren wie Geschlecht des Patienten, Alter zum Zeitpunkt der Vorstellung in der Klinik, Lokalisation und Histologie des Tumors sowie der Höhe der Tumormarker im Serum (Alpha-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), Lactatdehydrogenase (LDH)).

Bemerkenswerte Geschlechtsunterschiede liegen in der Inzidenz: 20 % der Ovarial-Neoplasmen sind Keimzelltumoren (vs. 95% beim Hodentumor) und in der Malignität der Keimzelltumoren: im Ovar sind 90% der Keimzelltumoren benigne Dermoidcysten und nur ca. 6-8% der Neoplasien sind maligne (Tannenbaum and Madden, 2006), Im Hoden sind 50% der Keimzelltumoren Seminome und damit maligne, 30% sind Nicht-Seminome, der Rest sind gemischte Tumoren. (Motzer et al., 2012)

Die Eigenschaft der Keimzelltumoren des Hodens, eine niedrige Mutationsrate und häufige uniparentale Disomien zu besitzen, hat große Ähnlichkeit zu embryonalen Stammzellen (Looijenga et al., 2007). Uniparentale Disomien entstehen, wenn beide Chromosomen eines homologen Chromosoms von einem Elternteil stammen. Auch das Unvermögen der Keimzelltumoren, DNA-Reparatur zu betreiben, sowie ihre Eigenschaft, rasch in die Apoptose zu gehen, sind den embryonalen Stammzellen ähnlich (Looijenga et al., 2007).

### 1.2.2 Klassifikation

Keimzelltumoren sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sehr unterschiedliche Histopathologien, klinische Erscheinungsbilder und Prognosen besitzen. Deshalb fällt die Einteilung schwer. Die geläufigste Klassifikation ist die der WHO, sie ist in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: WHO-Klassifikation der Keimzelltumoren

- 
1. Tumoren **eines** histologischen Typs
    - a) Seminome
    - b) spermatozytisches Seminom
    - c) Embryonales Karzinom
    - d) Trophoblastischer Tumor
    - e) Dottersacktumor
    - f) Teratom
- } Nichtseminom
2. Tumoren **mehrerer** histologischer Typen (gemischt)
- 

Quelle: (Bahrami et al., 2007)(Oosterhuis and Looijenga, 2005)

---

Diese Einteilung wird oft nochmals in drei Gruppen der Keimzelltumoren (Germ Cell Tumor (GCT)) des Hodens vereinfacht (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Typ I GCT: Teratome und Dottersacktumoren (vor allem des Kindes)

Typ II GCT: Seminomatöse und nicht-seminomatöse GCT (meist junge Erwachsene)

Typ III GCT: spermatozytisches Seminom des älteren Mannes

### 1.2.3 GCT Typ I bis III

#### Typ I GCT

Typ I GCT machen nur ca. 3% aller malignen Entartungen bei Kindern unter 15 Jahren aus (Rescorla and Breitfeld, 1999). Sakrale Teratome, eine Unterart dieser Tumoren, sind jedoch die häufigsten soliden Tumoren von Neugeborenen (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Im Alter unter 3 Jahren kommen Typ I GCT in sowohl gonadalen als auch extragonadalen Regionen vor, während und nach der Pubertät jedoch ist die Lokalisation vorwiegend gonadal (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Für fast alle Tumoren dieser Gruppe existieren Marker (spezifisch sind  $\beta$ -HCG und AFP (Rescorla, 1999) ), die die Beurteilung des Resektionsgrades und eines möglichen Rezidivs erleichtern. Durch die Einführung der platin-



basierten Chemotherapie hat sich die Prognose bei diesen Tumorarten merklich gebessert (Rescorla and Breitfeld, 1999).

### Typ II GCT

Typ II GCT lassen sich sowohl klinisch als auch histologisch in Seminome und Nicht-Seminome einteilen. Treten Seminome im Ovar auf, werden sie Dysgerminome genannt, im Gehirn Germinome, nur im Hoden Seminome (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Typ II GCT kommen vorwiegend im Hoden vor, diese Unterkategorie bildet ihrerseits eine eigene Entität mit dem Namen Testicular germ cell tumor (TGCT); nur 5% der Typ II GCT liegen extragonadal (Russell et al., 2013). Die Inzidenz von TGCT in der kaukasischen Bevölkerung beträgt ca. 6-11/100.000 und ist in den letzten Jahrzehnten um ca. 3-6% pro Jahr gestiegen (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Für alle TGCTs ist der ätiologische Vorgänger das *Carcinoma in situ* (CIS) (Hoei-Hansen et al., 2005), auch Intratubular Germ Cell Neoplasia Unclassified (ITGCNU) (Mostofi et al., 1987) oder testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) genannt.

Aus der ITGCNU entwickelt sich nach der gängigen Hypothese ein Seminom. Ein Nicht-Seminom entsteht nur, falls die ITGCNU oder die Seminomzelle reprogrammiert und damit pluripotent gemacht wird. Im Alter verlieren ITGCNU-Zellen ihre Stammzellaktivität, worin ein möglicher Grund für das spätere Auftreten von Seminomen verglichen mit den Nicht-Seminomen liegt. Sowohl das CIS als auch Seminome sind mit dem embryonalen Stammzellmarker OCT3/4 alias Pou5F1 (s. unten) anfärbbar, was dafür spricht, dass sie neben den Zellen des embryonalen Carinomes die einzige bekannte Krebszellart mit ebenfalls pluripotenten Eigenschaften sind (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

### Typ III GCT

Spermatozytische Seminome kommen bei Erwachsenen mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren vor (die Altersspanne liegt zwischen 25 und 87). Mit einer Inzidenz von 0,2 pro 100.000 (Oosterhuis and Looijenga, 2005) ist dieser Tumor relativ selten, nur 1-2 % der Hodentumoren sind spermatozytische Seminome. Er ist durch Orchiektomie praktisch vollständig kurierbar, das Auftreten von Metastasen wird kritisch diskutiert wegen der Verwechslungsgefahr mit Seminomen. Die

einzigste Ausnahme bildet die Weiterentwicklung zu Sarkomen, die oft die Todesursache der jeweiligen Patienten darstellt. Mit Seminomen hat das spermatozytische Seminom allerdings nichts gemeinsam und ist somit keine Unterart davon. Beispielsweise leitet es sich nicht vom Vorläufer ITGCNU ab (Eble, 1994). Vom Seminom abgrenzbar sind spermatozytische Seminome mittels Immunhistochemie: Sie sind mit SSX, XPA, CHK2 anfärbbar, während sie keine KIT-, PLAP- oder OCT 3/4-Färbung aufweisen (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Dies deutet auch auf eine differenziertere Vorläuferzelle hin, die noch zur Spermatogenese fähig ist.

### **Therapiebezogene Einteilungen**

Die klinisch bedeutsamste Einteilung ist die Unterscheidung in Seminome und Nicht-Seminome. Hiervon hängt sowohl die Therapie als auch die zu erwartende Prognose des Patienten ab (Bray et al., 2006).

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass sich prä- und postpubertäre Keimzelltumoren in ihrer Biologie sowie ihrer Herkunft unterscheiden, weshalb man auch eine Unterteilung in diese Kategorien vornimmt. Beweise für die unterschiedliche Entwicklung sind das unterschiedliche Verteilungsmuster, die andersartige Genese und verschiedene Chromosomenaberrationen. Präpubertäre Tumoren sind eher aus Dottersacktumoren und Teratomen zusammengesetzt, während postpubertär Seminome, embryonale Karzinome und gemischte Keimzelltumoren vorherrschen. Weiterhin konnte die Assoziation postpubertärer Tumoren mit dem Vorläufer TIN (siehe unten) nicht für präpubertäre Keimzelltumoren gezeigt werden. Postpubertale Keimzelltumoren haben häufig ein verändertes Chromosom 12 (sie haben ein Isochromosom d.h. ein Arm wurde nach Verlust durch die exakte Kopie des anderen ersetzt mit Gewinn des kurzen Arms), präpubertäre Chromosomen sind jedoch meist diploid und zeigen keine Veränderungen des Chromosoms 12 (Bahrami et al., 2007).

### **1.2.4 Diagnose**

Erstlokalisierung eines Keimzelltumors ist bei der Mehrzahl der Patienten der Hoden (Schmoll et al., 2004). Die schmerzlose Hodenvergrößerung ist das wegweisende Leitsymptom. Klinisch-differentialdiagnostisch muss eine Epididymitis und eine Hodentorsion ausgeschlossen werden.

Die Diagnosestellung erfolgt in erster Linie anhand der Sonographie beider Hoden, bei dringendem Verdacht sind die weiteren diagnostischen Schritte, ein Blutbild mit Entzündungszeichen und die Tumormarker LDH, AFP oder  $\beta$ -HCG.

Bei histologischer Bestätigung durch Orchiektomie, wird die Diagnose vervollständigt durch Computertomographie von Thorax, Abdomen und Becken zur Metastasensuche. Ein Magnetresonanztomographie (MRT) sollte bei jüngeren Patienten bevorzugt werden.

### 1.2.5 Staging

Die Tumor Node Metastasis (TNM)-Klassifikation der Union international contre le cancer (UICC) ist eine der international am weitesten verbreiteten Klassifikationen zur Krebsprogression (Staging). Eine große Studie von 1997 zur Klassifizierung von Seminomen und Nicht-Seminomen anhand von prognostischen Faktoren (Group, 1997) wurde sowohl in die TNM-Klassifikation (s. Tabelle 1.4) als auch in die „American Joint Committee on Cancer staging systems“ (s. Tabelle 1.3) eingearbeitet.

Tabelle 1.3: Lugano-Klassifikation

Stage	pT	N	M	S
I	pT1–4	N0	M0	S0
IA	pT1	N0	M0	S0
IB	pT2–4	N0	M0	S0
IS	jedes pT/Tx	N0	M0	S1–3
II	jedes pT/Tx	N1–3	M0	S0
IIA	jedes pT/Tx	N1	M0	S0
IIB	jedes pT/Tx	N2	M0	S0
IIC	jedes pT/Tx	N3	M0	S0
III	jedes pT/Tx	jedes N	M1	S0-3

Quelle: (Gschwend, 2010)

Nach der Lugano-Klassifikation der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) werden die Patienten in drei Gruppen unterteilt: Eine Gruppe mit guter (5-Jahresüberleben bei 90%), eine mit intermediärer (5-Jahresüberleben 75%) und eine mit schlechter Prognose (5-Jahresüberleben bei 50%). Beim Seminom existiert keine schlechte Prognosegruppe (Gschwend, 2010).

Tabelle 1.4: TNM-Klassifikation

<b>pT<sub>x</sub></b> :	Keine Aussage über Primärtumor möglich
<b>pT<sub>0</sub></b> :	Kein Anzeichen eines Primärtumors
<b>pT<sub>is</sub></b> :	intratubulärer Keimzelltumor (Carcinoma in situ)
<b>pT<sub>1</sub></b> :	Tumor auf Hoden/Nebenhoden begrenzt, ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion, (Tunica vaginalis intakt)
<b>pT<sub>2</sub></b> :	Tumor auf Hoden/Nebenhoden begrenzt, mit Blut-/Lymphgefäßinvasion, (Tunica vaginalis befallen)
<b>pT<sub>3</sub></b> :	Tumor infiltriert den Samenstrang (ohne/mit Blut-/Lymphgefäßinvasion)
<b>pT<sub>4</sub></b> :	Tumor infiltriert das Skrotum (ohne/mit Blut-/Lymphgefäßinvasion)
<b>N<sub>x</sub></b> :	Keine Aussage über regionale Lymphknoten (LK) möglich
<b>N<sub>0</sub></b> :	Keine Lymphknotenmetastasen vorhanden
<b>N<sub>1</sub></b> :	solitäre oder multiple LK, max. 2cm in größter Ausdehnung, max 5 LK befallen.
<b>N<sub>2</sub></b> :	multiple regionäre LK (>5) oder Lymphknotenkonglomerat 2-5cm in größter Ausdehnung oder extranodale Tumorausbreitung
<b>N<sub>3</sub></b> :	Lymphknotenkonglomerat >5cm in größter Ausdehnung
<b>M<sub>x</sub></b> :	Keine Aussage über Fernmetastasen möglich
<b>M<sub>0</sub></b> :	Keine Fernmetastasen vorhanden
<b>M<sub>1a</sub></b> :	nichtregionäre LK-oder Lungenmetastasen
<b>M<sub>1b</sub></b> :	andere Fernmetastasen
<b>S<sub>x</sub></b> :	Keine Serumtumormarker gemessen oder vorhanden
<b>S<sub>0</sub></b> :	alle Serumtumormarker in der Norm
<b>S<sub>1</sub></b> :	Serumtumormarker erhöht: AFP < 1.000ng/ml und $\beta$ -HCG < 5.000 ml.E./ml und LDH < 1,5 x Normwert
<b>S<sub>2</sub></b> :	Serumtumormarker: AFP 1.000-10.000 ng/ml oder $\beta$ -HCG < 5.000-50.000 ml.E./ml oder LDH 1,5-10 x Normwert
<b>S<sub>1</sub></b> :	Serumtumormarker: AFP > 10.000ng/ml, oder $\beta$ -HCG > 50.000 ml.E./ml oder LDH > 10 x Normwert
Quellen:(Haag et al., 2013), modifiziert nach (Bahrami et al., 2007)	

## 1.2.6 Therapie

Vor einer Therapie sollte bei fertilen Männern mit bestehendem Kinderwunsch eine Kryokonservierung von Samenflüssigkeit standardmäßig angeboten werden (Ragni et al., 2003). Bei markerpositiven Patienten ist die Verlaufskontrolle von AFP,  $\beta$ -HCG und LDH der wichtigste Parameter für klinisch-therapeutischen Erfolg.

Die Primärtherapie einer suspekten Raumforderung im Hoden besteht in erster Linie in der Orchiektomie und der histologischen Klassifikation des Präpa-

rats (Schmoll et al., 2004). Die European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG) empfiehlt zusammen mit der Orchiektomie eine kontralaterale Biopsie des Hodens mit dem Patienten zu diskutieren, vor allem bei Hochrisikopatienten für eine TIN (Evidenzebene IIB) (Krege et al., 2008). Falls eine Biopsie durchgeführt wird, ist der diagnostische Mehrwert einer doppelten Biopsie 18%, die Detektionswahrscheinlichkeit wird dadurch auf über 99% erhöht (Dieckmann et al., 2007). Die Biopsie steht allerdings aktuell in der Kritik, da eine Studie von Kier et al. (Kier et al., 2015) keinen signifikanten Unterschied der kumulativen Inzidenz von metachronen Hodentumoren mit und ohne Biopsie zeigt.

Seminome sind hoch strahlensensibel, sprechen jedoch auch auf Chemotherapie an. Eine randomisierte Studie bei Hodentumorpatienten von der European organization for Research and treatment of cancer (EORCT) und dem Medical research council (MRC) hat bei einer großen Patientenzahl und reinen Seminomen im Stadium I die Strahlentherapie mit der Standard-Carboplatintherapie verglichen. Nach 5-jähriger Nachbeobachtungszeit zeigte die rezidivfreie Überlebenszeit keinen signifikanten Unterschied (96% versus 94,7%), allerdings wurde die Chemotherapie von den Patienten deutlich besser toleriert (Oliver et al., 2005).

Bei Nichtseminomen ist therapeutisch meist eine Cisplatin-haltige Chemotherapie erforderlich.

Die Wahl jeglicher Therapie erfolgt nach dem Staging. Die Therapieentscheidung sollte dabei nicht nur unter dem Gesichtspunkt der kurzfristigen Tumorbekämpfung erfolgen, denn neue Studien zeigen als Spätfolgen von Chemo- oder Strahlentherapie Zweitmalignome. Diese betreffen vor allem im Strahlenfeld liegende Organe oder sind Knochenmarksmalignome als Folge der Chemotherapie. 16% der Patienten entwickeln beispielsweise nach Strahlentherapie ein Magenkarzinom (Hallemeier et al., 2014). So ist das Zweitmalignomrisiko höher als das initiale Rezidivrisiko von Seminomen im Stadium I (Lewinshtein et al., 2012). Da Seminome im Durchschnitt junge Patienten betreffen, ist eine Zweittumorerkrankung als Therapiefolge besonders bedeutend.

Nichtsdestotrotz ist der Erfolg der Primärtherapie von Hodentumoren beeindruckend: Die 5-Jahres-Überlebensraten haben sich seit 1993 kontinuierlich gesteigert. Wurde bei den 15 bis 29-jährigen Seminom-Patienten in Europa im Zeitraum zwischen 1993 bis 1997 eine 5-Jahres-Überlebensrate von 95,4% ermittelt, so ist sie 2003-2007 auf 99% gestiegen. (Für Nicht-Seminompatienten stieg die 5-Jahres-Überlebensrate von 93,4% auf 94,8%) Die Altersgruppe der 50 bis 85-jährigen profitierte am meisten vom Therapiefortschritt: Im Zeitraum zwischen 1993-1997 wurde die 5-Jahres-Überlebensrate von 87,1% gemessen, die 2003-

2007 um 6,6 Prozentpunkte auf 93,7% gestiegen ist (Verhoeven et al., 2012).

### 1.2.7 Chromosomenaberrationen

Mit den verschiedenen Typen der Keimzelltumoren in Tabelle 1.2 gehen spezifische Chromosomenaberrationen einher.

Typ I GCT haben unterschiedliche Ausprägungen von Chromosomenaberrationen. Teratome besitzen ein überwiegend normales Chromosomenmuster, während Typ I Dottersacktumoren aneuploid sind. Der Verlust der Chromosomen 1p, 4 und 6q und der Erwerb von 1q, 12(p13) und 20q sind die Chromosomenveränderungen mit der größten Signifikanz für Dottersacktumoren (Schneider et al., 2001).

Bei Typ II GCT, also Seminomen und Nicht-Seminomen, sind häufige Chromosomenaberrationen der Erwerb von Chromosom 7, 8, 12p und X und der Verlust der Chromosomen 4, 5, 11, 13, 18 und Y (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Die einzige strukturelle Aberration, die vorzufinden ist, ist das Isochromosom 12. Das heißt, Chromosom 12 hat einen Arm verloren, der durch eine exakte Kopie des anderen ersetzt wurde.

Extratestikulär gelegene Seminome sind vorwiegend diploid, wohingegen testikulär gelegene Seminome über einen hypertriploiden Chromosomensatz verfügen. Nicht-Seminome haben in allen Fällen einen hypotriploiden Satz von Chromosomen (Oosterhuis et al., 1989).

Typ III spermatozytische Seminome hingegen weisen häufig einen Erwerb des Chromosoms 9 auf (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

In der sogenannten GWAS-Analyse (Litchfield et al., 2015) wurde der neue Locus 3q25.31 für Hodentumore entdeckt. Männer mit einem bestimmten Risikoprofil (Kombination von 19 wesentlichen Genmutationen) wiesen ein 8,7-faches Risiko für Hodentumoren auf. Da dies unter dem 10-fach erhöhten Risiko liegt, ist ein genetisches Screening nicht empfehlenswert (Litchfield et al., 2015). Der molekularbiologisch auffällige Erwerb des X-Chromosoms liegt in Seminomen, Nicht-Seminomen und spermatozytischen Seminomen vor. Zellen mit vermehrter X-Chromosomenanzahl weisen eine vermehrte Expression des XIST-Gens auf, was bei Männern dazu führt, dass multiple X-Chromosomen inaktiviert werden (Looijenga et al., 1997).

### 1.2.8 Vorläuferzellen und ihre Entwicklung

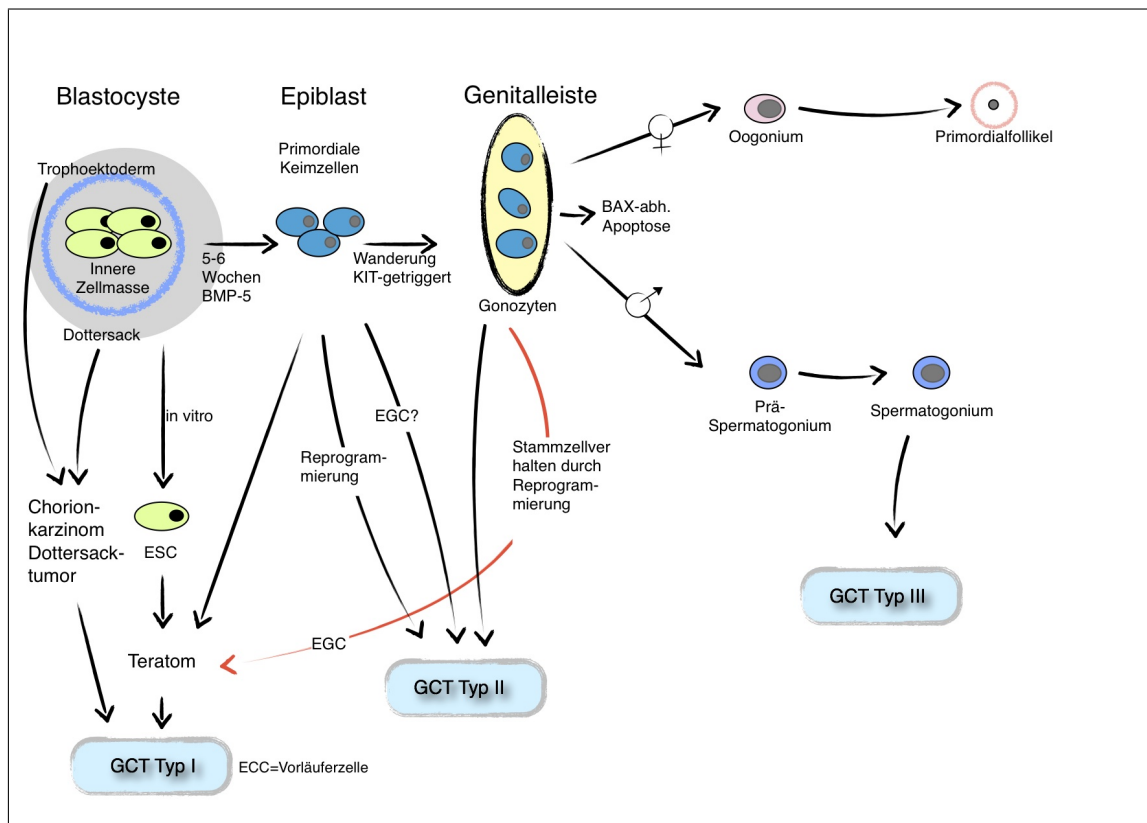


Abbildung 1.1: Keimzellentwicklung, Eigenmodifikation nach (Masters and Köberle, 2003),(Nuti et al., 2009),(Oosterhuis and Looijenga, 2005)

Um Keimzelltumoren, ihre Lokalisation und Herkunft nachvollziehen zu können, ist es hilfreich, einen kleinen Einblick in ihre Entwicklung und Vorläuferzellen zu gewinnen.

Ein Anteil von 5% (Oosterhuis and Looijenga, 2005) der Keimzelltumoren befinden sich nicht nur im Hoden beziehungsweise (bzw.) Ovar, sondern auch im Bereich des Hypothalamus und der Epiphyse, im Mediastinum und im Retroperitoneum (Looijenga and Oosterhuis, 2002). Dies entspricht der embryonalen Wanderung der Genitalanlage vom Dottersack zur Genitaleiste.

Als erster Schritt in der Embryogenese findet eine Differenzierung in die innere Zellmasse und das Trophoektoderm statt. Dass die Zellen der inneren Zellmasse vor Implantation noch pluripotent sind, beweist unter anderem die Expression des Stammzellmarkers Octamer binding transcription factor, auch POU5F1 (OCT 3/4) (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Werden diese embryonalen Stammzellen (Embryonal stem cell (ESC)) in ein syngenes Tiermodell transplantiert, entwickeln sich Teratome als Ausdruck der Pluripotenz.

Ab der 5.-6. Woche sind beim Menschen primordiale Keimzellen (Primordial germ cells (PGC)), die sich aus dem Epiblast (dem Vorläufer der embryonalen Stammzellen) entwickeln, nachweisbar. Die Differenzierung der primordialen Keimzellen hängt von unterschiedlichen Signalen wie BMP-4 (Bone morphogenic protein) und anderen ab. Diese werden vom extraembryonalen Ektoderm gebildet (Surani, 2001).

Reprogrammierte primordiale Keimzellen können in einer Mauslinie Keimzelltumoren bilden. Sie werden deshalb als Modellsystem für humane Keimzelltumoren herangezogen (Pierce et al., 1967).

Diese primordialen Keimzellen wandern entlang der Körpermittellinie durch das Rektum zur Genitalleiste und teilen sich unterdessen ständig. Dies wird durch den Signalweg des Stammzellsfaktors KIT getriggert. Sind sie in der Gonadenanlage angekommen, heißen sie Gonocyten. Je nach Geschlechts-Chromosomen differenzieren sie weiter in entweder Oozyten oder Prä-Spermatogonien (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Primordiale Keimzellen, die extragonadal lokalisiert sind, gehen in die BAX-abhängige Apoptose. 50% der pädiatrischen Keimzelltumoren sind extragonadal und werden auf Fehler dieser BAX-abhängigen Apoptose zurückgeführt (Stallock et al., 2003). Primordiale Keimzellen können in der Maus bis Tag 12,5 isoliert werden und dann als pluripotente embryonale Keimzellstammzellen (EGC) weiter gezüchtet werden (Matsui et al., 1992).

EGCs werden als Vorläuferzellen der Seminome diskutiert, die aus uniformen Tumorzellen bestehen und primordialen Keimzellen ähneln. Nicht-Seminome enthalten dagegen oft mehrere histologische Subtypen in verschiedenen embryonalen Stadien, hier bilden embryonale Karzinomzellen (embryonal carcinoma cells, ECC) die Stammzellkomponente, die sich in verschiedene Gewebe differenzieren können. (Teratom, Dottersacktumor und Chorionkarzinom)

Eine Theorie, warum TGCT-Zellen eine so einzigartige Biologie besitzen, leitet sich aus ihrer Aufgabe her. Keimzellen sind die einzigen Zellen, die sowohl Meiose als auch Mitose durchmachen. Damit sind andere und häufigere Regulationsmechanismen und Reparatursysteme erforderlich (Rajpert-De Meyts, 2006).

### 1.2.9 Carcinoma in situ

Ein Meilenstein für das Verständnis von Keimzellneoplasien wurde mit der ersten Beschreibung des testikulären CIS gesetzt (Skakkebak (Nielsen et al., 1974)).



Die von ihm beschriebenen Zellen wurden schon früher entdeckt, jedoch nie als Vorläufer von Keimzelltumoren beschrieben, wie von Skakkebæk erstmals geschehen.

Weitere Bezeichnungen wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vorgeschlagen:

TIN (Testikuläre intraepitheliale Neoplasie, hier weiterhin verwendet) (Loy und Dieckmann, 1990 (Loy and Dieckmann, 1990)), IGCN (Intratubular germ cell neoplasia) oder auch ITGCNU (Intratubular germ cell neoplasia unclassified) (Ulbright et al., 1999 (Ulbright, 1999)) und Gonocytom *in situ* (Grigor, 1993 (Grigor, 1993)). Klinische Beweise für die Theorie, dass diese Läsion Vorläufer der Keimzelltumoren ist, bieten die Patienten, die ein erhöhtes Risiko für einen Keimzelltumor haben. Sie weisen auch ein erhöhtes Risiko für TIN auf: Patienten mit Kryptorchismus haben ein 2%–4%-iges Risiko (Giwerzman et al., 1989; Rogers et al., 1998), Patienten mit Oligospermie ein 0–1.1%-iges Risiko (Bettocchi et al., 1994; Giwerzman et al., 1997) und der kontralaterale Hoden von Patienten mit Keimzelltumor hat ein 5%–6%-iges Risiko für eine TIN (Hoei-Hansen et al., 2005; Harland et al., 1998). Im Vergleich dazu beträgt die Prävalenz für TIN in Deutschland bei gesunden Männern nur 0,43% , was mit dem deutschen Lebenszeitrisko eines Keimzelltumors einhergeht (Linke et al., 2005).

Diese Zahlen verdeutlichen, dass ein erhöhtes Risiko für einen Keimzelltumor mit einem erhöhten Risiko für TIN einhergeht.

Patienten mit Androgenresistenz, deren Symptome auch den Kryptorchismus beinhaltet, sowie Patienten mit idiopathischer Unfruchtbarkeit, Trisomie 21 und niedrigem Geburtsgewicht haben auch ein erhöhtes Risiko für TIN (Rajpert-De Meyts et al., 1998). Eine dänische Studie an 399 Männern zeigt, dass 0,8% davon eine TIN aufweisen. Dies entspricht genau dem dänischen Lebenszeitrisko, an Hodenkrebs zu erkranken (Giwerzman et al., 1991).

Die Tatsache, dass TIN von so vielen unterschiedlichen Faktoren abhängt sowie der allgemeine Anstieg von TIN in vielen Ländern deutet auch auf einen Umwelteinfluss hin, der möglicherweise die Zellen genetisch prädisponierter Patienten noch weiter schädigt (Rajpert-De Meyts et al., 1998).

Das spermatozytische Seminom (GCT Typ III) leitet sich nicht von TIN ab, sondern von einer Keimzelle, die zum Teil paternell genomisches Imprinting vorweist (Oosterhuis and Looijenga, 2005), das heißt, dass das väterliche Allel vor allem durch Methylierung der DNA alleinig aktiv ist.

Für die präpubertären Keimzelltumoren (GCT Typ I) wird TIN als Vorläufer kontrovers diskutiert. Zytogenetische Studien legen eine unterschiedliche Pathogene-

se sowohl für präpubertäre und postpubertäre Keimzelltumoren (GCT Typ II) als auch für spermatozytische Seminome nahe (Bahrami et al., 2007; Tannenbaum and Madden, 2006).

Nicht jede TIN entwickelt sich schlussendlich auch zu einem Tumor: Das Risiko, dass eine TIN entartet, beträgt in 5 Jahren 50% und in 7 Jahren 70% (Tannenbaum and Madden, 2006).

### 1.2.10 Das klassische Seminom

Das Seminom ist die häufigste maligne testikuläre Neoplasie. 40-55% aller Keimzelltumoren sind reine Seminome, weitere 15% sind Teil eines gemischtzelligen Tumors. Gemischtzellige Tumoren bestehen aus mindestens zwei Keimzelltumortypen und entsprechen ca. 35-45% der Keimzelltumoren (Tannenbaum and Madden, 2006). Das heißt, es gibt keinen Keimzelltumortyp, der so häufig rein vorkommt wie das Seminom.

Als „Tumor des jungen Erwachsenen“ hat es seinen Altersgipfel grob zwischen 25 und 50 Jahren, ist also sehr untypisch bei Kindern und nach der 5. Dekade. Klinisch präsentiert es sich meist mit einer Hodenvergrößerung (70%), z.T. assoziiert mit leichten, ziehenden Schmerzen.

Marker im Blut sind die Serum-Placenta-alkalische Phosphatase (PLAP), das  $\beta$ -HCG (das nur in ca. 8-10% erhöht ist (Tannenbaum and Madden, 2006)) und die LDH. Zusammengenommen zeigen nur ca. 60% der Patienten mit Hodentumor eine Erhöhung dieser Marker (Syring et al., 2015). Ein neuer, noch nicht in die Routine eingeführter Serummarker vornehmlich für Seminome ist der MicroRNA 371-3-Komplex (Spiekermann et al., 2015; Syring et al., 2015). Die Expression korreliert dabei eindeutig mit dem Vorhandensein des Tumors, nach weiteren Validierungsstudien könnte dieser Marker in die Routine eingeführt werden.

### Histologie

Seminome sind homogene insel- oder strangförmig angeordnete Zellen mit klarem Zytoplasma. Diese Zellhaufen sind umgeben von fibrovaskulärem Gewebe, das meist von T-Lymphozyten infiltriert ist. In 8-10% der Fälle finden sich synzytiotrophoblastische Riesenzellen, die mit erhöhtem  $\beta$ -HCG einhergehen.

Die Zellen enthalten Glycogen, das mit PAS (Periodic acid Schiff) angefärbt werden kann.

### Ätiologie

8,5% der Seminome gehen mit Kryptorchismus einher (Tannenbaum and Madden, 2006), der ein Ergebnis von endogenen oder exogenen Einflüssen sein soll, die die Hodenentwicklung vor allem *in utero* beeinträchtigen.

Besonders der Einfluss von Fremddöstrogenen als Störfaktoren für körpereigene Hormone spielt hier eine Rolle (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Tierversuche zeigen, dass die Gabe von Diethylstilbestrol (DES), einem selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulator, Kryptorchismus und andere Hodenanomalien hervorruft (Henderson et al., 1988). Aber auch bei übergewichtigen Schwangeren werden höhere (endogene) Östrogenlevel gemessen, was zu einem höheren Risiko ihrer Söhne für Hodentumoren führt. Hier ist vor allem das freie, nicht proteingebundene Oestradiol erhöht (Henderson et al., 1988). Hohe Testosteronspiegel hingegen senken das Risiko, an einem TGCT zu erkranken (McGregor et al., 1995).

## 1.3 Zellkultur

Hodenzellen besitzen die Kapazität zur Pluripotenz. Erstmals gelungen ist der Pluripotenz-Nachweis in spermatogonalen Stammzellen (in Kultur *multipotente adulte Keimlinien-Stammzellen* genannt) von Mäusehoden Guan et al. (Guan et al., 2006). Die Zellen zeigten in Kultur die Eigenschaft, sich in alle drei Keimblätter differenzieren zu können. In immundefizienten Mäusen bildeten sich nach Einspritzen der Zellen Teratome.

