

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Pathologie:

Molekularpathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Arbeit unter der Anleitung von PD Dr. Ronald Simon

KRAS Gen-Amplifikationen in humanen Keimzelltumoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sebastian Paszkowiak aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 17.02.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg am:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD. Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Lamszus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Ziel der Arbeit.....	5
1.2	Epidemiologie, Ätiologie und Therapie der Keimzelltumoren.....	5
1.2.1	Epidemiologie.....	5
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	6
1.2.3	Histologische Typen und Einteilung der klinischen Stadien.....	7
1.2.4	Therapie, Prognosen und Spätfolgen.....	9
1.3	Genetik der TGCT	11
1.3.1	Chromosomale Konstitution in Keimzelltumoren des Hodens	11
1.3.2	Chromosomale Aberrationen.....	11
1.3.3	Die Rolle des Chromosoms 12p	12
1.3.4	Model der Signaltransduktion in TGCT	13
1.3.5	Das Protoonkogen KRAS	14
1.4	Amplifikationen	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Untersuchungsmaterial	18
2.2	FISH.....	19
2.2.1	pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung	20
2.2.2	DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur	21
2.2.3	DNA-Markierung mittels Nick-Translation.....	23
2.2.4	Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte	25
2.2.5	Hybridisierung.....	26
2.2.6	Waschen.....	28
2.2.7	Fluoreszenz-Detektion	29
2.3	Auswertung	30

2.3.1	Bewertung der FISH-Ergebnisse.....	30
2.3.2	Optimierung der Auswertbarkeit.....	30
2.3.3	In der Studie verwendete Fälle	31
2.3.4	pT-Kategorien	31
2.4	Sequenzierung	32
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.4.2	Kapillargelelektrophorese	34
2.4.3	ExoSAP	34
2.4.4	Sequenzierreaktion (BigDye).....	35
2.4.5	DNA-Fällung	36
2.4.6	Analyse.....	36
2.5	Statistik.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	KRAS-Amplifikation in Keimzelltumoren.....	37
3.1.1	Prävalenz der KRAS-Amplifikationen.....	37
3.1.2	Vergleich des Amplifikationsniveaus	38
3.1.3	Amplifikations-Typus	39
3.2	Manifestationsalter	42
3.3	KRAS-Amplifikationen und pT-Kategorie	43
3.4	Sequenzierung	44
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	55
6	Abkürzungsverzeichnis.....	57
7	Literatur.....	59
8	Danksagung.....	68
9	Eidesstattliche Erklärung.....	68

1 EINLEITUNG

1.1 Ziel der Arbeit

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) gilt als ein wichtiges Kandidatengen innerhalb des 12p11.2-12.1-Amplikons bei Keimzelltumoren. Aufgrund der großen Häufigkeit von Zugewinnen auf Chromosom 12p und der Entdeckung von umschriebenen Amplifikationen in dieser Region wird das dort lokalisierte Onkogen KRAS als ein wichtiges Gen für die Biologie von TGCT (Testicular germ cell tumors) angesehen. Bisher haben allerdings erst wenige Studien mit verhältnismäßig geringer Fallzahl speziell KRAS-Amplifikationen untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, die KRAS-Amplifikationsrate in einem großen Kollektiv von Keimzelltumoren (Seminome; Nicht-Seminome; Kombinierte Keimzelltumore) zu untersuchen. Darüber hinaus soll auch nach möglichen Zusammenhängen zwischen der KRAS-Amplifikation und dem Phänotyp der TGCT, dem klinischen Manifestationsalter, der pT-Kategorie (TNM-Klassifikation) sowie aktivierenden KRAS-Mutationen gesucht werden.

1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Therapie der Keimzelltumoren

1.2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2006 trat der Hodenkrebs (TGCT) mit einem Anteil von 2% an allen bösartigen Krebserkrankungen des Mannes in Deutschland auf (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2010). Im Unterschied zu fast allen anderen Krebserkrankungen manifestieren sich die meisten Fälle zwischen dem 25. und 45. Lebensjahr. Im jungen Erwachsenenalter ist der Hodenkrebs der häufigste bösartige Tumor bei Männern in Deutschland (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2010).

Weltweit wird ein stetig steigender Trend bezüglich der Inzidenz beobachtet (Huyghe *et al.* 2003). Davon betroffen sind insbesondere die Industrienationen Nordamerikas (Garner *et al.* 2005, Holmes *et al.* 2008) und Europas (Karim-Kos *et al.* 2008), sowie Australien (Baade *et al.* 2008). Im Jahre 2002 wurden

500.000 Neuerkrankungen weltweit diagnostiziert (Bray *et al.* 2006). Europa weist dabei eine Inzidenz von 11.7 pro 100 000 Einwohner auf (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2010). Im Jahr 2006 sind in Deutschland 4960 Männer an Hodenkrebs erkrankt (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2010), wodurch Deutschland zu den Staaten mit den meisten Hodenkrebsfällen zählt (Bray *et al.* 2002, Karim-Kos *et al.* 2008). Noch vor 15 Jahren starben in Europa jährlich etwa 2100 Männer an den Folgen von Hodenkrebs (Bray *et al.* 2002). Dank des Fortschrittes in der Hodenkrebstherapie fällt die Zahl der Todesfälle stetig (Bray *et al.* 2006). In Europa liegt die Mortalität bereits bei 0.3 Fällen pro 100.000 Einwohner (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2010). Trotz der guten Heilbarkeit ist der Hodenkrebs jedoch eine bedeutende Todesursache in der Altersgruppe zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (McIntyre *et al.* 2008).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die dem Hodenkrebs zugrunde liegenden Krankheitsursachen sind nicht vollkommen geklärt, ebenso wenig die Tatsache, warum die Inzidenz stetig steigt (Bray *et al.* 2006). Es wird aber davon ausgegangen, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung von TGCT spielen (McIntyre *et al.* 2008).

Ein weitestgehend akzeptiertes Modell der Keimzelltumorentstehung schlägt ein krebserregendes Ereignis während der Schwangerschaft und die Entwicklung einer Hodenkrebsvorstufe, der TIN (Testicular intraepithelial neoplasia; oder IGCNU: Intratubular germ cell neoplasia undifferentiated), vor (McIntyre *et al.* 2008). Diese Vorstufe, auch benannt als CIS (Carcinoma *in situ*), wurde bereits von Skakkebaek im Jahre 1972 beschrieben (Skakkebaek 1972). Während der Pubertät entwickeln sich aus der TIN entweder Seminome (SE) oder Nicht-Seminome (NiSe) (McIntyre *et al.* 2008).

In epidemiologischen Studien wurden einige perinatale Risikofaktoren untersucht, darunter die Dauer der Schwangerschaft, das Geburtsgewicht des Kin-

des und das Alter der Mutter, wobei die Ergebnisse nicht eindeutig waren (Richiardi *et al.* 2007). Bislang haben Malformationen des männlichen Geschlechts die höchste Assoziation zu den Keimzelltumoren des Hodens. Kryptorchismus erhöht das Risiko und auch die Hypospadie steht trotz geringerer Evidenz unter Verdacht, das Erkrankungsrisiko zu erhöhen (McIntyre *et al.* 2008, Moller *et al.* 1996, Prener *et al.* 1996). Für Männer mit testikulären Verkalkungen und für subfertile/infertile Männer wurde in einigen Publikationen ein erhöhtes Risiko beschrieben (Jacobsen *et al.* 2000, Moller und Skakkebaek 1999, Negri *et al.* 2008).

Malformationen, verminderte Spermienanzahl und Hodenkrebs scheinen eine gemeinsame Ursache während der fetalen Entwicklung zu haben; man spricht vom „Testicular dysgenesis syndrome“ (TDS). Als Ursache für das TDS wird die beeinträchtigte Produktion oder Aktivität von Androgenen während der Hodenentwicklung vermutet (Sharpe und Skakkebaek 2008).

Laut der Östrogenhypothese könnte die intrauterine Exposition mit Östrogenen während der Schwangerschaft verantwortlich für diese Beschwerden sein (Sharpe und Skakkebaek 1993). Weitere Studien konnten zeigen, dass die Belastung mit mütterlichem Östrogen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des TDS und der TGCT assoziiert ist (English *et al.* 2003, Sharpe 2003, Weir *et al.* 2000). Durch die Beanspruchung mit exogenem Östrogen während der Schwangerschaft, insbesondere mit DES (Diethylstilbestrol), konnte ebenfalls ein mäßiger Anstieg des Risikos für die Erkrankung an TGCT beobachtet werden (Martin *et al.* 2008, Strohsnitter *et al.* 2001).

1.2.3 Histologische Typen und Einteilung der klinischen Stadien

Die Keimzelltumoren entwickeln sich in den Gonaden oder extragonadal, meist in der Mittellinie des Körpers (ZNS, Mediastinum, Steiß) (Talerman 1985). Die Vorstufe (TIN) der TGCT entsteht aus primordialen Keimzellen oder Gonozyten (Skakkebaek *et al.* 1987); in 95% der Fälle ist der Hodenkrebs die Folge einer entarteten Keimzelle (Hoei-Hansen 2008). Während sich die TIN in der Kindheit ruhig verhält, beginnt sie mit der Pubertät zu proliferieren und entwickelt sich später entweder zu SE (40-50%), NiSe (40-50%) oder zu Tumoren, die Anteile

beider Entitäten beinhalten (~10%) (Goddard *et al.* 2007). Dabei manifestieren sich die SE in einem späteren Alter als die NiSe (Rodriguez *et al.* 2003). Die TGCT sind in 99% der Fälle maligne (Talerman 1985). Die histologischen Einteilungen der Keimzelltumoren des Hodens erfolgen nach den Kriterien der WHO, folgende Typen werden darunter subsumiert (s. **Tab. 1**) (Krege *et al.* 2008a).

Tabelle 1: WHO Klassifikation der Keimzelltumoren des Hodens (Krege *et al.* 2008a)

Tumours of one histological type
<ul style="list-style-type: none"> • Seminoma • Spermatocytic seminoma • Embryonal carcinoma • Polyembryoma • Teratoma <ul style="list-style-type: none"> ◦ Mature ◦ Immature ◦ With malignant transformation • Yolk sac tumour (endodermal sinus tumour) • Choriocarcinoma
Tumours of more than one histological type
<ul style="list-style-type: none"> • Embryonal carcinoma with teratoma (teratocarcinoma) • Choriocarcinoma and any other types (specify) • Other combinations (specify)

WHO, World Health Organisation

Tumoren, in denen beide Entitäten vertreten sind und somit Anteile eines seminomatösen als auch eines nicht-seminomatösen TGCT beinhalten, werden nach der britischen Klassifikation als Kombinierte Keimzelltumoren (CT) bezeichnet (Pugh 1976, Zafarana *et al.* 2002).

Die SE ähneln morphologisch den Keimzellen; Zellen von denen angenommen wird, dass sie der Ursprung der Keimzelltumoren sind (Krege *et al.* 2008a). Die NiSe sind eine heterogene Gruppe und können sowohl aus einem oder mehreren Anteilen bestehen – Embryonales Karzinom, Polyembryom, Teratom, Dottersacktumor oder Chorionkarzinom (Hoei-Hansen *et al.* 2005). Beim spermatocytischen Seminom, welches bei älteren Männern häufiger zu diagnostizieren ist, handelt es sich um eine weitere Tumorentität (Hoei-Hansen 2008).

Die Einteilung in die klinischen Stadien erfolgt nach den Kriterien der UICC (Union for International Cancer Control) TNM (Tumorgröße, Lymphknoten, Fernmetastasen) -Klassifikation. Die Differenzierung erfolgt nach Ausmaß und Vorhandensein von Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und der Höhe von Serumtumormarkern, wie der Lactatdehydrogenase (LDH), dem Alphafetoprotein (AFP) und dem humanen Choriongonadotropin (HCG). Patienten, deren Tumoren bereits metastasiert sind, werden nach der Klassifikation der IGCCCG (International Germ Cell Cancer Collaborative Group) in drei prognostische Gruppen (gut, mittel und schlecht) unterteilt. Dabei werden, die Histologie, die Lokalisation des Primärtumors und der Fernmetastasen, sowie die Höhe der relevanten Tumormarker nach der Orchiektomie und vor der Chemotherapie berücksichtigt (Krege *et al.* 2008a, b).

1.2.4 Therapie, Prognosen und Spätfolgen

TGCT Patienten befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in 70%-78% der Fälle im klinischen Stadium I (kS I) (Albers *et al.* 2008). Um die 9% der Patienten haben dann bereits im kontralateralen Hoden eine TIN, die unbehandelt nach 7-15 Jahren in 30%-70% ebenfalls zu Hodenkrebs führt. Die übrigen Patienten haben ein erhöhtes Risiko eine TIN im kontralateralen Hoden zu entwickeln (Krege *et al.* 2008a).

Die Standardtherapie des Primärtumors ist die Orchiektomie (Krege *et al.* 2008a). Mit der Einführung der Cisplatin-basierten Chemotherapie gelten die TGCT als ein „Modell“ der heilbaren Neoplasie (Hoei-Hansen 2008). Die SE sind aufgrund ihrer Strahlensensibilität gut mit Bestrahlung therapierbar, während die NiSe besser auf die Chemotherapie ansprechen. Die Heilungsrate der TGCT ist in den meisten Fällen sehr hoch und liegt in den frühen klinischen Stadien bei ca. 90%-100%. Die Rezidivrate hängt von den Risikofaktoren und der Therapie ab. Für TGCT Patienten mit Hochrisiko SE und NiSe liegt sie im kS I nach der Orchiektomie bei 32% bzw. bei 48%. Tumoren im fortgeschrittenen Stadium und ungünstiger Prognose, nach den Kriterien der IGCCCG, werden mit vier Zyklen BEP (Bleomycin, Etoposid, Cisplatin) therapiert. Diese Pati-

enten haben eine Überlebensrate von 48% und bleiben in 41% der Fälle fünf Jahre frei von Progression (Krege *et al.* 2008a, b).

Trotz sehr guter Heilungschancen durch Algorithmen mit etablierten Therapieoptionen birgt die Therapie der TGCT relativ viele Spätfolgen für zahlreiche der oft jungen Patienten. Beispielsweise erhöht sich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Spätfolgen wie Nephrotoxizität, Hypogonadismus, persistierende Neurotoxizität, Raynaud Syndrom und Ototoxizität können sich in 15-25% der Langzeitüberlebenden manifestieren. Das relative Risiko an Strahlen-/Chemotherapie induzierten Tumoren zu erkranken liegt nach 10 Jahren zwischen ca. 2% und 3%. Etwa 0,6%-2% der Patienten entwickelten in der ersten Dekade nach der Chemotherapie eine Leukämie (Krege *et al.* 2008a, b). Die Therapie führt in vielen Fällen zu erektiler Dysfunktion (Wiechno *et al.* 2007) und Patienten mit erniedrigtem Serumtestosteronspiegel müssen ihr Leben lang Testosteron substituieren, um ihre sexuelle Funktionsfähigkeit zu bewahren. Untersuchungen ergaben aufgrund hormoneller Abweichungen eine Verminderung der Lebensqualität nach der Therapie von Hodenkrebs. Neben der häufigeren Diagnose einer Depression wurde auch ein erhöhtes Angst-Level ermittelt (Wiechno *et al.* 2007). Bei Kinderwunsch sollten die Möglichkeiten der Spermienextraktion und Kryokonservierung in Erwägung gezogen werden, da Erkrankung und Therapie zu Infertilität führen können (Efstathiou und Logothetis 2006, Krege *et al.* 2008a, b).