Würde diese Möglichkeit auch mit humanen spermatogonalen Stammzellen bestehen, so könnte eine individuelle stammzellbasierte Therapie ohne die ethischen Probleme einer embryonalen Stammzelltherapie angeboten werden.

### Kultur von Seminomzellen

Der Versuch in Studien Seminome in Kultur zu nehmen, blieb in der Regel erfolglos. Die Seminome starben nach ca. 3 Tagen Kultur ab (Berends et al., 1991). Eine

stabile Seminomzelllinie konnte bisher nur durch Mizuno et al. generiert werden (Mizuno et al., 1993). So gilt Tcam als einzige Linie, die in einem relativ einfachen Kultur-Medium gezüchtet und charakterisiert werden kann. Allerdings sind Informationen über den Spender des Gewebes nicht bekannt, was als Grundlage für die vielen darauf aufbauenden Studien unzureichend erscheint.

Andere vielversprechende Linien wie z.B. JKT-1 (Kinugawa et al., 1998) stellten sich im Nachhinein als nicht seminom-ähnliche Linien heraus (de Jong et al., 2007). Eine weitere stabile Seminomlinie bzw. Methoden, die zu einem längeren Überleben der Zellen in Kultur führen, wären deshalb in diesem Forschungsgebiet wünschenswert.

## 1.4 Seminomzellmarker zur Charakterisierung

Es gibt eine steigende Anzahl sehr verschiedener Marker, mit denen die Differenzierung in verschiedene Stadien und unterschiedliche Entitäten erleichtert werden soll. Dazu gehören sowohl Marker der Zelloberfläche (PLAP und c-KIT) als auch solche, die mit Pluripotenz assoziiert sind (NANOG und OCT3/4). Die für diese Studie maßgeblichen werden im Folgenden beschrieben.

### c-KIT (CD117)

Dieses Gen codiert für einen membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor mit dem Ligand *stem cell factor* (SCF), welcher besonders wichtig für das frühe Keimzellüberleben ist, was erstmals an mutanten Mäusen herausgefunden wurde (Yarden et al., 1987).

Nach einer Studie von Strohmeyer et al. (Strohmeyer et al., 1995) befindet sich der c-KIT-Rezeptor auf humanen Keimzellen, während der Ligand in Sertolizellen vorliegt. Dies lässt darauf schließen, dass c-KIT in ein lokales Regulationssystem der Spermatogenese involviert ist. Zusätzlich wurde eine c-KIT Expression im Seminom gefunden, das Nicht-Seminom besaß im Unterschied dazu keine Expression dieses Markers.

Weiterhin kommt c-KIT auch in TIN-Zellen vor, was ihn zu einem brauchbaren Marker für diese Vorläuferläsion macht und die Hypothese unterstützt, dass sich Semineome daraus entwickeln und von primordialen Keimzellen abstammen. Diese Studie fand allerdings keine Expression von c-KIT in testikulären Keimzellen (Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994).

Die Frage, ob c-KIT nun in testikulären Keimzellen vorliegt oder nicht, wurde durch die Studie von Jørgensen et al. (Jørgensen et al., 1995) 1995 geklärt: Hier wurde eine hohe Expression von c-KIT im ersten Drittel der Gestation festgestellt, die dann langsam herunterreguliert wird. Doch mit der Verbesserung der immunhistochemischen Detektion von c-KIT wächst auch der Verdacht, dass dieser Marker nicht zur alleinigen Unterscheidung von CIS und nicht-neoplastischen Keimzellen herangezogen werden kann. Die Arbeitsgruppe Biermann et al. (Biermann et al., 2012) fand 2012 heraus, dass sowohl CIS als auch nicht-neoplastische Spermatozoen angefärbt wurden.

### **D 2-40 (M2A)**

Um die Differentialdiagnose von Keimzelltumoren zu erleichtern, entwickelten Bailey et al. (Bailey et al., 1986) 1986 einen monoklonalen Antikörper, genannt M2A. In dieser Studie reagierte M2A mit fetalen Keimzellen der Tubuli seminiferi, jedoch nicht mit den entsprechenden adulten Zellen. Weiterhin können damit Seminome, jedoch keine anderen Entitäten der Hodentumoren angefärbt werden. Weniger stark, doch auch positiv wurden Dysgerminome des Ovars gefärbt. Weiterhin fanden Bailey et al. (Bailey et al., 1991) später heraus, dass mit M2A auch intratubuläre maligne Keimzellen (wird in dieser Publikation so benannt, entspricht heute wohl der ITGCNU) angefärbt wurden, was sie die ersten Rückschlüsse auf die Pathogenese der Keimzelltumoren ziehen ließ. Auch die Tatsache, dass keine embryonalen Karzinome angefärbt wurden, konnte zeigen, dass Seminome eher aus den oben genannten intratubulären malignen Keimzellen entstehen als embryonale Karzinome. Fetale Hodenzellen werden von M2A besser angefärbt als von c-KIT, sodass dieser Marker in diesem Bereich als nützlicher eingestuft wird (Jin et al., 2010). Es wird vermutet, dass M2A identisch mit dem transmembranen Glycoprotein gp36 (auch Podoplanin, Aggrus oder T1A) ist. Daher lassen sich auch Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen, da diese bei gp36 bekannt ist. Wahrscheinlich spielt es eine Rolle in der Hodenentwicklung- genauer in den Zell-Zell-Interaktionen zwischen prämeiotischen Keimzellen und unreifen Sertolizellen (Sonne et al., 2006).

### **NANOG**

NANOG (von Tír na nÓg, irisch: „Land der ewigen Jugend“) (NANOG) ist ein Gen, das vor allem mit Pluripotenz in Verbindung gebracht wird. Zusammen mit OCT

3/4 verhindert es die weitere Differenzierung einer Zelle, um so einen Grundbestand von undifferenzierten Zellen zu sichern, aus dem sich das Gewebe erneuern kann. Außer in der frühen Embryonalentwicklung kann man eine hohe Expression von NANOG in primordialen Keimzellen, Gonozyten, Carcinoma *in situ*, Seminomen und embryonalen Karzinomen finden (Rajpert-De Meyts, 2006).

Die hohe Expression von NANOG in Zellen des Carcinoma *in situ* könnte eine Erklärung für deren Fähigkeit zur Reprogrammierung in pluripotente embryonale Karzinome sein. NANOG liegt auf dem Chromosom 12p13, neben weiteren für Keimzelltumoren wichtigen Markern (wie STELLAR). Dieser Locus ist bekannt für strukturelle Chromosomenveränderungen, die mit der Bildung von Keimzelltumoren assoziiert sind (Clark et al., 2004).

### **OCT 3/4 (POU5F1)**

Der Marker OCT 3/4 ist ein Transkriptionsfaktor. Während der normalen Zellentwicklung ist er an der Regulation der Pluripotenz beteiligt und in embryonalen Stamm- und Keimzellen nachweisbar.

Nach einer Studie von Looijenga et al. (Looijenga et al., 2003) ist dieser Marker geeignet, um Pluripotenz in Hodentumoren nachzuweisen. Der Nachweis von OCT 3/4 in TIN, Seminom/ Germinom/ Dysgerminom und embryonalem Karzinom deckt sich mit dem aktuellen Wissen, dass diese Entitäten die einzigen Keimzelltumoren sind, die Pluripotenz (oder das Potential dazu) besitzen. Der Nachweis ist den Autoren zufolge unabhängig davon, ob der Tumor selbst sensitiv oder nicht sensitiv für Chemotherapie ist (Rajpert-De Meyts et al., 2004). Auch weitere Studien, die Microarray-Vergleiche anstellten, kamen zu dem Ergebnis, dass POU5F1 signifikant hoch in ESC und Embryonal carcinoma cell (ECC) und Seminomen exprimiert wird, nicht aber in Dottersacktumoren, somatischen Tumorproben oder normalem Hodengewebe. Auch sie folgern daraus eine wichtige Funktion für die Pluripotenz (Sperger et al., 2003).

Auf zellulärer Ebene kann OCT 3/4 bis zum 14. Lebensmonat bei Kindern mit dysgenetischen Gonaden und Intersexualität nachgewiesen werden. Auch in primordialen Stammzellen während ihrer Migration in die Genitalleiste und in der indifferenten Gonadenanlage kann OCT 3/4 detektiert werden. Nachweisbar ist es noch etwa 3-4 Monate postnatalen Alters, die Expression nimmt jedoch schon langsam in den ersten 20 Tagen der Gestation und danach stetig ab. Dies steht im Zusammenhang mit der Umwandlung der Gonozyten in infantile Spermatogonien, die auch ca. 3-4 Monate postnatal stattfindet.

Im Ovar kommt OCT 3/4 nur im Primordialfollikel, jedoch nicht mehr im Primärfollikel vor (Rajpert-De Meyts et al., 2004).

Andere Daten zeigen, dass Mäuse, deren OCT 3/4-Expression in primordialen Keimzellen ausgeschaltet ist, eine wesentlich (bis 70%) höhere Apoptoserate der primordialen Keimzellen mit konsekutiver Infertilität entwickeln. Die Autoren stellen die Funktion des Markers im Zusammenhang mit Pluripotenz in Frage. Allerdings könnte durch Fehlen von OCT 3/4 auch eine Differenzierung der Zellen und darauf folgend die Apoptose eingeleitet werden (Kehler et al., 2004).

### **PLAP (ALPP)**

PLAP ist eine gewebespezifische Phosphatase mit unbekannter biologischer Funktion. Nachdem sie fast 30 Jahre in Vergessenheit geraten war, fanden Beckstead et al. (Beckstead, 1983) 1983 heraus, dass neoplastische Keimzellen in allen Fällen von Seminom und embryonalem Carcinom diese Phosphatase-positiv färbten. Nicht angefärbt werden Chorionkarzinome und Teratome. Somit kann dieser Marker sinnvoll für die Differentialdiagnose von Keimzelltumoren eingesetzt werden (Beckstead, 1983). Auch in der prä-mordialen Keimzelle, im Gonozyt und im Carcinoma *in situ* ist PLAP zu finden.

### **TERT**

TERT kodiert für eine katalytische Untereinheit des *TE*lomerase-*Reverse-Trans*kriptase-Komplexes (Turnbull et al., 2010). Bei jeder Zellteilung verliert eine Zelle terminale Sequenzen ihrer DNA. Die Telomerase versucht dem entgegenzuwirken, indem sie Sequenz-Wiederholungen (Repeats), zum Beispiel (z.B.) TTAGGG an die Telomere anbaut. Wenn die Telomere verkürzt bleiben, ist dies mit Geninstabilität und Neoplasien assoziiert. TERT ist in vielen Krebszellen reaktiviert und verlängert so die Lebensspanne von diesen Zellen.

Dieses Gen, das dem Locus 5p5 zugeordnet wird, steht in der Diskussion, für die hohe Cis-Platin-Sensitivität von Seminomen verantwortlich zu sein; beim Ovarialkarzinom ist dies bereits nachgewiesen (Turnbull et al., 2010).

In der Embryonalentwicklung besitzt TERT eine hohe Expressionsrate, während keine Expression in normalen adulten somatischen Zellen vorliegt. Gewebe, die TERT exprimieren, sind testikuläre Keimzellen und Seminome, während gut differenzierte Keimzelltumoren wie Teratome fast keine TERT-Expression aufweisen

(Schrader et al., 2002). Außerdem stellt eine Variante im TERT-CLPTM1L-Gen eine Prädisposition für sowohl familiäre als auch bilaterale Keimzelltumoren dar. Daraus lässt sich schließen, dass familiäre testikuläre Keimzelltumoren und sporadische Keimzelltumoren einen gemeinsamen genetischen Ursprung besitzen (Kratz et al., 2011).

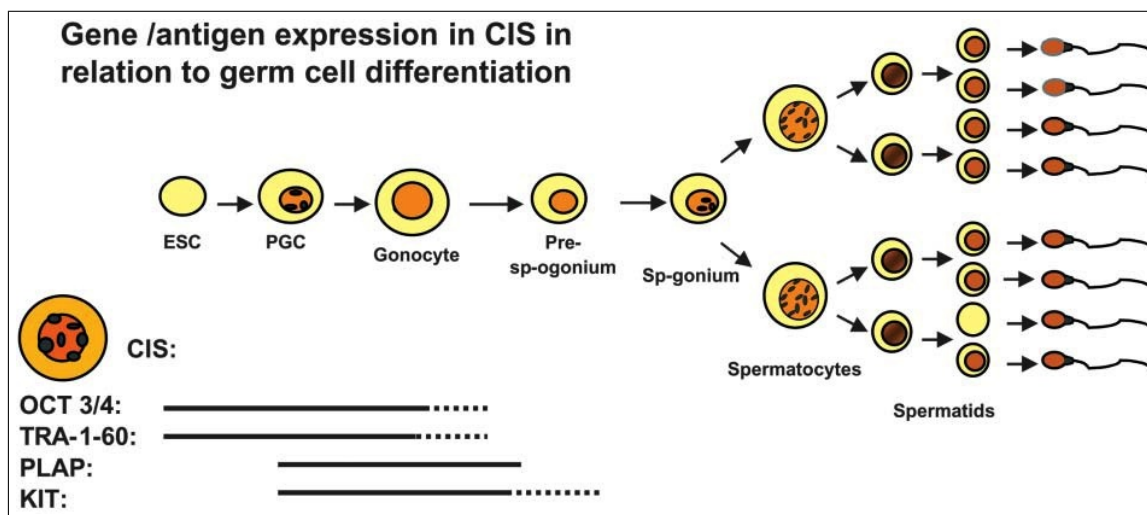


Abbildung 1.2: Expressionsmuster in TIN, Quelle:(Rajpert-De Meyts et al., 2003)

Die Abbildung verdeutlicht die Antigenexpression von OCT 3/4, c-KIT und PLAP während der Keimzelldifferentiation.

## 1.5 Bax und Bcl2 als Apoptosemarker

Um zu überprüfen, ob die in Kultur genommenen Seminome wachsen oder dem programmierten Zelltod, der Apoptose, unterliegen, werden zwei Apoptose-Gene zum Nachweis herangezogen. Sie stammen beide aus der Bcl-Familie: Der Apoptoseförderer Bax und der Apoptosehemmer Bcl2 (Jacobson, 1997).

Die stattfindende Apoptose ist somit ein Gleichgewicht, das sich unter anderem in diesen beiden Faktoren widerspiegelt und durch Bildung des Quotienten

$$\text{Apoptoserate} = \frac{Bax}{Bcl2}$$

in Relation gesetzt werden kann. Damit können Aussagen über die stattgefundenene Apoptose getroffen werden.



## 1.6 Lymphozyten und EBV

Der Nachbarbereich im Gewebe um Seminome hat verglichen mit dem Nachbarbereich von Nicht-Seminomen signifikante Unterschiede. Lymphozyteninfiltrate sind häufiger peri- (80% vs 60%) und intratubulär (68% vs 30%), weiterhin ist TIN weniger oft vorhanden (85% versus (vs) 97%) und kommt in geringerer Menge vor (26% vs 32%) (Oosterhuis et al., 2003). Die Autoren sehen den Grund für das deutlich weniger vorkommende TIN des Seminoms in der durch das invasive Wachstum hervorgerufenen Immunantwort, die bis zur klinischen Vorstellung bzw. chirurgischen Intervention des Patienten nicht nur Teile des Seminoms eliminiert, sondern auch die TIN angreift (Oosterhuis et al., 2003).

Das intra-/ peritubuläre Lymphozyteninfiltrat von Seminomen kann einen erheblichen Zellanteil betragen (Fend et al., 1995). Es ist deshalb wichtig, bei dem Versuch eine Seminomlinie zu züchten, die Kultur von CD20 bzw. CD45-positiven Lymphozyten auszuschließen. Diese beiden Marker können verwendet werden, um Lymphozyten zu identifizieren.

CD45 ist eine rezeptorassoziierte Tyrosinphosphatase, die auf sämtlichen Leukozyten exprimiert wird und eine wesentliche Rolle in der Funktion dieser Zellen spielt (Altin and Sloan, 1997). Weiterhin stellt sich die Frage, ob diese B-Lymphozyten EBV-infiziert sind und man somit von einer lymphozytoblastischen Transformation der Zellen ausgehen kann, die durch EBV induziert wird (Carter et al., 2002). Eine Infektion des Seminoms selbst durch EBV wurde von Fend et al. (Fend et al., 1995) ausgeschlossen. Es ist also davon auszugehen, dass der Nachweis von EBV-infizierten Zellen auf eine lymphozytoblastische B-Zelllinie deutet.

## 1.7 Fragestellung der vorgelegten Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die prospektive Isolation, Kultur und weitere Charakterisierung von Seminomzellen.

Die Kultur von Seminomzellen ist, wie in der Einleitung aufgezeigt, durch ihre genetische Ähnlichkeit mit Stammzellen für die Forschung einerseits wichtig und andererseits bei sehr labilen Zellen eine große Herausforderung, weshalb es bisher nur Mizuno et al. (Mizuno et al., 1993) im Jahr 1993 gelungen ist, eine stabile Linie zu züchten (Tcam-2). Diese wird bis jetzt für Versuche herangezogen. Da die

Herkunft von Tcam-2 bislang nicht von unabhängiger Seite bestätigt wurde und eine einzige Zelllinie als Grundlage sämtlicher Studienergebnisse auf diesem Gebiet nicht genügend erscheint, sind weitere Zellreihen erforderlich.

Seminome sind eine Entität mit einzigartigen Eigenschaften, die einer speziellen Herangehensweise bedürfen. Die Ähnlichkeit zu embryonalen Stammzellen wird durch die Expression oben erwähnter Marker gezeigt, die alle mit Pluripotenz assoziiert sind.

In dieser Studie sollen oben genannte Kulturbedingungen für embryonale oder gonadale Stammzellen genutzt werden, um zu testen, ob Seminome diese speziellen Maximalanforderungen an ihre Umgebung genauso zum Wachstum benötigen, wie embryonale Stammzellen dies tun.

Neben dem Ziel, eine stabile Seminomlinie zu etablieren, stellt die Charakterisierung der entstandenen Zellen einen weiteren Hauptteil der Studie dar. Dazu sollen verschiedene Pluripotenz-, aber auch Seminom- und Apoptosemarker in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Stadien quantifiziert werden. Dies erfolgt sowohl durch real-time quantitative PCR als auch durch immunhistochemische Färbung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Der Forschungsantrag wurde durch die Ethikkommission mit dem Vorsitzenden Prof. Dr. med. D. Luft geprüft und am 10. Mai 2010 mit der Projektnummer 137/2010BO1 stattgegeben.

Als Material wurden jeweils histologisch gesicherte reine Seminome von sechs Patienten, die sich am Universitätsklinikum Tübingen vorgestellt haben, herangezogen. Sie wurden in der Reihenfolge des Operations-Termins mit Nummern versehen, um die Patienten zu anonymisieren. In dieser Studie wurden Tumoren 188, 197\_2, 198, 210, 211 und 216 verwendet. Ein Teil des operativ entfernten Gewebes wurde zur histologischen Diagnosesicherung gesandt, der Rest wurde intraoperativ in eine sterile Lösung asserviert, um so zum Zellkulturlabor zu gelangen. Falls das pathologische Ergebnis kein reines Seminom ergab, wurde dieser Tumor nicht für die Studie herangezogen, weshalb die Nummern der Tumoren nicht fortlaufend sind.

Die Patienten haben jeweils eine ausführliche erweiterte Patientenaufklärung unterschrieben und damit bestätigt, dass sie mit der Weiterverwendung des entfernten Tumors zu Forschungszwecken einverstanden sind. Folgende Einschlusskriterien sind dabei im Ethikantrag wörtlich festgelegt:

"Nur Proben, welche die folgenden Eigenschaften besitzen, werden in die Studie eingeschlossen:

- TNM-entscheidende Strukturen dürfen nicht mit entfernt werden, d.h.
  - > Das Gewebestück darf keine Tunica albuginea des Hodens beinhalten.
  - > Das Gewebestück darf kein Rete testis des Hodens beinhalten.
- Mit Entfernen des besagten Gewebestückes darf keine morphologisch auffällige Gewebestruktur vollständig entfernt werden, sondern es muss ein entsprechendes Korrelat für die histologische Diagnostik im OP-Präparat bis zur definitiven histo-pathologischen Aufarbeitung verbleiben."

Tabelle 2.1: Seminomspender

Nummer	Alter	Tumorstadium	Größe Seminom [cm]	Inkulturnahme
188	35 Jahre	pT1, R0	1,2 x 0,7 x 0,4	16.06.2010
197_2	50 Jahre	pT1, pNX, L0, V0, R0	2,2 x 1,3 x 1,5	04.10.2010
198	38 Jahre	pT1, L0, V0, R0	7,0 x 4,0 x 3,5	04.10.2010
210	49 Jahre	pT1, pNX, L0, V0, R0	2,6 x 2,1 x 1	07.02.2011
211	30 Jahre	pT1, pNX, L0, V0, R0	keine Angaben	23.02.2011
216	30 Jahre	pT2, R0	6,1 x 5 x 2,3	01.04.2011
Tcam-2	35 Jahre	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Die Zelllinie Tcam wurde freundlicherweise von der AG Bührung der Medizinischen Klinik Tübingen (Leitung Prof. Kanz) zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Dissoziation und Primärkultur

Das Seminomzellgewebe wurde mit einem unsterilen, desinfizierten Tissue Chopper in verschiedenen Winkeln zerkleinert (Mikrometerschraube 1-3 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ )). Die Kleinteile wurden in Falcon-Tubes mit Collagenase aufgenommen (15 Milliliter (ml) bei Biopsien, größere Gewebeproben in 50ml-Tubes). Die Pipette wurde vorher mit fetal calf serum (FCS) gespült, damit weniger Gewebsverlust in der Pipettenspitze entsteht. Die Gewebesuspension wurde 5 Minuten (min) lang bei 1000rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 8 ml HANK's Puffer BSS 1x mit  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  aufgenommen und 2 ml Colagenase/ Dispase dazugegeben. Die Kollagenase XI (Sigma Aldrich, 1909U/mg) wurde dafür vorher abgewogen (750Unit (U)/ml), sterilfiltriert und zusammen mit der Dispase II (Roche 1U/ml = 250Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ )/ml) in 2ml HANK's gelöst. Das Gewebe wurde in dieser Lösung 45 min lang inkubiert. Die Suspension wurde danach durch einen gelben Cell Strainer (BD Falcon<sup>TM</sup>, Katalog-Nr.: 352360, 100 $\mu\text{m}$ ) gesiebt und mit HANK's BSS nachgespült. Danach wurde erneut bei 1000 rpm 10-15 min lang zentrifugiert. Nun wurde der Überstand

abgesaugt und das Pellet in Stammzellmedium resuspendiert. Das Pellet wurde eventuell wiederholt mit HANK's BSS gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen werden bei 37 Grad Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank (Heraeus, Thermo Scientific BBD 6220  $\text{CO}_2$  Inkubator) inkubiert.

### **Fetale Mausfibroblasten**

Um Tumor 188 in Primärkultur zu nehmen wurden Fetale Mausfibroblasten benutzt. Die beiden Linien CF1 und flp wurden freundlicherweise vom Labor der Arbeitsgruppe Conrad et al., Tübingen, zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 Medien**

Die Medien wurden nach dem Vorbild von Kanatsu-Shinohara et al. (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) hergestellt, die mit embryonalen Stammzellen oder gonadalen Keimzellen gearbeitet haben. Die Zusammensetzungen sind Tabelle 2.2 und 2.3 zu entnehmen.

Alle einzelnen Komponenten werden in ein Gefäß pipetiert und mit einem Bottle Top-Filter ( $0,22 \mu\text{m}$ ) sterilfiltriert.

Für die Tcam-Zellen wurde das ursprünglich für Leukozyten am Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickelte Medium wie in Tabelle 2.4 ersichtlich, hergestellt.

Grundsätzlich wurden diese Medien jeweils auf  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad vorgewärmt verwendet.

Tabelle 2.2: Kulturmedium hGSC

Zusätze	Konzentration Lieferung	im Ansatz	Ansatz 500 ml
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /Ham's F12 (1:1) + L-Glutamin	-	-	385 ml
Knockout Serumreplacement	-	-	100 ml
L-Glutamin	200 mM	1%	2,5 ml
Penicillin/Streptomycin	100x	1%	5 ml
Non-essential Amino-Acids (NEAA)	100mM	1%	5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	50mM	0,1%	1 ml
HEPES	1M	-	6,46 ml
Minimum essential medium (MEM) Vitamine	100x	1%	5 ml
N2 Supplement	100	1%	5 ml
Estradiol	1mg/ml	30ng/ml	15 Mikroliter ( $\mu$ l)
Progesteron	1mg/ml	60ng/ml	30 $\mu$ l
Epidermal Growth Factor (EGF)	40ng/ $\mu$ l	20ng/ml	62,5 $\mu$ l
basic fibroblast growth factor (FGF)	40ng/ $\mu$ l	10ng/ml	62,5 $\mu$ l
Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	2ng/ $\mu$ l	8ng/ml	1 ml
human recombinant leukemia inhibiting factor (LIF)	10 $\mu$ g/ml		140 $\mu$ l

Tabelle 2.3: Kulturmedium StemPro hGSC

Zusätze	Konzentration Lieferung	im Ansatz	Ansatz 500 ml
DMEM/F12 +GlutaMAX-I	-	-	442 ml
STEM PRO hESC Supplement	-	-	10 ml
ESC FCS		1%	5 ml
L-Glutamine	200mM	1%	5 ml
Penicillin/Streptomycin	100x	1%	5 ml
MEM Vitamine	100x	1%	5 ml
N2 Supplement	100x	1%	5 ml
NEAA	100mM	1%	5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	50mM	0,1%	1 ml
D+ Glucose	600mg/ml	6mg/ml	5 ml
Bovine Serum Albumin (BSA)	100mg/ml	5 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ l
Estradiol	1mg/ml	30ng/ml	15 $\mu$ l
Progesteron	1mg/ml	60ng/ml	30 $\mu$ l
EGF	40ng/ $\mu$ l	20ng/ml	62,5 $\mu$ l
basic FGF	40ng/ $\mu$ l	10ng/ml	62,5 $\mu$ l
GDNF	2ng/ $\mu$ l	8ng/ml	1 ml
Pyruvic Acid	-	30 $\mu$ g/ml	11,8 $\mu$ l
DL-Lactic Acid	-	1 $\mu$ l/ml	500 $\mu$ l
human recombinant LIF	-	1000U/ml	140 $\mu$ l

Tabelle 2.4: Kulturmedium RPMI

Zusätze	Konzentration Lieferung	Ansatz
RPMI-Medium	-	500 ml
L-Glutamine	200mM	5 ml
Penicillin/Streptomycin	1%	5 ml
ESC FCS		50 ml

**Hersteller**

Artikel	Artikel-Nr.	Herstellerfirma	Sonstiges
Ascorbic Acid, irradiated	A4403	Sigma	
$\beta$ -Estradiol	E22592	Sigma	250 $\mu$ g
$\beta$ -Mercaptoethanol	3135010	Gibco	
Brenztraubensäure 98%	107360	Sigma	25g
Collagenase XI	C7657	Sigma	
DMEM/F12 + L-Glutamin	E 15-813	PAA	500ml
EGF	E9644	Sigma	0,2mg
FBS (ES-cell)	16141- 079	Gibco	500ml
FGF	F0291	Sigma	25 $\mu$ g
GDNF	G1777	Sigma	10 $\mu$ g
Hepes Buffer	S11-001	PAA	
Knockout SR	10828-028	Gibco	500ml
Leukemia inhibitory factor human recombinant	LIF1010	Milipore	10 $\mu$ l
L-Glutamine	M11-004	PAA	
MEM-Vitamine 100x	N11- 002	PAA	100ml
NEAA	M11-003	PAA	
N2-Supplement	17502-048	Gibco	
N2-Supplement	F005-004	PAA	5ml
Pen/Strep	P11010	PAA	100x
Progesteron watersoluble	P7556	Sigma	100mg
Pyruvic Acid	P1656	Sigma	
RPMI 1640 ohne L-Glutamine		BioWhittaker	
StemPro hESC Serum- und feeder-frei (SFM)	A100701	Invitrogen	

**Herstellerfirmen**

- BioWhittaker®), Lonza, Basel, Schweiz
- Gibco/life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
- Invitrogen, s. Thermo Fisher (Firmenfusion)



- PAA/GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Großbritannien
- Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
- Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA,

### **2.2.3 Mediumwechsel**

Der Mediumwechsel musste alle zwei Tage vorgenommen werden, um den Zellen einerseits genügend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und andererseits, damit die entstandenen Zellhaufen nicht zu groß wurden und die Nährstoffe ins Innere des Agglomerates diffundieren konnten. Zuerst wurden dabei alle Zellen einer 6-Well-Platte in ein 15 ml Falcon aufgenommen und 5 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Pellet mit 9 ml des jeweiligen Mediums mehrmals trituiert, damit das Pellet und die Zellhaufen sich lösen konnten. Die gelösten Zellen wurden wieder gleichmäßig auf die Wells verteilt, in die bereits 1 ml des jeweiligen Mediums vorgelegt wurde.

### **2.2.4 Split**

Mussten die Zellen aufgrund ihres Wachstums in mehrere Portionen aufgeteilt werden, so wurde je nach Zelldichte entschieden, zu welchem Verhältnis gesplittet werden sollte. Es wurde wie bei einem Mediumwechsel vorgegangen. Die gelösten Zellhaufen wurden zu einem Teil verdünnt in neue 6-Well-Platten gegeben und der Rest für die Lagerung im -80°C-Kühlschrank vorbereitet, indem er erneut 5 min bei 1000rpm zentrifugiert wurde.

### **2.2.5 Einfrieren zur Lagerung und zur weiteren Charakterisierung**

Überstieg das Wachstum der Zellen die Kapazität zur Bebrütung, wurden sie nach Verdopplung der Zellzahl eingefroren. Die Lagerung erfolgte in einem speziellen Einfriermedium. Dieses enthielt 8ml FCS und 2ml DMSO. Diese beiden Komponenten wurden zusammengemischt und mit einem Filter ("Millex", Millipore) mit

0,22 $\mu$ m Porendichte sterilfiltriert. Dann wurde zu je einem Milliliter Einfriermedium ein Milliliter DMEM/Ham's F12-Medium gegeben und das Pellet der wie oben beschrieben vorbereiteten Zellen damit aufgelöst. Diese Suspension wurde zuerst für ca. 3-4h auf -20°C abgekühlt, damit eine stufenweise Kühlung erreicht wurde. Danach konnte das Röhrchen im -80°C-Kühlschrank gelagert werden.

### **2.2.6 Auftauen**

Die Zellen wurden hierzu vorsichtig 3-5 min lang im Wasserbad bei 38°C inkubiert. Sobald sie flüssig waren, wurden sie zu 10ml DMSO/F12-Medium gegeben und bei 1000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Da das Einfriermedium für die Zellen toxische Stoffe enthält, sollten diese Schritte relativ zügig erfolgen, damit die Zellen aufgetaut möglichst kurz dem Einfriermedium ausgesetzt waren. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 9 ml StemPro hGSC-Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Menge wurde nun gleichmäßig auf eine 6-Well-Platte (BectonDickinson, tissue culture plate "flat bottom") verteilt, das heißt in jedes Well wurden 1,5 ml pipettiert. Zuvor wurde in diese Wells schon jeweils 1 ml eines Kulturmediums vorgelegt. Die Zellen wurden dann bei 5% CO<sub>2</sub> und 37,0°C im Brutschrank bebrütet.

### **2.2.7 ADSC-Zellen**

Um den Tumorzellen nach dem Auftauen eine Mikroumwelt zu geben, die ihnen perfekt angepasst ist, wurden Adipose tissue derived stem cells (ADSC)-Zellen gezüchtet, die dann als Feederzellen versuchsweise zur Verfügung stehen. Dazu wurde freundlicherweise Material des Labors für Tissue Engineering in Tübingen zur Verfügung gestellt (ADSC # 15).

#### **Mediumwechsel**

Die ADSC-Zellen wurden in Kulturflaschen (BD Falcon Cell culture Flask 75 cm<sup>2</sup>) mit 75cm<sup>2</sup> Fläche kultiviert. Beim Mediumwechsel wurde das verbrauchte Medium abgesaugt (die Zellen sind adhären) und 10ml neues Medium (siehe Tabelle 2.5) dazupipettiert. Zusätzlich wurden noch 100 $\mu$ l Thrombozytenkonzentrat dazugegeben.

Tabelle 2.5: ADSC-Medium

Zusatz	Konz. Ansatz	Menge
DMEM 1g/l Glucose (Lonza BE12-707F)	-	500ml
Glutamin 2mM	1%	5ml
Pen/Strep 100mg/ml	1%	5ml
fresh frozen Plasma	5%	25ml
Heparinsulfat 1IU/ml	-	1 Ampulle

### Passage

Passagiert werden sollten Zellen, die eine Konfluenz von ca. 80-100% haben. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ ) gewaschen, wieder abgesaugt und 1,5 ml TrypLE Express® (Gibco, 12605-010) zugegeben. Das Ganze wurde dann 3 min bei 37°C inkubiert, danach die Zellen abgeklopft und mit 10 ml Medium in 15 ml-Falcons aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min lang bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen wieder in 10 ml Medium aufgenommen, in Kulturgefäße überführt und 100  $\mu\text{l}$  Thrombozytenkonzentrat hinzugegeben.

## 2.2.8 Vorbereitung und immunhistochemische Färbung

### Zytospin

Um die Zellen auf Objektträger zu fixieren, wurden Zytospins angefertigt. Dazu wurden 2 Wells der jeweiligen Zellen in ein 15 ml-Falcon überführt und bei 1000 rpm 5min lang zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ , Gibco 10010-015) „gewaschen“; das heißt (d.h.) bei 1000 rpm 5min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 10ml Phosphate buffered saline (PBS) gelöst. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die gelösten Zellen auf Eis zum Zytospin transportiert. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in einen Trichter pipettiert, der auf einem Filter angebracht war, worunter sich wiederum der Objektträger (SuperFrost® Plus von R. Langenbrinck)

befand. Sowohl Trichter als auch Filter und Objektträger waren in einer Halterung festgeschraubt. Diese Halterung mitsamt dem Inhalt wurde in die Zytospin-Zentrifuge gesteckt (Cytospin 2 der Firma Shandon). Nun wurde 3 min lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Herausnehmen der Halterung war darauf zu achten, dass die Kombination aus Trichter, Filter und Objektträger gemeinsam aus der Halterung gezogen wurde, um den Tropfen, der sich auf dem Objektträger gebildet hatte nicht zu zerstören. Danach wurde mikroskopisch die Konzentration der Zellen kontrolliert. Es sollte eine ausreichende Zelldichte für die darauf folgenden Färbungen vorhanden sein, aber es durften sich keinesfalls mehrere Zellschichten oder Haufen bilden. Auf Grundlage dieser visuellen Beurteilung musste dann eventuell die Menge der Zellsuspension angeglichen werden, die in den Trichter pipettiert wurde. Die Objektträger wurden in einer Plastikbox in Aluminiumfolie verpackt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **Zytoblock**

Im Gegensatz zum Zytospin werden die Zellen beim Zytoblock nicht auf einem Objektträger fixiert, sondern in einen Paraffinblock eingebettet, was das pathologische Institut Tübingen, Leitung Herr Prof. Fend, freundlicherweise übernahm. Um einen vollständigen Zytoblock zu erstellen, mussten die Zellen zuerst in Agarosegel fixiert werden, um sie nachher in Paraffin einzubetten. Diese Blöcke lassen sich gut schneiden und unter dem Mikroskop begutachten, sowie nach Entparaffinierung anfärben.

Für den ersten Schritt wurden folgende Vorbereitungen getroffen :

#### 1. Ansetzen und Gießen von 2 %-igen Agarose-Gel-Tubes

- Tubes (1,5 oder 2 ml) vorbereiten
- 2g Biozym ME Agarose (Biozym Art.-Nr.: 840015) in ein Becherglas abwiegen
- 100ml TBE (siehe unten) zugeben
- Mit dem Magnetrührer bei 500 rpm bei ca.  $150^{\circ}\text{C}$  die Agarose auflösen
- die entstandene Masse mit einer Transferpipette gleichmäßig in die Tubes geben und bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank kalt stellen.

#### 2. Ansetzen von 10x TBE

- 216g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Art.-Nr.: 4855.2)
- 113,6g Borsäure (Merck, Art.-Nr.: 1.00165.1000)
- 14,8g EDTA (Titriplex III, pro analysi, Merck , Art.-Nr.: 8418.1000)
- Das Ganze zusammenmischen und mit Aqua dest. auf 5 Liter auffüllen

Nun wurden die mit Agarose befüllten Tubes im Wasserbad 3 min lang erhitzt, um die Agarose wieder vollständig zu verflüssigen. Nach dem Zentrifugieren des Präparats wurde der Überstand abpipettiert. Die etwas abgekühlte Agarose wurde direkt mit einer Pipette auf das Pellet gegeben und mit einem Plastikrührstäbchen untergehoben. Danach wurde das Präparat (mit Rührstäbchen) für 20 min in den Kühlschrank gestellt. Das fest gewordene Pellet konnte nun in eine vorgedruckte Einbettkassette (Microtwin) in Formalin zur Fixierung eingelegt werden. Danach wurde das Pellet eingebettet und anschließend in Paraffin gegossen. Der so entstandene Block kann in bis zu 0,25 $\mu$ m- dünne Schnitte gesägt werden.

### 2.2.9 Immunhistochemische Färbung der Marker CD20, CD117, D2-40, EBV und PLAP

Die immunhistochemische Färbung wurde ebenfalls durch das pathologische Institut Tübingen an Zytospins sowie Zytoblocks durchgeführt. Folgende Antikörper wurden dabei verwendet (siehe Tab. 2.6)

Tabelle 2.6: Antikörper der immunhistochemischen Färbung

Antikörper	Verdünnung	Firma, Bestell-Nr.
CD20	1:500	DAKO, M0755
CD117	1:200	DAKO, A4502
D 2-40	1:15	DCS, SIG-3730
EBV	-	Roche
PLAP	1:50	DAKO, M7191

Die Färbeschritte wurden von einem Färbeautomat (BenchMarkXT, Ventana) mittels des iViewDAB Detection Kit von Roche (Bestell-Nr. 760091) durchgeführt. Dazu wurde folgendes Färbeprogramm verwendet:

- Aufheizen des Objektträgers auf 75°C und 4 min Inkubation.

- Entparaffinierung mittels EZ Prep™, einer lösungsmittelfreien wässrigen Lösung mit geschützter Zusammensetzung
- Auftragen des Liquid Coverslips, der das Austrocknen der Reagenzien verhindert und den Objektträger komplett abdeckt
- Aufheizen des Objektträgers auf 76°C und 4 min Inkubation
- Waschung des Objektträgers, erneutes Auftragen des Liquid Coverslips
- Aufheizen des Objektträgers auf 95°C für 8 min.
- Inkubation für 30 Minuten mit Cell Conditioner 1, damit eine Antigendemas-  
kierung stattfindet. Sie dient zur Verbesserung der Immunbindung zwischen  
Primär-Antikörper und Zielantigen
- Inkubation für weitere 60 Minuten mit Cell Conditioner 1
- Auftragen von einem Tropfen des jeweiligen Antikörpers und Inkubation für  
32 min
- Auftragen von einem Tropfen Counterstain 7 für die Gegenfärbung, Auftra-  
gen von liquid Coverslips und 4 min Inkubation

Dabei wurde Counterstain 7 für CD20, CD117, D 2-40 und PLAP als Hämatox-Gills-Lösung selbst hergestellt mit 10  $\mu$ l Aqua dest, 10 ml 100%iger Essigsäure und 7 ml GILL3 (ThermoScientific Bestell-Nr. 6765009).

Red Counterstain II wurde für die EBV-Färbung verwendet (Bestell-Nr. 7802218) Danach wurde die auf dem Objektträger entstandene Ölschicht mit einer Wasser-Detergenz-Mischung abgewaschen. Dieser Schritt brachte eine Blaufärbung hervor, nachdem vorher die Hämatox-Gill-Lösung eine Rotfärbung bewirkt hatte. Die Salze aus dem Wasser sorgten für die Blaufärbung. Als Drittes erfolgte eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe.

Für **CD20, CD117, D 2-40 und PLAP** wurde sie folgendermaßen durchgeführt:

1. 2 min in 70%-igem Ethanol inkubieren
2. 2 min in 80%-igem Ethanol inkubieren
3. Zweimal 2 min in 96%-igem Ethanol inkubieren
4. Viermal 2 min in 100%-igem Ethanol inkubieren
5. Viermal 2 min in Xylol inkubieren

Für **EBV** wurden folgende Arbeitsschritte angewandt:

1. 10 Mal kurz in 80%-igem Ethanol inkubieren
2. 10 Mal kurz in 96%-igem Ethanol inkubieren
3. Zweimal eine Minute in 100%-igem Ethanol inkubieren (dabei 1/2 Minute ablaufen lassen, Objektträger herausnehmen und den Alkohol trocknen lassen)
4. 10 Mal eine Minute in frischem Aceton inkubieren (dabei wieder 1/2 Minute ablaufen lassen, Objektträger herausnehmen und trocknen lassen)
5. 1-2 Mal kurz in Xylol inkubieren

Der vierte und letzte Schritt war das Eindecken der Objektträger, was von dem Eindeckautomaten Microm CTM6 durchgeführt wurde.

### **2.2.10 Bestimmung der Marker ALPP, Bax, Bcl2, CD45, CKIT, POUF5 und TERT mittels PCR**

#### **RNA-Isolation**

Gleichzeitig mit dem Erstellen des Zytoblocks wurden die einzelnen Zellreihen jeweils in Lysispuffer (10 ml RLT-Puffer + 100  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol) gelöst.

Dazu wurden 70  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, 99%) mit 7 ml RLT-Puffer (RNA Easy Extraction Kit, Quiagen) gemischt. Danach wurde ein Well der einzufrierenden Zellen 5 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert und in 500  $\mu$ l Lysispuffer aufgenommen. Waren dabei noch dickflüssige Schlieren zu sehen, wurde nach und nach in 100  $\mu$ l-Schritten Lysispuffer zugegeben, bis eine klare Mischung entstand. Der Lysispuffer bewirkte das Aufschließen der Zellen, da für die weitergehende RNA-Extraktion der Zellinhalt benötigt wurde. Die Suspension wurde bei -20°C gelagert. Die RNA-Isolation wurde mittels eines RNeasy Mini Kits von Quiagen durchgeführt. Dazu wurden 350  $\mu$ l 70%-iger Ethanol zum aufgetauten Lysisprodukt gegeben. Die Zellen wurden mit einer Spritze homogenisiert und auf die schon im Kit vorhandenen Säulchen gegeben, ohne diese zu berühren. Das Ethanol bewirkte, dass das Gemisch gut an die Membran der RNeasy Mini Säule binden konnte. Nun wurde bei 10.000 rpm 15 s lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und die Mini-Säule wird wieder in die Collection Tube gestellt, es wurden 350  $\mu$ l des Buffers RW1 hinzugefügt und bei 10.000 rpm 15 s lang zentrifugiert. Um reine RNA zu bekommen, musste noch ein DNase-Verdau

durchgeführt werden, denn DNA bindet ebenfalls an die Siliceamembran. Dazu wurden der Probe 80  $\mu\text{l}$  DNase Mix (10  $\mu\text{l}$  DNase + 70  $\mu\text{l}$  Puffer RDD) hinzugegeben und dieser Inhalt wurde 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 350  $\mu\text{l}$  Buffer RW1 hinzugegeben, wieder zentrifugiert und somit die DNase wieder entfernt. Der Durchfluss wurde entsorgt. Danach wurde die Membran gewaschen. Das erste Mal, indem 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE in die Mini-Säule gegeben wurde und das Ganze dann bei 10.000 rpm 15 s lang zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde entsorgt. Diese Prozedur wurde wiederholt, diesmal wurde das Säulchen nach dem Zentrifugieren in eine neue Collection Tube gestellt, 2 min lang erneut zentrifugiert, sodass sichergestellt war, dass kein Ethanol mehr darin enthalten war. Nun wurde das Säulchen in ein Auffanggefäß mit Deckel gestellt und es werden 40  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Die Probe wird 1 Minute lang bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA zu lösen.

### 2.2.11 cDNA-Umschrieb

Um eine PCR durchführen zu können, muss die RNA zuerst in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. cDNA bezeichnet eine DNA, die aus RNA mittels Reverser Transkriptase hergestellt wurde. Diese kann dann in der PCR amplifiziert werden. Dies wurde anhand des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche Applied Science durchgeführt. Folgende Mengen wurden dabei zum Mastermix pipettiert (siehe Tabelle 2.7)

Tabelle 2.7: cDNA-Umschrieb

Zusatz	Menge pro Probe
5-fach-Puffer	2 $\mu\text{l}$
Random Hexamer Primer	1 $\mu\text{l}$
dNTPs	1 $\mu\text{l}$
RNAse Inhibitor	0,25 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	0,5 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase	0,25 $\mu\text{l}$

In diesem Versuch wurden Random Hexamer Primer verwendet; das heißt Primer, die aus einer zufälligen Anordnung von Basen bestanden. Diese bildeten das Verbindungsstück zwischen RNA und Reverser Transkriptase, die den Umschrieb



tätigte. Da direkt von mRNA umgeschrieben wurde, entstand DNA, die keine Introns enthielt, diese wurden beim Prozessieren der RNA in der Zelle schon durch Splicing entfernt. Zu jeweils 5  $\mu\text{l}$  des Mastermix wurden 5  $\mu\text{l}$  RNA in ein DNase und RNase-freies 2ml-Eppendorf-Gefäß gegeben.

Das Mastermix-RNA-Gemisch wurde im StepOne™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems zuerst für 10 min auf 25°C erhitzt, damit die Primer an die RNA binden konnten. In den folgenden 30 min bei 55°C fand die cDNA-Synthese statt. Danach wurde die Reverse Transkriptase 5min bei 85°C deaktiviert. Zum Schluss wurde die Temperatur bei 16°C gehalten, bis die fertigen Proben entnommen wurden.

### 2.2.12 Real-time quantitative PCR

Um auch geringste Mengen an cDNA nachzuweisen, bedient man sich der real-time quantitativen Polymerase Chain Reaction (qPCR). Hierbei werden jeweils in einem Zyklus die Mechanismen der Zelle imitiert, die der DNA-Synthese dienen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA denaturiert, dann wird eine Temperatur erzeugt, bei der sich die spezifischen Primer besonders gut anlagern. Für eine Sequenz sind zwei Primer notwendig, ein „Forward“-Primer und ein „Reverse“-Primer, die den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren und somit bei der Synthese begrenzen. Sie sind notwendig, dass in der 3. Phase der PCR die DNA-Polymerase an der gewünschten Stelle ansetzt und mittels der zugemischten dNTPS die DNA-Synthese beginnen kann. Nach jedem Zyklus wird jeweils eine Fluoreszenzmessung durchgeführt.

Die Grundlagen der ersten PCR legte Mullis et al. (Mullis et al., 1986), der die Idee hatte, DNA in mehreren Zyklen mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase zu verdoppeln. 1993 wurde er dafür mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Weiterentwickelt wurde dieses Patent von Saiki et al. (Saiki et al., 1988). Die Forschungsgruppe extrahierte eine thermostabile Taq-Polymerase aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus*, die die Sensitivität, Spezifität und Länge des Produktes signifikant verbesserte.

Im Unterschied zu dieser herkömmlichen Art der PCR, bei der die Quantifizierung nur durch spätere gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts geschehen kann, wird bei der qPCR in der exponentiellen Phase des Fluoreszenzanstiegs die Menge an DNA quantifiziert. Die Quantifizierung muss in der exponentiellen Phase stattfinden, da hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen. Es

gibt verschiedene Methoden, die Fluoreszenz der PCR zu bestimmen. Zwei davon fanden in dieser Studie Anwendung: Die SYBR-Green-Methode und die Taq-Man-Sonden-Methode.

### 2.2.12.1 SYBR-Green

Der Farbstoff SYBR-Green bietet eine einfache Möglichkeit, die Fluoreszenz des Reaktionsgemisches zu bestimmen. Dabei bindet SYBR-Green an doppelsträngige DNA und emittiert dabei Licht der Wellenlänge  $\lambda=521\text{nm}$ . SYBR-Green I bindet zwar auch an RNA, sowie einzelsträngige DNA, doch ist die Fluoreszenz 11-mal geringer als bei doppelsträngiger DNA (Zipper et al., 2004). Dem Problem, dass dieser Farbstoff relativ unspezifisch an jegliche DNA bindet, wird mit einer Schmelzkurvenanalyse begegnet. Dabei wird die DNA kontinuierlich erhitzt und je nach Guanin/ Cytosin-Gehalt der amplifizierten DNA werden bei unterschiedlichen Temperaturen Einzelstränge aus der doppelsträngigen DNA. SYBR-Green wird freigesetzt und es kann eine Fluoreszenz-Peak gemessen werden.

Für die SYBR-Green PCR wurde das QuantiFast SYBR®Green PCR Kit von Qiagen (Cat.-No.: 204054) verwendet. Pro Ansatz und Primer wurden folgende Mengen als Mastermix pipettiert (siehe Tabelle 2.8):

Tabelle 2.8: SYBR-Green-PCR

Zusatz	Menge pro Probe
SYBR-Green-Mix	5 $\mu\text{l}$
Primer forward	0,5 $\mu\text{l}$
Primer reverse	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	2 $\mu\text{l}$

Die Primer sollten unabhängig von der Ausgangskonzentration auf eine Arbeitskonzentration von 10pmol/ $\mu\text{l}$  verdünnt werden. Es wurden für diese PCR mit dem Programm qBase plus selbst erstellte Primer von MetaBion verwendet.

Tabelle 2.9: Primer PCR SYBR-Green

Primer	Sequenz
GAPDH forward (for)	5'GTT CGA CAG TCA GCC GCA TC 3'
GAPDH reverse (rev)	5' GAA CAT GTA AAC CAT GTA GTT 3'
CD45 for	5' GCA TTT GGC TTT GCC TTT CTG GAC A 3'
CD45 rev	5' CAG TGG GGG AAG GTG TTG GGC TTT 3'
BAX for	5' AGG ATG CGT CCA CCA AGA AG 3'
BAX rev	5' GCC ACT CGG AAA AAG ACC TC 3'
Bcl2 for	5' TGC CTT ATG CAT TTG TTT TGG 3'
Bcl2 rev	5' TTC CAA TTC CTT TCG GAT CTT T 3'

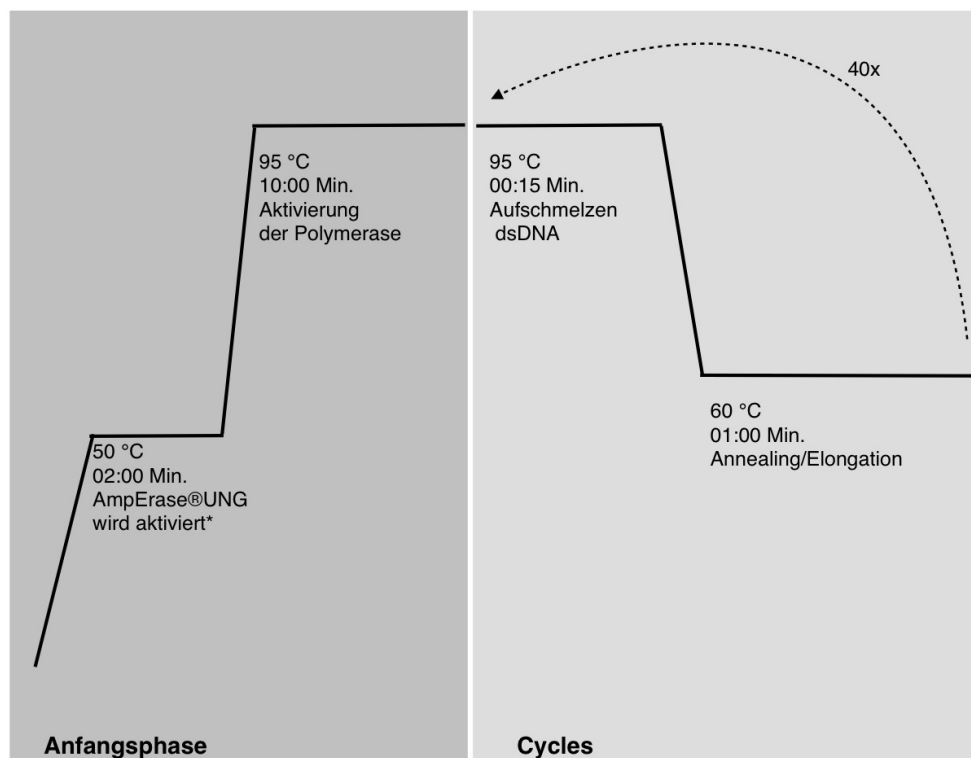
Mit der Multipette (Multipette®Plus, Eppendorf) wurden je Well 8  $\mu$ l des Mastermixes in die PCR-Platte (MicroAmpFast optical 96well reaction plate) vorgelegt und 2  $\mu$ l der verdünnten cDNA dazugegeben. Dieser Arbeitsschritt erfolgte am cDNA-Arbeitsplatz, welcher separat vom Mastermixplatz gelegen war, um Verschmutzungen zu vermeiden. Die Verdünnung der cDNA erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu$ l reinem Wasser, danach wurde der Ansatz gevortext (VortexGenie2, Scientific Industries, Model Nr G560E) und kurz mit der Tischzentrifuge (NeoLab, Heidelberg, Cat.-No. C1301B) zentrifugiert. In die No-Template-Control wurden statt den 2  $\mu$ lcDNA 2  $\mu$ l RNase- und DNase-freies Wasser hinzugegeben. Diese Kontrolle diente dazu, herauszufinden, ob rein gearbeitet wurde oder ein Reagenz schon mit DNA verschmutzt war oder sich Primerdimere bildeten.

Pro Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Um die Anfangsmenge der in den Proben enthaltenen Templates zu bestimmen, war eine Standardkurve notwendig. Diese wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe errechnet. Für die Verdünnungsreihe wurde ein Standard-Mix erzeugt, welcher 4  $\mu$ l der Tumoren 188, 198 und 216 enthielt. Daraus ergab sich ein Gemisch von 12  $\mu$ l, aus dem 1  $\mu$ l entnommen wurde, um es mit 9  $\mu$ l reinem Wasser zu mischen (1:10-Verdünnung), ein anderer Mikroliter des Gemisches wurde für die 1:100-Verdünnung mit 99  $\mu$ l reinem Wasser gemischt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 2  $\mu$ l anstatt der cDNA mit dem Mastermix in die Wells verteilt. Die damit erhaltenen  $C_T$ -Werte wurden gegen den Logarithmus des Anfangswertes aufgetragen und so mittels linearer Regression eine Kurve errechnet. Hatte man nun die  $C_T$ -Werte der Proben, konnte man mit diesem Wert an der Geraden die

Anfangskonzentration des Templates ablesen.

Die fertig pipettierte Platte wurde mit einem Plastikcover bedeckt (Optical Adhesive Covers, Applied Biosciences) und eine Minute lang bei 1000rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, 5810R). Danach wurde die Platte in das PCR-Gerät gesetzt (StepOnePlus, Applied Biosciences) und ein neues Experiment erstellt. Die Temperaturen, die das Gerät durchlief, sind in Abb. 2.1 dargestellt. Allerdings wurde bei SYBR Green sofort 10 min lang auf 95°C erhitzt, der erste Schritt wurde übersprungen.



\* Enzym, das in doppelsträngige oder einzelsträngige DNA eingebautes Uracil entfernt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Abbildung 2.1: Die Temperaturen während einer PCR (eigenes Diagramm)

Es wurden ca. 40 Zyklen durchlaufen. Danach wurde schrittweise auf 95°C erhitzt, um eine Schmelzkurve zu erstellen, damit Aussagen über die Spezifität gemacht werden konnten. Wurde das entstandene Reaktionsprodukt erhitzt, so denaturierte die entstandene Doppelstrang-DNA, wobei SYBR-Green freigesetzt wurde. Die Temperatur ist spezifisch für das entstandene Fragment und ist höher als die der unspezifischen Primerdimere.

### 2.2.12.2 Taq-Man-Sonde

Eine andere Methode sind die Taq-Man Sonden, die am 3'-Ende einen Quencher und am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff besitzen (wie z.B. FAM/TAMRA). Normalerweise unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters und es kann keine Fluoreszenz gemessen werden. Wird nun die DNA amplifiziert, nachdem die Sonde an die DNA hybridisiert ist, entfernt die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Polymerase den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und er fängt an zu fluoreszieren. Je mehr cDNA des Targets also amplifiziert wird, desto mehr Fluoreszenz kann gemessen werden. Diese kann am Ende jeder Elongationsphase gemessen werden.

Für die Taq-Man-PCR wurden folgende Mengen pro Primer als Mastermix pipettiert (siehe Tabelle 2.10)

Tabelle 2.10: Taq-Man-PCR

Zusatz	Menge pro Probe
Gene Expression Master Mix (ABI, CA.:94404)	5 $\mu$ l
Primer forward	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2,7 $\mu$ l

Die Pipettierung von 8  $\mu$ l Mastermix in eine 96-well-Platte fand am Mastermix-Platz mithilfe der Multipette statt. Folgende TaqMan-Primer der Firma ABI wurden pro Mastermix-Ansatz benutzt (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Primer PCR Taq-Man

Primer	Nummer	Mix
GAPDH	FAM-MGB, 4352934-080-3023	20x Mix
ALPP	HS03046558_s1	20x Mix
TERT	HS009726567_m1	20x Mix
c-KIT	HS00174029_m1	20x Mix
POU5F1	HS00742896_s1	20x Mix

Anmerkung: Das Suffix *\_s* steht dafür, dass die Primer innerhalb eines bestimmten Exons liegen. Das Suffix *\_m* bedeutet, dass die Primer so kreiert wurden, dass

ein Intron in der Sequenz enthalten ist.

Pro Well wurden  $2\mu\text{l}$  verdünnte cDNA am cDNA-Arbeitsplatz dazugegeben (Verdünnung erfolgt wie oben beschrieben). Dann wurde die PCR-Platte mit einem Plastikcover versiegelt, wie oben beschrieben zentrifugiert und in das PCR-Gerät gesetzt. Während der PCR wurden wieder die gleichen Temperaturen wie in Abb. 2.1 dargestellt, durchlaufen und eine anschließende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Rohdaten wurden mittels Microsoft® Excel® für Mac, Version 14.0.0. nach dem Modell von Pfaffl MW (Pfaffl, 2001) ausgewertet. Die Standardabweichung wurde mit der Formel

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

berechnet. Dabei entsprach  $S$  der Schätzfunktion für die Standardabweichung,  $x_i$  der Merkmalsausprägung am  $i$ -ten Element,  $\bar{x}$  dem empirischen Mittelwert, also dem Arithmetische nMittel der Stichprobe und  $n$  dem Stichprobenumfang.

### 2.2.13 Benennung der unterschiedlichen Stadien

Für die jeweiligen Untersuchungen wurden verschiedene Stadien der Zellen je nach Wachstum und Passage herangezogen.

In der zeitlichen Reihenfolge lässt sich dies wie folgt darstellen:

Vom ursprünglichen Seminomgewebe für die Primärkultur wurde jeweils ein kleiner Teil dieser Zellen sofort eingefroren für das PCR-Stadium „Tumor“. Für das PCR-Stadium „Früh“ wurde eine in der frühe Passage der Linie genommen, ca. 2-8 Monate nach Inkulturnahme der Zellen, je nach Wachstum und Verdopplungszeit der Zellen. Für das Stadium „Spät“ wurden die Zellen genommen, die nach Einfrieren und Wiederauftauen in Kultur genommen wurden und dort ca. 2-6 Wochen gewachsen sind. Die gleichen Zellen wie für das Stadium „Spät“ der PCR wurden auch für die Zytoblockherstellung verwendet. Zytospins wurden von Tumor 188 p9, Tumor 197\_2 p8, Tumor 198 p15, Tumor 211 p4 und Tcam p2 gemacht.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Primärkultur

Die Spanne der Verdopplungszeiten in Primärkultur wird, jeweils kulturmedien-abhängig in Tabelle 3.1 aufgezeigt.

Tabelle 3.1: Verdopplung der Zellen in Primärkultur

	Verdopplungszeitspanne in Tagen, [Mittelwert]		
Zellreihe	StemPro	hGSC	RPMI
188	4-14 [7,1]	1-10 [3,7]	1-19 [7,0]
197_2	-	62	35
198	-	1-7[2,9]	3-23[9,5]
210	1-28 [9,8]	1-36 [14,3]	-
211	1-53 [12,5]	1-73 [20,8]	-
216	1-4 [2,4]	3-110 [49]	-
Tcam			3-13 [5,7]

Tumor 188 wurde zudem auf durch Röntgenstrahlen inaktivierten fetalen Mausfibroblasten im StemPro-Medium in Kultur genommen, um das Wachstum der Zellen auf Feedern zu beobachten. Auf der Fibroblasten-Linie FLP hatten die in Kultur genommenen Seminome eine Verdopplungszeit von 1-20 Tagen [Mittelwert: 6,0 Tage], wohingegen sie sich auf cF1 alle 1-25 Tage verdoppelten [Mittelwert: 9,7 Tage].

## 3.2 Überlebenszeit der Zellen

Das Zellüberleben der in Kultur genommenen Seminome bis zum Einfrieren der Zelllinie betrug unterschiedlich viele Tage. Dabei zeigte sich eine längere Überle-

benszeit im StemPro-Medium vor allem für Tumor 188. Die anderen Überlebenszeiten bis zum Einfrieren der Zellen unterschieden sich in den Medien StemPro und hGSC nicht. Einen Unterschied zeigt das Überleben der Linien 188, 197\_2 und 198 im hGSC-Medium im Vergleich zum RPMI-Medium, in dem die Zellen bei allen drei Linien eine kürzere Überlebenszeit aufwiesen (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Überleben der Zellen in Primärkultur

Zellreihe	Überlebenszeit in Tagen		
	StemPro	hGSC	RPMI
188	496	265	265
197_2	-	125	71
198	-	147	143
210	260	260	-
211	247	244	-
216	207	207	-
Tcam			36

### 3.3 Zellverhalten nach Auftauen

Direkt nach erstmaligem Auftauen und Wiederaufnahme in Kultur zeigten die Zellen unterschiedliche Wachstumsmuster. Anfangs sahen sehr viele Zellen perlenförmig aus, ähnlich wie Spermatogonien in Kultur (rote Kreise auf Abb. 3.1). Mit beginnender Aktivität wurden sie teils keulenförmig, manche sogar tintenfischähnlich mit größerem Kopf und mehreren dünnen Ausläufern (siehe Pfeile auf Abbildung 3.1) Nach einigen Tagen waren auch Riesenzellen zu beobachten, die aber von Tumor zu Tumor in unterschiedlicher Anzahl vorhanden waren (vergleiche (vgl.) Sternchen auf Abbildung 3.1).



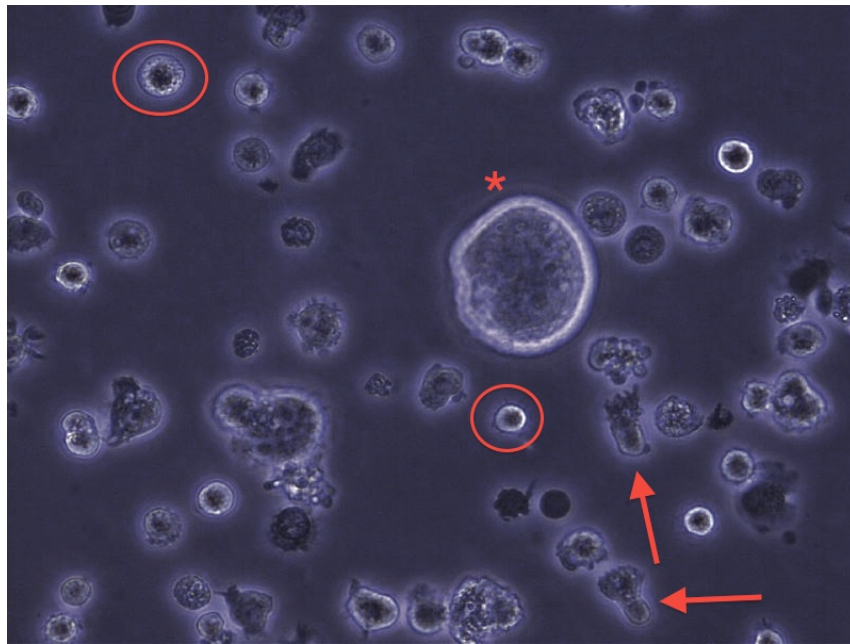
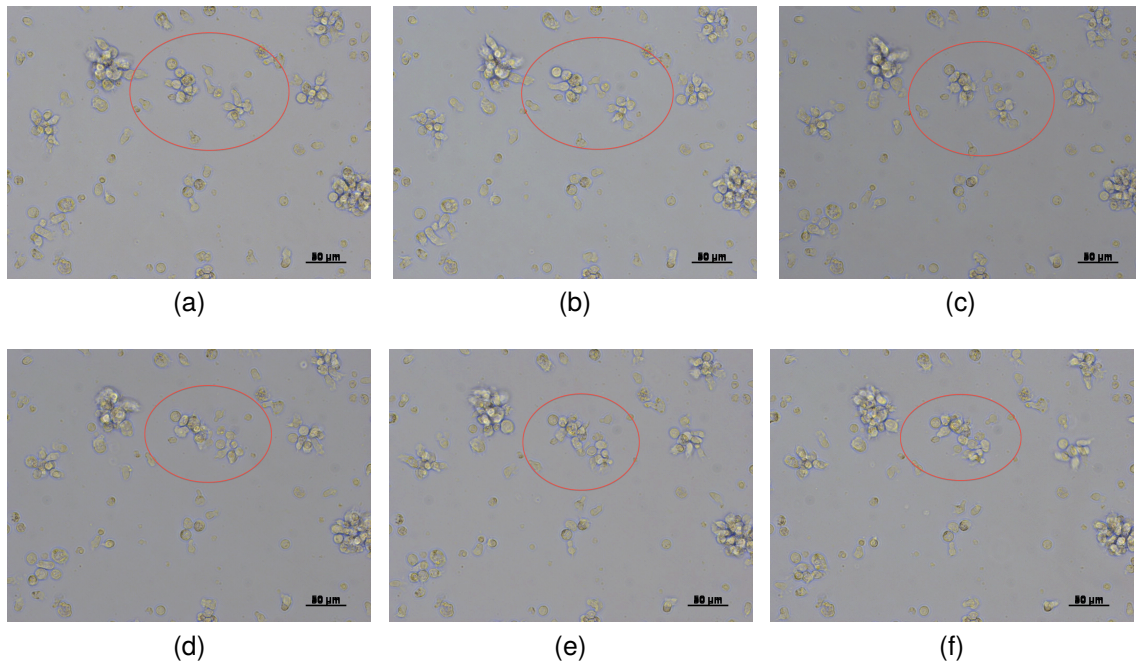


Abbildung 3.1: Seminomzellen in Kultur

Circa 24 Stunden nach Aufnahme in Einzelzellsuspension bildeten die Zellen kleine Zellhaufen (Cluster), in die sie sich aktiv zusammenschlossen. Die Zellen entwickelten dazu kleine Ausläufer, mit denen sie sich amöboid fortbewegen konnten. In Abbildung 3.2 kann der Verlauf eines solchen Clustering beobachtet werden. Diese Momentaufnahmen wurden innerhalb von etwa sieben Minuten (Mikroskop: Nikon Eclipse TS100, Kamera: PIXElink A662) durchgeführt, was zeigt, mit welcher Geschwindigkeit dieser Vorgang ablief. Je nach Tumor und Passage erfolgte das Clustering der Zellen mehr oder weniger stark. Selbst Zellen aus dem selben Ursprungstumor im selben Medium zeigten auf unterschiedlichen 6-Well-Platten eine unterschiedlich starke Ausbildung dieser Zellhaufen.