In der medikamentösen Therapie der TGCT richtet sich derzeit das Interesse auf die Entwicklung zielgerichteter Therapieverfahren. Von besonderer Relevanz scheinen dabei Therapeutika zu sein, die sich direkt gegen die Tyrosinkinase Rezeptoren, c-KIT (Stem cell factor receptor) und HER2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2) richten (Goddard *et al.* 2007). Auch das Ras-Protein könnte ein direktes Therapieziel darstellen. Medikamente (Farnesyl Transferase Inhibitoren, FTI) gegen das Ras-Protein befinden sich bereits seit einigen Jahren in klinischer Erprobung (Phase II/III) (Downward 2003).

1.3 Genetik der TGCT

1.3.1 Chromosomale Konstitution in Keimzelltumoren des Hodens

Es gibt bestimmte Hinweise darauf, dass die Entstehung von Hodenkrebs einer genetischen Prädisposition und Vererbung unterliegt. Beispielsweise haben Kaukasier in den USA und in West Europa im Vergleich zu anderen Populationen die höchste Hodenkrebsinzidenz (McIntyre *et al.* 2008). Liegt eine TGCT-Erkrankung in der Familie vor, so steigt das relative Risiko unter Verwandten 1. Grades ebenfalls zu erkranken. Unter Brüdern steigt das Erkrankungsrisiko sogar um das 8-10 fache (Forman *et al.* 1992). Auch der Manifestationszeitpunkt wurde bei familiärer Häufung früher beobachtet als in der Allgemeinbevölkerung (Mai *et al.* 2009). Patienten mit Klinefeltersyndrom (Halse *et al.* 1995) und Trisomie 21 (Satge *et al.* 1997) erkrankten ebenfalls häufiger. Einige Genloci wurden bisher mit familiärer Prädisposition in Verbindung gebracht, darunter zum Beispiel Xq27 (Lutke *et al.* 2004, Rapley *et al.* 2000) und die „gr/gr“-Deletion auf dem Y-Chromosom (Nathanson *et al.* 2005). Auch andere chromosomale Aberrationen wurden häufig im Zusammenhang mit SE und NiSe beschrieben.

1.3.2 Chromosomale Aberrationen

Die TGCT sind aneuploid, höchst wahrscheinlich aufgrund der frühen Etablierung einer Polyploidie. Die Polyploidie ist Ausdruck von genomischer Instabilität und führt zu genetischer Heterogenität. Im Hoden zeigen die SE im Durchschnitt einen hypertriploiden DNA-Index. Alle histologischen Bestandteile der NiSe zeigen einen durchschnittlich hypotriploiden DNA-Index, möglicherweise durch den Nettoverlust chromosomalen Materials während der Kanzerogenese (Oosterhuis *et al.* 1989). Durch diverse Untersuchungen wurden sowohl in der TIN als auch in den manifesten Keimzelltumoren bestimmte genetische Aberrationen beobachtet. Ein Zugewinn an genetischem Material zeigte sich auf den Chromosomen 1, 5, 7, 8, 12p und X, während sich auf Chromosom 18 ein Verlust zeigte (Summersgill *et al.* 2001). Bemerkenswert ist die Stetigkeit und die Häufigkeit, mit der die Aberrationen auf Chromosom 12p beobachtet werden (Oosterhuis und Looijenga 2005). In diversen Publikationen wird der Zugewinn

von 12p-Sequenzen als die einzige beständige strukturelle chromosomale Aberration in den invasiven TGCT beschrieben (Oosterhuis und Looijenga 2005, Sandberg *et al.* 1996). In ca. bis zu 80% der TGCT ist der komplette p-Arm des Chromosoms 12 vermehrt vorzufinden, was zurückzuführen ist auf eine oder mehrere Kopien des Isochromosoms 12p [i(12p)] (Atkin und Baker 1982, Oosterhuis und Looijenga 2005, van Echten *et al.* 1995). Tumoren ohne ein [i(12p)] zeigen zusätzliche Sequenzen durch unterschiedliche strukturelle Anomalien (Rodriguez *et al.* 1993, Suijkerbuijk *et al.* 1993), unter anderem auch durch high-level Amplifikationen (Oosterhuis und Looijenga 2005). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass hier Gene mit einer Schlüsselfunktion für die Entstehung der Keimzelltumoren lokalisiert sind (Oosterhuis und Looijenga 2005).

1.3.3 Die Rolle des Chromosoms 12p

Basierend auf ihrer Kopiezahlerrhöhung wurden bereits einige auf 12p lokalisierte Gene als mögliche Kandidaten in der Tumorentstehung vorgeschlagen, darunter SOX5, LRMP, KRAS, LDHB, SSPN, ITPR2 (Rodriguez *et al.* 2003) aber auch EKI1 und DAD-R (Zafarana *et al.* 2002). Im Bereich des 12p-Amplikons, zytogenetisch lokalisiert auf 12p11.2-12.1, wurde im Jahre 1994 der erste Fall einer Amplifikation in einer [i(12p)] negativen Seminom-Metastase beschrieben (Suijkerbuijk *et al.* 1994). Weitere Studien konnten diese Amplifikation in den TGCT nachweisen (Korn *et al.* 1996, Mostert *et al.* 1996, Mostert *et al.* 1998, Roelofs *et al.* 2000, Suijkerbuijk *et al.* 1994, Zafarana *et al.* 2002). In den untersuchten Seminom-Fällen konnte die Amplifikation in 8-10% beobachtet werden, während sie in den NiSe seltener zu finden war (Eble *et al.* 2004). Die Amplifikationen wurden hauptsächlich in Seminomen beobachtet, denen das [i(12p)] fehlte (Mostert *et al.* 1998). Patienten, die eine Amplifikation des Abschnittes 12p11.2-12.1 anstelle der Vermehrung des gesamten 12p-Arms zeigten, wurden klinisch früher auffällig (Roelofs *et al.* 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die amplifizierten Zellen weniger zu Apoptose neigen und ein verlängertes Überleben aufweisen (Roelofs *et al.* 2000). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine erhöhte Kopiezahl der Gene in dieser Region vorteilhaft für das Überleben der Tumorzellen ist (Oosterhuis *et al.* 2005). Mit Hilfe der Array CGH (Comparative genomic hybridisation) wurde in einer Studie von Rodri-

guez *et al.* mittels des Vergleichs sich überlappender amplifizierter Bereiche eine Minimal-Region auf 12p11.2-12.1 bestimmt. Diese amplifizierte Region umfasst ca. 5Mb (22.57-27.54 Mb) und beinhaltet unter Anderen das KRAS-Gen (Rodriguez *et al.* 2003). Einige der dort lokalisierten Gene, darunter auch KRAS, zeigen eine Überexpression und könnten demnach eine potentielle Rolle in der Tumorentstehung spielen (Rodriguez *et al.* 2003). Vor allem das KRAS-Gen wird aufgrund seiner bekannten onkogenen Funktion als wichtiger Kandidat im Prozess der Tumorentstehung in dieser Region angesehen.

1.3.4 Model der Signaltransduktion in TGCT

Das Model der Signaltransduktion von McIntyre *et al.* 2008 (s. **Abb. 1**) betrachtet diejenigen Genprodukte und Signalwege näher, von denen man annimmt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung der TGCT und deren Entwicklung aus der TIN spielen. In dieser Abbildung sind die Proteine, die in diversen Studien zu den TGCT in abweichender Weise beobachtet wurden (Expression, Gen-Kopiezahl und/oder Mutation), gestreift dargestellt. Zu diesen Genprodukten gehört auch das RAS (=KRAS), welches eine zentrale Rolle im Signalweg von den membranständigen Rezeptoren zum Zellkern spielt. Durch Abweichungen der normalen Proteinfunktionen kann es zur Beeinflussung der Zellen in ihrem Proliferations- und Migrationsverhalten, sowie ihrem Überleben kommen. Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Hochregulation der Ras-Signaltransduktion in TGCT wichtig ist, da dies in Zusammenhang gebracht wird mit Förderung des Zellüberlebens sowie invasiver Migration und starker Proliferation (McIntyre *et al.* 2008).

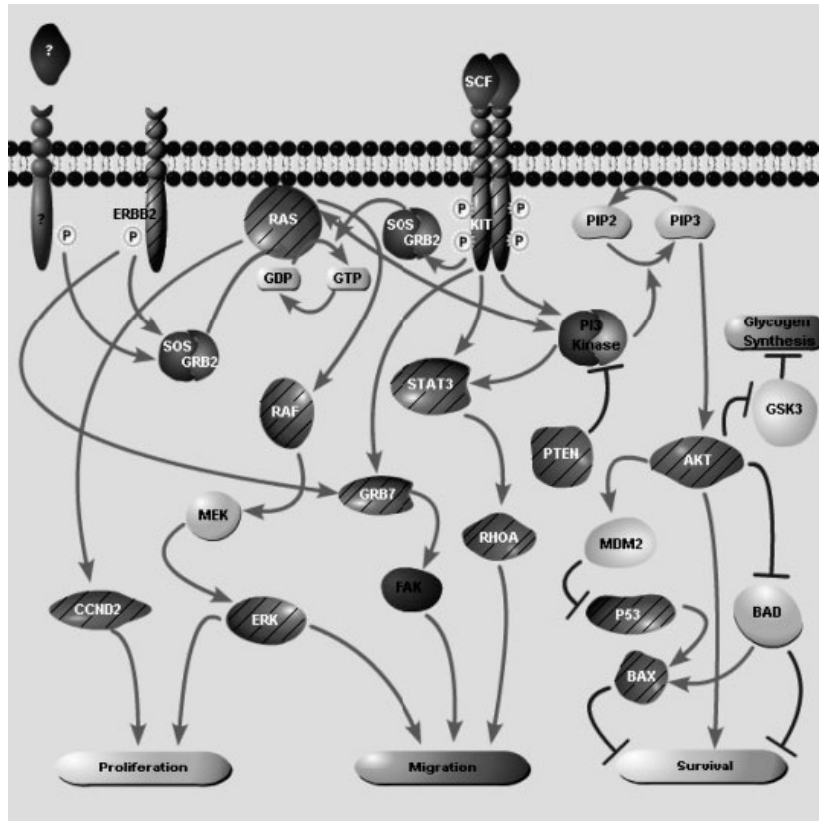


Abb. 1: Model der Signaltransduktion in den TGCT (McIntyre *et al.* 2008)

1.3.5 Das Protoonkogen KRAS

Das Gen, welches für K-Ras codiert, befindet sich auf Chromosom 12p12.1. Das K-Ras Protein gehört, wie auch das H-Ras und das N-Ras zu der Ras-Familie. Die Ras Proteine haben ein geringes Molekulargewicht und sind an der Membran lokalisierte GTPasen, welche extrazelluläre Signale über intrazelluläre Signalkaskaden weiterleiten (Wu *et al.* 2008). Unterschiedliche Membranrezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, darunter auch c-KIT oder HER2/neu, sind fähig das Ras-Protein zu aktivieren. Durch die Bindung eines spezifischen Liganden und anschließender Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle kommt es über die nun aktive Tyrosinkinasedomäne zur Phosphorylierung des Proteins GBR2 (engl.: Growth factor receptor-bound protein 2). Dieses gibt nun das Signal an SOS (engl.: Son of sevenless) weiter, welches wiederum K-Ras aktiviert. K-Ras aktiviert durch Phosphorylierung weitere Effektormoleküle und dadurch DNA bindende Transkriptionsfaktoren. Diese translozieren schließlich das Signal in den Zellkern und die Transkription der Zielgene wird initiiert. Die auf die

sem Wege exprimierten Zielgene sind in Zellwachstum, Differenzierung, Überleben und Angiogenese involviert (Goddard *et al.* 2007, McIntyre *et al.* 2008).

Das KRAS ist das am häufigsten mutierte Gen der RAS-Familie, meist Punktmutationen in den Kodons 12,13 und 61. Aktivierende Mutationen wurden am häufigsten in Pankreas-, Kolon- und Lungen-Karzinomen beschrieben (Wu *et al.* 2008). Außerdem ist bekannt, dass aktivierende Mutationen und Überexpression des Wildtyp KRAS-Gens die Zellen der NIH3T3-Zelllinie transformieren (Goddard *et al.* 2007). Aktivierende Mutationen und Überexpression von KRAS wurden auch in den TGCT beschrieben (Goddard *et al.* 2007). In ungefähr 10% konnten aktivierende Mutationen (Goddard *et al.* 2007, McIntyre *et al.* 2005, Sommerer *et al.* 2005) und in 35% Überexpression von KRAS belegt werden (McIntyre *et al.* 2005). Es ist möglich, dass sowohl aktivierende Mutationen als auch die KRAS-Überexpression zu einer gesteigerten Aktivität des Ras-Signalweges führen (McIntyre *et al.* 2005). Allerdings treten aktivierende Mutationen und Überexpression nicht gemeinsam auf, sondern schließen sich gegenseitig aus (McIntyre *et al.* 2005). Eine Vermehrung der KRAS-Kopiezahl wurde nur in den malignen Keimzelltumoren, nicht aber in deren Vorläuferstufen (TIN) beschrieben. Der KRAS-Zugewinn ist demnach scheinbar involviert in die Tumorprogression (McIntyre *et al.* 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte KRAS-Kopiezahl positiv mit der Höhe der Expression korreliert und somit ein 12p-Zugewinn mit einer KRAS-Überexpression einhergeht (McIntyre *et al.* 2005, Rodriguez *et al.* 2003).

Die bisherigen Forschungsergebnisse deuten auf die Relevanz der 12p11.2-12.1 Amplifikation hin. Insbesondere der KRAS-Amplifikation scheint in Bezug auf die Pathogenese der TGCT von besonderer Bedeutung zu sein. Seit Entdeckung der Amplifikation im Jahre 1994 (Suijkerbuijk *et al.* 1994) erschienen einige Publikationen (Korn *et al.* 1996, McIntyre *et al.* 2005, Mostert *et al.* 1996, Mostert *et al.* 1998, Rao *et al.* 1998, Roelofs *et al.* 2000, Summersgill *et al.* 2001, Zafarana *et al.* 2002) die sich unter anderem mit der Prävalenz der Amplifikation beschäftigt haben. Allerdings waren diese Publikationen bisher von relativ geringer Fallzahl. (siehe **Tab. 2**).