Abbildung 3.2: Tumor 188 Passage 11



### 3.4 Tumorzellen auf Feedern

Um die Frage zu klären, wie sich die Tumorzellen auf anderen Zellen, die ein adhärentes Wachstumsmuster zeigen, verhalten und ob Feeder-Zellen ihnen beim Wachstum oder bei der Fortbewegung behilflich sind, wurden die Tumorzellen auf ADSC-Zellen gesetzt. Am Tag zwei nach Umsetzen der Tumorzellen auf die ADSC-Zellen wurden kleine Kurzfilme gemacht, um die Aktionen der Zellen genauer beobachten zu können (Mikroskop: Zeiss, Axiovert 200M).

Die Bilder zeigen Ausschnitte aus den Kurzfilmen von Tumor 188p12, beide Filme haben eine Länge von 30 Sekunden und wurden mit einer Frequenz von 3 Bildern pro Sekunde gemacht, entsprechend einer realen Zeit von 90 Sekunden.

Folgende Beobachtungen können in den Abbildung 3.3 und 3.4 gemacht werden: Die Tumorzellen konnten sehr viel schneller auf den ADSC-Feederzellen entlangwandern, als ihre amöboide Fortbewegung ohne Feeder es erlaubt (die roten Pfeile in Abb. 3.3 und 3.4 deuten die Fortbewegung einer Zelle an). Die Feederzellen dienen also gewissermaßen als Leiter oder Stütze der Tumorzellen. Ist eine Tumorzelle die gesamte Feederzelle entlanggewandert, so bleibt sie an deren Ende stehen, tastet mit kleinsten Zellmembranausläufern an der Kante entlang oder dreht um und wandert den gleichen Weg wieder zurück. Unter genauer Beobach-

tung erkennt man, dass sich dort, wo keine ADSC-Zellen wachsen, auch wenig oder keine 188-Tumorzellen befinden. Sehr viele kleine tentakelartige Zellmembranausläufer lassen sich entdecken, die eine Verbindung von der Tumorzelle zum Feeder bilden.

Abbildung 3.3: Tumor 188, Passage 12, 100-fach, Film 1

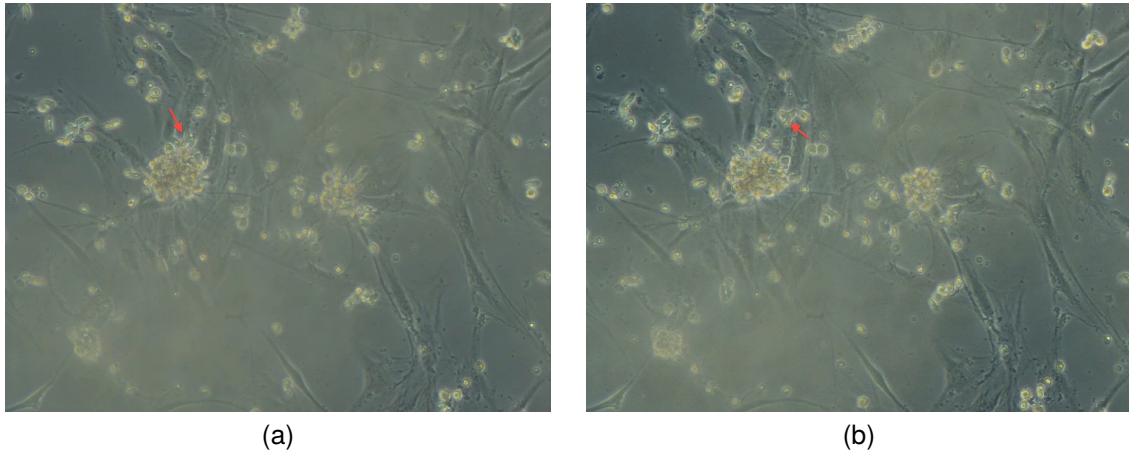
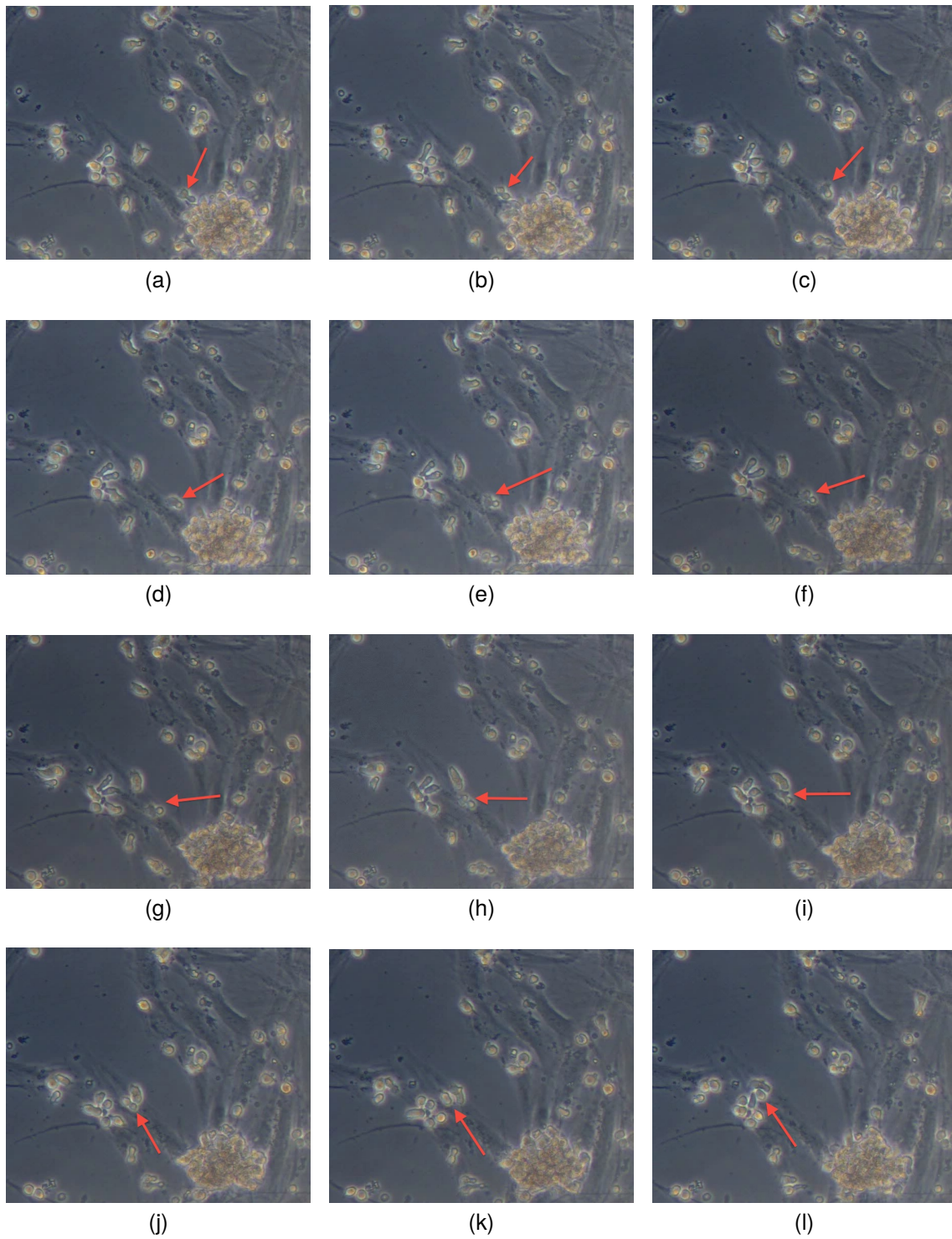


Abbildung 3.4: Tumor 188, Passage 12, 100-fach, Film 2



## 3.5 Zytospin

Es wurden insgesamt 5 immunhistochemische Färbungen an durch Zytospin fixierten Zellen durchgeführt: CD20, EBV und CD45, PLAP und CD117.

Die Färbung ist dann als spezifisch positiv zu werten, wenn vor allem die Zellwand gefärbt ist, da es sich um Zell-Oberflächenantikörper handelt.

Abbildung 3.5: CD20-Färbung Zytospins

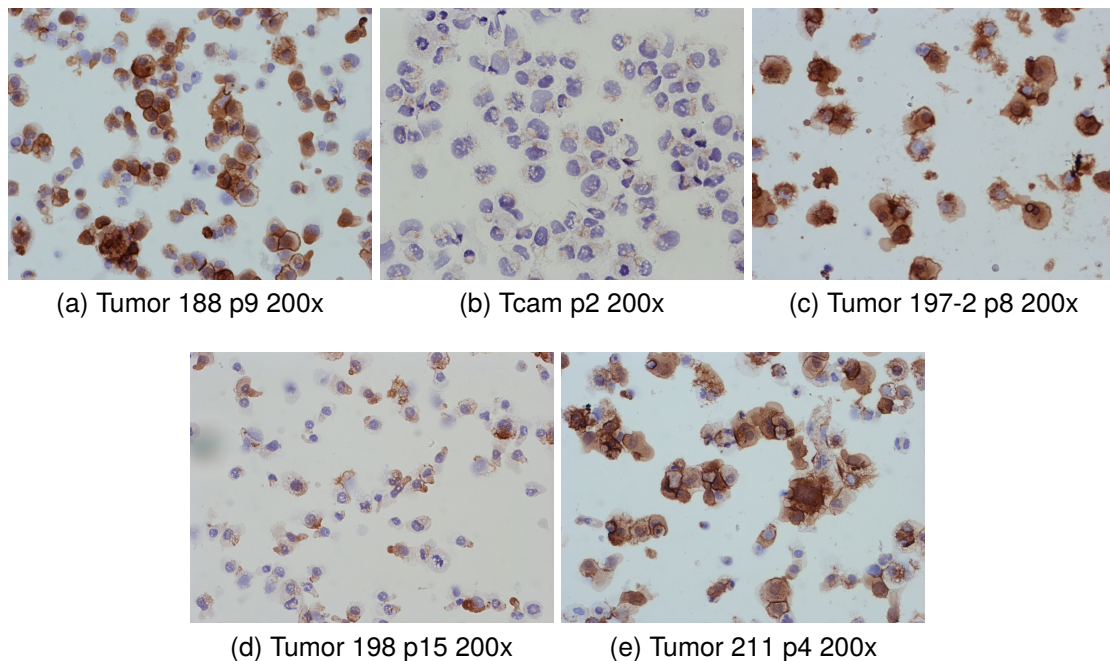
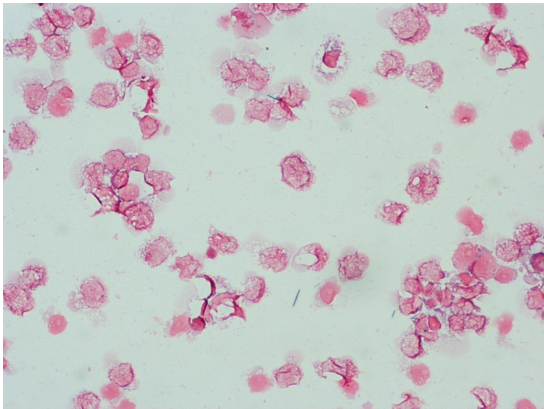


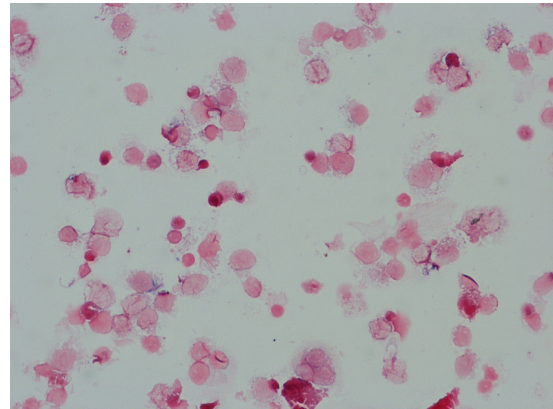
Abbildung 3.5 zeigt die CD20-Färbungen der Zytospins des Tumors 188, Tcam, 197\_2, 198 und 211. Spezifisch positiv angefärbt sind Tumor 188, 197\_2 und 211. Zelllinie 198 zeigt nur vereinzelt CD20-positive Zellen.

Die EBV-Färbung von Linien 198 und 211 kann in Abbildung 3.6 beurteilt werden. Es ist bei beiden Zelllinien keine spezifische Färbung für EBV zu erkennen.

Abbildung 3.6: EBV-Färbung Zytospins

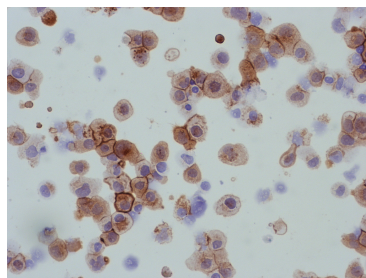


(a) Tumor 198 p15 200x

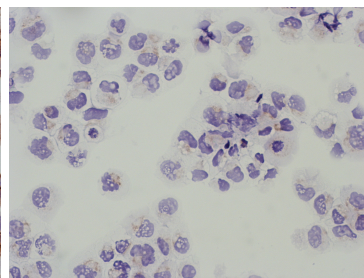


(b) Tumor 211 p4 200x

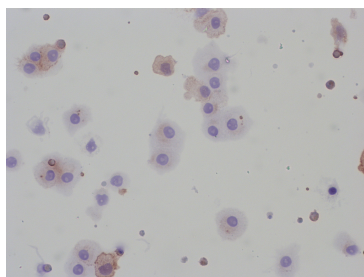
Abbildung 3.7: CD45-Färbung Zytospins



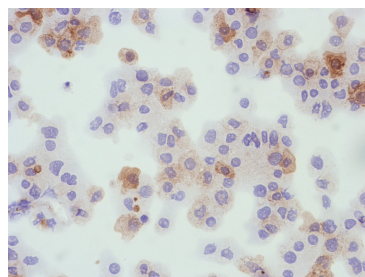
(a) Tumor 188 p9 200x



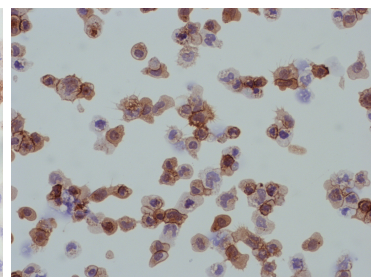
(b) Tcam p2 200x



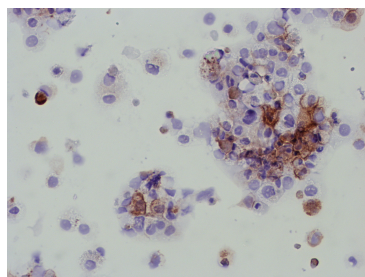
(c) Tumor 197-2 p8 200x



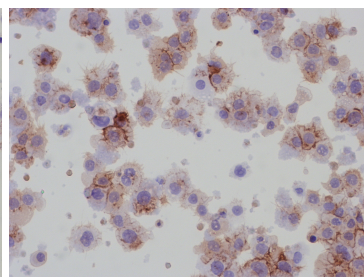
(d) Tumor 198 p14 200x



(e) Tumor 210 p9 200x



(f) Tumor 211 p4 200x

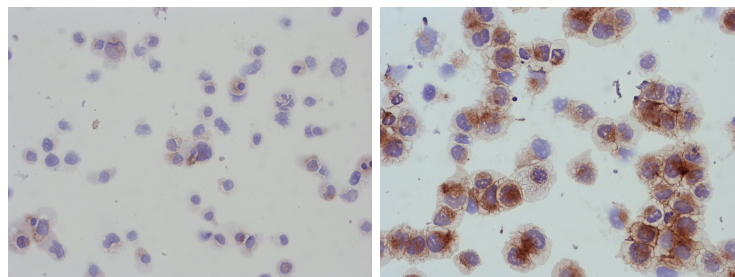


(g) Tumor 216 p10 200x

Die CD-45-Färbung in Abbildung 3.7 ist in den Tumoren 188, 198, 210 und 216 als vollständig positiv zu werten. In Tumor 211 und 197\_2 sind ca. ein Viertel der abgebildeten Zellen spezifisch angefärbt. Tcam zeigt als einzige Zelllinie keine Färbung für CD45.

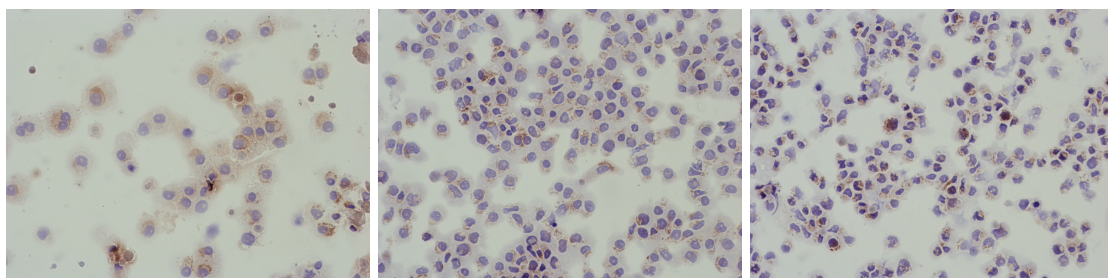
In Abbildung 3.8 ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu CD45 Tcam stark positiv für CD117 färbt. Tumor 197\_2 zeigt eine eher schwache aber dennoch vorhandene spezifische Färbung, alle anderen Zelllinien weisen lediglich eine geringe unspezifische Färbung des Zytoplasmas auf und sind deshalb als negativ zu werten. Einen geringen positiven Anteil besitzt Tumor 211; hier sind links unten im Bild drei spezifisch positiv gefärbte Zellen zu erkennen, die jedoch einen geringen Anteil an der Gesamtzellzahl ausmachen.

Abbildung 3.8: CD117-Färbung Zytospins



(a) Tumor 188p9 200x

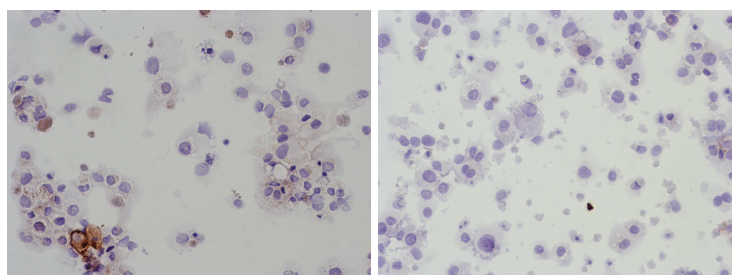
(b) Tcam p2 200x



(c) Tumor 197-2 p8 200x

(d) Tumor 198 p14 200x

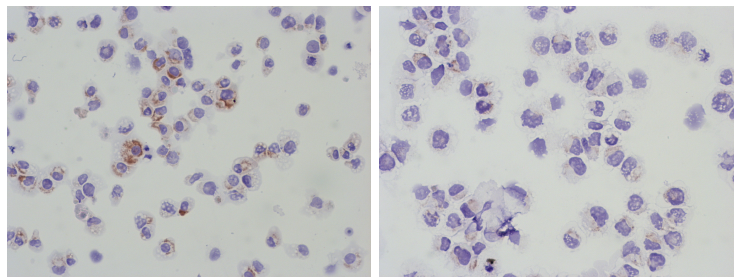
(e) Tumor 210 p9 200x



(f) Tumor 211 p4 200x

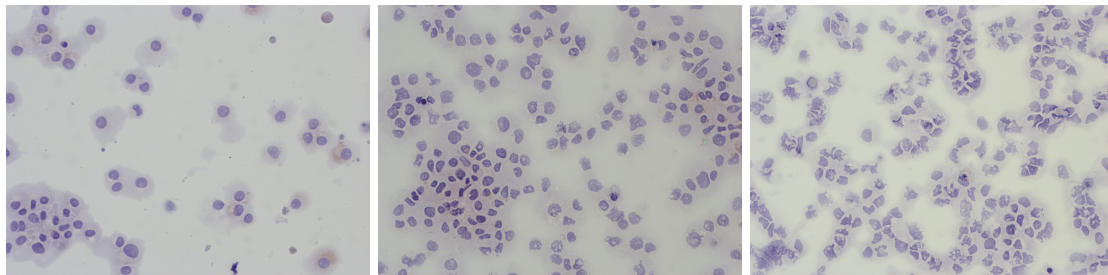
(g) Tumor 216 p10 200x

Abbildung 3.9: PLAP-Färbung Zytospins



(a) Tumor 188p9 200x

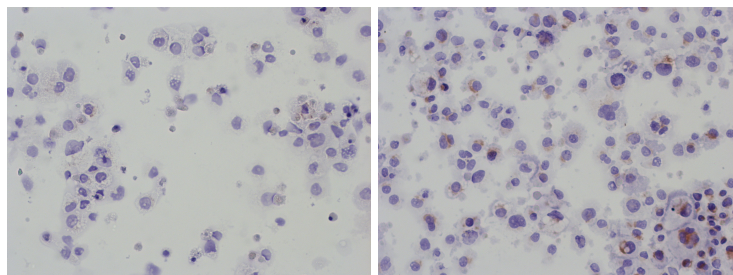
(b) Tcam p2 200x



(c) Tumor 197-2 p8 200x

(d) Tumor 198 p14 200x

(e) Tumor 210 p9 200x



(f) Tumor 211 p4 200x

(g) Tumor 216 p10 200x

Die PLAP-Färbung der Zytospins kann bei allen Linien (Tumoren 188, Tcam, 197\_2, 198, 210, 211 und 216) als negativ gewertet werden.

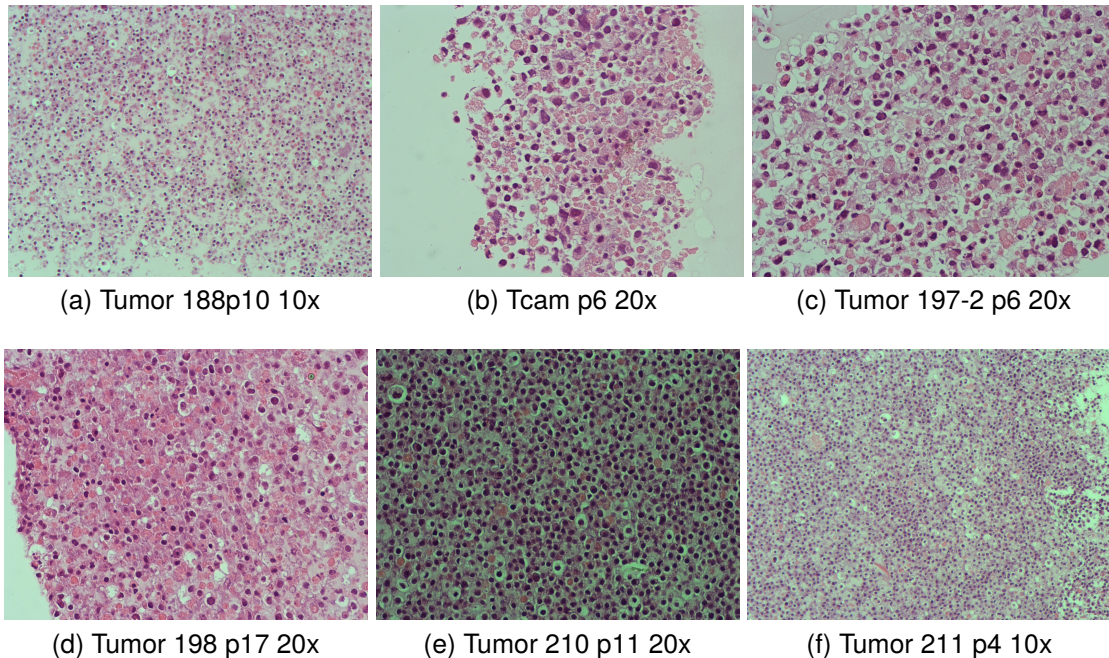
### 3.6 Zytoblock

Es wurde von den Zelllinien 188 Passage 10, Tcam Passage 6, 197\_2 Passage 6, 198 Passage 17, 210 Passage 11 und 211 Passage 4 Zytoblocks angefertigt.

Von jeder dieser Linien wurde eine HE-Färbung gemacht sowie eine EBV- und CD20-Färbung. Die Ergebnisse der HE-Färbung sind in Abbildung 3.10 zu sehen.



Abbildung 3.10: HE-Färbung Zytoblocks



Die HE-Färbung von Tumor 188 zeigt viele kleine rundliche Zellen mit teilweise sichtbarem, basophilen Zellkern. Einige Zellen besitzen eine Art weißen Hof, der aber von einer dünnen Membran umgeben ist. Weiterhin sind rundliche eosinophile Strukturen ohne erkennbaren Zellkern auf dem Bild vorhanden.

**Tcam** zeigt ein inhomogeneres Zellbild: Die Zellen haben unterschiedliche Größen und haben sehr unterschiedliche Formen. Einige Zellen besitzen einen großen, stark basophilen Zellkern. Auch hier sind wie bei **Tumor 188** eosinophile Anteile vorhanden, die zum Teil sehr große Strukturen ausbilden, allerdings lassen sich hier eher Zellkerne erahnen als bei Tumor 188.

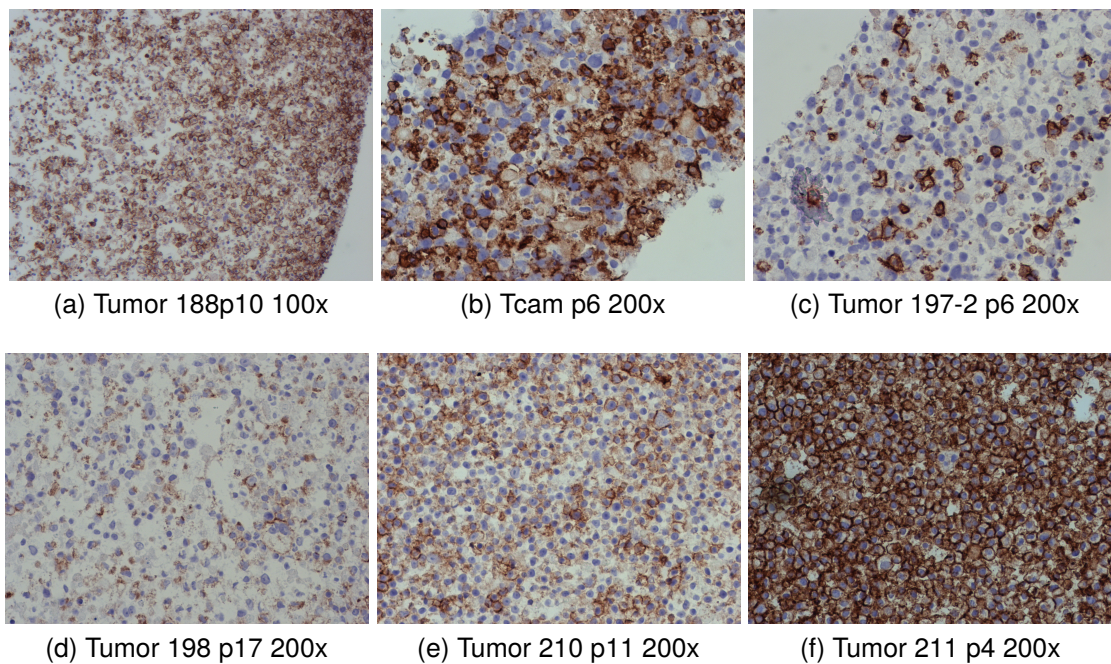
**Tumor 197\_2** hat viele basophile Anteile und nur vereinzelte eosinophile Punkte. Bei diesem Tumor sind die Zellen sehr häufig von einem oben beschriebenen weißen Hof umgeben. Mittig ist einer Art Riesenzelle mit drei Zellkernen zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigt **Tumor 198** so gut wie keine weißen Höfe, sondern dicht an dicht liegendes Zellmaterial. Einige Zellen zeigen prominente Kerne, links oben in Abb. 3.10 (d) ist eine Zelle mit zwei Kernen zu erkennen, welche auch einem eosinophilen Granulozyten entsprechen könnte.

Ähnlich ist der HE-Schnitt von **Tumor 210** aufgebaut: sehr dicht gelagerte Zellen, etwas häufiger mit weißen Höfen, die zum Teil sehr dünn sind. Einziger Unterschied ist die größere Anzahl von basophil rundlichen Zellkernen, die in fast jeder

Zelle anzutreffen sind. Alle eosinophilen Strukturen lassen keinen dieser basophilen Zellkerne erkennen.

**Tumor 210 und 211** unterscheiden sich im HE-Schnitt kaum. Auch die Zellen von Tumor 211 sind rundlich-oval aufgebaut und besitzen einen dunklen Nukleus. Das Zellmaterial lagert sich sehr dicht und es sind kaum weiße Höfe zu erkennen.

Abbildung 3.11: CD20-Färbung Zytoblocks



Aus der Zusammenschau von Abbildungen 3.11 und 3.12 lässt sich für die einzelnen Tumoren Folgendes schließen:

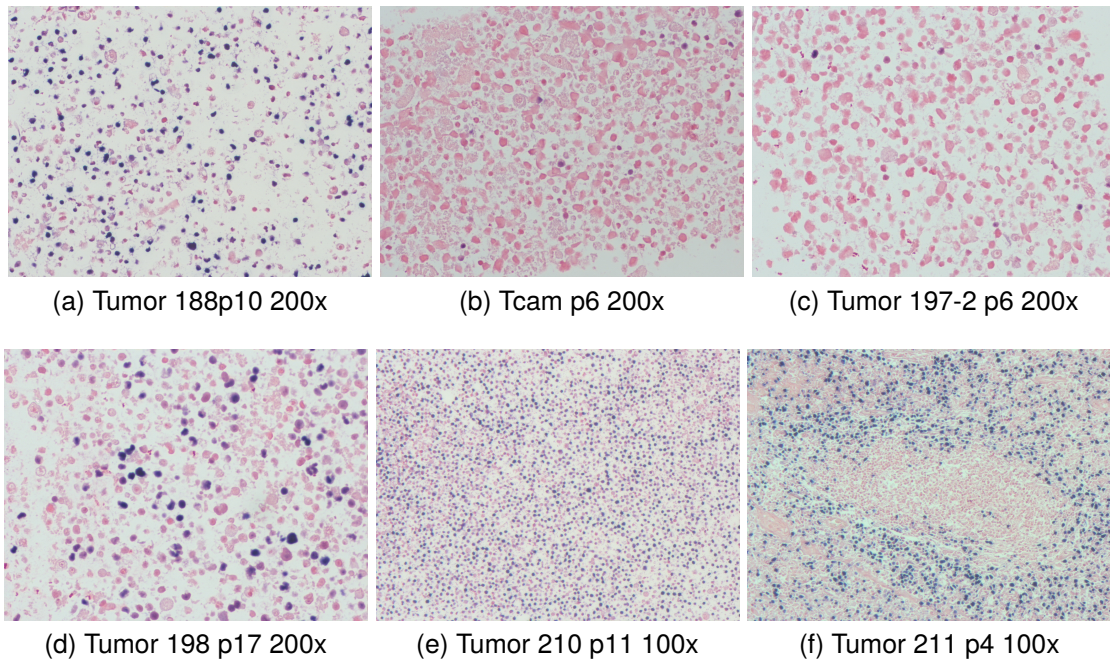
**188:** In der EBV-Färbung ist eine fast vollständige positive Reaktion zu erkennen, auch die CD20-Färbung zeigt sich bei den kompletten Zellen positiv.

**Tcam:** Dieses Ergebnis scheint, da es sich hier um die schon etablierte Zelllinie Tcam handelt, von großem Interesse. Die EBV-Färbung zeigt sehr wenige EBV-positive Zellen, die mit einer ähnlich geringen Anzahl an CD20-positiven B-Zellen korrelieren. Eine große Anzahl vitaler CD20-negativer Zellen ist bei Tcam zu vermerken, dies erkennt man an den Kernen, die auf dem Bild intakt erscheinen.

**197\_2:** Diese Zelllinie hat, die CD20- und EBV-Färbung betreffend, große Ähnlichkeiten zur etablierten Zelllinie Tcam. EBV-positive Zellen sind kaum aufzufinden, sodass die Färbung als negativ zu werten ist. Es finden sich weiterhin noch weniger CD20-positive Zellen im Präparat als bei Tcam (siehe Abb. 3.11 (c)).