Tabelle 2: Publikationen zur 12p11.2-12.1 Amplifikation in TGCT

Publikation	Fallzahl (n=)	Methode	i(12p) %	Amplifikation %
Suijkerbuijk <i>et al.</i> , 1994*	1	CGH FISH	-	100
Mostert <i>et al.</i> , 1996*	15	CGH	66.7	13.3
Korn <i>et al.</i> , 1996	11	CGH, FISH (YAC)	-	27.3
Rao <i>et al.</i> , 1998	22	CGH	-	9.1
Mostert <i>et al.</i> , 1998*	49	CGH, FISH (YAC)	26,5	16.3
Roelofs <i>et al.</i> , 2000*	76	CGH, FISH (YAC)	-	7.9
Summersgill <i>et al.</i> , 2001	7	CGH, FISH (YAC)	71,4	28.6
Zafarana <i>et al.</i> , 2002*	45	sqRT-PCR, FISH (BAC)	-	17.8
McIntyre <i>et al.</i> , 2005	65	qPCR, RT-PCR	-	32.3

* From the laboratory for Experimental Patho-Oncology, Dr. Daniel den Hoed Cancer Center, University Hospital Rotterdam, LHJ

CGH (Comparative genomic hybridization), FISH (Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung), sq/qRT-PCR (Semi quantitative/ quantitative real time polymerase chain reaction), YAC(Yeast artificial chromosome)

1.4 Amplifikationen

Die Vermehrung des Gengehaltes durch Amplifikation chromosomaler Abschnitte wurde sowohl als gezielter Mechanismus, beispielsweise während des Entwicklungsprozesses einiger Spezies (Fruchtfliege, Huhn), aber auch als ungezielter Mechanismus im Rahmen der Tumorgenese (Säugetiere) beschrieben. In beiden Szenarien konnte aufgrund der Amplifikation eine Überexpression bestimmter Gene beobachtet werden. Prominente Vertreter amplifizierter Protoonkogene, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren erwähnt wurden, sind c-MYC (V-Myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog), HER2/neu, EGFR (Epidermal growth factor receptor) und KRAS. Die Amplifikationen können in der Höhe der Genkopiezahl aber auch in der Länge des vervielfältigten Genabschnittes variieren (Schwab 1998, Schwab 1999). Im Folgenden soll auf die Amplifikationstypen kurz eingegangen werden.

Bei der Cluster-Amplifikation wird ein Abschnitt des Chromosoms durch fortgesetzte Verdopplung vervielfältigt. Weil dieser Abschnitt im Chromosom verbleibt, führt die Amplifikation zu einer deutlich sichtbaren Verlängerung des Chromosoms, die auch lichtmikroskopisch als sogenannte „homogen anfärbba-

re Bereiche“ (engl.: Homogeneous staining regions, HSR) erkennbar sind. Es wird vermutet, dass dieser Typ der Amplifikation vor allem nach dem sogenannten „Breakage-Fusion-Bridge“-Modell (BFB) entsteht (Schwab 1999). Nach dieser Theorie bricht das Chromosom, wodurch ein offenes Ende des DNA-Doppelstranges gebildet wird. Zelluläre Reparaturmechanismen verbinden die beiden DNA-Stränge, sodass sich eine „Brücke“ bildet. Bei der nächsten Mitose wird das Chromosom verdoppelt, die beiden Chromatiden bleiben aber durch die Brücke verbunden. Wenn die Chromatiden in der Telophase auf die Tochterzellen verteilt werden, reißen die verbundenen Chromatiden schließlich an einer zufälligen Stelle auseinander. Der homologe DNA-Abschnitt zwischen der Brücke und dem Punkt, an dem das Chromatid reißt, liegt als Folge in der einen Tochterzelle doppelt vor, während er in der anderen fehlt. Befinden sich nun in diesem DNA-Abschnitt wachstumsrelevante Gene wie z.B. KRAS, gewinnt die Tochterzelle mit erhöhter Kopiezahl einen Wachstumsvorteil. Dieser Zyklus von Reparatur, Brückenbildung und Zerreißen des Chromosoms wiederholt sich mit jedem Zellzyklus und kann zu Dutzenden von zusätzlichen Genkopien auf einem Chromosom führen (Schwab 1999).

Die extrachromosomale Amplifikation vom „Double-minute“-Typus (DM) entsteht, wenn ein Stück DNA aus dem Chromosom entfernt wird. Die kleinen Chromosomenfragmente haben ihren Namen von der charakteristischen Form eines „Doppelten Kommas“. Weil DMs kein Zentromer besitzen, werden sie bei der Mitose zwar verdoppelt, aber rein zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Auch hier gilt, dass die Tochterzellen mit der höheren Kopiezahl an DMs einen Wachstumsvorteil erhalten, wenn im amplifizierten Bereich ein entsprechendes wachstumsrelevantes Gen vorhanden ist. So wird z.B. das MYCN (V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) häufig in Form von DMs amplifiziert (Schwab 1999).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Studie wurden Gewebeproben von insgesamt 301 Keimzelltumoren in einem Gewebe-Mikroarray-Format (Tissue Microarray, TMA) untersucht. Bearbeitet wurden dafür die Keimzelltumor tragenden Anteile der Multi-Tumorarrays 3 und 4 (MTA). Verwendet wurde Formalin fixiertes (4% gepufferte wässrige Lösung), in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe.

Tabelle 3: TMA Zusammenstellung, der verwendeten Abschnitte, für den MTA-3/4.

MTA-3 alle Fälle	Entität	n =107
Histologie	Seminom	50
	Nicht-Seminom	57
MTA-4 alle Fälle	Entität	n =194
Histologie	Teratom	57
	Seminom	92
	Nicht-Seminom	45
Stadium des Primärtumors	pT1	112
	pT2	32
	pT3	8
	pT4	1

Um mehr Informationen über die untersuchten Keimzelltumoren zu erhalten, wurde in den Berichten der Pathologie recherchiert, um zusätzliche Angaben zu Tumorbestandteilen, pT-Kategorie und Manifestationsalter zu erhalten. Diese Recherche war nur für den MTA-4 möglich. Die Daten des MTA-3 waren vollständig anonymisiert.

Insgesamt befinden sich 57 Teratome auf dem MTA-4 (vgl. **Tab. 3**), darunter 22 weibliche und 35 männliche Fälle. Diese Teratom-Kohorte ist eine heterogene Gruppe, in der reife und unreife Teratome zu finden sind. Die Teratome sind unter anderem Anteile von Nicht-Seminomen (n=17) und Keimzelltumoren, die

sowohl seminomatöse als auch nicht-seminomatöse Keimzelltumorbestandteile (CT, n=4) beinhalten.

Auch in der Kohorte der NiSe finden sich Keimzelltumoren, die sowohl seminomatöse als auch nicht-seminomatöse Keimzelltumorbestandteile (CT, n=19) beinhalten.

2.2 FISH

Für die zweifarbige FISH (Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung) -Analyse (KRAS-Signal: grün, Zentromer12-Signal: orange) wurden 4µm dicke Paraffinschnitte benutzt, welche ausgewähltes Tumorgewebe enthielten. Dazu wurden die Paraffinblöcke, welche gestanztes Gewebe enthalten geschnitten (4µm) und auf Objektträger übertragen. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL). Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (12p12.1; BAC RP11-707G18, RZPD, Deutschland), welche das KRAS-Gen umfasst, eingesetzt. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 12 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt. Diese umfassen:

1. pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung
2. DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur
3. DNA-Markierung mittels Nick-Translation
4. Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
5. Hybridisierung
6. Waschen
7. Fluoreszenz-Detektion

2.2.1 pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

Verwendete Materialien

- pBAC-E.coli-Klon (Chloramphenicolresistent), RZPD-Nr.: RP11- 707G18 (Stab-Stock-Kultur)
- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (25g/1 dH₂O); autoklaviert
- Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.)

Laborprotokoll: pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

- 1) 10ml Medium in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben füllen
- 2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol (0,1mg/ml)
- 3) Mit abgeflammter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und einen Abstrich aus der Stab-Stock-Kultur machen
- 4) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- 5) Inkubation der angeimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage
- 6) Überimpfen von 10µl der trüb gewordenen Kultur in einen mit 10ml frischen LB-Medium und 30µl Chloramphenicol versetzten 100ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette
- 7) Inkubation der angeimpften Kultur bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator über Nacht
- 8) DNA-Extraktion

2.2.2 DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur

Die DNA wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mithilfe des „QIAprep Spin MiniprepKit“ von Qiagen nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- 1) 3ml (*2ml+1ml*) der Flüssigkultur im 2ml-Tube in einer Tischzentrifuge (~17.900x g) für 90 Sek. bei 13.000rpm pelletieren, Überstand wird verworfen
- 2) Pellet in 250µl Puffer P1 (RNase zugefügt) vollständig resuspendieren
- 3) Zugabe von 250µl Puffer P2 (enth. SDS: Spaltung der Zellmembran & Denaturierung der Proteine, NaOH: Denaturierung der chromosomalen und Plasmid-DNA) und vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren (nicht länger als 5 Min. mit dem folgenden Schritt warten)
- 4) Zugabe von 350µl Puffer N3 Neutralisationspuffer und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren, zur Renaturierung der Plasmid-DNA
- 5) 10 Min. Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge, Plasmid-DNA verbleibt im Überstand
- 6) Überstand in eine „QIAprep spin Säule“ (in einer 2ml Auffang-Eppendorfküvette) überführen
- 7) 1 Min. Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge, Plasmid- bindet an die Säule
- 8) Durchfluss verwerfen
- 9) „QIAprep spin Säule“ mit 500µl Puffer PE beladen und 1Min. Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 10) Durchfluss verwerfen
- 11) „QIAprep spin Säule“ erneut mit 500µl ethanolhaltigem 70% PE-Puffer beladen und 1 Min. Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 12) Durchfluss verwerfen
- 13) „QIAprep spin Säule“ erneut 1 Min. bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- 14) Durchfluss verwerfen; zur Elution der pBac-DNA „QIAprep spin Säule“ in ein 1,5ml-Tube setzen
- 15) „QIAprep spin Säule“ mit 50µl auf 70°C erwärmten Elutionspuffer EB (enthält 15% Isopropanol) beladen
- 16) 1 Min. bei Raumtemperatur inkubieren

- 17) 1 Min. Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 18) Säule entfernen und Quantifizierung der DNA im Nanodrop und Aufbewahrung im 1,5ml-Tube bei 4°C

Die Messung der DNA-Konzentration, sowie ihrer Reinheit, erfolgt durch photometrische Messung (DNA Absorption bei 260nm) am Nano Drop ND-1000 mit dem Programm: "ND3.1.0:Nucleic Acid". Als Referenz gilt die Leerprobe mit 1.5µl des verwendeten Elutionspuffers EB. Die Proben, welche einen ausreichenden DNA-Gehalt (DNA-Mindestkonzentration: circa 50 ng/µl) und eine Reinheitsration (260/280 Absorptionsverhältnis DNA/Proteine, die die Probe verunreinigen) zwischen 1.8 und 2.0 enthalten, werden zur DIG-Nick-Translation für die Sondenherstellung verwendet.

2.2.3 DNA-Markierung mittels Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine DNA-Markierungstechnik, bei der das Enzym DNase genutzt wird, um Einzelstrangbrüche (sogenannte „nicks“) der DNA zu verursachen. Mithilfe seiner 5'-3'-Exonuclease-Aktivität, welche Nukleotide entfernen und am 5'-Ende wieder richtig verketteten kann, baut das Enzym (Polymerase I) mit Digoxigenin markierte Nukleotide in den DNA-Doppelstrang ein. Bei dieser Reparatur der DNA mit Digoxigenin markierten Nukleotiden als Substrat verschiebt die Polymerase I die Einzelstrangbrüche, anstatt sie einfach zu schließen, weshalb die Methode „Nick-Translation“ genannt wird (Rigby *et al.* 1977). Die DNA wird gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge für die spätere Hybridisierung gekürzt, welche durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden kann.

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt, wobei eine Mindestmenge von 1µg DNA zu einem Ansatz von 50µl gegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNA-Lösung von 38µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1.5 bis 2.5µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit, ein weiteres Mal Pol I-/DNase-Enzym-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Verwendete Materialien

- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11- dUTP (Roche)
- Polymerase I (Invitrogen)

Pipettieransatz im 0.5ml-Tube (alle zu verwendenden Enzyme stehen auf Eis)

Wieviel Volumen der vorher hergestellten DNA-Lösung benötigt wird, um die optimale Menge von circa 2µg DNA zu dem Ansatz hinzuzufügen, muss errechnet werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass maximal 38µl der DNA-Lösung verwendet werden können, da der gesamte Ansatz das Volumen des 50µl Eppendorfröhrchens nicht überschreiten darf.

Zuerst wird die DNA-Mindestkonzentration errechnet, indem die benötigte DNA-Menge (2000ng) durch das maximal verwendbare Volumen an DNA-Lösung (38µl) geteilt wird:

$$2000\text{ng} / 38\mu\text{l} = 52.6\text{ng}/\mu\text{l}$$

Das benötigte Volumen an DNA-Lösung muss für jede Probe abhängig von ihrer DNA-Konzentration bestimmt werden, sofern diese mindestens 52.6ng/µl beträgt. Dafür wird die optimale Menge der DNA von 2000ng durch die Konzentration der aktuellen Probe geteilt:

$$2000\text{ng} / X_{\text{Konzentration der Probe}} \text{ ng}/\mu\text{l} = X_{\text{benötigte DNA-Lösung}} \mu\text{l}$$

Ist das errechnete Volumen der benötigten DNA-Lösung kleiner als 38µl, wird die Differenz zu 38µl mit dH₂O aufgefüllt. Das folgende Pipettierschema gibt einen Überblick über den DIG-Nick-Translationsansatz:

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1µl
pBAC-DNA-Lösung	38µl
Pol I-/ DNase Enzym Mix	5µl
DNA Polymerase I	1µl
<hr/>	
Ansatzmenge	50µl

Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation

- 1) Ansatz gut durchmischen und danach herunter zentrifugieren
- 2) Inkubation für 90 Min. bei 15°C im Thermocycler
- 3) Zugabe von weiteren 5µl Pol I-/DNase Enzym Mix; mit der Pipette durchmischen
- 4) Inkubation für 15 Min. bei 15°C im Thermocycler
- 5) Zugabe von 5µl Stop Puffer (0.5 M EDTA, pH 8.0)
- 6) Durchmischen (auf dem Vortex) und danach zentrifugieren
- 7) Lagerung bei 4°C

2.2.4 Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) behandelt.

Verwendete Materialien

- Destilliertes Wasser (dH₂O)
- Ethanol (70% / 80% / 96%)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Puffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

- 1) TMA-Schnitte 3× 10 Min. ins Xylol stellen
- 2) Schnitte 2× 5 Min. in Ethanol (96%) stellen
- 3) Schnitte 3 Min. auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
- 4) Schnitte 15 Min. in 80°C warmer Pretreatmentlösung (NaSCN-pH 5.4, im Wasserbad) inkubieren, um die Tertiärstruktur der Membranproteine durch aufbrechen der Disulfidbrücken aufzuheben
- 5) Schnitte 2 Min. in dH₂O waschen
- 6) Schnitte 150 Min. in 37°C warmer Proteaselösung (pH 2.0+ 250mg Pepsin im Wasserbad) inkubieren, um die Proteine im Gewebe zu verdauen
- 7) Schnitte 2 Min. in dH₂O waschen
- 8) Schnitte 3 Min. in Ethanol (70%) stellen, um dem Gewebe das Wasser zu entziehen
- 9) Schnitte 3 Min. in Ethanol (80%) stellen, um dem Gewebe das Wasser zu entziehen
- 10) Schnitte 3 Min. in Ethanol (96%) stellen, um dem Gewebe das Wasser zu entziehen
- 11) Schnitte 3 Min. auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

Die hiermit abgeschlossene proteolytische Vorbehandlung des Gewebes ermöglicht der Sonde einen leichten Zugang in das Gewebe und damit die Möglichkeit, optimal komplementär an die zu untersuchende Sequenz zu binden.