**198:** Für diesen Tumor zeigt sich die Färbung wesentlich heterogener. Die Fär-

Abbildung 3.12: EBV-Färbung Zytoblocks



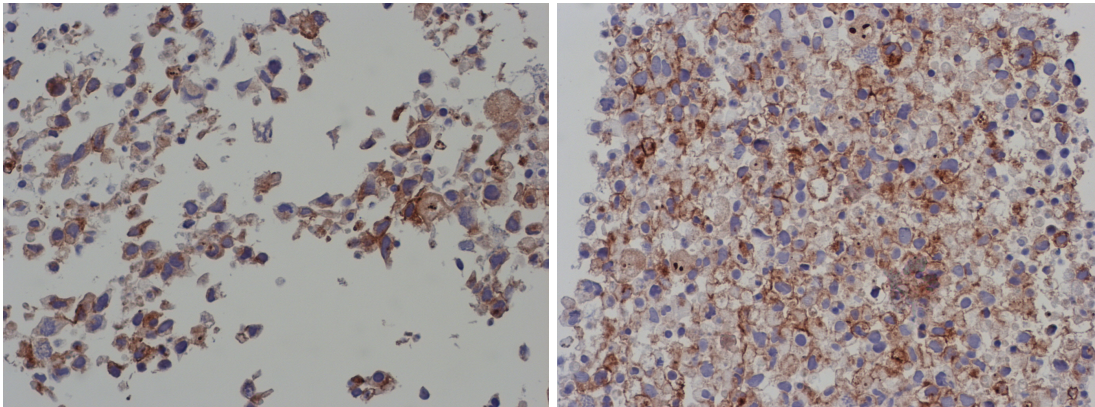
bung für EBV ist lediglich minimal positiv, auch die CD20-Färbung lässt sich nicht als positiv werten.

**210:** Tumor 210 zeigt sich ebenso polymorph. Die CD20-Färbung kann eine Mehrzahl von positiven Reaktionen erkennen lassen und die EBV-Färbung zeigt sehr viele EBV-positiven Zellen.

**211:** Dieser Tumor zeigt die von allen stärkste Färbung für CD20. Diese ist auch spezifisch positiv, das heißt die Zellwände werden sichtbar angefärbt. Die EBV-Färbung zeigt einen zentralen, nicht positiven Anteil und einen um diesen zentralen Teil liegenden stark positiven Anteil.

Aufgrund der Tatsache, dass Tumor 197\_2 der Modelllinie Tcam am ähnlichsten ist sowie EBV- und CD20 negativ ist, wurde Linie 197\_2 weiter charakterisiert. Jeweils zum Vergleich wurde auch noch ein Präparat der Vergleichslinie Tcam mitgefärbt. Folgende Färbungen wurden vorgenommen: CD117, D2-40 und PLAP. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.13 - 3.15 zu sehen.

Abbildung 3.13: CD117-Färbung Zytoblocks

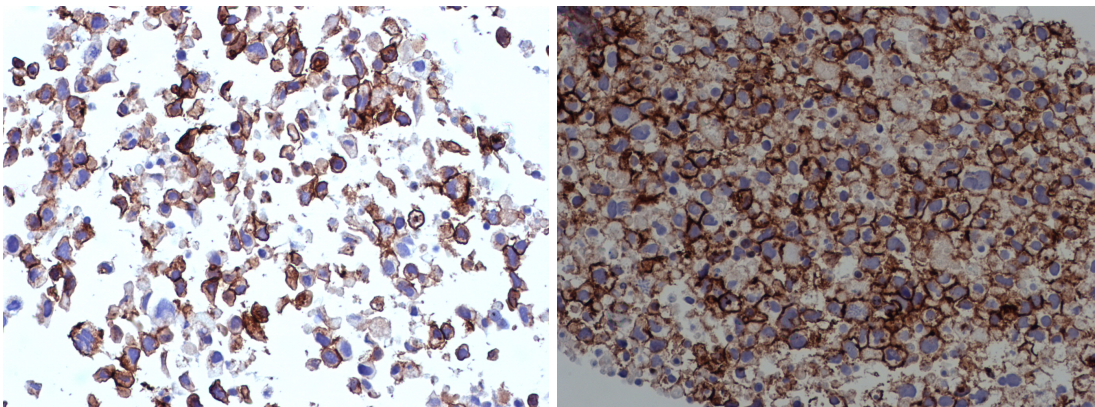


(a) Tcam p6 200x

(b) Tumor 197-2 p6 200x

Die CD117-Färbung lässt sowohl bei Tcam als auch bei Tumor 197\_2 spezifisch positive Färbungen erkennen. Vor allem Tumor 197\_2 zeigt fast ausschließlich gefärbte Zellen, das heißt die CD117-Reaktion dieser Zelllinie ist als stark positiv zu werten, etwas stärker als die der Zelllinie Tcam.

Abbildung 3.14: D2-40-Färbung Zytoblocks

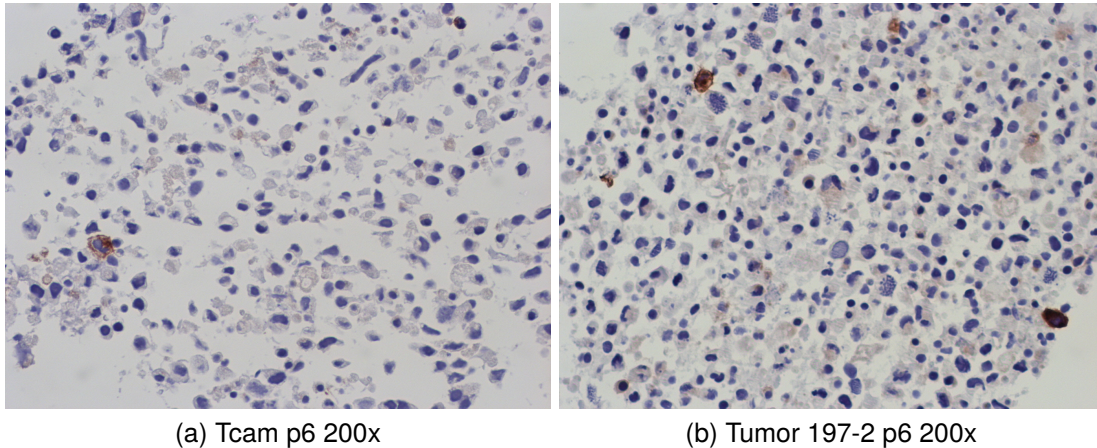


(a) Tcam p6 20x

(b) Tumor 197-2 p6 20x

Die D2-40-Färbung zeigt ein ähnliches Bild, doch hier ist der Unterschied noch stärker zu erkennen. Ein Großteil der Tcam-Zellen sind spezifisch positiv gefärbt, doch im Vergleich dazu zeigen die Zellen der Tumors 197\_2 deutlich mehr und auch teilweise spezifischere Färbung als Tcam.

Abbildung 3.15: PLAP-Färbung Zytoblocks



Die PLAP-Färbung zeigt sowohl für Tcam als auch für 197\_2 vereinzelte positive Reaktionen geringer Anzahl. Der Großteil der Zellen ist jedoch PLAP-negativ, dies gilt in gleicher Weise für Tcam wie für 197\_2.

### 3.7 Real-time quantitative PCR

Die Real-Time quantitative PCR wurde ergänzend durchgeführt, um die Marker ALPP, Bax, Bcl2, CD45, CKIT, POUF5 und TERT quantitativ zu bestimmen. Die Tumoren 188, 198, 210, 211 und 216 wurden jeweils auf die unterschiedlichen Marker in drei verschiedenen Stadien getestet. Die Zellreihe 197\_2 wies im Stadium „Früh“ eine sehr geringe Anzahl von Zellen auf, weshalb eine dreizeitige Charakterisierung hier nicht möglich war. Auch die Zellreihe Tcam wurde nur in zwei Stadien gestoppt.

Das Stadium „Tumor“ stellt Ergebnisse des Materials dar, das am Tag der Inkultur- nahme des Seminoms gewonnen wurde. Das Stadium „Früh“ ist je nach Wachst- um der Zellen ca. 2-8 Monate nach Inkultur- nahme gewonnen. Für Stadium „Spät“ wurden die Zellen aufgetaut, 2-6 Wochen in Kultur gehalten und dann un- tersucht. Dieser Schritt diente gleichzeitig der Gewinnung von Daten darüber, ob es grundsätzlich möglich ist, diese Zellen einzufrieren und ob die Zellen nach dem Auftauen ein Wachstum zeigen.

Für die PCR wurde als Housekeeping-Gen GAPDH verwendet, die Werte der je- weiligen Marker-Messungen wurden anhand dieses Wertes korrigiert. Als House-

keeping-Gen wird ein Gen bezeichnet, das in der Zelle abhängig vom Grundstoffwechsel, jedoch unabhängig von anderen äußeren Einflüssen exprimiert wird. Ist der Grundstoffwechsel einer Zelle erhöht, würde dies in der PCR eine falschhohe Expression eines gemessenen Gens ergeben. Dieser Fehler kann durch die Korrektur des Wertes anhand des Housekeeping-Gens ausgeschaltet werden. Diese Korrektur geschah mit allen Ansätzen, um die Ergebnisse untereinander vergleichbar zu machen. Für jeden einzelnen Marker wird im Folgenden eine Gesamt-Graphik gezeigt, die alle Zellreihen mit einschließt und die Markerkonzentration als  $n$ -faches im Vergleich zum Anfangswert angibt. Die Anfangskonzentration des Markers in „Tumor“ wurde auf den (beliebig gewählten) Wert 1 gesetzt.

### 3.7.1 Seminommarker ALPP, c-KIT, OCT3/4 und TERT

#### PLAP(ALPP)

Der Marker PLAP ist ein spezifischer Marker für Seminome, unter anderem auch zur Differentialdiagnose von anderen Keimzelltumoren geeignet.

Wie in der Gesamt-Graphik 3.16 zu erkennen, sinkt dieser Wert im zeitlichen Verlauf von „Tumor“ über „Früh“ hin zu „Spät“. Allerdings ist die Standardabweichung sehr hoch, was eine genauere Betrachtung der Einzelergebnisse notwendig macht und eine Gesamt-Interpretation der PLAP-Entwicklung über die Zeit zu unspezifisch erscheinen lässt.

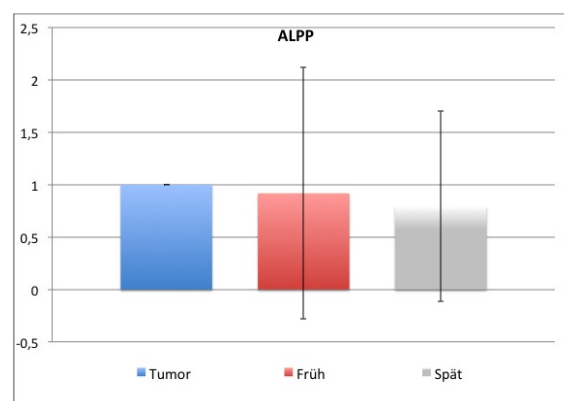
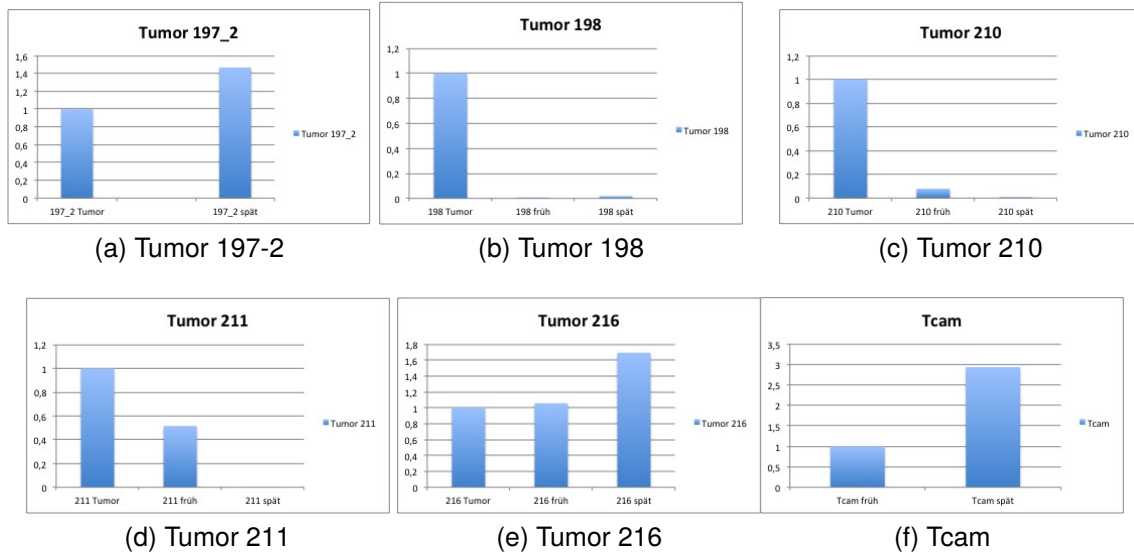


Abbildung 3.16: PLAP gesamt

Abbildung 3.17: PCR PLAP



Bei der separaten Betrachtung jeder Zellreihe lassen sich spezifischere Schlüsse ziehen.

**Tumor 197\_2** zeigt von seinem Anfangsstadium ausgehend eine Zunahme um das 1,46-fache des Markers PLAP. Das heißt, die PLAP-positive Subpopulation, die in der immunhistochemischen Färbung detektiert wurde, ist auch in der PCR nachzuweisen.

**Tumor 198** hingegen weist einen vollständigen Rückgang der PLAP-Konzentration auf.

Die PLAP-Konzentration in **Tumor 210** beschreibt eine ähnliche Entwicklung wie Tumor 198: Sie geht im Verlauf vollständig zurück, hier ist im Stadium „Früh“ noch das 0,08-fache der Anfangskonzentration vorhanden, im Stadium „Spät“ ist sie beim 0,003-fachen.

**Tumor 211** zeigt eine schrittweise Reduktion der PLAP-Konzentration zuerst auf das 0,5-fache und im späten Stadium sinkt der Wert unter die Nachweisgrenze. Somit macht dieser Tumor die gleiche Entwicklung wie die Tumoren 198 und 210 durch, nur etwas langsamer.

Eine gegensätzliche Entwicklung zeigt sich bei **Tumor 216**. Hier steigt die PLAP-Konzentration im Verlauf. Im frühen Stadium bleibt sie etwa konstant, das späte weist eine 1,7-fache Konzentration des Markers PLAP auf. Die Vergleichslinie **Tcam** hat die wohl stärkste Zunahme des Markers vom Anfangs- bis zum Spät-Stadium, in welchem die Konzentration auf das 2,9-fache angestiegen ist.

### c-KIT und OCT3/4

Die beiden Marker c-KIT (CD117) und OCT 3/4 (POU5F1) sind Marker, die die Stammzelleigenschaft der Seminome aufzeigen. Das Vorhandensein von OCT 3/4 beweist die Pluripotenz der Seminome/Germinome und des Embryonalen Karzinoms. Beide Marker sind auch in der Vorläuferläsion (TIN) des Seminoms vorhanden.

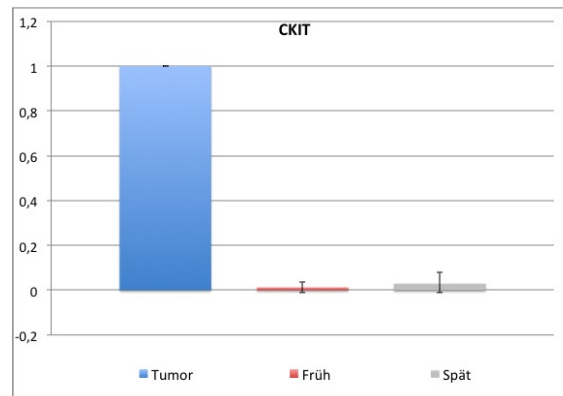


Abbildung 3.18: c-KIT gesamt

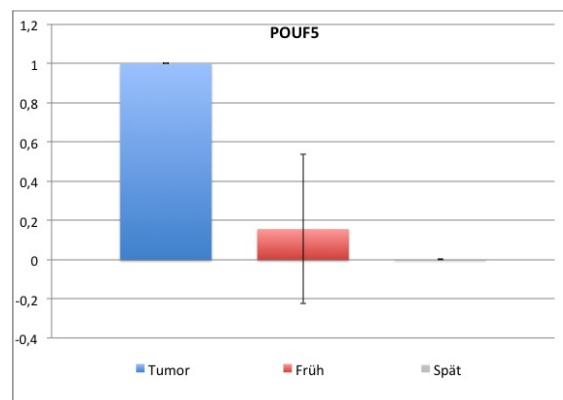


Abbildung 3.19: OCT3/4 gesamt

Sowohl in Abbildung 3.18 als auch in 3.19 ist ein deutlicher Rückgang der Marker zu erkennen. Während die Konzentration von c-KIT schon im Stadium „Früh“ auf das 0,01-fache sinkt, beträgt die OCT3/4-Konzentration in diesem Stadium noch das 0,16-fache. Im späten Stadium sind beide Marker unter die Nachweisgrenze gesunken.

Betrachtet man die Entwicklung der c-KIT-Konzentration der einzelnen Tumorklinen in Abb. 3.20, so fällt auf, dass der Marker schon im Stadium „Früh“ in sämtlichen Linien unter die Nachweisgrenze sinkt, sowie in der Vergleichslinie Tcam



auf das 0,06-fache fällt. Im weiteren Verlauf steigt die Konzentration des Markers nur in **Tumor 210** minimal auf das 0,08-fache, in den restlichen Linien bleibt c-KIT nicht nachweisbar. Die Messung der c-KIT-Konzentration in **Tumor 197\_2** konnte wegen der zu geringen Konzentration an Material nicht durchgeführt werden. Eine ähnliche Entwicklung wie bei c-KIT zeigt sich bei OCT3/4. Auch hier fallen die Werte des Markers schon im frühen Stadium unter die Nachweisgrenze, was sich ins späten Stadium fortsetzt. Einzig die OCT3/4 Konzentration der Linie **Tcam** ist im frühen Stadium auf das 0,93-fache des Ausgangswertes abgesunken. Somit ist nur in der Vergleichslinie Tcam die OCT3/4-Konzentration relativ konstant geblieben.

Abbildung 3.20: PCR c-KIT

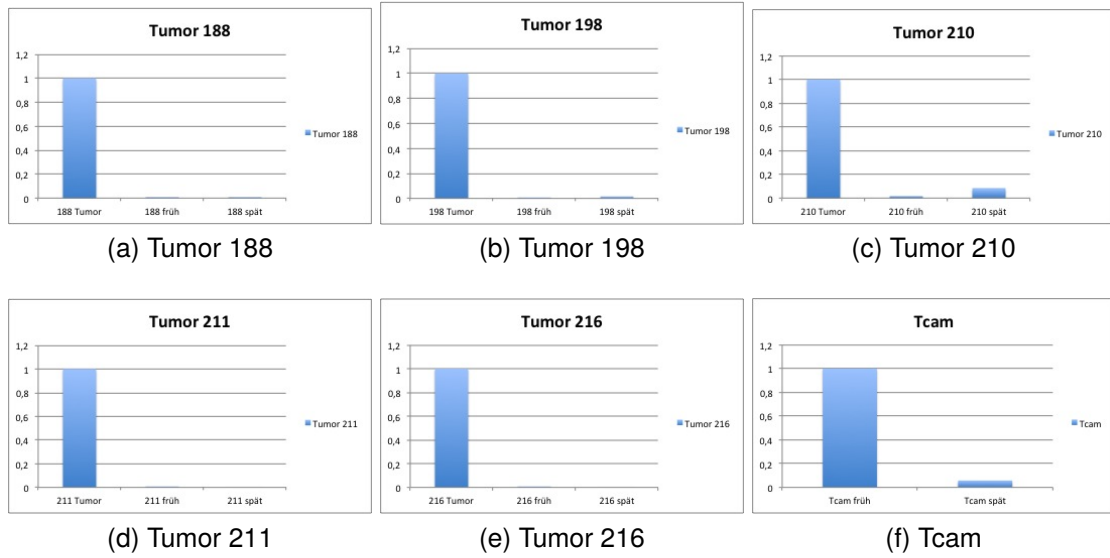
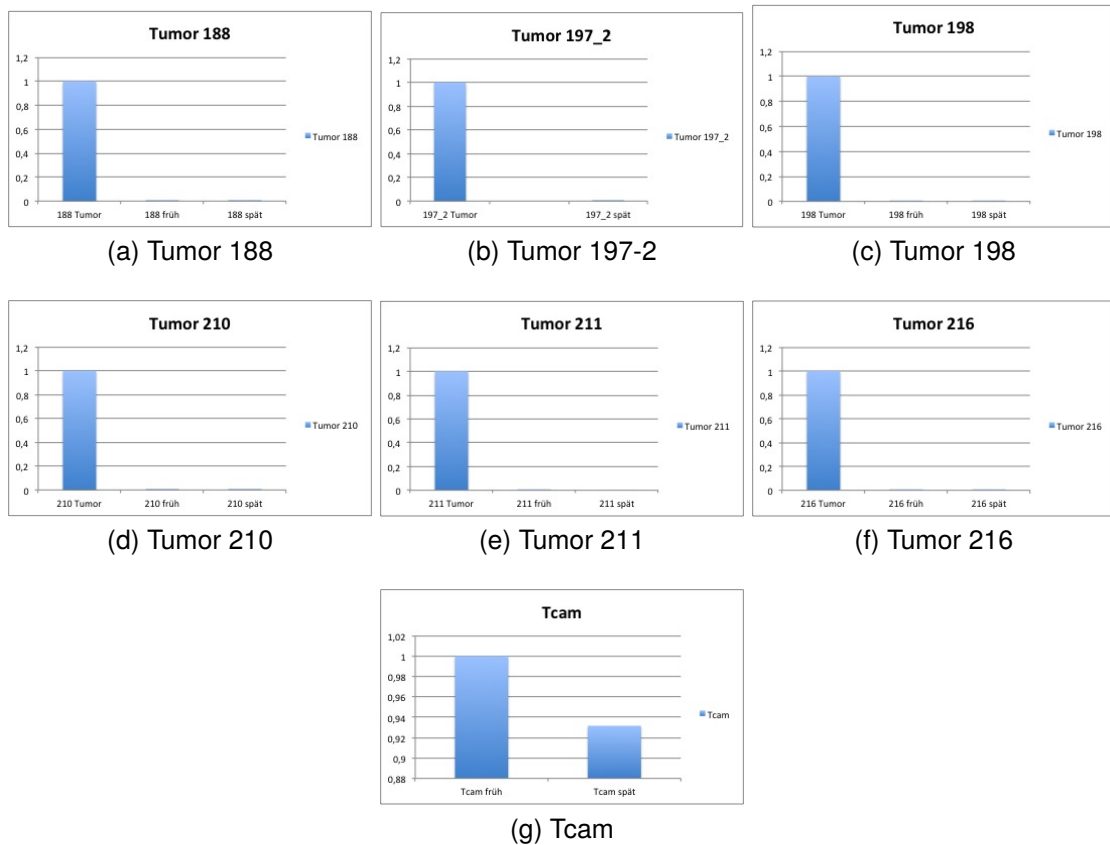


Abbildung 3.21: PCR OCT3/4



## TERT

Der Marker TERT wird sowohl in der frühen Embryonalentwicklung des Menschen als auch in Seminomzellen stark exprimiert. Die Übersichtsgrafik 3.22 zeigt, dass die Konzentration von TERT im zeitlichen Verlauf vom Stadium „Tumor“ bis „Früh“ auf das 0,3-fache abnimmt, diese sinkt im Stadium „Spät“ weiter auf das 0,2-fache.

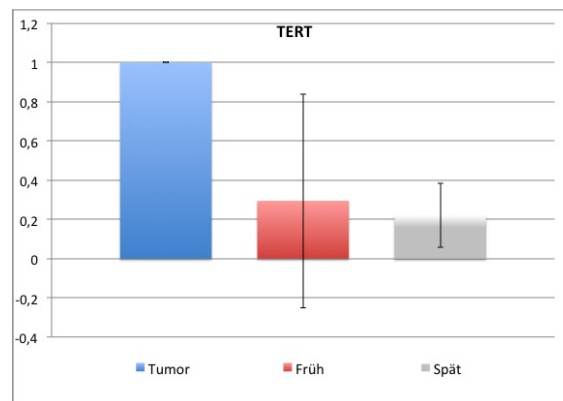
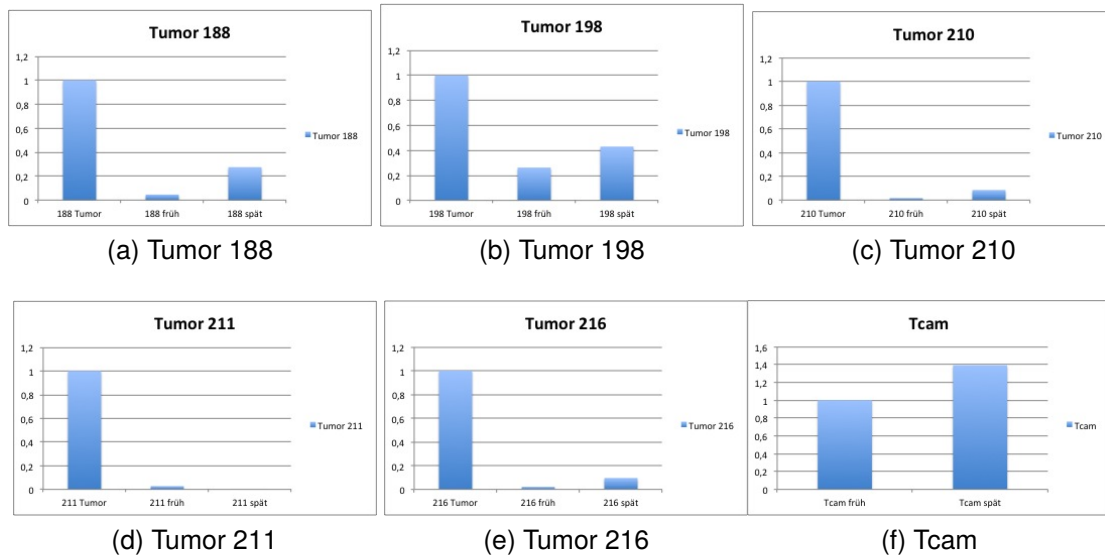


Abbildung 3.22: TERT gesamt

Die einzelnen Tumoren zeigen jeweils unterschiedliche Entwicklungen der TERT-Expression, wobei insgesamt die Konzentrationen rückgängig sind, eine Ausnahme bildet die Vergleichslinie **Tcam**: Hier steigt die Konzentration auf das 1,4-fache. In **Tumoren 188 und 198** geht die Expression im Stadium „Früh“ jeweils auf das 0,05 bzw. 0,3-fache zurück, steigt dann wieder auf das 0,3 bzw. 0,4-fache an, erreicht aber nicht mehr das Ausgangsniveau. **Tumoren 210, 211 und 216** zeigen einen starken Rückgang der TERT-Konzentration in allen Stadien. Für Analysen bei **Tumor 197\_2** war für diesen Versuch zu wenig Material vorhanden.

Abbildung 3.23: PCR TERT



### 3.7.2 Lymphozytenmarker CD45

Die PCR mit dem Marker CD45 erfolgte, um eine genauere Differenzierung zwischen einer eventuell entstandenen lymphoblastischen Zellreihe und Seminomzellen vornehmen zu können. Abbildung 3.24 zeigt die generelle Entwicklung des Markers CD45 in allen Zellreihen. Im frühen Stadium steigt die Konzentration von CD45 um das 1,7-fache, was aber mit einer Standardabweichung von 3,2 nicht als generelle Entwicklung gewertet werden kann. Somit ist eine Einzelbetrachtung jeder Zellreihe erforderlich. Im späten Stadium sinkt die CD45-Konzentration im Vergleich zum frühen Stadium, beträgt aber immer noch das 1,3-fache des Ausgangswertes.

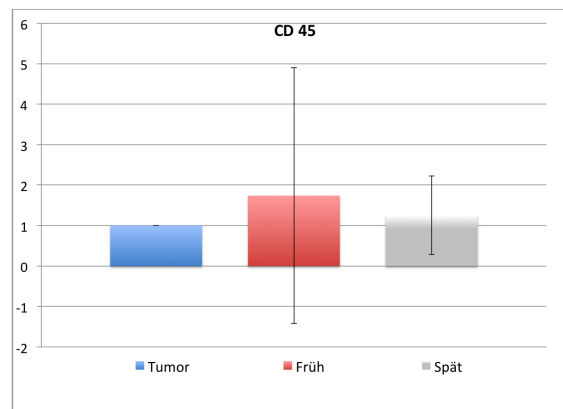
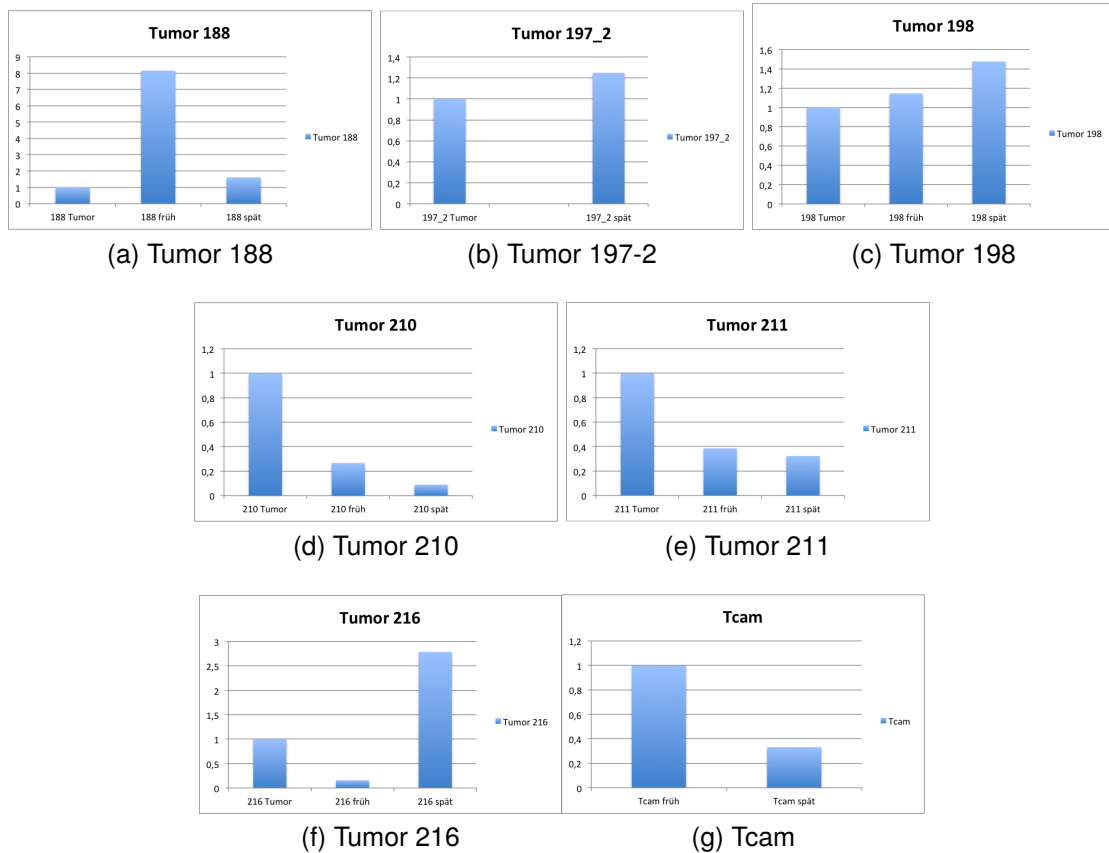


Abbildung 3.24: CD45 gesamt

Abbildung 3.25: PCR CD45



Betrachtung im Einzelnen: **Tumor 188** zeigt eine Zunahme der CD45-Konzentration auf das 8,1-fache im frühen Stadium, welche auf 1,6 zurückgeht.

**Tumor 197\_2** zeigt von seinem Anfangsstadium ausgehend eine Zunahme um das 1,3-fache des Markers CD45.

**Tumor 198** zeigt eine leichte stetige Zunahme von CD45 jeweils im frühen Stadium auf das 1,1-fache und im späten auf das 1,5-fache.

Die CD45-Konzentration in **Tumor 210** beschreibt eine ähnliche Entwicklung wie die in **Tumor 211**: Im Stadium „Früh“ sinkt sie jeweils auf das 0,3 bzw. 0,4-fache, im Stadium „Spät“ auf das 0,1 bzw. 0,3-fache.

Eine gegensätzliche Entwicklung zeigt sich bei **Tumor 216**. Hier sinkt die CD45 zwar auch zuerst auf das 0,2-fache, doch steigt sie danach wieder auf das 2,8-fache der Ausgangskonzentration.

In Linie **Tcam** sinkt die CD45-Konzentration auf das 0,3-fache.

### 3.7.3 Apoptosemarker Bax und Bcl2

Die beiden Apoptosemarker Bax und Bcl2 wurden untersucht, um zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß die Zellkulturen den programmierten Zelltod ausgeführt haben. Besonders in Tumorkulturen, aus denen sich fraglich lymphoblastische Zelllinien entwickelt haben, scheint dies von Interesse, um zu klären, inwiefern die Apoptose eine Rolle bei der Entwicklung von lymphoblastischen Zellreihen führte. Zuerst werden die Marker einzeln betrachtet, dann wird der Quotient Bax/Bcl2 gebildet und dieser nochmals separat ausgewertet.