2.2.5 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (12p12.1, RZPD Nr.: RP11-707G18) und einer kommerziellen Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 12 (Spectrum orange, Vysis) durchgeführt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht durch den mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner COT-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen/repetitiver Sequenzen), einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, für 10 Min. bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt.

Verwendete Materialien

- 20× SSC
- COT-DNA
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix

- 1) 5ml deionisiertes Formamid, 1.5ml 20× SSC und 1g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
- 2) Bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- 3) Suspension mit HCl auf pH7 einstellen
- 4) Mit dH₂O auf 7ml auffüllen
- 5) Bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (Master-mix 1.0)

Um die Hybridisierung mit dem vorbereiteten Objektträger zu starten, werden 20µl Sonden-Hybridisierungsmix benötigt. Dieser enthält 14µl Basis-Hybridisierungsmix, 2.0µl COT-DNA (1g/µl) und 4µl Sonden DNA, siehe Pipettierschema. Der Basis-Hybridisierungsmix enthält Formamid, welches die Denaturierungstemperatur der DNA durch Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen herabsetzt. Dies erleichtert die vor der Hybridisierung nötige Auftrennung des DNA-Doppelstranges. Die Sonden-DNA setzt sich in diesem Fall aus

3.5µl der selbst hergestellten Gensonde und 0.5µl kommerzieller Zentromer-sonde zusammen. COT Human DNA verhindert Kreuzhybridisierungen mit un-spezifischen/repetitiven DNA-Sequenzen, indem sie diese abblockt.

Basis-Hybridisierungsmix	14µl
COT-DNA	2µl
Sonden-DNA	4µl
<hr/>	
Ansatz	20µl

Laborprotokoll: Hybridisierung

- 1) Hybridisierungsmix auf den TMA geben
- 2) Eindeckeln mit einem 24× 32mm Deckgläschen
- 3) Mit Rubbercement versiegeln zur Vermeidung des Austrocknens während der Hybridisierung.
- 4) Bei 72°C für 10 Min. im Hybrite denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

Da die kommerziellen Zentromersonden bereits direkt mit einem Fluorochrom markiert sind, das lichtempfindlich ist, ist ab diesem Zeitpunkt darauf zu achten, die Proben und den Objektträger vor Licht zu schützen. Ansonsten bleicht das Leuchtsignal des Fluorochroms frühzeitig aus.

2.2.6 Waschen

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien

- 2× SSC
- dH₂O
- NP40

Laborprotokoll: Waschen

- 1) TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbercement und Deckgläschen entfernen
- 2) Schnitte in Waschpuffer (2× SSC; 0.3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- 3) Schnitte 2 Min. bei 72°C im Waschpuffer (2× SSC; 0.3% NP40) waschen
- 4) Schnitte kurz in dH₂O waschen
- 5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

2.2.7 Fluoreszenz-Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbsthergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium für Fluoreszenz mit DAPI; H-1200 (Vector)) und einem 24×32mm Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum versiegelt.

Laborprotokoll Detektion:

- 1) Schnitte mit Blocking Solution 30-45 Min. in einer dunklen Inkubationskammer eindeckeln
Niedermolekulare Proteine aus der Lösung sättigen freie Bindungsstellen ab, um Protein bindende Oberflächen abzublocken. Dies ermöglicht hochspezifische Antikörperbindungen an die Digoxigenin markierten Sonden, was zu weniger Hintergrundleuchten führt.
- 2) Blocking Solution abkippen
- 3) Schnitte für 60-90 Min. bei 37°C (Brutschrank) in feuchter, dunkler Kammer mit dem 1. Detektions-Antikörper inkubieren, welcher an das Hapten Digoxigenin bindet
- 4) Schnitte 3x 1 Min. bei 37°C in Detektionspuffer waschen
- 5) Schnitte für 60-90 Min. bei 37°C (Brutschrank) in feuchter, dunkler Kammer mit dem 2. Detektions-Antikörper inkubieren, welcher an den 1. Antikörper bindet
- 6) Schnitte 3x 1 Min. bei 37°C in Detektionspuffer waschen
- 7) Schnitte für 60-90 Min. bei 37°C (Brutschrank) in feuchter, dunkler Kammer mit dem 3. Detektions-Antikörper inkubieren, welcher an den 2. Antikörper bindet
- 8) Schnitte 3x 1 Min. bei 37°C in Detektionspuffer waschen
- 9) Schnitte in dunkler Kammer Lufttrocknen lassen
- 10) Schnitte mit DAPI/ Antifade betropfen und mit einem Deckgläschen abdecken

2.3 Auswertung

2.3.1 Bewertung der FISH-Ergebnisse

Die fertigen Objektträger (TMA's) wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Beurteilung der Gensignale wurde der grüne FITC-Filter, zur Beurteilung der Zentromersignale der orangene Rhodamin-Filter verwendet. Die Gen- und Zentromersignale konnten durch Anfärbung des Zellkerns mit DAPI und einem entsprechenden DAPI-Filter genau einem Zellkern zugeordnet werden. Mit dieser Technik konnte die Ratio KRAS-Signale/Zentromer12-Signale in den einzelnen Zellen jeder Gewebeprobe gezählt werden.

Bei der Auswertung der Arrays wurde die Ratio (KRAS-Signale/Zentromer12-Signale) in den einzelnen Krebszellen ausgezählt und ein Mittelwert für die vorliegende Gewebeprobe errechnet. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen KRAS-Signalen wie Zentromer 12-Signalen (Ratio KRAS/Cen12 \geq 2.0) definiert. Fälle, die mehr als 10 Genkopiezahlen pro Zellkern zeigen, werden als high-level Amplifikationen bezeichnet. Gewebeproben, die eine KRAS/Cen12-Ratio von über 1.0 aber unter 2.0 aufwiesen ($1.0 >$ Ratio KRAS/Cen12 $<$ 2.0), wurden als „Gain“ bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben (Ratio KRAS/Cen12 \leq 1.0) wurden als normal definiert.

2.3.2 Optimierung der Auswertbarkeit

Um eine möglichst hohe Anzahl von Patienten untersuchen zu können und die Anzahl der fehlenden und nicht auswertbaren Spots auf ein Minimum zu reduzieren, wurden 3 Schnitte des TMAs gefischt. Bewertet wurde jedoch nur der erste auswertbare Spot jedes Gewebes. War z.B. der Spot auf TMA-Schnitt 1 auswertbar, wurden TMA-2 und TMA-3 für diesen Spot vernachlässigt. Erst wenn ein Spot auf TMA-1 nicht auswertbar war, wurde TMA-2 und (falls dieser auch nicht auswertbar war) TMA-3 ausgewertet. Auf diese Weise wurde für jedes Gewebe nur ein einziger Spot ausgewertet. Ein möglicher Einfluss auf das Ergebnis z.B. durch eine unterschiedliche Menge an auswertbaren Spots in verschiedenen Geweben, oder durch unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Spots desselben Gewebes, wurde so verhindert.

2.3.3 In der Studie verwendete Fälle

Im weiteren Verlauf werden nur die männlichen Fälle bearbeitet, da es sich bei dieser Studie um die Untersuchung männlicher Keimzelltumoren handelt.

Für diese Studie werden alle Tumoren, die beide Entitäten beinhalten und somit Anteile eines seminomatösen als auch eines nicht- seminomatösen TGCT in-
nehoben, nach der britischen Klassifikation als kombinierte Keimzelltumoren (CT) bezeichnet (Zafarana *et al.* 2002).

Die im Ergebnisteil untersuchte Gruppe setzt sich aus allen vorhandenen SE-, NiSe- und CT-Fällen zusammen, sodass wir auf eine Untersuchungsgruppe von insgesamt 263 Patienten kommen.

2.3.4 pT-Kategorien

Unter den insgesamt 140 auswertbaren Fällen befinden sich 106 Fälle im pT1-Kategorie und 34 Fälle im pT2-Kategorie oder höher (pT2, 3, 4 zusammengefasst).

2.4 Sequenzierung

Zur DNA-Extraktion wurde eine Gewebestanze mit 0.6 mm Durchmesser aus dem Gewebeblock entnommen. Das Gewebe wurde in ATL-Puffer, inklusive Proteinase K (20µl), über Nacht bei 56°C verdaut, bis die Lösung klar war. Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNA-Mini-Kit der Firma Qiagen (Kat. # 51306, Qiagen) gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Sequenzierung wurde die DNA zunächst mit PCR vervielfältigt. Die Primer und die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Exon 2:

Vorwärts-Primer: 5'- AGG TAC TGG TGG AGT ATT TGA TAG T- 3'(25)

Rückwärts-Primer: 5'- GGT CAG AGA AAC CTT TAT CTG TAT C- 3'(25)

Exon 2 nested:

Vorwärts-Primer: 5'- GTG TGA CAT GTT CTA ATA TAG TCA C- 3'(25)

Rückwärts-Primer: 5'- GAA TGG TCC TGC ACC AGT AA- 3'(20)

Exon 3:

Vorwärts-Primer: 5'- CCT ACA GGA AGC AAG TAG TAA TTG A- 3'

Rückwärts-Primer: 5'- GGC AAA TAC ACA AAG AAA GCC CTC- 3'

Exon 3 nested:

Vorwärts-Primer: 5'- GCA AGT AGT AAT TGA TGG AGA AAC C- 3'

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Laborprotokoll: Herstellung des PCR-Ansatzes

Pipettierschema (Master-Mix)

2.5 mM d- NTP's (Promega)	2µl
5 pM/µl Primer (Mix F+T-Primer)	1µl
Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems)	0.3µl
Puffer (Applied Biosystems)	4µl
<hr/>	
Ansatzmenge	7.3µl

- 1) 100ng der extrahierten DNA bis maximal 17.7µl mit destilliertem Wasser auffüllen
- 2) DNA-Ansatz in 7.3µl PCR-Master- Mix dazugeben, sodass insgesamt ein 25µl PCR-Ansatz entsteht

Thermocycler- Programm:

Das Thermocycler (Bio-Rad C1000)-Programm:

- 1.) Initiale Denaturierung: 10 Min. bei 95°C
- 2.) 35 Zyklen:
 - a. Denaturierung: 20 Sek. bei 95°C
 - b. Annealing: 20 Sek. bei 58°C
 - c. Elongation: 40 Sek. bei 72°C
- 3.) Finale Elongation: 7 Min. bei 72°C

2.4.2 Kapillargelelektrophorese

Zur Kontrolle und Auswertung der PCR wurden die PCR-Produkte auf dem QIAxel (Kapillargelelektrophorese von Qiagen) laufen gelassen. War das PCR-Ergebnis negativ, so wurde der ersten PCR eine nested- bzw. seminested-PCR angeschlossen. Die nested-PCR wurde wie oben erläutert durchgeführt. Im Unterschied dazu wurden hier die nested-Primer und 0.5µl des PCR-Produktes als Template verwendet.

Alle positiven Proben (Auswertung aus dem QIAxel) wurden mit dem ExoSAP (USB) laut Vorschrift behandelt.

2.4.3 ExoSAP

Laborprotokoll: ExoSAP

- 1) 1.5ml Tubes (Schablone) beschriften
- 2) 0.2ml durchnummerieren
- 3) Je Tube:

ExoSAP	2µl
PCR-Produkt	5µl
<hr/>	
Ansatzmenge	7µl

- 4) Programm: ExoSAP
 - a. 15 Min. bei 37°C
 - b. 15 Min. bei 80°C
 - c. Ende bei 10°C

2.4.4 Sequenzierreaktion (BigDye)

Nach der Behandlung mit dem ExoSAP folgt die Sequenzierreaktion laut dem BigDye Protokoll von Applied Biosystems. Die anschließende Sequenzierreaktion wurde mit jeweils einem der o.g. Primer, getrennt für die Vorwärts- oder Rückwärts-Sequenz durchgeführt. Dazu wird als Erstes der Master-Mix vorbereitet. Siehe dazu folgendes Pipettierschema.

H ₂ O (steril)	4µl
2,5x Puffer	6µl
BigDye	2µl
Primer	1µl
<hr/>	
Ansatzmenge	13µl

Laborprotokoll: Sequenzierreaktion mit BigDye (Methode nach Sanger)

- 1) Zu dem ExoSAP-Ansatz (7µl) den Master-Mix (13µl) dazugeben (insgesamt 20µl Sequenzieransatz)
- 2) Programm: SeqKurz
 - a. 35 Zyklen
 - i. 10 Min. bei 95°C
 - ii. 10 Sek. bei 95°C
 - iii. 10 Sek. bei 55°C
 - iv. 2 Min. bei 60°C
 - b. 10°C Ende

2.4.5 DNA-Fällung

Nach erfolgter Sequenzierreaktion wird eine großvolumige DNA-Fällung vorgenommen.

Laborprotokoll: DNA-Fällung

- 1) Kühlzentrifuge anstellen, auf 4°C abkühlen lassen
- 2) In 1.5ml Tube: max. 30 Plätze in der Kühlzentrifuge

H ₂ O (steril)	170µl
3M NaAc	17µl
Sequenzierreakton	20µl
EtOH (100%)	500µl
<hr/>	
Ansatzmenge	707µl

- 3) Ansatz kurz vortexen + schwenken
- 4) Kühlzentrifuge: 20 Min. bei 4°C (14.000rpm)
- 5) Sofort 2x absaugen, ohne das Pellet zu entfernen
- 6) Ca. 10 Min. lufttrocknen lassen

2.4.6 Analyse

Die Pellets werden in 30µl Formamid gelöst und anschließend im 3100 Genetik Analyser (Applied Biosystem) sequenziert.

Zur Überprüfung wurde die KRAS-Sequenz der Exons 2 (speziell Codon 12/13) und 3 (speziell Codon 61) mit der KRAS-Referenzsequenz (NM_033360) verglichen.

2.5 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Tumorstadium und Genamplifikationen darzustellen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Um Gruppenunterschiede zwischen den histologischen Tumortypen bezüglich des Manifestationsalters und des KRAS-Amplifikationsniveaus zu ermitteln, wurde eine ANOVA (Varianzanalyse) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 KRAS-Amplifikation in Keimzelltumoren

3.1.1 Prävalenz der KRAS-Amplifikationen

Von 263 Keimzelltumoren des Hodens konnten insgesamt 227 (86.3%) erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Bei 36 Tumoren konnte kein Resultat erzielt werden, weil entweder der entsprechende Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte ($n=7$, 2.7%), oder weil kein Fluoreszenzsignal für KRAS/Zentromer12 sichtbar war ($n=31$, 11.8%). Von den insgesamt 227 auswertbaren Fällen zeigten 23 (10.1%) eine KRAS-Amplifikation und 64 (28.2%) zeigten Gains. Die SE waren zu 12.2% ($n=16/131$) amplifiziert, die NiSe zu 6.8% ($n=5/73$) und die CT zu 8.7% ($n=2/23$). Für die Gains wurden in den entsprechenden Entitäten folgende Werte ermittelt. In den SE wurden 26.7% ($n=35$) Gains gefunden, in den NiSe 28.8% ($n=21$) und in den CT 34.8% ($n=8$). Alle weiteren Werte können der **Tab. 4** entnommen werden.

Tabelle 4: Häufigkeiten der KRAS-Kopiezahlveränderungen in Seminomen (SE), Nicht-Seminomen (NiSe) und in Kombinierten Keimzelltumoren (CT). (*Absolute Zahlen*)

	N	Normale %	Gain %	Amplifikation %
Alle	227	61.7 (140)	28.2 (64)	10.1 (23)
SE	131	61.1 (80)	26.7 (35)	12.2 (16)
NiSe	73	64.4 (47)	28.8 (21)	6.8 (5)
CT	23	56.5 (13)	34.8 (8)	8.7 (2)

In der vorliegenden Untersuchung wurde geprüft, ob sich die Häufigkeit von KRAS-Veränderungen in den verschiedenen Tumorentitäten unterscheidet. Dies war jedoch nicht der Fall; für die Seminome im Vergleich zu den Nicht-Seminomen lag der p-Wert für Amplifikationen bei 0.228 und für die Gains bei 0.949 (siehe **Tab. 5**). Daraus lässt sich schließen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Gruppenunterschied bezüglich der getesteten Merkmale vorhanden ist. Entsprechend verhält es sich sowohl bei dem Vergleich von NiSe mit CT als

auch von SE mit CT. Die entsprechenden p-Werte sind der **Tab. 5** zu entnehmen.

Tabelle 5: Vergleich der p-Werte zwischen Seminomen (SE), Nicht-Seminomen (NiSe) und Kombinierten Keimzelltumoren (CT) bezüglich des Vorkommens von Amplifikationen und Gains.

Test	p-Wert Amplifikation	p-Wert Gain
NiSe vs. SE	0.228	0.949
NiSe vs. CT	0.686	0.541
SE vs. CT	0.739	0.493

3.1.2 Vergleich des Amplifikationsniveaus

Seminome zeigten im Vergleich zu Nicht-Seminomen höhere KRAS-Kopiezahlen in den amplifizierten Fällen. Während die SE-Amplifikationen eine durchschnittliche KRAS-Kopiezahl von 16.6 ($n=16$) zeigten, wiesen die NiSe im Mittel nur 6.2 ($n=5$) Kopien pro Zellkern auf ($p=0.065$, **Abb. 2**).

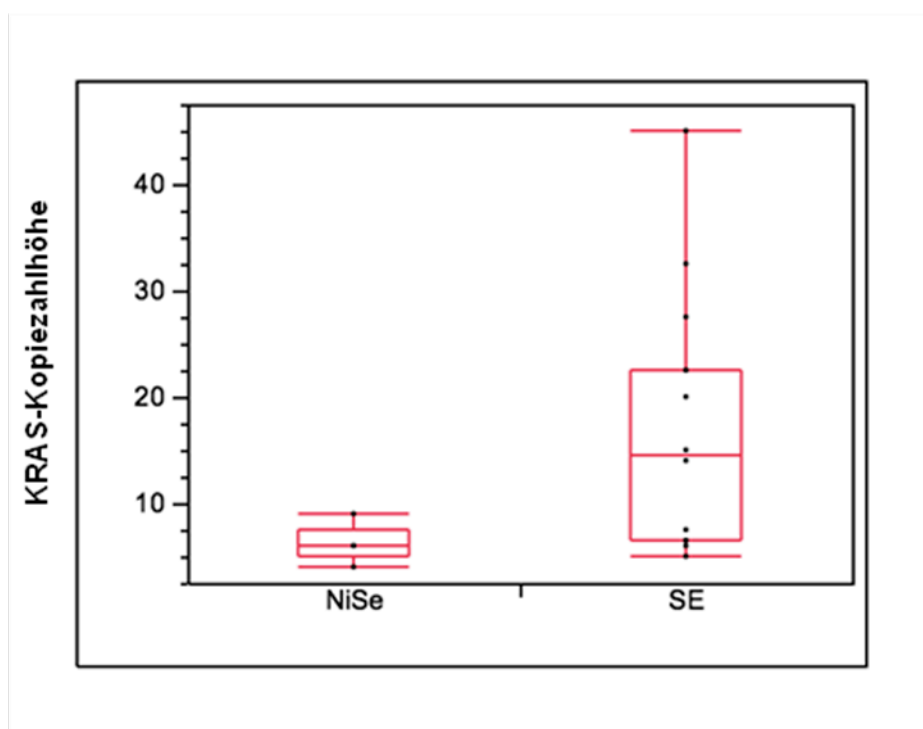


Abb. 2: KRAS-Kopiezahlhöhe in NiSe bzw. SE in Boxplot-Darstellung.

Auch die mittlere Ratio KRAS/Cen12 war in den Seminomen höher (6.9; $n=16$) als in den NiSe (2.9; $n=5$). Allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0.119$, **Abb. 3**).

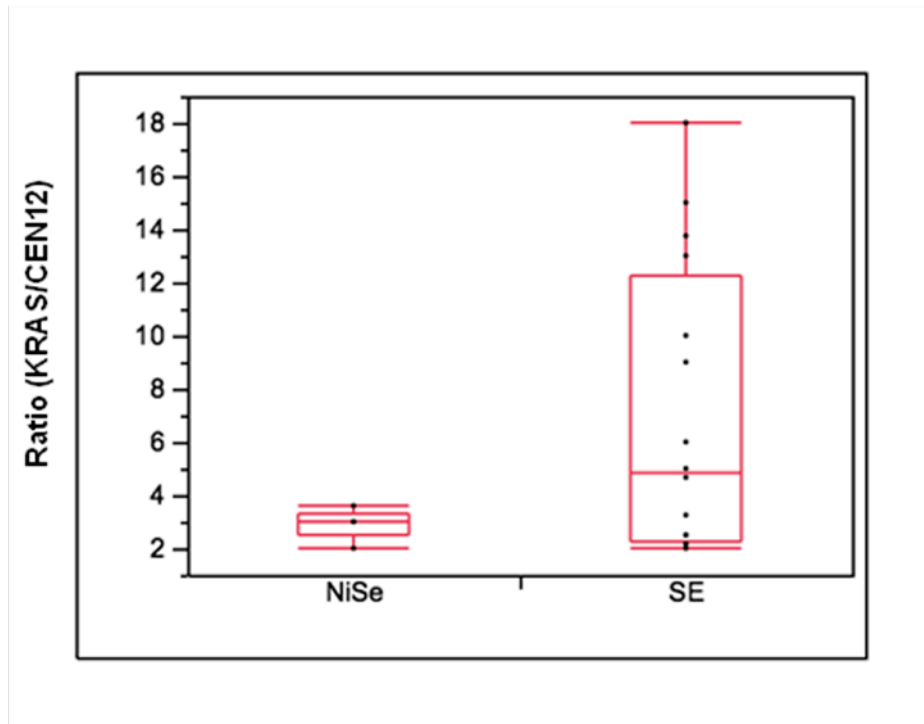


Abb. 3: Ratio KRAS/CEN12 in NiSe bzw. SE in Boxplot-Darstellung.

3.1.3 Amplifikations-Typus

Die unterschiedlichen Kopiezahlen in den Seminomen und Nicht-Seminomen waren mit einer unterschiedlichen Amplikon-Morphologie assoziiert. So zeigten 9/16 KRAS amplifizierte Seminome deutliche Signalcluster (HSR-Typus, siehe **Abb. 4**) mit durchschnittlich 24.6 Genkopien, während 5/5 NiSe eine gleichmäßige Verteilung der Gensignale im Zellkern („Double-minute“-Typus, siehe **Abb. 5**) mit durchschnittlich nur 6.2 KRAS-Kopien aufwiesen.

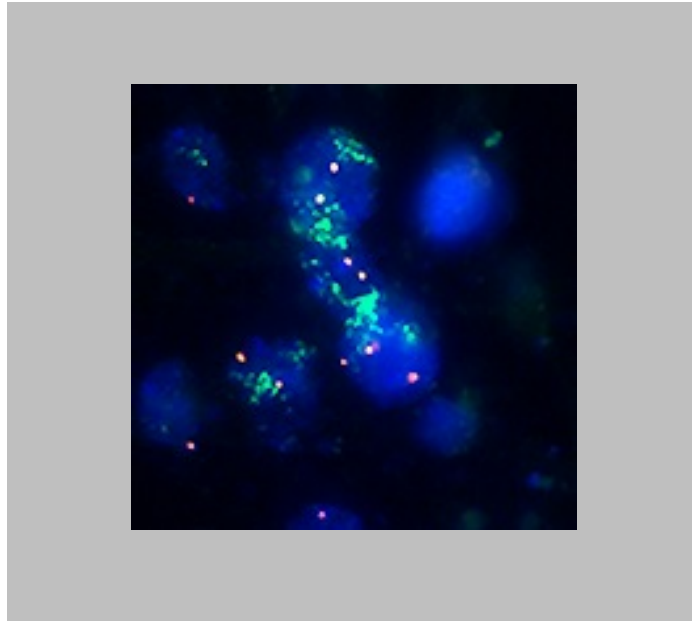


Abb. 4: Darstellung einer KRAS high-level Amplifikation vom HSR-Typus (ca. 50 Gensignale, Gen/Cen12 Ratio:18) in einem Seminom-Fall.

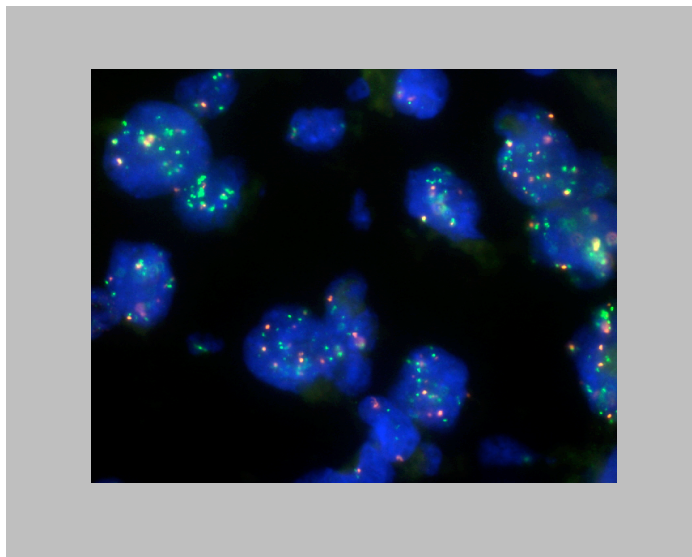


Abb. 5: Darstellung einer KRAS-Amplifikation vom „Double minute“-Typus in einem Nicht-Seminom Fall (ca. 10 Gensignale, Gen/Cen12 Ratio: 3,6).

Die **Abb. 6** zeigt zum Vergleich einen normalen Fall ohne Genkopiezahlveränderungen.

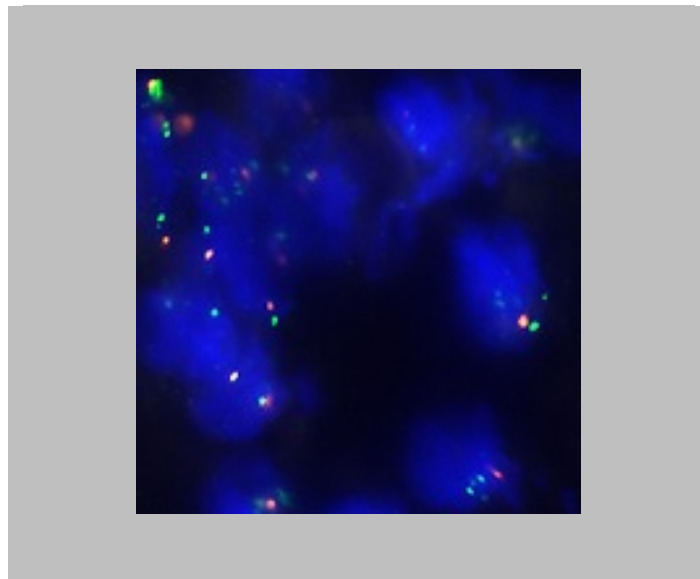


Abb. 6: Darstellung normaler Zellkerne mit zwei Gen- und zwei Zentromer-Signalen.

Der direkte Vergleich der SE und NiSe bezüglich der Amplikon-Morphologie, ergab ein hoch signifikant häufigeres Vorkommen von Signalclustern in den SE (siehe **Abb. 7**, $p=0.009$).

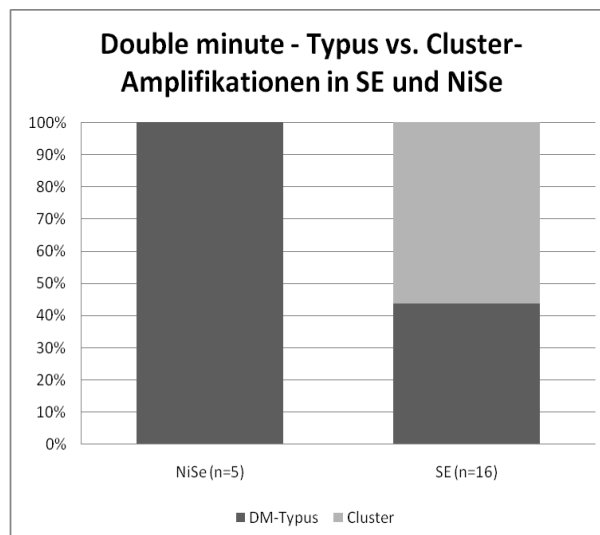


Abb. 7: Verteilung unterschiedlicher Amplikon-Morphologien (DM-Typus, Cluster (HSR-Typus)) in Seminomen (SE) und in Nicht-Seminomen (NiSe) ($p=0.009$).

3.2 Manifestationsalter

Wir haben insgesamt 148 auswertbare SE-, NiSe- und CT-Fälle untersucht, bei denen das Lebensalter bei Diagnosestellung bekannt war. Darunter befanden sich 89 Seminome, 36 NiSe und 23 CT. Es konnte gezeigt werden, dass sich NiSe im Durchschnitt 8 Jahre früher als SE und 4 Jahre früher als CT klinisch manifestieren ($p = <0.0001$, **Tab. 6**).