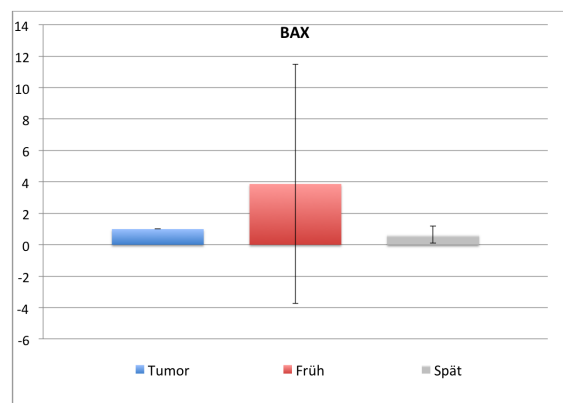
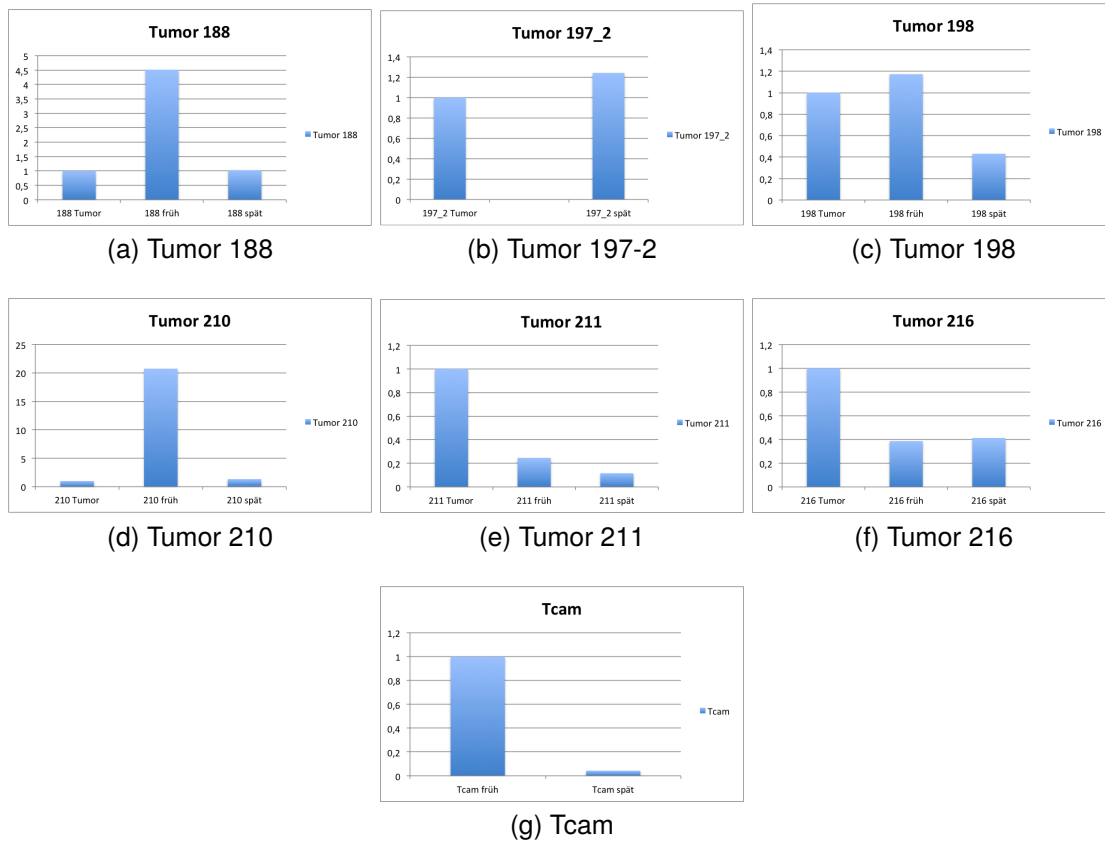


Abbildung 3.26: BAX gesamt

In Graphik 3.26 zeigt sich besonders im Stadium „Früh“ eine 3,9-fache Zunahme des Apoptoseförderers Bax, allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung (7,6). Dies erfordert eine separate Auswertung für jeden Tumor, da sich ein einheitlicher Trend nicht feststellen lässt. Im Stadium „Spät“ ist der Wert auf das 0,65-fache gesunken.

Abbildung 3.27: PCR BAX



**Tumor 188** zeigt eine Zunahme des Markers Bax um das 4,5-fache im frühen Stadium und einen Rückgang von Bax im späten Stadium auf das Ausgangsniveau (1,03-fach).

In **Tumor 197\_2** nimmt die Bax-Konzentration vom Anfangsstadium ausgehend um das 1,24-fache zu.

**Tumor 198** weist zuerst einen Anstieg um das 1,17-fache und im späten Stadium einen Rückgang auf 0,43-fache auf.

Die Bax-Konzentration in **Tumor 210** zeigt eine ähnliche Entwicklung wie Tumor 188, allerdings in noch stärkerer Form. Im Vergleich zum Tumorstadium ist Bax im Stadium „Früh“ 20,7-fach vorhanden, diese Konzentration geht auf das 1,3-fache zurück.

**Tumor 211** und **Tumor 216** zeigen beide eine Reduktion der Bax-Konzentration im Verlauf zuerst auf das 0,25 (0,39)-fache - im späten Stadium sinkt der Wert auf das 0,12- (0,41)-fache.

Die Vergleichslinie **Tcam** hat die wohl stärkste Abnahme des Markers vom Anfangs- bis zum Spät-Stadium, in welchem die Konzentration auf das 0,042-fache abge-

fallen ist.

Der Apoptosehemmer Bcl2 stellt den Gegenspieler zu Bax dar. Kippt das Gleichgewicht dieser Gegenspieler in Richtung Bcl2, so findet mehr Hemmung der Apoptose als Förderung statt und man kann davon ausgehen, dass in dieser Zellkultur weniger Apoptose stattfindet. Diese Überlegung findet auch noch Anwendung im Quotienten, der im nächsten Schritt gebildet wird.

Betrachtet man nur die Bcl2-Konzentrationen im Gesamtüberblick wie in Abbildung 3.28 zu erkennen, so fällt eine im Vergleich zur Anfangskonzentration auf das 21-fache gestiegene Bcl2-Konzentration auf, die sich dann auf das 10,6-fache reduziert. Dies ist ein wesentlich höherer Anstieg als der Anstieg der Bax-Konzentration, was im Bax/Bcl2-Quotienten zu tragen kommen wird.

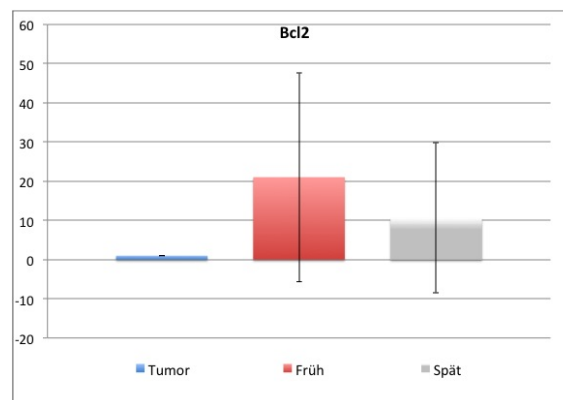


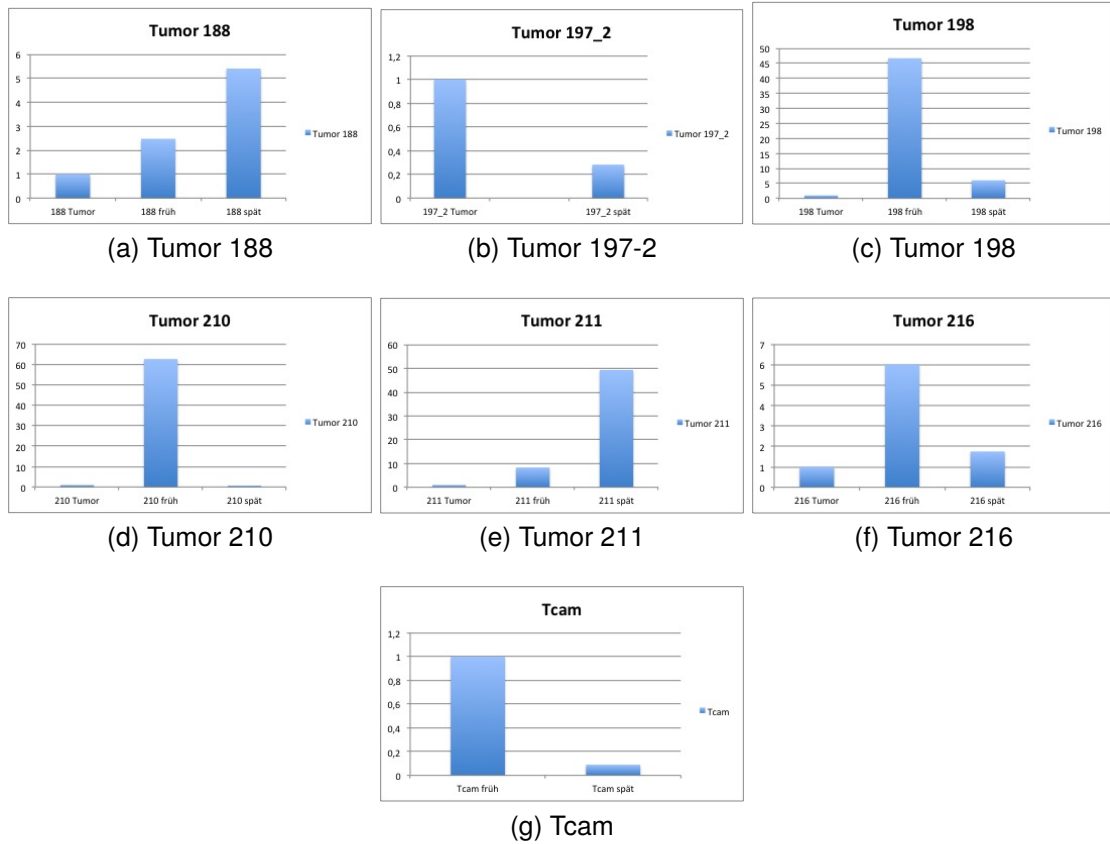
Abbildung 3.28: Bcl2 gesamt

Im Gegensatz zum Anstieg der Bcl2-Konzentration in **Tumor 188** auf das 5,4-fache im Spätstadium sinkt die Konzentration auf das 0,3-fache bei **Tumor 197\_2**. **Tumor 198, 210 und 216** zeigen eine etwa gleiche Tendenz der Entwicklung ihrer Bcl2-Werte im Zeitverlauf. Zuerst ist ein z.T. sehr starker Anstieg zu verzeichnen (47-, 63 bzw. 6-fach), welcher dann im Spätstadium auf das 6-, 0,7- bzw. 1,7-fache sinkt. Der stufenweise Anstieg der Bcl2-Konzentration in **Tumor 211** lässt sich wiederum mit der von Tumor 188 vergleichen. Im Stadium „Früh“ beträgt er das 8-fache, steigt aber im Stadium „Spät“ dann auf das 49-fache an.

In der Vergleichslinie **Tcam** findet ein Abfallen des Markers auf das 0,09-fache des Ausgangswertes statt, auch die Bax-Konzentration dieser Zellreihe ist ähnlich stark gefallen.



Abbildung 3.29: PCR Bcl2



Bildet man nun den Quotienten aus Bax und Bcl2 (also Apoptoseförderer/ Apoptosehemmer) gibt er die Apoptoserate an. Das heißt: je größer dieser Faktor ist, desto gewichtiger ist Bax als Zähler und somit hat mehr Apoptose stattgefunden. Das Gesamtergebnis ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

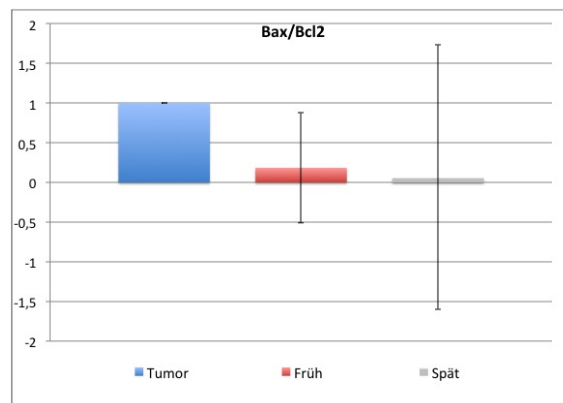
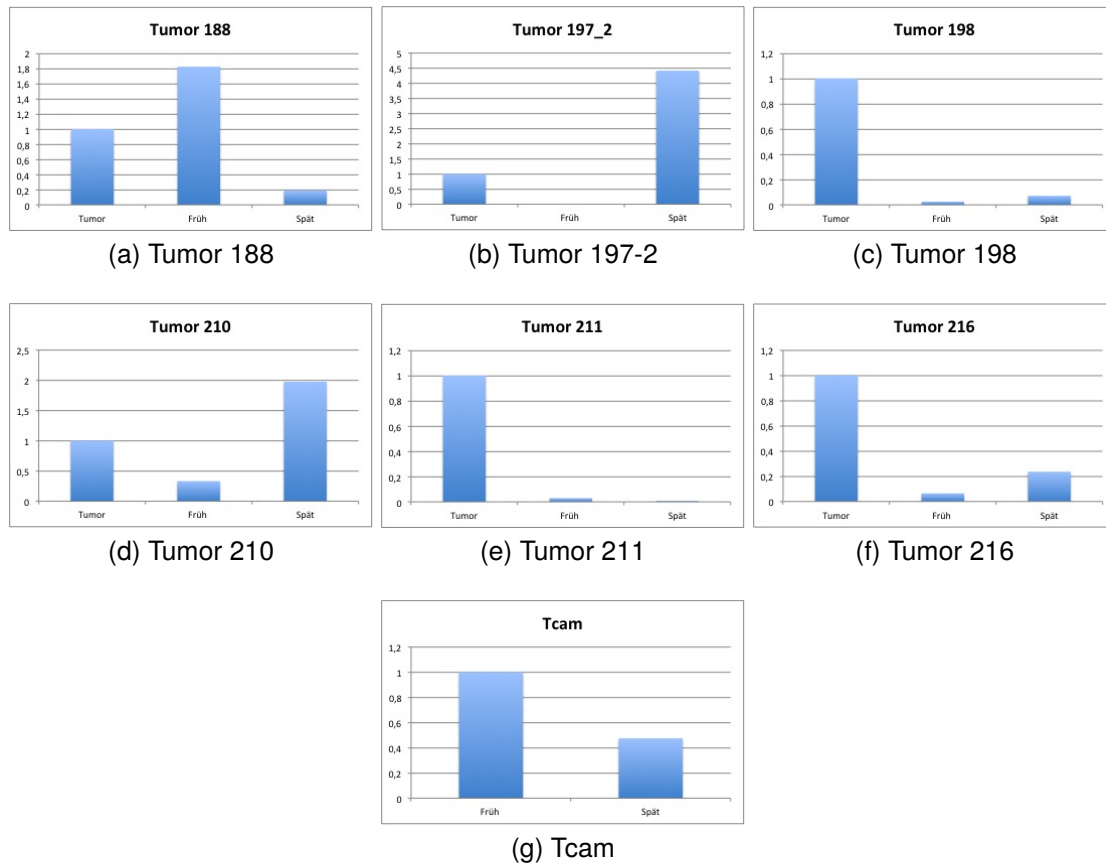


Abbildung 3.30: Bax/Bcl2 gesamt

Was hier besonders auffällig ist, sind die im Vergleich zum abnehmenden Apoptosefaktor zunehmenden Standardabweichungen. Sinkt der Wert des Quotienten auf das 0,18-fache im frühen Stadium mit einer Standardabweichung von 0,69, so beträgt die Standardabweichung 1,67 im späten Stadium bei einem Abfall des Quotienten auf 0,06.

Abbildung 3.31: PCR Bax/Bcl2



**Tumor 188** zeigt eine Zunahme der Apoptoserate auf das 1,8-fache im frühen Stadium, welche auf 0,19 zurückgeht.

**Tumor 197\_2** zeigt von seinem Anfangsstadium ausgehend eine Zunahme um das 4,4-fache der Apoptoserate in der späten Phase, also beim Wiederauftauen, in **Tumor 198** hingegen geht die Apoptoserate auf 0,03 und 0,07 im frühen bzw. späten Stadium zurück.

Die Apoptoserate in **Tumor 210** beschreibt eine ähnliche Entwicklung wie die in Tumor 197\_2: Sie geht im Stadium „Früh“ auf das 0,33-fache der Anfangskonzentration zurück, im Stadium „Spät“ steigt sie auf das 1,9-fache.

**Tumoren 211** und **216** zeigen eine starke Reduktion der Apoptoserate im Verlauf. Im Stadium „Früh“ beträgt sie das 0,03-fach bzw. das 0,06-fache, im Stadium

„Spät“ geht sie auf das 0,002-fache zurück bzw. steigt leicht auf das 0,23-fache an.

Eine abnehmende Tendenz zeigt sich auch bei **Tcam**. Die Apoptoserate sinkt im Verlauf auf das 0,47-fache.

Tabelle 3.3 zeigt alle Ergebnisse der Seminom- sowie Lymphozytenmarker im Überblick ohne Bax und Bcl2.

Tabelle 3.3: Ergebnisse Überblick

		Seminommarker					Lymphozytenmarker		
Linie		CD117	PLAP	OCT3/4	TERT	D2-40	CD20	CD45	EBV
188	PCR Tumor	1	-	1	1	-	-	1	-
	PCR Früh	0	-	0	0	-	-	8	-
	PCR Spät	0	-	0	0,3	-	-	1,6	-
	Zytoblock p10	-	-	-	-	-	neg	-	pos
	Zytospin p9	neg	neg	-	-	-	pos	pos	-
197_2	PCR Tumor	1	1	1	-	-	-	1	-
	PCR Spät	-	1,5	0	-	-	-	1,2	-
	Zytoblock p6	pos	neg	-	-	pos	neg	-	neg
	Zytospin p8	pos	-	-	-	-	pos	neg	-
198	PCR Tumor	1	1	1	1	-	-	1	-
	PCR Früh	0	0	0	0,3	-	-	1,2	-
	PCR Spät	0	0	0	0,4	-	-	1,4	-
	Zytoblock p17	-	-	-	-	-	neg	-	neg
	Zytospin p14/15	neg	neg	-	-	-	neg	pos	neg
210	PCR Tumor	1	1	1	1	-	-	1	-
	PCR Früh	0	0	0	0	-	-	0,3	-
	PCR Spät	0	0	0	0,1	-	-	0,1	-
	Zytoblock p11	-	-	-	-	-	pos	-	pos
	Zytospin p9	neg	neg	-	-	-	-	pos	-
211	PCR Tumor	1	1	1	1	-	-	1	-
	PCR Früh	0	0,5	0	0	-	-	0,4	-
	PCR Spät	-	-	-	-	-	-	0,3	-
	Zytoblock p4	-	-	-	-	-	pos	-	pos
	Zytospin p4	neg	neg	-	-	-	pos	neg	neg
216	PCR Tumor	1	1	1	1	-	-	1	-
	PCR Früh	0	1,1	0	0	-	-	0,2	-
	PCR Spät	-	1,7	0	0,1	-	-	2,8	-
	Zytospin p10	neg	neg	-	-	-	-	pos	-
Tcam	PCR Tumor	1	1	1	1	-	-	1	-
	PCR Spät	0,1	3	0,9	1,4	-	-	0,3	-
	Zytoblock p6	pos	neg	-	-	pos	neg	-	neg
	Zytospin p2	pos	neg	-	-	-	neg	neg	-

Erläuterung: In den Zeilen „Tumor“, „Früh“ und „Spät“ sind jeweils die PCR-Ergebnisse aufgetragen (als  $n$ -faches des Ausgangswertes des Wertes „Tumor“). Färbungen der Zytospins/Zytoblocks sind entweder pos (positiv) gewertet, wenn mehr als die Hälfte der Zellen angefärbt waren, bei weniger als der Hälfte als neg (negativ).

## 4 Diskussion

Wie in der Einleitung aufgezeigt, ist die Kultur einer Seminomzelllinie (Tcam) bisher nur einer Arbeitsgruppe gelungen (Mizuno et al., 1993). Andere Zelllinien, wie JKT-1 oder SEM-1 stellten sich, obwohl anfangs von den Autoren so deklariert, nicht als Seminomlinien heraus (Eckert et al., 2008). Bei dem Versuch, Seminomzellen zu kultivieren, ist bei der Arbeitsgruppe von Fend et. al (Fend et al., 1995) eine lymphoblastische B-Zelllinie entstanden, die mit einer gleichzeitigen EBV-Infektion der Zellen einherging. Andere Arbeitsgruppen wie Berends et al. (Berends et al., 1991) versuchten, die Lebenszeit der Seminomzellen durch Feederzellen zu verlängern. Die aus einem Seminom frisch aufbereitete und danach eingefrorene Suspension bestand bei Berends et al. zu 75% aus Lymphozyten und zu 25% aus Seminomzellen. Nach dem Auftauen waren 95% der Lymphozyten, aber nur 10% der Seminomzellen lebensfähig. Das durchschnittliche Überleben der Seminomzellen betrug hier 3-11 Tage. Diese Zeit reicht für Zellkulturexperimente an Seminomen nicht aus.

Da adulte spermatogonale Stammzellen in Mäusehoden die Kapazität zur Pluripotenz besitzen (Guan et al., 2006) und andere Zellen des Hodens im Verdacht stehen, diese Kapazität ebenfalls zu besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass auch Seminomzellen Stammzeleigenschaften aufweisen könnten. Die vorgelegte Arbeit zeigt einen neuen Ansatz, Seminomzellen in Kultur zu nehmen mit der Idee, dass diese unter den Kulturbedingungen von Stammzellen wachsen könnten. Die hohe und frühe Absterberate von Seminomen, die in Kultur genommen werden, könnte am Fehlen bestimmter Faktoren liegen, die durch Stammzellmedien zugeführt werden.

## 4.1 Seminomspender

Die Materialgewinnung der Seminome erfolgte nach strikten Einschlusskriterien. Dennoch konnten spenderabhängige Eigenschaften wie z.B. weitere Erkrankungen insbesondere Infektion mit EBV, der allgemeine Immunstatus des Patienten, Informationen zum Lebensstil wie Nikotin- und Alkoholkonsum des Spenders nicht normiert werden. Auch die Entnahmetechnik des jeweiligen Operateurs, die genaue Transferzeit vom Operationssaal bis zur Primärkultur und eine evtl. Zwischenkühlung sind als Einflüsse auf das Wachstum der Zellkulturen denkbar. Diese Zwischenkühlungszeit betrug maximal 12h (vom Operationszeitpunkt bis zur Inkulturnahme am Abend).

Tumoren 188 und 198 beispielsweise hatten fast keine Zwischenkühlungszeit, sondern wurden direkt nach Entnahme in Primärkultur genommen. Dies könnte das sehr gute Wachstum der Linie 188 erklären, sie unterlag keiner potentiell für die Zellen schädlichen Kühlung.

Der Einfluss auf die Entwicklungspotenz zur lymphoblastischen Zellreihe scheint unwahrscheinlich, da auch andere Zelllinien, wie z.B: Tumor 210 und Tumor 211, die eine längere Zwischenkühlungszeit hatten, die Entwicklungstendenz zur lymphoblastischen Zellreihe aufweisen. Auf diese Entwicklung wird in Kapitel 4.4 genauer eingegangen.

Die aus Tabelle 2.1 resultierenden Größen der jeweiligen Seminome entsprechen den unterschiedlichen Primärgrößen der entnommenen Seminome. Von dieser Masse wurde Gewebe zur genauen histologischen Differenzierung entnommen, das nicht zur Primärkultur verwendet wurde. Somit bleibt unklar, wie viel Gewebe zur tatsächlichen Primärkultur vorhanden war und ob dies einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Mit der Verteilung der Zellen nach ihrer Anzahl auf 6-Well-Platten wurde versucht, den Einflussfaktor so gering wie möglich zu halten.

## 4.2 Überlebenszeiten der Zellen im Vergleich zu anderen Studien

Das durchschnittliche Überleben von Seminomzellen in Kultur betrug in anderen Studien (z.B. Berends et al. (Berends et al., 1991)) ca. 3-11 Tage. Die in Tabelle 3.2 aufgezeigten Zeiten geben die Überlebenszeit der in dieser Studie verwendeten

Zellen an. Hier gilt zu beachten, dass dies nicht heißt, dass am Ende dieser Zeit die Zellen abgestorben sind, sondern dass sie eingefroren wurden. Das Einfrieren wurde vorgenommen, damit getestet werden kann, wie die Zellen dies tolerieren und ob sie nach dem Auftauen weiter gezüchtet werden können. Eine längere Überlebenszeit ist also durchaus denkbar.

Die Überlebensdauer der Zellen dieser Studie betrug ein Vielfaches der Zeiten, die in anderen Studien angegeben sind. Es bleibt die Frage, ob bei vielen Linien nicht Lymphozyten die lange Überlebenszeit ausmachen. Dies ist sicherlich bei einigen der Fall, allerdings beträgt die Überlebenszeit bei Seminomlinie 197\_2 125 Tage in hGSC und 71 Tage in RPMI. Da nur diese Linie als Seminomlinie zu werten ist (wie später genauer erläutert), kann man diese Überlebenszeit als großen Fortschritt im Vergleich zu den vorangegangenen Ergebnissen sehen.

### 4.3 Einflussgröße Stammzellmedium

Eine für die Zellkultur ganz entscheidende Einflussgröße sind die verschiedenen Kulturmedien, in denen die Zellen bebrütet wurden. Am Anfang der Kultur von humanen embryonalen Stammzellen (hESC), mussten bis dahin eher unbekannte Faktoren dem Stammzellmedium durch das sogenannte „conditioning“ zugeführt werden, indem zuerst embryonale Mausfibroblasten mit dem Medium zusammengegeben wurden, die löslichen Faktoren, die die Fibroblasten bildeten damit gewonnen und später zu den hESC gegeben wurden (Wang et al., 2007). Dieser Prozess war schwer standardisierbar und durch die fortschreitende Entwicklung des Wissens über die Stammzellkultur wurde das „conditioning“ langfristig durch die Zugabe von synthetischen Wachstumsfaktoren, die dem Medium supplementiert werden konnten, ersetzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind modifiziert nach Kanatsu-Shinohara et al. (Kanatsu-Shinohara et al., 2003).

DMEM/Ham's F12 -Basismedium und Knockout Medium bilden die zwei unterschiedlichen Medien-Grundlagen (siehe Tabelle 2.2 und 2.3). Gemeinsame Zusätze dieser Medien sind L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin,  $\beta$ -Mercaptoethanol, sowie essentielle Vitamine und Aminosäuren.

$\beta$ -Mercaptoethanol gilt als potenter Radikalfänger und wird verwendet, um toxische Sauerstoffkonzentrationen in der Zellkultur zu vermeiden.

Auch die Hormone Estradiol und Progesteron sowie die Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und GDNF sind in beiden Medien dieser Arbeit zu finden.

Der Faktor EGF hat eine Auswirkung auf die Proliferation und Apoptose von humanen embryonalen Stammzellen. Laut einer Studie von Wang et al. (Wang et al., 2007) wird durch Blockieren von ERBB2, der zur Gruppe der Epidermal growth factor-Rezeptoren (EGFR) gehört, die Proliferation dieser Zellen gehemmt und die Apoptose eingeleitet. EGF wirkt aktivierend auf diesen Rezeptor und hat damit eine wachstumsfördernde Wirkung.

Eine ähnliche Aufgabe scheint bFGF zu besitzen. Nach einer Studie von Amit et al. (Amit et al., 2000) ist die Klonalität embryonaler Stammzellen besser in Medien mit zugesetztem bFGF und Serum replacer als in Medien, die nur fetales Kälberserum erhalten.

GDNF hingegen hat spezielle Auswirkungen direkt auf die Keimbahn-Stammzelle (germ line stem cell, GSC). Im Mäusehoden sind die Stammzellen im direkten Kontakt mit der Basalmembran von Sertolizellen. GDNF spielt bei diesem Kontakt eine Hauptrolle und ist für die Kontrolle der Selbst-Erneuerung der GSC verantwortlich (Li and Xie, 2005). Eine weitere, vor allem für die Kultur von Stammzellen wichtige Aufgabe von GDNF ist die Erhaltung der Zellen in vitro (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Ein für die embryonale Stammzellkultur viel diskutierter Zusatz ist LIF. Dieser Faktor wurde 1988, zu einem relativ frühen Entwicklungszeitpunkt der Stammzellkultur, entdeckt. Seine Zugabe erhält die Pluripotenz der murinen embryonalen Stammzellen (Williams et al., 1988). Es bleibt fraglich, ob dieser Faktor auch für die humane Stammzellkultur unerlässlich ist, da der LIF-Rezeptor sowie sein Ko-Rezeptor keine Expression in den Microarray-Analysen von humanen embryonalen Stammzellen, ECC sowie Seminomen und anderen Hodentumoren zeigten (Sperger et al., 2003). Humane embryonale Stammzellen ohne embryonale Mäusefibroblasten differenzierten mit und ohne die Anwesenheit von LIF (Thomson et al., 1998), was dafür spricht, dass nicht LIF allein für die Erhaltung der Pluripotenz und Hemmung der Differenzierung verantwortlich ist. Kanatsu-Shinohara et al. hingegen verwenden im Medium für murine spermatogonale Stammzellen unter anderem auch den Faktor LIF, das Ergebnis ihrer Studie ist eine 5-monatige Aufrechterhaltung der Kultur und die Erhaltung der Funktionalität der spermatogonalen Stammzellen zur Therapie infertiler Mäuse (Kanatsu-Shinohara et al., 2003). In ihrer Folgearbeit zeigten Kanatsu-Shinohara et al. 2007 dass LIF am Beginn einer murinen Keimzell-Stammzellkultur eine Rolle spielt und stellen deshalb die These auf, dass LIF in der Entwicklung von Gonozyten zu Spermatogonien involviert ist (Kanatsu-Shinohara et al., 2007).

In den Kulturmedien modifiziert aus DMEM/Ham's F12 -Basismedium und Knockout-



Serumreplacement finden die oben genannten Zusätze eher einzeln Verwendung. Mit unseren modifizierten Medien wurde versucht, ein möglichst breites Spektrum an benötigten Supplements wie bei Kanatsu-Shinohara et al. zu erzeugen, deshalb sind die Zusätze, bis auf einige Unterschiede, in beiden Medien komplett zu finden.

### 4.3.1 Unterschiede von StemPro und hGSC

Im StemPro-Medium ist im Unterschied zum hGSC-Medium FCS und BSA zugesetzt. FCS ist für die Stammzellkultur ein häufig verwendeter Zusatz (Kanatsu-Shinohara et al., 2003), ist aber laut Berends et al. für Seminomzellen schädlich, da diese ohne FCS signifikant länger im Medium überleben (Berends et al., 1991). Weiterhin sind im StemPro-Medium Laktat und Pyruvat vorhanden. Diese beiden sauren Bestandteile werden auch dem Kulturmedium von Kanatsu-Shinohara et al. (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) zugesetzt. Laktat kann, einer Publikation von Lampe et al. zufolge, neurale Vorläuferzellen von exogen zugeführten freien Radikalen reinigen, den intrazellulären Redoxstatus reduzieren und die Proliferation einer Zellpopulation steigern (Lampe et al., 2009). Die Übertragbarkeit auf humane Stammzellen wäre zu überprüfen, allerdings finden sowohl Pyruvat als auch Laktat Verwendung im Kulturmedium von Lim et al. (Lim et al., 2010), die mit ihrem Medium humane spermatogonale Stammzellen Feeder-frei züchteten.

Im hGSC-Medium ist als zusätzlicher Bestandteil HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) verwendet worden, der in Zellkulturmedien als Puffersubstanz dient.

Ingesamt lässt sich zusammenfassen, dass die hier verwendeten Zellkulturmedien beide der Feeder-freien Kultur von Stammzellen dienen. StemPro®hESC SFM von ThermoFisher Scientific ist laut Hersteller speziell für das Wachstum und die Ausbreitung von humanen ESC und humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) entwickelt. Ob der Zusatz von FCS, BSA sowie Laktat und Pyruvat im StemPro-Medium eine Wirkung auf das Wachstum bzw. die Differenzierung der Zellen hat, wird im folgenden Unterkapitel diskutiert.

## 4.4 Histologie der Zellen im Vergleich

Die in der Einleitung beschriebene Histologie von Seminomzellen beschreibt zum einen inselförmig angeordnete Zellen mit klarem Zytoplasma und zum anderen synzytiotrophoblastische Riesenzellen. Beide dieser Zellarten waren nach dem Auftauen aller Zellreihen *in vitro* wiederzufinden. Die inselförmig angeordneten Zellen waren gut zu erkennen, in dieser Arbeit wurden sie „Cluster“ genannt, was den gleichen Sachverhalt beschreibt. Die Zellen scheinen einen Vorteil aus einer inselförmigen Anordnung zu ziehen. Was dieser Vorteil ist, könnte Gegenstand weiterer Studien sein, um herauszufinden, ob Zellen in diesen Inseln Vorteile aus der Zell-Zell-Interaktion ziehen oder eventuell nur in solchen Clustern ein regelmäßiges Wachstum aufweisen.

Die von uns weiterhin beobachtete Eigenschaft, die noch nicht in dieser Form beschrieben wurde, waren die Ausläufer der Zellen, die „Ärmchen“, die den Zellen ein tintenfischähnliches Aussehen verliehen, falls sie mehrere dieser Ärmchen besaßen. Diese Ausläufer könnten für den eventuellen Kontakt untereinander oder zu den Feederzellen zuständig sein. Es stellt sich die Frage, ob dieses Aussehen mehr mit Seminomzellen oder mit B-Lymphozyten vereinbar ist.

Das Aussehen von nativen B-Lymphozyten wird von Ulrich Welsch beschrieben als Zellen, die ca. 6-8  $\mu\text{m}$  groß seien und einen rundlichen Kern mit schmalen Zytoplasmasaum besäßen. T-Lymphozyten hätten ein ähnliches morphologisches Aussehen (Welsch, 2006). Ein Vorkommen von Ausläufern ist nur bei antigenpräsentierenden Zellen bekannt. Somit ist die Unterscheidung allein anhand von morphologischen Kriterien zwischen B-Lymphozyten und Seminomzellen in diesem Fall schwer. Das Vorkommen von Zellinseln und Riesenzellen leitet die Vermutung jedoch mehr in Richtung Seminom.

Allerdings ist eine amöboide Fortbewegung auf Feeder-Zellen, wie in den Ergebnissen beschrieben, weder für B-Lymphozyten noch für Semineome dokumentiert. Eine dritte Zellart, die somit in Betracht zu ziehen ist, sind dendritische Zellen, die histologisch Ausläufer besitzen und CD45 exprimieren (Ren et al., 2013).

Die nach dem Auftauen verwendeten Feederzellen wurden nicht inaktiviert, wie beispielsweise die Mausfibroblasten der Primärkultur. Der Versuch zeigte also auch, dass ein Zusammenleben der beiden Zellarten möglich ist, ohne dass nennenswerte Phagozytosen oder Kreuzreaktionen auftreten, die zum Absterben einer Zellart geführt hätten.

## 4.5 Kulturmedienabhängige Entwicklung der Zellen

Zum Vergleich des Wachstums in den Kulturmedien StemPro und hGSC wurden die Zellreihen 188, 210, 211 und 216 in beiden Medien kultiviert.

Betrachtet man die Verdopplungszeiten, fällt ein höherer Mittelwert in Tagen im hGSC - Medium im Vergleich zu StemPro bei drei der vier getesteten Zelllinien auf (210: 14,3 vs. 9,8; 211: 20,8 vs. 12,5; 216 49 vs. 2,4). Allein Zelllinie 188 zeigt mit 3,7 Tagen Verdopplungszeit in hGSC vs. 7,1 Tagen in StemPro eine konträre Entwicklung.

Auch im Standard-Medium RPMI wurde das Zellwachstum kontrolliert, da Vergleichslinie Tcam nur dieses Medium benötigte. Linie 188 und 198 wurden sowohl in RPMI als auch in hGSC bzw. bei Linie 188 in allen drei Medien gezüchtet. Tumor 188 zeigte ein langsames Wachstum der Zellen in RPMI als in hGSC (7,0 und 3,7 Tage Verdopplungszeit), was mit den Ergebnissen von Linie 198 übereinstimmt (9,5 vs 2,9 Tage). Die mit Abstand längste Verdopplungszeit zeigte Tumor 197\_2 (62 Tage in hGSC und 35 Tage in RPMI). Nach ca. 2 Monaten Wachstum blieb eine signifikante Verdopplung der Zellen aus.

Grundsätzlich können dadurch zwei Hypothesen aufgestellt werden.

Erstens: gutes Wachstum der Zelllinie entspricht gutem Wachsen der Seminomzellen. Zweitens: gutes Wachstum der Zelllinie entspricht vor allem dem Wachstum einer lymphoblastischen B-Zelllinie.

Dem Fakt folgend, dass nur Linie 197\_2 seminomähnliche Züge zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass das fehlende Wachstum ein Hinweis für das Vorliegen einer Seminomlinie ist.

Bei allen Zelllinien, bei denen sich lymphoblastische B-Zelllinien entwickelt haben, sind die Lymphozyten medienabhängig schnell gewachsen (in StemPro schneller als in hGSC). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Medium hGSC durch seine spezifischeren Zutaten das Lymphozytenwachstum eher gehemmt hat, das heißt, eher fördernd für das Wachstum von Seminomen war und somit ein langsames Wachstum begünstigte. In den lymphoiden Zelllinien wie z.B Zelllinie 188, die die größte Wachstumsgeschwindigkeit aufgewiesen hat, könnten die anfangs noch vorhandenen Seminomzellen durch B-Lymphozyten verdrängt worden sein.

Was nun in Tumor 197\_2 diesen Shift verhindert hat, ist durch die Zugabe von verschiedenen Medien nicht zu klären.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Medium wohl nur einen Einfluss auf die Schnelligkeit des Wachstums (von evtl. lymphozytoblastischen B-Lymphozyten) hatte, nicht aber auf die Potenz der Tumorzellen, sich zu einer

Seminomlinie zu entwickeln.

## 4.6 Spezifität der herangezogenen Marker

Um Aussagen über Spezifität und Sensitivität der Ergebnisse machen zu können, sollte die Spezifität der herangezogenen Marker diskutiert werden.

### 4.6.1 Seminommarker

Die zwei am häufigsten verwendeten Seminommarker sind PLAP und die Rezeptor-Tyrosinkinase c-KIT (CD117). Sie gelten als relativ spezifisch. Der immunhistochemische Nachweis von Zellen gelingt in 90- 100% der Seminome sowohl für PLAP als auch für c-KIT (Teilum (Teilum, 1976)). Besonders zur Abgrenzung vom embryonalen Karzinom sind beide gut geeignet (Wittekind et al.(Wittekind, 2008)). Allerdings ist laut Biermann et al. (Biermann et al., 2012) die immunhistochemische Färbung mit c-KIT nicht zur Differenzialdiagnose von CIS und nicht-neoplastischen Spermato gonien heranzuziehen, da die Färbungen sowohl in Biopsien als auch in Orchiectomie-Präparaten jeweils positiv für c-KIT waren, wohingegen PLAP und OCT3/4 spezifisch CIS und keine Spermato gonien anfärbten. Der Grund hierfür liegt in der kompletten Herunterregulierung von OCT3/4 und PLAP in (Prä-)Spermato gonien im Vergleich zu CIS . Somit sollte c-KIT nur in Kombination mit anderen Markern für diese Differenzialdiagnose verwendet werden. Ob c-KIT auch unspezifisch in Kultur genommene Spermato gonien nicht von Seminomzellen unterscheiden kann, bleibt fraglich.

Der monoklonale Antikörper D 2-40 (auch M2A) wurde eigens mit der Intention hergestellt, einen spezifischen Marker zu generieren, der Seminome und Dysgerminome verlässlich identifiziert. Der Antikörper färbt fetale, aber keine adulten Hoden, Seminome und Dysgerminome, aber keine anderen gonadalen oder extragonadalen Tumoren, insbesondere keine Lymphknoten und Lymphome. 12 von 12 Seminomen wurden durch D 2-40 angefärbt, die Spezifität beträgt also 100% (Bailey et al., 1986). 2002 veröffentlichten Kahn et al. (Kahn et al., 2002) allerdings, dass D 2-40 ein neuer selektiver Marker für lymphatisches Endothel und ein Marker für das Kaposi-Sarkom sei (Kahn et al., 2002), was den Aussagen von Bailey et al. widerspricht.

Dies könnte insofern von Bedeutung sein, dass lymphozytoblastische B-Zelllinien auch durch D2-40 angefärbt werden können. Laut Kahn et al. wird jedoch sehr spezifisch das Endothel von Lymphgefäßen und nicht die Lymphozyten in ihren Untersuchungen gefärbt. Weiterhin wurden von ihnen nur Gewebeverbände und die darin enthaltenen Lymphgefäße und keine Einzelzellen untersucht. Dies wäre eine Grundlage weiterer Untersuchungen. Für extragonadale Seminome ist D2-40 sogar der sensitivste Marker im Vergleich mit PLAP, c-KIT und OCT 3/4 (Biermann et al., 2006).

### 4.6.2 Lymphozytenmarker und EBV

Unter der Annahme, dass sich der Großteil der pathologisch gesicherten Seminome zu lymphoiden Zelllinien entwickelt haben, müssen die Zellen auf Lymphozyten-spezifische Marker untersucht werden. Deshalb wurden immunhistochemische Färbungen der Lymphozyten-Antigene CD20 und CD45 sowie die Färbung auf EBV durchgeführt und ein PCR-Nachweis des Antigens CD45 getestet. Während CD20 spezifisch für B-Zellen ist, wird CD45 auf allen Leukozyten exprimiert (Thiel et al., 2015). Damit können also sowohl B- als auch T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von T-Lymphozyten und der Aktivierung dieser Zellen. Auf T-Lymphozyten hängt die exprimierte Isoform von CD45 von der Subpopulation und anderen Eigenschaften der Zelle ab, zu der sie gehört (Altin and Sloan, 1997).

Um die Spezifität der Erkennung von CD45 zu erhöhen, hätten bei unseren Versuchen mehrere Isoformen getestet werden können. Diese Unspezifität schlägt sich eventuell in den PCR-Ergebnissen der Tumore 210 und 211 nieder. Obwohl durch die immunhistochemische Färbung der Zytoblocks bei beiden Linien eine spezifisch positive Färbung für CD20 nachgewiesen wurde, ist die PCR für CD45 in beiden Fällen stark sinkend. Da die Zellen auch positiv für EBV sind, ist mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich um Lymphozyten handelt. Diese waren lediglich für die von uns verwendete Isoform von CD45 nicht positiv.

Zur Höhe der kombinierten Spezifität von CD20 mit CD45 für Lymphozyten fehlen Hinweise in der Literatur.

Weiterhin wurde noch auf das Vorhandensein von EBV in den Zellen untersucht, da eine Ko-Infektion die Entwicklung einer lymphozytoblastischen B-Zelllinie hervorruft (Carter et al., 2002) und sich so die Spezifität des Nachweises für Lym-

phozyten erhöht. Gleichzeitig wird bei einer Infektion der B-Lymphozyten mit EBV die Expression verschiedener Gene verändert, unter anderem wird die CD20-Expression auf der Oberfläche herunterreguliert (Carter et al., 2002). Somit können eventuelle mit EBV infizierte B-Zellen nicht mehr durch das CD20-Antigen nachgewiesen werden.

Eine Rolle spielt diese Tatsache bei der immunhistochemischen Färbung von Tumor 198. Sie zeigt für EBV eine minimal positive Färbung, die Färbung für CD20 ist nicht als positiv zu werten. Unter dem Aspekt, dass unter EBV-Einfluss die CD20-Expression herunterreguliert sein könnte, kann keine sichere Aussage über den CD20-Status der Linie gemacht werden. Fehlen also seminomtypische Marker, so muss trotzdem von einer lymphoblastischen Linie ausgegangen werden. Unterstützt wird diese These auch durch einen Nachweis und Anstieg der CD45-Expression im Verlauf.

Eine weitere Folge einer EBV-Infektion ist eine Immunreaktion mit CD8- und CD45-positiven T-Lymphozyten. T-Lymphozyten scheinen eine wichtige Rolle in der Kontrolle von EBV-Infektionen zu spielen. Pope et al. entdeckten, dass Blutlymphozyten, die in vitro mit EBV infiziert wurden, ein für B-Zellen typisches Wachstum zeigten und durch eine T-Zellantwort innerhalb von zwei Wochen zurückgedrängt wurden bzw. starben (Pope and Moss, 1978).

Wie in der Einleitung aufgezeigt, sind laut Fend et al. (Fend et al., 1995) Seminomzellen nicht EBV-positiv, lediglich das Lymphozyteninfiltrat, sofern vorhanden. Allerdings ist zu unterscheiden zwischen einer Infektion des Körpers mit EBV und EBV-positiven B-Lymphozyten. Bei gesunden EBV-Infizierten sind laut einer Studie von Yang et al. lediglich 9 aus  $10^6$  mononukleären Zellen des peripheren Blutes EBV-positiv (Yang et al., 2000). Auch wenn die Spender mit einer hohen Wahrscheinlichkeit EBV-positiv waren, (geht man von einer Durchseuchungsrate von 98% der 40-jährigen aus) müssen sich keine EBV-positiven Lymphozyten im Hoden befinden.

## 4.7 Interpretation der Apoptoserate

Weitere Marker, die durch die PCR bestimmt wurden, sind Bcl2, der Apoptosehemmer und Bax, der Apoptoseförderer. Wird daraus der Quotient gebildet, ergibt sich ein Faktor, der in dieser Studie als Apoptoserate bezeichnet wird.

Vergleicht man die Apoptoserate der verschiedenen Zellreihen, so fällt auf, dass sie in der Tendenz sehr unterschiedlich sind.

**Tumor 188** zeigt im frühen Stadium eine Zunahme, welche dann stark abnimmt. Das heißt, es findet im Stadium „Früh“ am meisten Apoptose statt. Dies könnte darauf hindeuten, dass in diesem Stadium der Umwandlungsprozess vom Seminom zur lymphoblastischen B-Zelllinie stattgefunden hat. Die Seminomzellen sind gestorben bzw. wurden von Lymphozyten verdrängt. Die niedrige Apoptoserate im Stadium „Spät“ deckt sich mit den weiteren Ergebnissen von Linie 188. Sie ist die wachstumsstärkste Linie und die mit der höchsten Überlebenszeit. Somit hat in diesem Stadium weniger bis keine Apoptose stattgefunden, was auch auf ein langes Überleben der Lymphozyten hindeutet.

In **Tumor 197\_2** steigt die Apoptoserate im Stadium „Spät“ auf das 4,4-fache. Aus Materialmangel war es hier nicht möglich, Bax und Bcl2 im frühen Stadium zu bestimmen. Die steigende Tendenz der Apoptoserate entspricht dem Ergebnis, dass diese Zellreihe die höchste Verdopplungs- und die kürzeste Überlebenszeit hatte. Die vorhandenen Zellen scheinen nach und nach programmiertem Zelltod zu unterlaufen.

**Tumoren 198, 211 und 216** zeigen wie **Tcam** im Vergleich zum Anfangsstadium abfallende Apoptoseraten. Vorallem in den jeweiligen Stadien „Früh“ und „Spät“ der Tumoren 198, 211 und 216 fallen die Werte sehr stark, sodass davon ausgegangen werden kann, dass fast keine Apoptose mehr stattgefunden hat. Somit sind die meisten Zellen am Anfang in den programmierten Zelltod gegangen, von dem, ähnlich Tumor 188, wohl vor allem die Seminomzellen betroffen waren. Im Gegensatz zu Tumor 188, bei dem dieser Prozess erst im Stadium „Früh“ erfolgt ist, findet er bei oben genannten Tumoren bereits im Stadium „Tumor“ statt. Ein möglicher Einfluss ist die Größe des Primärpräparats. Tumor 188 ist- verglichen mit den anderen Linien- das kleinste Präparat, weshalb es hier denkbar ist, dass die Zellen besser separiert und verteilt und so ein längeres Überleben der Seminomzellen gesichert werden konnte. Allerdings wird dieser „Vorsprung“ im Stadium „Früh“ wieder verloren, da hier die relevante Apoptose von Tumor 188 stattfindet.

**Tumor 210** zeigt zuerst einen Abfall der Apoptoserate, woraufhin diese dann im Stadium „Spät“ auf das 1,9-fache steigt. Diese Entwicklung ähnelt der von Tumor 197\_2. Hier wäre zu erwarten, dass in diesem Stadium dann noch Seminomzellen vorhanden wären, die dann erst in die Apoptose gehen, was aber Tabelle 3.3 zufolge nicht der Fall ist. Es müssen also andere unbekanntere Einflussgrößen dazu beigetragen haben, dass diese beiden Zelllinien sich so unterschiedlich entwickelt haben.

## 4.8 Entstehung von Seminomlinien

### 4.8.1 Einordnung der Ergebnisse von Zytospin und Zytoblock

Um die Zellen färben zu können, wurde eine Methode benötigt, durch die eine Fixierung der Zellen erreicht wird. In dieser Studie wurde zum einen der Zytospin- also das Zentrifugieren der Zellen auf einen Objektträger und das nachfolgende Fixieren verwendet und zum anderen eine Einbettung in Paraffin- hier Zytoblock genannt- zur Zellfixierung durchgeführt.

Die immunhistochemische Färbemethode mit Antikörpern war allerdings nur für Zytoblocks etabliert, die Färbung der Zytospins war experimenteller Natur, um zu herauszufinden, ob die Ergebnisse mit den Zytoblocks vergleichbar sind.

Tatsächlich zeigten vor allem die Lymphozytenmarker einige Unterschiede in der Färbung. Die CD20-Färbung verdeutlicht diese Feststellung am besten. In 3 Fällen (Linien 198, 211 und Tcam) deckten sich die Zytospin- mit den Zytoblock-Ergebnissen, wohingegen sie sich in zwei Fällen (Linien 188 und 197\_2) widersprachen. Interessanterweise waren die beiden widersprüchlichen Ergebnisse im Kontext völlig anders zu bewerten. Linie 188 zeigte einen CD20-negativen Zytoblock, der Zytospin war CD20-positiv. Da hier, eher von lymphoblastischen Zellen auszugehen war und die Zellen zusätzlich noch EBV-positiv waren (vgl. Kapitel 4.8.2), ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Zellen zusätzlich noch CD20-positiv sind, also das Zytospin-Ergebnis zutrif. Es muss allerdings auch bedacht werden, dass die CD20- Expression durch EBV herunterreguliert wird, was ein CD20- negatives Ergebnis ebenso wahrscheinlich macht.

Bei der Linie 197\_2, die EBV-negativ war und keiner lymphoblastischen Linie entsprach, würde das negative Zytoblock-Ergebnis besser ins Gesamtbild passen.

Denkbar wäre auch noch eine unterschiedliche Isoform der Rezeptoren, da die Zytoblock- und Zytospin-Zellen in unterschiedlichen Stadien gewonnen wurden und die Zellen sich in dieser Zeit eventuell verändert haben.

Die EBV-Färbung hingegen war nur in Linie 211 unterschiedlich. Der Zytoblock war EBV-positiv und der Zytospin EBV-negativ. Da die EBV-Färbung einen zentralen negativen Anteil und einen um diesen zentralen Teil liegenden stark positiven Anteil zeigte, lassen die unterschiedlichen Farbe-Ergebnisse auch noch eine ganz andere Interpretation zu. Es existierten eventuell zwei unterschiedliche Arten von Zellen in Ko-Kultur, die ständig in Konkurrenz miteinander standen: Seminomzellen und durch EBV immortalisierte lymphoblastische B-Lymphozyten. Je nachdem, welcher Anteil überwogen hat, wurde das Farbe-Ergebnis positiv oder



negativ.

Interessant wäre auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine zwei- bzw. dreizeitige Untersuchung gewesen, wie sie in der PCR durchgeführt wurde. Dies könnte in weiteren Studien ausgebaut werden.

#### 4.8.2 Seminome, aus denen sich lymphozytoblastische B-Zelllinien entwickelt haben

Die Zusammenschau aller in Tabelle 3.3 gezeigten Ergebnisse lässt sich folgendermaßen interpretieren:

**Linie 188** zeigte keinen Nachweis eines Seminommarkers, wohingegen sie EBV und CD45-positiv war (sowohl immunhistochemisch als auch in der PCR) und zudem noch eine sehr hohe Verdopplungsrate aufwies. Somit lieferte sie genügend Hinweise, um als eine transformierte lymphoblastische Zelllinie zu gelten. Die Apoptoserate dieser Linie ist im Stadium „Früh“, also 6 Monate nach Inkulturnahme am höchsten. In diesem Stadium wurde auch die höchste CD45-Konzentration gemessen. Dies deutet darauf hin, dass hier das größte Wachstum von Lymphozyten stattgefunden hat und somit auch der größte Zellzerfall von Seminomzellen, das heißt die Transformation in eine lymphozytoblastische Linie muss vorher stattgefunden haben.

**Linie 198:** Auch hier kann von einer lymphoblastischen Zellreihe mit sich komplett zurückbildenden seminomatösen Anteilen ausgegangen werden. Dafür spricht, dass im Stadium „Spät“ keine Seminommarker mehr nachzuweisen waren, CD45 jedoch im Verlauf angestiegen ist. Allerdings war diese Zellreihe EBV und CD20-negativ, weshalb zu überlegen gilt, ob sicher lymphoblastische Zellen entstanden sind oder es sich um eine dritte Zellart handelt, die hier nicht untersucht ist. Diese Zellart scheint die wohl wenigen Seminomzellen überwuchert zu haben, die Apoptoserate war in den Zwei Stadien „Früh“ und „Spät“ fast bei null, es fand also wenig bis kein Zelltod statt. Die Apoptoserate des Stadiums „Tumor“ ist die vergleichsweise höchste, was den Zelltod der Seminomzellen zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich macht. Eine mögliche dritte Zellart, die die Seminomzellen überwuchert haben könnte, sind die Feederzellen. Allerdings wurden für alle Linien außer 188 nur ADSC-Feeder im Stadium „Spät“ verwendet. Diese ADSC-Feeder sind laut einer Studie von Naderi et al. (Naderi et al., 2014) CD45-negativ in der Flowzytometrie. Da hier aber CD45-positive Zellen nachgewiesen sind, scheint diese Theorie unwahrscheinlich.

**Tumor 210:** Die Zellen, die sich hier entwickelt haben, waren in der immunhistochemischen Färbung EBV, CD20 sowie CD45 positiv, was wie bei Linie 188 stark auf die Entwicklung einer lymphoblastischen Linie hinweist. Auch das fehlende Vorhandensein von Seminommarkern in der PCR war ein weiterer Hinweis. Allein das PCR-Ergebnis stand im Gegensatz dazu. Die CD45-Konzentration im Stadium „Früh“ sank auf das 0,3-fache, im Stadium „Spät“ auf das 0,1-fache.

**Tumor 211:** Diese Zelllinie, die ebenfalls EBV-positiv war, zeigte ein für die Theorie der Entstehung einer lymphoiden Zelllinie wichtiges Detail: Die EBV-Färbung hatte einen zentralen, nicht positiven Anteil und einen um diesen zentralen Teil liegenden stark positiven Anteil. Das heißt, hier liegen eventuell zwei unterschiedliche Zellsorten nebeneinander vor. Da sich aus vielen Seminomen lymphoblastische Zelllinien entwickelt haben, ist die Vorstellung am naheliegendsten, dass am Anfang die Seminomanteile überwiegen, diese jedoch (unterschiedlich schnell) von Lymphozyten überwuchert werden. Diese Überwucherung gilt es in fortsetzenden Arbeiten zu verhindern. Das gesamte Präparat von Tumor 211 ist ebenfalls als lymphoblastische Zelllinie zu werten, selbst wenn es wenige, nicht positive Anteile gibt. Die Apoptoserate zeigte hier eine ähnliche Entwicklung wie die von Tumor 198. Deshalb findet hier auch die relevante Apoptose im Stadium „Tumor“ statt, was die plausibelste Erklärung dafür bietet, dass hier die Seminomzellen absterben und von Lymphozyten überwuchert werden.

**Tumor 216:** Diese Linie zeigte in der PCR einen stärkeren Anstieg des seminom-spezifischen Markers PLAP als Linie 197\_2. Dies ist jedoch das einzige Indiz, welches auf eine Ähnlichkeit mit einer Seminomlinie hinweist. Dagegen steht der ebenfalls vorhandene Anstieg an CD45-positiven Zellen, die auch in der Zytolock-Färbung nachgewiesen wurden. Eine EBV-Färbung wurde für diese Zelllinie aus materialtechnischen Gründen nicht vorgenommen, obwohl sie von großer Bedeutung wäre, da sie die Ergebnisse weiter hätte einschränken bzw. in eine Richtung lenken können.

**Linie Tcam** zeigte ein für diese Linie erwartete Ergebnis. CD117 ist in der immunhistochemischen Färbung positiv. Warum sich die Konzentration allerdings auf das 0,1-fache im Stadium „Spät“ reduziert, ist fraglich. Eventuell muss von einem PCR-Fehler (Applikationsfehler, Funktionsfehler Primer) ausgegangen werden, der alle Zelllinien betraf, da in keiner Linie ein Anstieg oder gleichbleibendes Ergebnis in der Entwicklung zu beobachten war. Alle anderen Seminommarker sind etwa gleich bleibend in der PCR nachgewiesen. Weiterhin sank die CD45-Konzentration auf das 0,3-fache, was sich wiederum mit der immunhistochemischen Färbung deckte, da hier wenige CD20-positive Zellen und somit wenig Lym-

phozyten nachgewiesen werden konnte.

### 4.8.3 Seminomlinie 197\_2

Einer für Seminomlinien typischen Markerkonstellation am nächsten kam Linie 197\_2. Wie bei der Vergleichslinie Tcam waren die Färbungen für CD117 und D2-40 positiv. Diese Färbungen waren zum Teil viel deutlicher positiv als die der Tcam-Linie (siehe Abbildungen 3.14 und 3.13). Die EBV- und CD20-Färbung der Zytoblocks und die CD45-Färbung der Zytospins wurde für beide Linien als negativ gewertet. Somit konnte das Vorliegen einer EBV-positiven lymphoblastischen B-Zelllinie mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die CD20-Färbung der Zytospins wurde bei Tcam allerdings als negativ, bei 197\_2 als positiv gewertet. Dies könnte an der fehlenden Etablierung der Färbemethode für Zytospins liegen, die in weiteren Studien evaluiert werden sollte.

Das Vorhandensein der Gewebsphosphatase PLAP in den immunhistochemischen Färbungen von 197\_2 und Tcam war in beiden Fällen nur schwach ausgeprägt, was untypisch erscheint, da im Regelfall 90-100% der Seminome PLAP-positiv sind (Wittekind, 2008). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den PCR-Ergebnissen. Diese erbringen bei Tcam einen PLAP-Nachweis, der im Stadium „Spät“ 3-fach höher war als im Anfangsstadium und bei Tumor 197\_2 vom Stadium „Tumor“ zum Stadium „Spät“ auf das 1,5-fache gestiegen ist. Die Untersuchungen der Linie Tcam von Russell et al. (Russell et al., 2013) und Eckert et al. (Eckert et al., 2008) zeigen einen PLAP-negativen Befund in der immunhistochemischen Färbung sowie in der PCR. Dies scheint, obwohl PLAP eine sehr hohe Sensitivität für Seminome besitzt, überraschend. Das PLAP-negative Ergebnis der Immunhistochemie deckt sich also mit dem Ergebnis dieser Studie. Warum die PCR-Nachweise sich unterscheiden, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Die Färbung des Zytoblocks von 197\_2 weist allerdings kleine „Inseln“ auf, die PLAP-positiv sind. Das heißt, vielleicht gibt es hier Subpopulationen verschiedener Zellen, von denen eine kleine Anzahl PLAP-positiv ist, was wiederum für die These sprechen würde, dass die Seminomzellen der anderen Zelllinien durch solche Subpopulationen in einem gewissen Stadium „überwuchert“ wurden. Die weiteren Ergebnisse der PCR von Tcam und 197\_2 waren weniger vergleichbar. Der Nachweis von OCT 3/4 gelang zwar in Tcam, jedoch nicht in 197\_2. Verglichen mit Russell et al. (Russell et al., 2013) entsprechen sich diese Ergebnisse, da auch in ihrer Studie Tcam OCT3/4-positiv ist.

CD117, ein Marker, der wegen seiner Potenz, Seminome von Nicht-Seminomen

zu unterscheiden, noch von großem Interesse gewesen wäre, konnte durch die PCR nur im Stadium „Tumor“ nachgewiesen werden, für das Stadium „Spät“ hat das Zellmaterial nicht ausgereicht.

Auch für Mehrfachbestimmungen der PCR reichte insbesondere das Zellmaterial von 197\_2 nicht aus, was für eine bessere Reproduzierbarkeit notwendig gewesen wäre.

Insgesamt gab diese Zelllinie also die besten Anhaltspunkte dafür, dass sie einer Seminomlinie entsprechen könnte. Ein Hinweis war unter anderen das eher langsame Wachstum dieser Linie, da dies einen wesentlicher Unterschied zu allen anderen Linien darstellte. Dies ist zugleich ein großer Nachteil, da nicht genug Zellmaterial gewonnen werden konnte, um abschließende Untersuchungen durchzuführen. Weiterhin wäre eine komplette CD117-Bestimmung von besonderem Interesse gewesen, da in der Studie von Russell et al. (Russell et al., 2013) Tcam CD117 negativ ist (sowohl in der PCR als auch in der Immunhistochemie), allerdings ist Tcam in der Studie von Eckert et al. (Eckert et al., 2008) CD117 positiv. In dieser Studie sind die immunhistochemischen Färbungen für CD117 sowohl beim Zytoblock als auch beim Zytospin positiv, im PCR-Verlauf allerdings sinkt die Konzentration. Weiterhin ließ die steigende Apoptoserate (von 1 auf das 4,4-fache) darauf schließen, dass diese Zellreihe in der Gesamtzahl der Zellen eher abnahm, aber nicht vollständig durch lymphoblastische Zellen ersetzt wurde, wie die immunhistochemische Auswertung zeigte. Auf diesen Sachverhalt könnte die Zunahme der Apoptoserate hindeuten, die Zellen starben zwar ab, es fand aber kein kompletter Zellaustausch statt.

#### **4.8.4 Weitere Studien in der Diskussion**

Unter konventionellen Kulturbedingungen ist es sehr lange nicht gelungen, Seminome anzuzüchten. Diese starben durchschnittlich innerhalb der ersten 3 Tage des Versuchs (Berends et al., 1991). Im Vergleich zu Nicht-Seminomen, welche bei der Zellkultur anscheinend weniger Probleme bereiten, erscheint es bei Seminomen extrem schwer, Kulturen zu gewinnen und aufrecht zu erhalten. Eine Eigenschaft, die dabei sicherlich eine Rolle spielt, ist die Entfernung der Zellen aus ihrem Milieu, was sie schnell in die Bax-abhängige Apoptose treibt. Noch vor der Entwicklung von Tcam-2 wurden Versuche angestellt, diese Umgebung zu imitieren. Zusammen mit Ratten-Sertolizellen überlebten Seminomzellen statt

3 Tagen 11 Tage in Kultur (Berends et al., 1991). Bisher ist es nur einer Arbeitsgruppe gelungen, eine immortalisierte Zelllinie von Seminomzellen zu generieren: Tcam-2 (Mizuno et al., 1993). Doch selbst bei dieser Linie wurde die Herkunft nie von unabhängiger Stelle bestätigt. Die Kultur dieser Zelllinie ist unerwartet einfach: RPMI-Medium mit fetalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin reichen aus (de Jong et al., 2008). Weitere Untersuchungen bestätigen die Theorie, dass Tcam-2 eine Seminomlinie ist (de Jong et al., 2008), (Eckert et al., 2008).

Eine weitere Linie, die lange für viele Untersuchungen als Modellkultur für Seminome galt, ist JKT-1 (Kinugawa et al., 1998). Doch 2007 wurde gezeigt, dass diese Linie nicht den Eigenschaften eines Seminars entspricht und somit nicht weiter verwendet werden kann (de Jong et al., 2007).

Dass es auf diesem Gebiet also nur eine Zelllinie gibt, von der alle Untersuchungen ausgehen, scheint unzureichend als Ansatzpunkt so vieler Studien.

Um für Seminomzellen Stammzellbedingungen zu schaffen, wird die embryonale Stammzellkultur als Vorbild herangezogen. Die embryonale Stammzellkultur ist eine komplexe Kultur, da die Medien hierfür aufwendig sind und Stammzellen vulnerabel erscheinen.

Ein Beispiel für die Kultur solcher Zelllinien, die allerdings an Mäusen durchgeführt wurde, ist die Kultur von aus neuronalen Stammzellen mittels GFP-Viren-Induktion gewonnener pluripotenter Stammzellen (Kim et al., 2009). Die neuronalen Stammzellen werden durch spezifische Aktivierung der Expression von Oct4 oder Klf4 durch Viren zu pluripotenten Zellen umgewandelt. Um die entstandenen pluripotenten Stammzellen in Kultur zu halten, wurden sie in Stammzellmedium gehalten, das so auch für embryonale Stammzellen verwendet wird.

500 ml dieses Mediums (ESC-Medium) setzen sich zusammen aus 409ml DMEM, 75ml FCS, 5ml L-Glutamin, 5ml Penicillin/Streptomycin, 5ml NEAA-Lösung, 1ml  $\beta$ -Mercaptoethanol und 50  $\mu$ l LIF. Ob diese Studie, die an Mäusen durchgeführt wird allerdings so auf den Menschen übertragen werden kann, erscheint fraglich (Kim et al., 2009). Nichtsdestotrotz wurden viele dieser Zusätze so für die humane Stammzellkultur übernommen und finden auch in dieser Studie ihre Verwendung. Vergleicht man die Überlebenszeit der Zellen mit denen anderer Studien, so ist diese deutlich verlängert. Berends et al. schafften eine Verlängerung des Überlebens der Zellen von 3 auf 11 Tage durch Züchtung auf Sertoli-Zellen von Ratten (Berends et al., 1991). Die Autoren stellten die Theorie auf, dass Seminome sehr abhängig von ihrer Mikroumwelt sind und deshalb schneller als andere Zellen in Kultur absterben. Durch die Schwierigkeit des Wachstums von Seminomzellen auch in dieser Studie kann diese Theorie bestätigt werden. Durch das lange

Überleben von Zellen der Seminomlinie 197\_2 kann zur These ergänzend hinzugefügt werden, dass zu der von Berends et al. in die Diskussion gebrachten Mikroumwelt Faktoren der embryonalen Stammzellkultur gehören. Welche weiteren Faktoren allerdings dafür sorgen, dass sich keine Lymphozyten entwickeln, bleibt zu erörtern.

Das Problem, dass lymphozytoblastische B-Zellreihen entstehen, scheint in der Geschichte der Seminomzellkultur nicht neu zu sein. Auch Fend et al. (Fend et al., 1995) beschrieben eine Transformation der Seminomlinie zu EBV-infizierten B-Lymphozyten. Weiterhin detektierten Berends et al. (Berends et al., 1991) in ihren Kulturen, dass diese zu 75% aus Lymphozyten bestanden. Von den restlichen 25% Seminomzellen waren nach einmaligem Einfrieren und wieder Auftauen nur noch 10% lebensfähig. Dies wirft die Frage auf, ob das auch in dieser Studie praktizierte Einfrieren der Zellen eventuell schädlich ist. Allerdings lässt sich dies schwer quantifizieren. Dagegen sprechen würde die Tatsache, dass auch Tumor 197\_2 eingefroren und wieder aufgetaut wurde und trotzdem seminomähnliche Züge behielt.