Tabelle 6: Vergleich des durchschnittlichen Manifestationsalters (MA) in Seminomen (SE), Nicht-Seminomen (NiSe) und Kombinierten Keimzelltumoren (CT)

Typ	N	MA	p-Wert
Alle	148	35.0	
SE	89	37.5	
NiSe	36	29.5	
CT	23	34.3	<0.0001

In 15 (10.1%) von 148 Fällen haben wir eine Amplifikation gefunden und in weiteren 41 (27.7%) Fällen zeigten sich Gains. Je jünger die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung/klinischen Manifestation waren, desto häufiger wurde eine KRAS-Amplifikation beobachtet. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant ($p = 0.038$). Für die einzelnen Tumorentitäten konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse zu dieser Untersuchung sind in der **Tab. 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Durchschnittliches Manifestationsalter (MA) in Seminomen (SE), Nicht-Seminomen (NiSe) und Kombinierten Keimzelltumore (CT) im Vergleich mit der KRAS-Kopiezahllhöhe

Typ	MA Normal	MA Gains (N)	MA Amplifikationen (N)	p-Wert
Alle	36.5 (92)	32.8 (41)	31.9 (15)	0.038
SE	38.8 (57)	35.7 (22)	33.6 (10)	0.127
NiSe	30.4 (22)	28.7 (11)	25.3 (3)	0.562
CT	36.8 (13)	30.4 (8)	33.5 (2)	0.302

3.3 KRAS-Amplifikationen und pT-Kategorie

Wir haben insgesamt 140 auswertbare SE-, NiSe- und CT-Fälle untersucht, denen eine pT-Kategorie (pT1 und pT2 und höher) zugeordnet werden konnte. Darunter befanden sich 85 Seminome, 33 NiSe und 22 CT. In 13 (9.3%) Fällen haben wir eine Amplifikation beobachtet und in 41 (29.8%) Fällen zeigten sich Gains. Die Verteilung der Amplifikationen und Gains auf die Tumorentitäten und pT-Kategorien ist der **Tab. 8** zu entnehmen.

Tabelle 8: Gegenüberstellung von pT-Kategorie und KRAS-Kopiezahlniveau in den untersuchten Tumorentitäten

Typ	pT-Stadium	Gain N	Amplifikation N	p-Wert
Alle Tumoren (SE/NiSe/CT)	pT1 n=106	31	10	0.994
	≥ pT2 n=34	10	3	
SE	pT1 n=62	16	8	0.458
	≥ pT2 n=23	6	1	
NiSe	pT1 n=27	10	1	0.123
	≥ pT2 n=6	1	2	
CT	pT1 n=17	5	1	0.398
	≥ pT2 n=5	3	0	

In dieser vergleichenden Untersuchung zwischen der pT-Kategorie und der KRAS-Kopiezahlhöhe in SE, NiSe und CT konnte kein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden. Es liegt daher mit großer Wahrscheinlichkeit kein Gruppenunterschied vor.

3.4 Sequenzierung

Von den 23 amplifizierten Fällen konnten 13 Tumore sequenziert und auf Mutationen untersucht werden. Dabei wurde speziell auf Codon 12/13 (Exon 2) und Codon 61 (Exon 3) geachtet. Die untersuchte Kohorte setzt sich aus insgesamt 10 Seminomen, 1 Nicht-Seminom und 2 Kombinierten Keimzelltumoren zusammen. In 4 von 10 Seminomen konnten Amplifikationen vom Cluster-Typus beobachtet werden. Die restlichen untersuchten Tumoren zeigten Amplifikationen vom DM-Typus. Alle untersuchten Tumoren erwiesen sich als Wildtypen, es wurden keine KRAS-Mutationen beobachtet.

4 DISKUSSION

Genetische Instabilität, verursacht durch viele Faktoren, wie beispielsweise genetische Prädisposition oder die Exposition mit Kanzerogenen, kann eine Ursache für die Kanzerogenese in unterschiedlichen Gewebetypen sein. Genamplifikationen können durch solch eine Instabilität entstehen (Albertson 2006). Seit der Entdeckung der HER2/neu-Amplifikation in Drüsengewebe der Brust (King *et al.* 1985) haben viele Forschungsarbeiten zeigen können, dass die Her2/neu-Amplifikation ein entscheidender Faktor für die Tumorbildung ist (Ross und Fletcher 1998). Weitere in Tumoren amplifizierte Onkogene sind unter Anderen MYCN, EGFR und KRAS (Schwab 1999). Somit ist sehr wahrscheinlich, dass Genamplifikationen für die Entstehung vieler Tumortypen verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der Amplifikationsstatus von KRAS, welches das vermutliche Zielgen der 12p11-Amplifikation ist, in Keimzelltumoren untersucht. Hierbei standen 131 Seminome (SE), 73 Nicht-Seminome (NiSe) und 23 Kombinierte Keimzelltumoren (CT) zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass KRAS häufig (10.1%, vgl. **Tab. 4**) in den Keimzelltumoren amplifiziert vorliegt, was sich gut mit den Ergebnissen von Roelofs *et al.*, die eine 12p11-Amplifikation in 8% der Keimzelltumoren finden (Roelofs *et al.* 2000), deckt. Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die KRAS-Amplifikationshäufigkeit in den untersuchten Typen der Keimzelltumoren nur geringfügig variiert. Dabei wurde eine Verteilung der Amplifikationen von 12.2% in den SE, 6.8% in den NiSe und 8.7% in den CT (vgl. **Tab. 4**) beobachtet. Zwar war der Unterschied zwischen den Seminomen und Nicht-Seminomen in der vorliegenden Untersuchung nicht statistisch signifikant ($p=0.228$, vgl. **Tab. 5**). Es ist aber zu vermuten, daß dieser Umstand vielleicht lediglich auf die insgesamt geringe Fallzahl amplifizierter Tumoren (insgesamt 21/204) zurückzuführen ist. Ähnliche Ergebnisse kommen auch aus früheren Studien (zusammengefaßt in Eble *et al.* 2004). So sprechen die Ergebnisse einiger Publikationen, die die zellulären Eigenschaften der NiSe untersucht haben, dafür, dass die NiSe eher seltener amplifiziert sind als die SE (Roelofs *et al.* 2000, Zafarana *et al.* 2002, Zafarana *et al.* 2003). Allem Anschein nach sind die NiSe weniger ab-

hängig von hochgradigen Amplifikationen im Sinne eines überlebenssichernden Faktors. Möglicherweise werden in den NiSe andere Mechanismen aktiv, die einen Selektionsvorteil bieten. So lassen sich NiSe *in-vitro* kultivieren, ohne dass Amplifikationen vorhanden sind, während die SE erst durch high-level Amplifikationen diese Fähigkeit erlangen (Zafarana *et al.* 2002). Dies hängt damit zusammen, dass nur die amplifizierten Seminome verminderte Apoptoseraten zeigen (Roelofs *et al.* 2000). Es wird vermutet, dass die NiSe die Expression relevanter 12p Gene unabhängig von der Genkopiezahlhöhe hochregulieren können. So wurden in den NiSe höhere Expressionsraten der im Amplikon lokalisierten Gene beobachtet als in den amplifizierten SE (Zafarana *et al.* 2002, Zafarana *et al.* 2003). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Untersuchung einer größeren Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Amplifikationshäufigkeit in Seminomen und Nicht-Seminomen zeigen wird.

Die FISH-Analyse ergab, dass in den Nicht-Seminomen ausschließlich Amplifikationen (5/5, 100%) des sogenannten „Double-minute“ Typus (vgl. **Abb. 5**) vorlagen, während sich in den Seminomen zu 56% Amplifikationen des HSR-Typus zeigten (vgl. **Abb. 4**). Der Unterschied bezüglich des Amplifikationstypus stellt sich statistisch hoch signifikant dar (vgl. **Abb. 7**; $p = 0.009$). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass zumindest bei einem Teil der SE die Amplifikation durch einen anderen Mechanismus entsteht und vielleicht eine andere Ursache hat. Es gibt allerdings keine Regel, dass bestimmte Gene nur nach dem einen oder dem anderen Typus amplifiziert werden. Die Beobachtung, dass SE häufiger den HSR-Typus zeigen, muss daher nicht bedeuten, dass ein anderes Gen die Amplifikation treibt als bei den NiSe. Möglich ist es, dass in diesen Tumortypen ein unterschiedlicher Mechanismus der genetischen Instabilität oder der DNA-Reparatur vorherrscht, welcher die Entstehung des einen oder anderen Amplifikationstypus bevorzugt. Beispielsweise können brüchige chromosomale Regionen (engl.: fragile sites), Defekte der DNA-Replikation oder Defekte der Telomere, wie beispielsweise der Strukturverlust, die Entstehung der HSR-Amplifikationen begünstigen (Albertson 2006). Besonders Strukturverluste der Telomere und DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB)

sollen im Rahmen des sog. „Breakage-Fusion-Bridge“-Modells die Entstehung der HSR-Amplifikation fördern (McClintock 1942). Dies liegt unter anderem daran, dass die Telomere einen Verlust von biologisch relevanten codierenden DNA-Sequenzen verhindern und das Chromosom strukturell stabilisieren. Mit jedem Zellzyklus kommt es im Zuge der DNA-Replikation zur Verkürzung der Telomere um 40-50bp. Sobald die Telomere kritisch verkürzt sind, kommt es in den somatischen Zellen zu einem Proliferationsstopp. In vielen Tumoren kommt es zur Reaktivierung der Telomerase, was ihnen, da die Telomere verlängert werden, eine gesteigerte Proliferation erlaubt (Albertson 2006). Kommt es in Tumoren zur weiteren Proliferation, ohne Reaktivierung der Telomerase und somit zur weiteren Verkürzung der Telomere, so begünstigt dies die Fusion zweier Chromatiden an den Telomerenden (Londono-Vallejo 2004, Sabatier *et al.* 2005). In einer Studie von Nowak *et al.* konnte gezeigt werden, dass SE erheblich kürzere Telomere als die NiSe zeigen. Die NiSe besitzen lange Telomere ähnlich wie die humanen Spermien mit TRF >23kb (Telomeric restriction fragment), während die Telomerlänge in den SE starken Schwankungen unterliegt. SE mit besonders verkürzten Telomeren zeigen eine TRF <5 kb (Nowak *et al.* 2000). Diese starke Verkürzung der Telomere in den SE könnte dafür sprechen, dass vor allem dieser Subtyp der Keimzelltumoren Amplifikationen vom HSR-Typus entwickelt. Wie oben bereits erwähnt, können auch DNA-DSB die Entstehung der HSR-Amplifikation begünstigen. Die Verwendung von ionisierenden Strahlen ist eine häufig verwendete Therapiestrategie bei der Behandlung von Krebspatienten. Auch in der Therapie der Keimzelltumoren findet die Bestrahlung Anwendung (Looijenga *et al.* 2007). Durch die Bestrahlung der Tumoren entstehen Strangbrüche, die eine (erhöhte) Expression von P53 verursachen, was in Apoptose resultiert (Looijenga *et al.* 2007, di Pietro *et al.* 2005). Das WT (Wildtyp) p53-Protein ist somit ein wichtiger Tumorsuppressor, dessen Funktion darin besteht das Genom vor akkumulierenden DNA-Schäden, zu bewahren und die Weitergabe dieser DNA-Schäden an die Tochterzelle zu verhindern. Jedoch liegt in ca. 50% aller Tumore ein mutiertes p53 vor, was zum Funktionsverlust führt und somit kein Zelltod durch dieses Protein mehr herbeigeführt werden kann (Song und Xu 2007). Trotz der Tatsache, dass in

den TGCT der WT des p53 exprimiert wird, reagieren die SE sensibler auf die Bestrahlung als die NiSe. Das mangelnde Ansprechen der NiSe gegenüber der Bestrahlung liegt daran, dass diese fähig sind, die durch Bestrahlung typischerweise entstandenen DNA-DSB zu reparieren (Oosterhuis und Looijenga 2005) und somit der Apoptose zu entgehen. In Zelllinien (Coquelle *et al.* 1997, Pipiras *et al.* 1998) und Mausmodellen (Difilippantonio *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2002) konnte gezeigt werden, dass DNA-DSB die Entstehung von HSR-Amplifikationen im Rahmen des BFB-Modells initiieren können. Somit ist wahrscheinlich, dass die Existenz von Reparaturmechanismen, welche die DNA-DSB reparieren, die NiSe-Zellen vor der Amplifikationsentstehung schützen. Es ist möglich, dass die SE eine genetische Vulnerabilität gegenüber der Entstehung von HSR-Amplifikation haben, während die NiSe einen gewissen Schutz besitzen. Dieses Ergebnis könnte somit Ausdruck unterschiedlicher genetischer Instabilität sein. Darüber hinaus könnte dies auch eine mögliche Erklärung dafür sein, warum die KRAS-Amplifikation häufiger in den SE als in den NiSe zu finden ist. Ein solcher Unterschied ist im Einklang mit der Theorie, dass die Keimzelltumoren einer gemeinsamen Krebsvorstufe (TIN) abstammen und sich dann unabhängig voneinander weiterentwickeln (McIntyre *et al.* 2008, Skakkebaek 1972). Gleichzeitig besteht ein Widerspruch zu der Annahme, dass die Keimzelltumoren sich linear von der TIN über die SE zu den NiSe entwickeln (Oliver 1987, Oosterhuis *et al.* 1989). Ob diese Begründungen mögliche Erklärungen für das seltenere Vorkommen von HSR-Amplifikationen in den NiSe sind, muss in weiteren Studien untersucht werden. Ein denkbarer Grund dafür, warum bisher keine Studie einen Unterschied bezüglich der Amplifikations-Typen in den Keimzelltumor Subtypen beobachten konnte, ist eine unterschiedliche Definition der untersuchten Amplifikationen. So wurde in den bisher größten Studien die Amplifikation definiert als >15 Genkopien pro Interphasekern (Mostert *et al.* 1998, Roelofs *et al.* 2000, Zafarana *et al.* 2002). Während wir in der vorliegenden Studie die Amplifikation als Ratio >2 definieren. Da die beobachteten DM-Amplifikationen maximal etwa 10 Kopien pro Interphasekern aufweisen, ist die Definition der Amplifikation mit >15 Gensignalen pro Interphasekern zu hoch, um diesen Typ der Amplifikation zu detektieren.

Neben den KRAS-Amplifikationen wurden in vielen Tumortypen (z. B. *Lunge, Kolon*) häufig Mutationen im KRAS-Gen gefunden. Diese betrifft fast immer (> 98%) das Codon 12/13 und Codon 61 (<2%). Diese Mutation führt zu einer permanenten Aktivierung des KRAS-Proteins unabhängig von der übergeordneten Signalkaskade über z. B. EGFR. Weil Amplifikationen und Mutationen beide zu einer Aktivierung führen, erscheint es unwahrscheinlich, dass beide Veränderungen in einem Tumor gleichzeitig auftreten. Um diese Theorie zu prüfen, wurde eine Mutationsanalyse mittels Sequenzierung durchgeführt. Insgesamt 13 amplifizierte Keimzelltumoren ($n=10$ SE; $n=1$ NiSe und $n=2$ CT) standen für die Mutationsanalyse zur Verfügung. In 4 der untersuchten Fälle handelt es sich um HSR-Amplifikationen (SE), während die restlichen Tumoren Amplifikationen des DM-Typus ($n=9$) vorweisen. Wir konnten zeigen, dass Amplifikationen (weder Cluster noch DM-Typus) und aktivierende Mutationen nicht gemeinsam auftreten. Unsere Ergebnisse unterstützen somit die Aussage von McIntyre *et al.*, dass Überexpression, beispielsweise durch eine Genkopiezahlerhöhung, und aktivierende KRAS-Mutationen sich gegenseitig ausschließen (McIntyre *et al.* 2005).

Ein weiterer Befund der Arbeit ist, dass ein frühes klinisches Manifestationsalter häufig gemeinsam mit KRAS-Amplifikationen auftritt. Diese Beobachtung stimmt überein mit den Ergebnissen von Roelofs *et al.* und Zafarana *et al.* (Roelofs *et al.* 2000, Zafarana *et al.* 2002). Je höher die KRAS-Genkopiezahl war, desto jünger war das Alter der Patienten bei der Diagnose (vgl. **Tab. 7**; $p=0.038$). So manifestieren sich Keimzelltumoren ohne KRAS-Zugewinne erst in einem durchschnittlichen Lebensalter von 36.5 Jahren. Patienten, deren Tumoren KRAS-Zugewinne zeigen, erkranken bereits durchschnittlich im Alter von 32.8 Jahren (Gain) bzw. 31.9 Jahren (Amplifikation). Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass bei einer Amplifikation meist nur ein relativ kleiner Abschnitt vermehrt wird. Dies ist die Folge eines Selektionsprozesses, bei dem Zellen aufgrund der erhöhten Kopiezahl und Überexpression eines ganz bestimmten Gens, wie z.B. KRAS, einen Wachstumsvorteil erlangen können. Diese Annahme beruht unter anderem auf Entdeckungen, wie sie von Heidenblad *et al.* gemacht wurden. So identifizierte diese Forschungsgruppe 6 Tumorzelli-

nien mit KRAS-Amplifikation und fand in allen 6 Zelllinien eine erhöhte KRAS-Expression im Vergleich zu Zelllinien mit normaler KRAS Kopiezahl (Heidenbald *et al.* 2002). In zwei unabhängigen Studien von Winter *et al.* und Puciani *et al.* konnte im Zelllinienmodell gezeigt werden, dass schon eine moderate Amplifikation von KRAS zu einer klaren Erhöhung der Tumorgenität führt (Winter und Perucho 1986, Pulciani *et al.* 1985). Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Expressionsanalysen an KRAS amplifizierten und nicht-amplifizierten Tumoren durchgeführt werden. Jedoch konnte von Anderen gezeigt werden, dass eine gesteigerte KRAS-Kopiezahl positiv mit der Höhe der Expression in Keimzelltumoren korreliert (McIntyre *et al.* 2005, Rodriguez *et al.* 2003). Die Zellen, die eine Amplifikation aufweisen, zeigen eine geringere Apoptoserate und ein längeres Überleben (Roelofs *et al.* 2000), was durchaus mit einer gesteigerten KRAS-Expression zusammenhängen kann. Geht man nun davon aus, die Amplifikation sei ein relativ frühes Ereignis in der Tumorgenese, so resultiert eine Senkung der Apoptoserate bei unveränderter Proliferation in schnellerem Tumorstadium und in früherer klinischer Präsentation (Roelofs *et al.* 2000). Angesichts dieser Beobachtungen deutet einiges darauf hin, dass eine gesteigerte KRAS-Kopiezahl maßgeblich mitverantwortlich für die frühere Manifestation der Keimzelltumoren ist. Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass NiSe im Durchschnitt früher klinisch auffällig werden als die CT und die SE. Die NiSe präsentieren sich etwa 4 Jahre früher als die CT und 8 Jahre früher als die SE, dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant (*vgl. Tab 6; p* = <0.0001). Auch andere Forschungsgruppen kommen zu ähnlichen Resultaten (McIntyre *et al.* 2008, Rodriguez *et al.* 2003). Das Ergebnis unterstützt die Theorie, die NiSe seien weniger abhängig von Amplifikationen als die SE im Sinne eines wachstumsfördernden Faktors. Somit ist dieser Sachverhalt dahin gehend theoriekonform, als dass sich die NiSe trotz des selteneren Auftretens der 12p11-Amplifikation (Eble *et al.* 2004) statistisch signifikant ($p = <0.0001$) früher klinisch manifestieren als die SE. Diese hingegen manifestieren sich nur dann ähnlich früh wie die NiSe, wenn sie amplifiziert sind (Zafarana *et al.* 2002). Auch dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, die Keimzelltumoren entstammen einer gemeinsamen Krebsvorstufe und entwickeln sich darauf unabhängig voneinan-

der zu SE, NiSe oder CT (McIntyre *et al.* 2008, Skakkebaek 1972). Eine weitere denkbare Fragestellung wäre, die Vulnerabilität für die Entstehung der KRAS-Amplifikation unterläge einem Vererbungsmechanismus. Diese Fragestellung basiert auf der Beobachtung von Mai *et al.*, die zeigen konnten, dass es in Familien mit Keimzelltumoren, verglichen mit der Allgemeinbevölkerung, nicht nur zur häufigeren, sondern auch zur früheren Erkrankung kommt (Mai *et al.* 2009). Möglicherweise ist die KRAS-Amplifikation auch in diesen Fällen für eine frühere Manifestation verantwortlich. Eine genetische Prädisposition könnte möglicherweise darin begründet sein, dass es zur Vererbung eines Phänotypen kommt, („amplifier phenotype“) (Albertson 2006), der strukturelle genetische Aberrationen wie die Entstehung der KRAS-Amplifikation begünstigt. Die daraus resultierende KRAS-Amplifikation würde durch Steigerung der Onkogenität zur früheren Manifestation führen. Auch wenn diverse Beobachtungen die Annahme unterstützen, dass es eine genetische Grundlage für die Entstehung von Amplifikationen wie den „amplifier phenotype“ gibt, so sind dennoch die verantwortlichen Prozesse, die diesen Typ der genetischen Instabilität begünstigen, noch nicht eindeutig identifiziert worden (Albertson 2006). Ob eine genetische Vulnerabilität für die Entstehung der KRAS-Amplifikation tatsächlich einem Vererbungsmechanismus unterliegt, muss somit noch erforscht werden. Beispielsweise könnten Gewebeproben von Patienten, in deren Familie es zu einer Akkumulation von Keimzelltumoren gekommen ist, auf KRAS-Amplifikationen untersucht werden. Ein häufigeres Auftreten in dieser Patientengruppe wäre ein sicheres Indiz für die familiäre Vererbung einer Vulnerabilität für die Entstehung der Amplifikation. Über dies hinaus wäre die KRAS-Amplifikation auch ein prognostischer Marker für familiär bedingte frühere Erkrankung.

Zusätzlich konnten in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse, zwar ohne statistische Signifikanz, jedoch mit klaren Tendenzen erhoben werden. Dazu gehört, dass die SE durchschnittlich eine tendenziell signifikant höhere KRAS-Kopiezahl zeigen als die NiSe (vgl. **Abb. 2**; SE: 16.6 Kopien, NiSe:6.2 Kopien; $p= 0.069$). Diese Tendenz können wir für die Ratio KRAS/CEN12 nicht beobachten (vgl. **Abb. 3**; $p= 0.119$). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Zusammenhang dadurch begründet werden kann, dass in den SE häufiger Clus-

ter-Amplifikationen beobachtet wurden, welche sich mit einer durchschnittlichen Amplifikationshöhe von 24.6 Genkopien pro Zellkern präsentieren, während sich die Amplifikationen in den NiSe (DM-Typus) nur mit durchschnittlich 6.2 Genkopien pro Zellkern darstellen. Ähnlich wie bereits erwähnt unterstützt diese Beobachtung die Hypothese, dass in diesen Tumortypen möglicherweise genetische Unterschiede vorliegen, die die Entstehung des einen oder anderen Amplifikationstypen unterstützen. Möglicherweise sind die SE empfänglich für sehr hohe Cluster-Amplifikationen, während in den NiSe entweder Mechanismen aktiv sind, die diese unterdrücken können, oder Gegebenheiten vorliegen, die diese überflüssig machen. Darüber hinaus könnte in den SE ein höherer Selektionsdruck bestehen, wodurch Zellen mit hohen Amplifikationen einen Selektionsvorteil erlangen. Dieser Zusammenhang konnte für die Ratio zwar nicht bestätigt werden, vermutlich aber vor allem wegen der geringen Fallzahl.

Die Bedeutung der KRAS-Amplifikation in den Keimzelltumoren resultiert aus diversen Hinweisen wie früherer Manifestation (Roelofs *et al.* 2000, Zafarana *et al.* 2002), verminderter Apoptoserate, gesteigertem *in-vitro* Überleben (Roelofs *et al.* 2000) und verstärkter Proteinexpression (McIntyre *et al.* 2005, Rodriguez *et al.* 2003). Gleiches gilt für die Annahme, dass es durch die Hochregulation der Ras-Signalkaskade zur Förderung des Zellüberlebens sowie invasiver Migration und starker Proliferation kommt (McIntyre *et al.* 2008). Dass bereits in präneoplastischem Gewebe Strukturverluste der Telomere beobachtet wurden, von denen angenommen wird, die Entstehung der Amplifikation zu fördern, unterstützt die Annahme der Amplifikation als frühes Ereignis in der Tumorgenese (Albertson 2006). Dass die Amplifikation nur in den invasiven Tumoren, nicht aber in deren gemeinsamer Vorstufe (TIN) nachgewiesen wurde (Roelofs *et al.* 2000, Summersgill *et al.* 2001), deutet darauf hin, dass eine Überrepräsentation der im Amplikon lokalisierten Gene, darunter auch KRAS, für die Progression von der präinvasiven zur invasiven Tumorform entscheidend ist. Dennoch konnte bisher keine Studie einen Zusammenhang zwischen der Amplifikation und dem Tumorstadium aufzeigen. So fanden Roelofs *et al.* keine Korrelation mit dem klinischen Stadium oder der Größe des Tumors (Roelofs *et al.* 2000). Auch in der vorliegenden bisher größten Studie konnte keine Korrelation zwischen

der KRAS-Amplifikation und der pT-Kategorie bestätigt werden. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Zahl der untersuchten Gewebe ($n= 140$) vielleicht zu gering und damit nicht vollkommen repräsentativ war und zum Anderen daran, dass zu wenig Gewebe hochgradiger pT-Kategorien (pT2-pT4) in die Untersuchung eingegangen sind (vgl. **Tab. 8**). Es ist nicht auszuschliessen, dass in einer größer angelegten Studie mit stärkerer Repräsentation höhergradiger Tumoren (pT2-pT4) eine positive Korrelation zwischen der Amplifikation und dem Tumorstadium gefunden werden könnte, wie es auch in anderen Tumoren der Fall ist (z. B. Mamma-Karzinome und EGFR1-Amplifikation (Moelans *et al.* 2010)). Dabei ist anzumerken, dass sich die Erstellung einer solchen Kohorte als schwierig erweisen könnte. Das liegt daran, dass sich die meisten Patienten aufgrund der guten Diagnostizierbarkeit in frühen klinischen Stadien präsentieren (80%, kS I) (Albers *et al.* 2008).

In dieser Studie erreichen wir nicht die von der Literatur vorbeschriebenen 80% Zugewinne (Gains) auf Chromosomen 12p (Atkin und Baker 1982, Oosterhuis und Looijenga 2005, van Echten *et al.* 1995). Dies liegt wahrscheinlich teilweise an Zählfehlern, z.B. auf Grund ausgeschnittener Zellkerne. Darüber hinaus könnte diese Problematik aber auch darin begründet sein, dass der Genkopiezahl-Status (Ratio) rein mathematisch definiert ist und einen Mittelwert der Zellen innerhalb eines Gewebeslots darstellt. Eine Zelle ist dann „Normal“, wenn die Ratio 1 ist. So erscheint in den Ergebnissen ein Fall mit einer Ratio 2/2 (Gensignale/Zentromersignale) als „Normal“. Ein Fall ist aber beispielsweise auch dann definitionsgemäß Normal, wenn die Ratio 5/5 ausfällt. So lange eindeutige Fallsituationen vorliegen (z. B. Ratio: 2/2, oder Ratio: 8/2) ist dies kein Problem. Das ändert sich, wenn die Signalhöhe beider Sonden nahe zu gleich hoch erscheint. Erschwert wird die Auswertung zusätzlich durch das häufige Vorkommen von Polyploidien in den TGCT. Es zeigen sich in unseren Ergebnissen insgesamt 96 Fälle mit dem Status „Normal“, bei denen mehr als zwei KRAS-Gensignale gezählt wurden. Es ist mit einiger Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass sich unter diesen Fällen auch Fälle befinden, die eigentlich zu den Gains hätten gezählt werden müssen. Rechnen wir diese Fälle zu der

Gruppe mit KRAS-Zugewinnen dazu, wächst die Gruppe mit 12p11-Zugewinnen von 38.8% auf über 80%.

Diese Studie ist ein Beispiel für die Effizienz der Gewebemikroarray-Technologie zur Detektion von seltenen molekularen Veränderungen. Die Analyse von 227 Tumoren mit klassischen Verfahren – Schnitt für Schnitt an jedem Tumor einzeln – wäre im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich gewesen. Die TMA-Technologie erlaubt darüber hinaus ein Maß an Standardisierung der Analyse, das mit herkömmlichen Methoden nicht erreichbar ist. Weil die Menge an Sonde, die in einem Versuchsansatz hergestellt werden kann, begrenzt ist, hätten im klassischen Verfahren nur etwa 15 Objektträger mit derselben FISH-Sonde analysiert werden können. Abgesehen von den enormen Kosten der Reagenzien, die bei der Herstellung von FISH-Sonden für 263 Analysen angefallen wären, muss immer mit einer gewissen Varianz der Versuchsergebnisse je nach Qualität der Sonde gerechnet werden. Für die vorliegende Studie wurde aus mehreren Sondenansätzen die beste ausgewählt, sodass alle Gewebe unter genau denselben, optimalen experimentellen Bedingungen ausgewertet werden konnten. Trotz der Tatsache, dass die hier vorliegende Studie die mit Abstand größte Untersuchung ist, welche sich mit der Prävalenz von Amplifikationen in malignen Keimzelltumoren befasst hat, konnten einige Fragen abschließend noch nicht beantwortet werden. Das zeigt, wie wichtig es ist mit großen Untersuchungsgruppen zu arbeiten. Ein solches Vorgehen wird durch die TMA-Technologie unterstützt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Europa erkranken derzeit ca. 11.7 Männer pro 100.000 Einwohner an Keimzelltumoren des Hodens (TGCT) und die Inzidenz steigt stetig. Trotz der guten Heilbarkeit ist diese Krankheit eine bedeutende Todesursache in der Altersgruppe zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Bei der Entstehung der TGCT scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Zugewinne auf Chromosom 12p sind typische Veränderungen der Keimzelltumoren. Dabei scheint besonders die Amplifikation des Abschnittes 12p11.2-12.1 von Bedeutung zu sein. Durch eine Amplifikation kommt es in der Regel zu einer starken Überexpression der eingeschlossenen Gene. Befinden sich darunter Gene mit onkogenem Potential, kann es zur Tumorbildung kommen. Es wird vermutet, dass die GTPase KRAS ein solches biologisch relevantes Onkogen in der Tumorgenese der TGCT ist. In vergangenen Jahren haben sich diverse Forschungsgruppen unter anderem mit der Prävalenz der 12p11-Amplifikation beschäftigt. Diese Publikationen waren bisher allerdings von relativ geringer Fallzahl.

Das Ziel der Studie ist daher, an einem größeren Patientenkollektiv die Prävalenz, die Assoziation von KRAS-Amplifikationen und den Phänotyp von Keimzelltumoren zu untersuchen. Darüber hinaus soll auch nach möglichen Zusammenhängen zwischen der KRAS-Amplifikation und dem klinischen Manifestationsalter, der pT-Kategorie (TNM-Klassifikation) sowie aktivierenden KRAS-Mutationen gesucht werden.