Eine weitere Studie, die sich mit dem Thema Seminomlinien befasst, stammt von Russel et al. (Russell et al., 2013). Die Seminomlinie namens SEM-1, die die Arbeitsgruppe züchtete, stammt von einem mediastinalen, also extragonadalen Seminom. Die Inkulturnahme erfolgte ähnlich wie in dieser Studie. Zuerst das Dissoziieren des Gewebes, dann ein Verdau mittels Collagenase/ Dispase. Das Medium bestand aus RPMI-Medium-1640 mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin). Die Zellen wurden wie in dieser Studie bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Vor allem das Medium betreffend bestehen Unterschiede zur vorliegenden Studie. Es beschränkt sich auf wesentliche Bestandteile wie Grundmedium, FCS und Antibiotika. Auch die Verdopplungszeit von 50 Stunden bei der Linie SEM-1 stellt einen erheblichen Unterschied zu den hier gemessenen Verdopplungszeiten dar. Die Zellen der Linie SEM-1 wurden nach 3 Wochen in Nacktmäuse transplantiert, somit ist Vergleich über einen längeren Zeitraum nicht möglich. Die durchgeführte CD45-Färbung zeigte sich in Linie SEM-1 negativ, es waren also keine Lymphozyten nachweisbar. Da fast alle der hier in Kultur genommenen gonadalen Seminome mehr oder weniger große Lymphozyteninfiltrate aufwiesen, lässt sich die Theorie aufstellen, dass das gonadale Seminom durch seine spezielle Umgebung im Hoden und die damit verbundene reproduktive Bedeutung eine andere Mikroumwelt besitzt als extragonadale Tumoren, was das Wachstum der Linie SEM-1 ohne Lymphozyten erklären könnte.

### Schlussfolgerung und Ausblick

Die Diskussion zeigt auf, dass die kultivierten Zellen im Überleben sowie in der Wachstumsgeschwindigkeit von den Stammzellmedien abhängig sind. Linien 188, 198, 210, 211 und 216 sind durch großteils EBV-infizierte B-Lymphozyten verdrängt worden, was z.T mit einem starken Anstieg der Apoptoserate in diesem Stadium einhergeht. Nur Linie 197\_2 hat sich durch noch nicht sicher geklärte Einflussfaktoren zu einer Seminomlinie entwickelt. Wie in der Einleitung aufgezeigt, ruft das invasive Wachstum eines Seminoms eine Immunantwort hervor, die nicht nur die TIN, sondern auch das Seminom selbst angreift (Oosterhuis et al., 2003). Diese Immunantwort erfolgt wahrscheinlich auch durch EBV-positive B-Lymphozyten. Eine Theorie könnte sein, dass diese Infiltration das Seminom *in vivo* nicht komplett zerstören kann. Erst *in vitro*, wenn, wie von Pope et al. (Pope and Moss, 1978) beschrieben, der hemmende Effekt von T-Lymphozyten entfällt, können die B-Zellen volle Wirkung zeigen. Diese Wirkung bedeutet im vorliegenden Fall, dass fast alle Seminomlinien durch lymphozytoblastische B-Zelllinien ersetzt wurden.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wäre der Versuch, Lymphozyten zu Beginn der Primärkultur herauszufiltern, um prospektiv das Wachstum der Seminome ohne Lymphozyteneinfluss zu beobachten, sinnvoll. Die Auswirkungen des Wachstums von Seminomzellen ohne die „Co-Kultur“ von Lymphozyten sollte Gegenstand weiterer Studien sein.





## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit der prospektiven Isolation, Kultur und Charakterisierung von Seminomzellen unter der Annahme, dass diese durch ihre Zelleigenschaften ähnlich wie Stammzellen behandelt werden müssen.

Die Stammzellkultur gilt als eine der komplexesten Kulturen, die der Theorie dieser Studie zufolge den großen Anforderungen der labilen Seminomzellen in Kultur gerecht werden könnte.

Als Material wurden sowohl pathologisch gesicherte reine Seminome von sechs Spendern als auch die schon etablierte Seminomlinie Tcam herangezogen. Die Seminome wurden am Universitätsklinikum Tübingen operativ entfernt und in Kultur genommen.

Für diese Kultur wurden drei unterschiedliche Medien verwendet. Zwei komplexere Stammzellmedien namens StemPro und hGSC und als drittes Medium das für Tcam etablierte Medium RPMI (de Jong et al., 2008) (Russell et al., 2013). StemPro und hGSC enthielten die für die Stammzellkultur essentiellen Zusätze wie Wachstumsfaktoren und Hormone. Das Wachstum der Zellen wurde in diesen unterschiedlichen Medien verglichen.

Zur Charakterisierung wurden Zellen verschiedener Stadien herangezogen. Es wurden Zytopins, Zytoblocks und die real- Time quantitative PCR verwendet, um die Zellen anhand von Seminommarkern, Lymphozyten- und EBV-Markern zu charakterisieren. Weiterhin wurde die Expression von Apoptosegenen bestimmt. Als eins der wesentlichen Ergebnisse wurde ein längeres Überleben der Zellen in unseren verwendeten Medien als in allen Studien zuvor festgestellt. Weiterhin wiesen fünf von sechs Zellkulturlinien in der Charakterisierung wenig Seminommarker auf. Stattdessen waren Lymphozytenmarker nachweisbar. Eine einzige Zellkulturlinie (Linie 197\_2) zeigte die größte Ähnlichkeit ihrer Expressions- und Färbemuster zur Vergleichslinie Tcam. Sie verdoppelte sich im Unterschied zu den anderen Linien am langsamsten. Sie zeigte mit 125 Tagen Überlebenszeit im hGSC-Medium die längste für Seminome gemessene Überlebenszeit seit Tcam. Die Diskussion der gezeigten Ergebnisse kam zu dem Schluss, dass alle Linien im histologischen Nativbild Seminomzellen glichen.

Aus den Linien 188, 198, 210, 211 und 216 sind lymphozytoblastische B-Zelllinien entstanden, was mit einer gleichzeitigen EBV-Infektion der Zellen einherging (außer bei Linie 198). Dieses Virus begünstigt die Transformation in eine lymphozytoblastische Linie (Fend et al., 1995) (Carter et al., 2002). Weitere Einflüsse, die eine Entwicklung zur lymphoblastischen Linie begünstigen könnten, sind spenderabhängige Eigenschaften und die Größe des Primärpräparats.

Somit kann als Schlussfolgerung gezogen werden, dass die in dieser Studie verwendeten Kulturbedingungen ein längeres Überleben von Seminomzellen begünstigen.

Es sollte in weiterführenden Studien das Wachstum einer lymphoblastischen B-Zelllinie verhindert werden. Dies könnte durch Entfernung der Lymphozyten bei der Inkulturnahme der Seminome oder spezifisches Unterdrücken des Lymphozytenwachstums durch Inhibitoren erfolgen. Damit könnte die Grundlage für die unkomplizierte Etablierung mehrerer Seminomlinien geschaffen werden, was für die weitere Erforschung von Seminomen von essentieller Bedeutung ist.

# Literaturverzeichnis

- Adami, H. O., Bergström, R., Möhner, M., Zatoński, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., and Rahu, M. (1994). Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer*, 59(1):33–38.
- Altin, J. G. and Sloan, E. K. (1997). The role of cd45 and cd45-associated molecules in t cell activation. *Immunology and cell biology*, 75(5):430–445.
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J. A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology*, 227(2):271–278.
- Bahrami, A., Ro, J. Y., and Ayala, A. G. (2007). An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 131(8):1267–1280.
- Bailey, D., Baumal, R., Law, J., Sheldon, K., Kannampuzha, P., Stratis, M., Kahn, H., and Marks, A. (1986). Production of a monoclonal antibody specific for seminomas and dysgerminomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14):5291–5295.
- Bailey, D., Marks, A., Stratis, M., and Baumal, R. (1991). Immunohistochemical staining of germ cell tumors and intratubular malignant germ cells of the testis using antibody to placental alkaline phosphatase and a monoclonal anti-seminoma antibody. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 4(2):167–171.
- Beckstead, J. H. (1983). Alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 7(4):341–349.
- Berends, J. C., Schutte, S. E., van Dissel-Emiliani, F. M., de Rooij, D. G., Looijenga, L. H., and Oosterhuis, J. W. (1991). Significant improvement of the survival of seminoma cells in vitro by use of a rat sertoli cell feeder layer and serum-free medium. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(19):1400–1403.

- Bettocchi, C., Coker, C. B., Deacon, J., Parkinson, C., and Pryor, J. P. (1994). A review of testicular intratubular germ cell neoplasia in infertile men. *J Androl*, 15 Suppl:–16.
- Biermann, K., Klingmüller, D., Koch, A., Pietsch, T., Schorle, H., Büttner, R., and Zhou, H. (2006). Diagnostic value of markers m2a, oct3/4, ap-2 $\gamma$ , plap and c-kit in the detection of extragonadal seminomas. *Histopathology*, 49(3):290–297.
- Biermann, K., Stoop, H., and Looijenga, L. (2012). c-kit protein expression does not discriminate neoplastic from non-neoplastic intratubular germ cells. *Histopathology*, 60(6):1017–1019.
- Bray, F., Ferlay, J., Devesa, S. S., McGlynn, K. A., and Moller, H. (2006). Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nat Clin Pract Urol*, 3(10):532–543.
- Carter, K. L., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2002). Epstein-barr virus-induced changes in b-lymphocyte gene expression. *Journal of Virology*, 76(20):10427–10436.
- Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Abeyta, M. J., Cedars, M. I., Turek, P. J., Firpo, M. T., and Reijo Pera, R. A. (2004). Human stellar, nanog, and gdf3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *STEM CELLS*, 22(2):169–179.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A. J., Hersmus, R., van Gorp, R. J., van de Geijn, G. J., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Schneider, D. T., Sherlock, J. K., Baeten, J., Kitazawa, S., van Zoelen, E. J., van Roozendaal, K., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2008). Further characterization of the first seminoma cell line tcam-2. *Genes Chromosomes Cancer*, 47(3):185–196.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A. J., van Gorp, R. J., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Lau, Y. F., Schneider, D. T., Sherlock, J. K., Baeten, J., Hatakeyama, S., Ohyama, C., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2007). Jkt-1 is not a human seminoma cell line. *Int J Androl*, 30(4):350–365.
- Dieckmann, K.-P., Kulejewski, M., Pichlmeier, U., and Loy, V. (2007). Diagnosis of contralateral testicular intraepithelial neoplasia (tin) in patients with testicular germ cell cancer: systematic two-site biopsies are more sensitive than a single random biopsy. *European urology*, 51(1):175–83; discussion 183–5.
- Eble, J. N. (1994). Spermatocytic seminoma. *Hum Pathol*, 25(10):1035–1042.

- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L. C., Kitazawa, S., Biermann, K., and Schorle, H. (2008). Tcam-2 but not jkt-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res*, 331(2):529–538.
- Fend, F., Hittmair, A., Rogatsch, H., Gredler, E., Obrist, P., and Mikuz, G. (1995). Seminomas positive for epstein-barr virus by the polymerase chain reaction: viral rna transcripts (epstein-barr-encoded small rnas) are present in intratumoral lymphocytes but absent from the neoplastic cells. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 8(6):622–625.
- Giwerzman, A., Bruun, E., Frimodt-Moller, C., and Skakkebaek, N. E. (1989). Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol*, 142(4):998–1001.
- Giwerzman, A., Müller, J., and Skakkebaek, N. E. (1991). Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes from 399 men who died suddenly and unexpectedly. *J Urol*, 145(1):77–80.
- Giwerzman, A., Thomsen, J. K., Hertz, J., Berthelsen, J. G., Jensen, V., Meinecke, B., Thormann, L., Storm, H. H., and Skakkebaek, N. E. (1997). Prevalence of carcinoma in situ of the testis in 207 oligozoospermic men from infertile couples: prospective study of testicular biopsies. *BMJ*, 315(7114):989–991.
- Grigor, K. M. (1993). A new classification of germ cell tumours of the testis. *Eur Urol*, 23(1):93–100.
- Group, I. G. C. C. C. (1997). 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*, 15(2):594–603.
- Gschwend, J. (2010). *Medikamentöse Tumorthherapie in Der Uroonkologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440(7088):1199–1203.
- Haag, P., Hanhart, N., and Müller, M. (2012/2013). *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis - 2012/2013*, volume 6. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.

- Hallemeier, C. L., Davis, B. J., Pisansky, T. M., and Choo, R. (2014). Late gastrointestinal morbidity in patients with stage i-ii testicular seminoma treated with radiotherapy. *Urologic oncology*, 32(4):496–500.
- Harland, S. J., Cook, P. A., Fossa, S. D., Horwich, A., Mead, G. M., Parkinson, M. C., Roberts, J. T., and Stenning, S. P. (1998). Intratubular germ cell neoplasia of the contralateral testis in testicular cancer: defining a high risk group. *J Urol*, 160(4):1353–1357.
- Henderson, B. E., Bernstein, L., Ross, R. K., Depue, R. H., and Judd, H. L. (1988). The early in utero oestrogen and testosterone environment of blacks and whites: potential effects on male offspring. *Br J Cancer*, 57(2):216–218.
- Hoei-Hansen, C. E., Rajpert-De Meyts, E., Daugaard, G., and Skakkebaek, N. E. (2005). Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Ann Oncol*, 16(6):863–868.
- Huyghe, E., Matsuda, T., and Thonneau, P. (2003). Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol*, 170(1):5–11.
- Jacobson, M. D. (1997). Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Current Biology*, 7(5):R277 – R281.
- Jin, Z. W., Kim, Y. G., Yu, H. C., Murakami, G., Fujimiya, M., and Cho, B. H. (2010). A comparison between d2-40 and c-kit immunohistochemistry for the human fetal testis and ovary at the second trimester of gestation. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 87(1):1–4.
- Jorgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Graem, N., Müller, J., Giwercman, A., and Skakkebaek, N. E. (1995). Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest*, 72(2):223–231.
- Kahn, H. J., Bailey, D., and Marks, A. (2002). Monoclonal antibody d2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol*, 15(4):434–440.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Os-himura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., and Shinohara, T. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119(7):1001–1012.

- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Yoshida, S., Toyokuni, S., Lee, J., Ogura, A., and Shinohara, T. (2007). Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biology of reproduction*, 76(1):55–62.
- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of reproduction*, 69(2):612–616.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Schöler, H. R., and Tomilin, A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports*, 5(11):1078–1083.
- Kier, M. G. G., Lauritsen, J., Almstrup, K., Mortensen, M. S., Toft, B. G., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Rørth, M., von der Maase, H., Agerbaek, M., Holm, N. V., Andersen, K. K., Dalton, S. O., Johansen, C., and Daugaard, G. (2015). Screening for carcinoma in situ in the contralateral testicle in patients with testicular cancer: a population-based study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26(4):737–742.
- Kim, J. B., Zaehres, H., Araúzo-Bravo, M. J., and Schöler, H. R. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. *Nature protocols*, 4(10):1464–1470.
- Kinugawa, K., Hyodo, F., Matsuki, T., Jo, Y., Furukawa, Y., Ueki, A., and Tanaka, H. (1998). Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, jkt-1. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 5(3):282–287.
- Kratz, C., Han, S., Rosenberg, P., Berndt, S., Burdett, L., Yeager, M., Korde, L., Mai, P., Pfeiffer, R., and Greene, M. (2011). Variants in or near *kitlg*, *bak1*, *dmrt1*, and *tert-clptm1l* predispose to familial testicular germ cell tumour. *Journal of medical genetics*, 48(7):473–476.
- Krege, S., Beyer, J., Souchon, R., Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Cavallin-Ståhl, E., Classen, J., Clemm, C., Cohn-Cedermark, G., Culine, S., Daugaard, G., De Mulder, P. H. M., De Santis, M., de Wit, M., de Wit, R., Derigs, H. G., Dieckmann, K.-P., Dieing, A., Droz, J.-P., Fenner, M., Fizazi, K., Flechon, A., Fosså, S. D., del Muro, X. G.,

- Gauler, T., Geczi, L., Gerl, A., Germa-Lluch, J. R., Gillessen, S., Hartmann, J. T., Hartmann, M., Heidenreich, A., Hoeltl, W., Horwich, A., Huddart, R., Jewett, M., Joffe, J., Jones, W. G., Kisbenedek, L., Klepp, O., Kliesch, S., Koehrmann, K. U., Kollmannsberger, C., Kuczyk, M., Laguna, P., Galvis, O. L., Loy, V., Mason, M. D., Mead, G. M., Mueller, R., Nichols, C., Nicolai, N., Oliver, T., Ondrus, D., Oosterhof, G. O. N., Ares, L. P., Pizzocaro, G., Pont, J., Pottek, T., Powles, T., Rick, O., Rosti, G., Salvioni, R., Scheiderbauer, J., Schmelz, H.-U., Schmidberger, H., Schmoll, H.-J., Schrader, M., Sedlmayer, F., Skakkebaek, N. E., Sohaib, A., Tjulandin, S., Warde, P., Weinknecht, S., Weissbach, L., Wittekind, C., Winter, E., Wood, L., and von der Maase, H. (2008). 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 (egccccg): part i. *European urology*, 53(3):478–496.
- Lampe, K. J., Namba, R. M., Silverman, T. R., Bjugstad, K. B., and Mahoney, M. J. (2009). Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnology and bioengineering*, 103(6):1214–1223.
- Lewinshtein, D., Gulati, R., Nelson, P. S., and Porter, C. R. (2012). Incidence of second malignancies after external beam radiotherapy for clinical stage i testicular seminoma. *BJU international*, 109(5):706–712.
- Li, L. and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology*, 21:605–631.
- Lim, J. J., Sung, S.-Y., Kim, H. J., Song, S.-H., Hong, J. Y., Yoon, T. K., Kim, J. K., Kim, K.-S., and Lee, D. R. (2010). Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell proliferation*, 43(4):405–417.
- Linke, J., Loy, V., and Dieckmann, K. P. (2005). Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males. *J Urol*, 173(5):1577–1579.
- Litchfield, K., Sultana, R., Renwick, A., Dudakia, D., Seal, S., Ramsay, E., Powell, S., Elliott, A., Warren-Perry, M., Eeles, R., Peto, J., Kote-Jarai, Z., Muir, K., Nsengimana, J., UKTCC, Stratton, M. R., Easton, D. F., Bishop, D. T., Huddart, R. A., Rahman, N., and Turnbull, C. (2015). Multi-stage genome-wide association study identifies new susceptibility locus for testicular germ cell tumour on chromosome 3q25. *Human molecular genetics*, 24(4):1169–1176.



- Looijenga, L. H., Gillis, A. J., Stoop, H. J., Hersmus, R., and Oosterhuis, J. W. (2007). Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1120:187–214.
- Looijenga, L. H., Gillis, A. J., van Gorp, R. J., Verkerk, A. J., and Oosterhuis, J. W. (1997). X inactivation in human testicular tumors. Xist expression and androgen receptor methylation status. *Am J Pathol*, 151(2):581–590.
- Looijenga, L. H. and Oosterhuis, J. W. (2002). Pathobiology of testicular germ cell tumors: views and news. *Anal Quant Cytol Histol*, 24(5):263–279.
- Looijenga, L. H., Stoop, H., de Leeuw, H. P., de Gouveia Brazao, C. A., Gillis, A. J., van Roozendaal, K. E., van Zoelen, E. J., Weber, R. F., Wolffenbuttel, K. P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E. J., Schneider, D. T., Kononen, J., Sauter, G., and Oosterhuis, J. W. (2003). Pou5f1 (oct3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res*, 63(9):2244–2250.
- Loy, V. and Dieckmann, K. P. (1990). Carcinoma in situ of the testis: intratubular germ cell neoplasia or testicular intraepithelial neoplasia? *Hum Pathol*, 21(4):457–458.
- Masters, J. R. and Köberle, B. (2003). Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer*, 3(7):517–525.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70(5):841–847.
- McGregor, J. A., Jackson, G. M., Lachelin, G. C., Goodwin, T. M., Artal, R., Hastings, C., and Dullien, V. (1995). Salivary estriol as risk assessment for preterm labor: a prospective trial. *Am J Obstet Gynecol*, 173(4):1337–1342.
- Mills, S. E., Carter, D., Greenson, J. K., Reuter, V. E., and Stoler, M. H. (2009). *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology* -. Lippincott Williams; Wilkins, Philadelphia, 5th revised edition. edition.
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., and Kitazawa, S. (1993). [establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (tcam-2)]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 84(7):1211–1218.

- Mostofi, F. K., Sesterhenn, I. A., and Davis, C. J. (1987). Immunopathology of germ cell tumors of the testis. *Semin Diagn Pathol*, 4(4):320–341.
- Motzer, R. J., Agarwal, N., Beard, C., Bhayani, S., Bolger, G. B., Buyyounouski, M. K., Carducci, M. A., Chang, S. S., Choueiri, T. K., Gupta, S., Hancock, S. L., Hudes, G. R., Jonasch, E., Kuzel, T. M., Lau, C., Levine, E. G., Lin, D. W., Margolin, K. A., Michaelson, M. D., Olencki, T., Pili, R., Ratliff, T. W., Redman, B. G., Robertson, C. N., Ryan, C. J., Sheinfeld, J., Wang, J., Wilder, R. B., and National Comprehensive Cancer Network (2012). Testicular cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 10(4):502–535.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–273.
- Naderi, N., Wilde, C., Haque, T., Francis, W., Seifalian, A. M., Thornton, C. A., Xia, Z., and Whitaker, I. S. (2014). Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells in 3-dimensional spheroid cultures (microtissue): implications for the reconstructive surgeon. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 67(12):1726–1734.
- Nielsen, H., Nielsen, M., and Skakkebaek, N. E. (1974). The fine structure of a possible carcinoma-in-situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*, 82A(2):235–248.
- Nuti, F., Luciani, P., Marinari, E., Erdei, E., Bak, M., Deledda, C., Rosati, F., Mazzinghi, B., Danza, G., Stoop, H., Looijenga, L. H., Peri, A., Serio, M., and Krausz, C. (2009). Seladin-1 and testicular germ cell tumours: new insights into cisplatin responsiveness. *J Pathol*, 219(4):491–500.
- Oliver, R., Mason, M., Mead, G., von der Maase, H., Rustin, G., Joffe, J., de Wit, R., Aass, N., Graham, J., Coleman, R., Kirk, S., and Stenning, S. (2005). Radiotherapy versus single-dose carboplatin in adjuvant treatment of stage i seminoma: a randomised trial. *The Lancet*, 366(9482):293–300.
- Oosterhuis, J. W., Castedo, S. M., de Jong, B., Cornelisse, C. J., Dam, A., Sleijfer, D. T., and Schraffordt Koops, H. (1989). Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. pathogenetic and clinical relevance. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 60(1):14–21.

- Oosterhuis, J. W., Kersemaekers, A. M., Jacobsen, G. K., Timmer, A., Steyerberg, E. W., Molier, M., Van Weeren, P. C., Stoop, H., and Looijenga, L. H. (2003). Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. an interim report. *APMIS*, 111(1):32–40.
- Oosterhuis, J. W. and Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*, 5(3):210–222.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic acids research*, 29(9):e45.
- Pierce, G. B., Stevens, L. C., and Nakane, P. K. (1967). Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 39(4):755–773.
- Pope, J. H. and Moss, D. J. (1978). Inhibition of epstein-barr virus transformation: evidence for a block between ebna production and cell proliferation. *IARC scientific publications*, 2(24):617–622.
- Ragni, G., Somigliana, E., Restelli, L., Salvi, R., Arnoldi, M., and Paffoni, A. (2003). Sperm banking and rate of assisted reproduction treatment: insights from a 15-year cryopreservation program for male cancer patients. *Cancer*, 97(7):1624–1629.
- Rajpert-De Meyts, E. (2006). Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*, 12(3):303–323.
- Rajpert-De Meyts, E., Bartkova, J., Samson, M., Hoei-Hansen, C. E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J., and Skakkebaek, N. E. (2003). The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS*, 111(1):267–278.
- Rajpert-De Meyts, E., Hanstein, R., Jorgensen, N., Graem, N., Vogt, P. H., and Skakkebaek, N. E. (2004). Developmental expression of pou5f1 (oct-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod*, 19(6):1338–1344.
- Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Brondum-Nielsen, K., Müller, J., and Skakkebaek, N. E. (1998). Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS*, 106(1):198–204.
- Rajpert-De Meyts, E. and Skakkebaek, N. E. (1994). Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl*, 17(2):85–92.

- Ren, X., Shah, T. A., Ustiyan, V., Zhang, Y., Shinn, J., Chen, G., Whitsett, J. A., Kalin, T. V., and Kalinichenko, V. V. (2013). Foxm1 promotes allergen-induced goblet cell metaplasia and pulmonary inflammation. *Molecular and cellular biology*, 33(2):371–386.
- Rescorla, F. J. (1999). Pediatric germ cell tumors. *Semin Surg Oncol*, 16(2):144–158.
- Rescorla, F. J. and Breitfeld, P. P. (1999). Pediatric germ cell tumors. *Curr Probl Cancer*, 23(6):257–303.
- Richiardi, L., Bellocco, R., Adami, H. O., Torr ang, A., Barlow, L., Hakulinen, T., Rahu, M., Stengrevics, A., Storm, H., Tretli, S., Kurtinaitis, J., Tyczynski, J. E., and Akre, O. (2004). Testicular cancer incidence in eight northern european countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(12):2157–2166.
- Rogers, E., Teahan, S., Gallagher, H., Butler, M. R., Grainger, R., McDermott, T. E., and Thornhill, J. A. (1998). The role of orchiectomy in the management of postpubertal cryptorchidism. *J Urol*, 159(3):851–854.
- Russell, S. M., Lechner, M. G., Mokashi, A., Megiel, C., Jang, J. K., Taylor, C. R., Looijenga, L. H., French, C. A., and Epstein, A. L. (2013). Establishment and characterization of a new human extragonadal germ cell line, sem-1, and its comparison with tcam-2 and jkt-1. *Urology*, 81(2):1–9.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Schmoll, H. J., Souchon, R., Krege, S., Albers, P., Beyer, J., Kollmannsberger, C., Fossa, S. D., Skakkebaek, N. E., de Wit, R., Fizazi, K., Droz, J. P., Pizzocaro, G., Daugaard, G., de Mulder, P. H., Horwich, A., Oliver, T., Huddart, R., Rosti, G., Paz Ares, L., Pont, O., Hartmann, J. T., Aass, N., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Classen, J., Clemm, S., Culine, S., de Wit, M., Derigs, H. G., Dieckmann, K. P., Flashaove, M., Garcia del Muro, X., Gerl, A., Germa-Lluch, J. R., Hartmann, M., Heidenreich, A., Hoeltl, W., Joffe, J., Jones, W., Kaiser, G., Klepp, O., Kliesch, S., Kisbenedek, L., Koehrmann, K. U., Kuczyk, M., Laguna, M. P., Leiva, O., Loy, V., Mason, M. D., Mead, G. M., Mueller, R. P., Nicolai, N., Oosterhof, G. O., Pottek, T., Rick, O., Schmidberger, H., Sedlmayer, F., Siegert, W., Studer, U., Tjulandin, S., von der Maase, H.,

- Walz, P., Weinknecht, S., Weissbach, L., Winter, E., Wittekind, C., and European Germ Cell Cancer Consensus Group (2004). European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the european germ cell cancer consensus group (egcccg). *Ann Oncol*, 15(9):1377–1399.
- Schneider, D. T., Schuster, A. E., Fritsch, M. K., Hu, J., Olson, T., Lauer, S., Göbel, U., and Perlman, E. J. (2001). Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res*, 61(19):7268–7276.
- Schrader, M., Burger, A. M., Müller, M., Krause, H., Straub, B., Smith, G. L., Newlands, E. S., and Miller, K. (2002). Quantification of human telomerase reverse transcriptase mrna in testicular germ cell tumors by quantitative fluorescence real-time rt-pcr. *Oncology reports*, 9(5):1097–1105.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(1):10–29.
- Sonne, S. B., Herlihy, A. S., Hoei-Hansen, C. E., Nielsen, J. E., Almstrup, K., Skakkebaek, N. E., Marks, A., Leffers, H., and Rajpert-De Meyts, E. (2006). Identity of m2a (d2-40) antigen and gp36 (aggrus, t1a-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Archiv*, 449(2):200–206.
- Sonne, S. B., Kristensen, D. M., Novotny, G. W., Olesen, I. A., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Leffers, H. (2008). Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *International journal of andrology*, 31(2):275–287.
- Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., and Thomson, J. A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13350–13355.
- Spiekermann, M., Dieckmann, K.-P., Balks, T., Bullerdiek, J., and Belge, G. (2015). Is relative quantification dispensable for the measurement of micrnas as serum biomarkers in germ cell tumors? *Anticancer research*, 35(1):117–121.
- Stallock, J., Molyneaux, K., Schaible, K., Knudson, C. M., and Wylie, C. (2003). The pro-apoptotic gene *bax* is required for the death of ectopic primordial

- al germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development*, 130(26):6589–6597.
- Stang, A., Rusner, C., Eisinger, B., Stegmaier, C., and Kaatsch, P. (2009). Subtype-specific incidence of testicular cancer in Germany: a pooled analysis of nine population-based cancer registries. *Int J Androl*, 32(4):306–316.
- Strohmeyer, T., Reese, D., Press, M., Ackermann, R., Hartmann, M., and Slamon, D. (1995). Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (scf) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol*, 153(2):511–515.
- Surani, M. A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 414(6859):122–128.
- Syring, I., Bartels, J., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., Müller, S. C., and Ellinger, J. (2015). Circulating serum miRNA (mir-367-3p, mir-371a-3p, mir-372-3p and mir-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer. *The Journal of urology*, 193(1):331–337.
- Tannenbaum, M. and Madden, J. F. (2006). *Diagnostic Atlas of Genitourinary Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier.
- Teilum, G. (1976). Comparative pathology—tumors of germ cell origin. *Special tumors of ovary and testis. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard*, pages 32–119.
- Thiel, N., Zischke, J., Elbasani, E., Kay-Fedorov, P., and Messerle, M. (2015). Viral interference with functions of the cellular receptor tyrosine phosphatase cd45. *Viruses*, 7(3):1540–1557.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391):1145–1147.
- Turnbull, C., Rapley, E. A., Seal, S., Pernet, D., Renwick, A., Hughes, D., Ricketts, M., Linger, R., Nsengimana, J., Deloukas, P., et al. (2010). Variants near *dmrt1*, *tert* and *atf7ip* are associated with testicular germ cell cancer. *Nature genetics*, 42(7):604–607.
- Ulbricht, T. M. (1999). Testis risk and prognostic factors. the pathologist's perspective. *Urol Clin North Am*, 26(3):611–626.

- Verhoeven, R. H., Gondos, A., Janssen-Heijnen, M. L., Saum, K. U., Brewster, D. H., Holleczeck, B., Crocetti, E., Rosso, S., Hakulinen, T., Aareleid, T., Brenner, H., and The EUNICE Survival Working Group (2012). Testicular cancer in Europe and the USA: survival still rising among older patients. *Ann Oncol*.
- Wang, L., Schulz, T. C., Sherrer, E. S., Dauphin, D. S., Shin, S., Nelson, A. M., Ware, C. B., Zhan, M., Song, C.-Z., Chen, X., Brimble, S. N., McLean, A., Galeano, M. J., Uhl, E. W., D'Amour, K. A., Chesnut, J. D., Rao, M. S., Blau, C. A., and Robins, A. J. (2007). Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and *erbB2* receptor signaling. *Blood*, 110(12):4111–4119.
- Welsch, U. (2006). *Repetitorium Histologie*. Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200):684–687.
- Wittekind, C. (2008). Biologie und pathologie von Keimzelltumoren des Hodens. *Der Onkologe*, 14(6):602–610.
- Yang, J., Tao, Q., Flinn, I. W., Murray, P. G., Post, L. E., Ma, H., Piantadosi, S., Caligiuri, M. A., and Ambinder, R. F. (2000). Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood*, 96(13):4055–4063.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, 6(11):3341–3351.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12).





## 6 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik Tübingen am Urologischen Institut unter Betreuung von Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl durchgeführt.

Die Betreuung, Konzeption der Studie und die Korrektur des Manuskripts erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Markus Renninger, Facharzt für Urologie.

Die immunhistochemischen Färbungen der Zytospins sowie die Einbettung in Paraffinblöcke und das Färben dieser wurden mit freundlicher Unterstützung durch das pathologische Institut Tübingen, Prof. Fend durchgeführt.

Alle anderen Versuche wurden selbstständig von mir in Zusammenarbeit mit Markus Renninger, meinem Betreuer, Rebekka Strittmatter, Mitdotorandin durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorand



## 7 Danksagung

Herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl für die Überlassung des Themas, sowie die freundliche Unterstützung und Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich besonders Herrn Dr. med. Markus Renninger für die Betreuung danken, für die vielen Anregungen bei der Lösung fachspezifischer Probleme, das jederzeit offene Ohr und die Ermunterung.

An dieser Stelle danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Fend und seinen Mitarbeitern. Sie führten freundlicherweise für uns die Zytoblockherstellung durch und erleichterten auch die Färbung der Zellen mithilfe Ihres Färbeautomaten.

Für die Zuteilung der Seminome danke ich insbesondere Jörg Hennenlotter.

Auch den Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors möchte ich danken für die Unterstützung in praktischen Fragen.

Lieber Flo, vielen Dank für die TeX-nische Hilfe!

Meiner Schwester Rebekka möchte ich für das gute Teamwork danken, das wir schon von Geburt an gewohnt sind.

Meinen Eltern möchte ich danken für die Ermöglichung meines Studiums und die vielseitige Unterstützung während dieser Zeit.

Lieber Johannes- Danke!