Untersucht wurden 227 Keimzelltumoren in einem Gewebemikroarrayformat (TMA) mittels Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung mit einer selbst hergestellten FISH-Sonde. Des Weiteren wurden 13 amplifizierte Fälle – Methode nach Sanger – sequenziert und auf aktivierende Mutationen überprüft.

KRAS-Amplifikationen treten in 10.1% ($n=23$) der untersuchten Keimzelltumoren auf. Zwischen den Phänotypen (SE und NiSe) kann hinsichtlich der Amplifikationshäufigkeit kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden ($p=0.228$). SE zeigen im Durchschnitt eine Tendenz zu höheren Amplifikationen

als die NiSe ($p=0.065$). Wobei sich die SE-Amplifikationen zu 56% als HSR-Typus darstellen, während die NiSe zu 100% in Form von „Double-minutes“ amplifiziert sind ($p=0.009$). Die Patienten erkrankten durchschnittlich mit 29.5 Jahren an NiSe und somit ca. 8 Jahre früher als an SE ($p=0.0001$). Die Patienten erkrankten signifikant früher, wenn der Tumor KRAS-Amplifikationen zeigt ($p=0.038$). In keinem der untersuchten amplifizierten Fälle ($n=13$) konnte eine aktivierende KRAS-Mutation nachgewiesen werden. In der vergleichenden Untersuchung zwischen der pT-Kategorie und der KRAS-Kopiezahllhöhe konnte kein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden.

Zusammenfassend unterstützt diese Studie die Hypothese, dass KRAS ein relevantes Gen im 12p11-Amplikon bei Keimzelltumoren ist. KRAS-Amplifikationen sind nicht nur häufig in SE (12,2%), sondern kennzeichnen auch eine Patientengruppe, die besonders früh klinisch auffällig wird. Die Ergebnisse zeigen zudem Unterschiede in der Höhe der KRAS-Genkopiezahl und dem Amplifikations-Typus zwischen SE und NiSe, die auf einen unterschiedlichen Entstehungsmechanismus und Vulnerabilität gegenüber der Entstehung von Amplifikationen hinweisen könnten.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

AFP	Alphafetoprotein
Anti-DIG-AK	Anti Digoxigenin-Antikörper

B

BEP	Bleomycin, Etoposide, Cisplatin
BFB	Breakage-Fusion-Bridge-Modell

C

cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEP	Zentromer-Sonde (centromeric probe)
CGH	Comparative genomic hybridization
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
c-KIT	Stem cell factor receptor
c-MYC	V-Myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog
COT-DNA	competitor DNA
CT	Kombinierte Keimzelltumoren (Combined Tumors)

D

DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DES	Diethylstilbestrol
DM	Double-minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

E

E. coli	Escherichia coli
EGFR	Epidermal growth factor receptor

F

FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FTI	Farnesyl Transferase Inhibitoren

G

GBR2	Growth factor receptor-bound protein 2
------	--

H

HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HCG	humanes Choriongonadotropin
HER2 (v-erb-b2)	Human epidermal growth factor receptor 2
HSR	Homogeneous staining regions

I

IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
IGCNU	Intratubular germ cell neoplasia undifferentiated

K	
kDa	kilo Dalton
KRAS (v-Ki-ras)	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
kS	Klinisches Stadium
L	
NaOH	Natriumhydroxid
LDH	Lactatdehydrogenase
M	
MTA	Multi-Tumorarray
MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
N	
NiSe	Nicht-Seminome
NP40	Octylphenoloxypolyethoxyethanol
P	
PBS	Phosphate buffered saline
R	
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Seminome
SOS	Son of sevenless
Sq/ qRT-PCR	Semi-/quantitative real time polymerase chain reaction
T	
TDS	Testicular dysgenesis syndrome
TRF	Telomeric restriction fragment
TGCT	Testicular germ cell tumors (Hodenkrebs)
TIN	Testicular intraepithelial neoplasia
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumogrösse, Lymphknoten, Fernmetastasen
TWEEN	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	
UICC	Union for International Cancer Control
W	
WHO	World Health Organisation
WT	Wild-Typ
Y	
YAC	Yeast artificial chromosome
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 LITERATUR

- Albers P, Siener R, Krege S, Schmelz HU, Dieckmann KP, Heidenreich A, Kwasny P, Pechoel M, Lehmann J, Kliesch S, Köhrmann KU, Fimmers R, Weissbach L, Loy V, Wittekind C, Hartmann M; German Testicular Cancer Study Group **(2008)** Randomized phase III trial comparing retroperitoneal lymph node dissection with one course of bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I Nonseminomatous testicular germ cell tumors: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 26:2966-72.
- Albertson DG **(2006)** Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics*. 22:447-55.
- Atkin NB, Baker MC **(1982)** Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *The Lancet*. 2:1349.
- Baade P, Carriere P, Fritschi L **(2008)** Trends in testicular germ cell cancer incidence in Australia. *Cancer Causes and Control*. 19:1043-9.
- Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Moller H **(2006)** Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nature Clinical Practice Urology*. 3:532-43.
- Bray F, Richiardi L, Ekblom A, Pukkala E, Cuninkova M, Moller H **(2006)** Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. *International Journal of Cancer*. 118:3099-111.
- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM **(2002)** Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *European Journal of Cancer*. 38:99-166.
- Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M **(1997)** Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*. 89:215-25.
- di Pietro A, Vries EG, Gietema JA, Spierings DC, de Jong S **(2005)** Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37:2437-56.
- Difilippantonio MJ, Petersen S, Chen HT, Johnson R, Jasin M, Kanaar R, Ried T, Nussenzweig A **(2002)** Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *Journal of Experimental Medicine*. 196:469-80.
- Downward **(2003)** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 3:11-22.

- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon **2004**. p. 217 - 278.
- Efstathiou E, Logothetis CJ (**2006**) Review of late complications of treatment and late relapse in testicular cancer. National Comprehensive Cancer Network. 4:1059-70.
- English PB, Goldberg DE, Wolff C, Smith D (**2003**) Parental and birth characteristics in relation to testicular cancer risk among males born between 1960 and 1995 in California (United States). Cancer Causes and Control. 14:815-25.
- Forman D, Oliver RT, Brett AR, Marsh SG, Moses JH, Bodmer JG, Chilvers CE, Pike MC (**1992**) Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. British Journal of Cancer. 65:255-62.
- Garner MJ, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D (**2005**) Epidemiology of testicular cancer: an overview. International Journal of Cancer. 116:331-9.
- Goddard NC, McIntyre A, Summersgill B, Gilbert D, Kitazawa S, Shipley J (**2007**) KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. International Journal of Andrology. 30:337-49.
- Hasle H, Mellempgaard A, Nielsen J, Hansen J (**1995**) Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. British Journal of Cancer. 71:416-20.
- Heidenblad M, Jonson T, Mahlamaeki EH, Gorunova L, Karhu R, Johansson B, Hoeglund M (**2002**) Detailed genomic mapping and expression analyses of 12p amplifications in pancreatic carcinomas reveal a 3.5-Mb target region for amplification. Genes, Chromosomes and Cancer. 34:211-23.
- Hoei-Hansen CE (**2008**) Application of stem cell markers in search for neoplastic germ cells in dysgenetic gonads, extragonadal tumours, and in semen of infertile men. Cancer Treatment Reviews. 34:348-67.
- Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE (**2005**) Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. Annals of Oncology 16:863-8.
- Holmes L Jr, Escalante C, Garrison O, Foldi BX, Ogungbade GO, Essien EJ, Ward D (**2008**) Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? Public Health. 122:862-72.
- Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P (**2003**) Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. The Journal of Urology. 170:5-11.

- Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE, Moller H **(2000)** Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *British Medical Journal*. 321:789-92.
- Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW **(2008)** Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European Journal of Cancer*. 44:1345-89.
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA **(1985)** Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 229:974-6.
- Korn WM, Oide Weghuis DE, Suijkerbuijk RF, Schmidt U, Otto T, du Manoir S, Geurts van Kessel A, Harstrick A, Seeber S, Becher R **(1996)** Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 17:78-87.
- Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Cavallin-Stahl E, Classen J, Clemm C, Cohn-Cedermark G, Culine S, Daugaard G, De Mulder PH, De Santis M, de Wit M, de Wit R, Derigs HG, Dieckmann KP, Dieing A, Droz JP, Fenner M, Fizazi K, Flechon A, Fossa SD, del Muro XG, Gauler T, Geczi L, Gerl A, Germa-Lluch JR, Gillessen S, Hartmann JT, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Horwich A, Huddart R, Jewett M, Joffe J, Jones WG, Kisbenedek L, Klepp O, Kliesch S, Koehrmann KU, Kollmannsberger C, Kuczyk M, Laguna P, Galvis OL, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller R, Nichols C, Nicolai N, Oliver T, Ondrus D, Oosterhof GO, Ares LP, Pizzocaro G, Pont J, Potttek T, Powles T, Rick O, Rosti G, Salvioni R, Scheiderbauer J, Schmelz HU, Schmidberger H, Schmoll HJ, Schrader M, Sedlmayer F, Skakkebaek NE, Sohaib A, Tjulandin S, Warde P, Weinknecht S, Weissbach L, Wittekind C, Winter E, Wood L, von der Maase H **(2008a)** European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I. *European Urology*. 53:478-96.
- Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Cavallin-Stahl E, Classen J, Clemm C, Cohn-Cedermark G, Culine S, Daugaard G, De Mulder PH, De Santis M, de Wit M, de Wit R, Derigs HG, Dieckmann KP, Dieing A, Droz JP, Fenner M, Fizazi K, Flechon A, Fossa SD, del Muro XG, Gauler T, Geczi L, Gerl A, Germa-Lluch JR, Gillessen S, Hartmann JT, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Horwich A, Huddart R, Jewett M, Joffe J, Jones WG, Kisbenedek L, Klepp O, Kliesch S, Koehrmann KU, Kollmannsberger C, Kuczyk M, Laguna P, Galvis OL, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller R, Nichols C, Nicolai N, Oliver T, Ondrus D, Oosterhof GO, Ares LP, Pizzocaro G, Pont J, Potttek T, Powles T, Rick O, Rosti G, Salvioni R, Scheiderbauer J, Schmelz HU, Schmidberger H, Schmoll HJ, Schrader M, Sedlmayer F, Skakkebaek NE, Sohaib A, Tjulandin S, Warde P, Weinknecht S, Weiss-

bach L, Wittekind C, Winter E, Wood L, von der Maase H **(2008b)** European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I. *European Urology*. 53:497-513.

Negri L, Benaglia R, Fiamengo B, Pizzocaro A, Albani E, Levi Setti PE **(2008)** Cancer risk in male factor-infertility. *Placenta*. 29:178-83.

Londono-Vallejo JA **(2004)** Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Letters*. 212:135-44.

Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW **(2007)** Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1120:187-214.

Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH **(2004)** Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *The Lancet Oncology*. 5:363-71.

Mai PL, Chen BE, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Bodrogi I, Geczi L, Olah E, Heimdal K, Fossa SD, Nathanson KL, Korde L, Easton DF, Dudakia D, Huddart R, Stratton MR, Bishop DT, Rapley EA, Greene MH **(2009)** Younger age-at-diagnosis for familial malignant testicular germ cell tumor. *Familial Cancer*. 8:451-6.

Martin OV, Shialis T, Lester JN, Scrimshaw MD, Boobis AR, Voulvoulis N **(2008)** Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 116:149-57.

McClintock B **(1942)** The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 28:458-63.

McIntyre A, Gilbert D, Goddard N, Looijenga L, Shipley J **(2008)** Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 47:547-57.

McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J **(2005)** Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. *Neoplasia*. 7:1047-52.

- Moelans CB, Monsuur HN, de Pinth JH, Radersma RD, de Weger RA, van Diest PJ **(2010)** ESR1 amplification is rare in breast cancer and is associated with high grade and high proliferation: A multiplex ligation-dependent probe amplification study. *Analytical Cellular Pathology*. 33:13-8.
- Moller H, Prener A, Skakkebaek NE **(1996)** Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer, Causes and Control*. 7:264-74.
- Moller H, Skakkebaek NE **(1999)** Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *British Medical Journal*. 318:559-62.
- Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LH **(1998)** Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene*. 16:2617-27.
- Mostert MM, van de Pol M, Olde Weghuis D, Suijkerbuijk RF, Geurts van Kessel A, van Echten J, Oosterhuis JW, Looijenga LH **(1996)** Comparative genomic hybridization of germ cell tumors of the adult testis: confirmation of karyotypic findings and identification of a 12p-amplicon. *Cancer, Genetics and Cytogenetics*. 89:146-52.
- Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaiti-Pellie C, Heidenreich A, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Oosterhuis JW, Gillis AJ, Looijenga LH, Guilford P, Fossa SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Rudd M, Huddart R, Crockford GP, Forman D, Oliver DT, Einhorn L, Weber BL, Kramer J, McMaster M, Greene MH, Pike M, Cortessis V, Chen C, Schwartz SM, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rapley EA **(2005)** The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *The American Journal of Human Genetics*. 77:1034-43.
- Nowak R, Sikora K, Pietas A, Skoneczna I, Chrapusta SJ **(2000)** Germ cell-like telomeric length homeostasis in nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 19:4075-8.
- Oliver RT **(1987)** HLA phenotype and clinicopathological behaviour of germ cell tumours: possible evidence for clonal evolution from seminomas to nonseminomas. *International Journal of Andrology*. 10:85-93.
- Oosterhuis JW, Castedo SM, de Jong B, Cornelisse CJ, Dam A, Sleijfer DT, Schraffordt Koops H **(1989)** Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Laboratory Investigation*. 60:14-21.

- Oosterhuis JW, Looijenga LH **(2005)** Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews Cancer*. 5:210-22.
- Pipiras E, Coquelle A, Bieth A, Debatisse M **(1998)** Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *The EMBO Journal*. 17:325-33.
- Prener A, Engholm G, Jensen OM **(1996)** Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. *Epidemiology*. 7:14-9.
- Pulciani S, Santos E, Long LK, Sorrentino V, Barbacid M **(1985)** ras gene Amplification and malignant transformation. *Molecular and Cellular Biology*. 5:2836-41.
- Pugh, R. C. B **(1976)** Combined tumours. R. C. B. Pugh (ed.), *Pathology of the Testis*, Oxford: Blackwell. 245–258.
- Rao PH, Houldsworth J, Palanisamy N, Murty VV, Reuter VE, Motzer RJ, Bosl GJ, Chaganti RS **(1998)** Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Research*. 58:4260-3.
- Rapley EA, Crockford GP, Teare D, Biggs P, Seal S, Barfoot R, Edwards S, Hamoudi R, Heimdal K, Fossa SD, Tucker K, Donald J, Collins F, Friedlander M, Hogg D, Goss P, Heidenreich A, Ormiston W, Daly PA, Forman D, Oliver TD, Leahy M, Huddart R, Cooper CS, Bodmer JG, Easton DF, Stratton MR, Bishop DT **(2000)** Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nature Genetics*. 24:197-200.
- Richiardi L, Pettersson A, Akre O **(2007)** Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. *International Journal of Andrology*. 30:230-41.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P **(1977)** Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology*. 113:237-51.
- Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. **(2010)** Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends 7. Ausgabe. [Online im Internet] URL: http://www.rki.de/cln_178/nn_203956/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichtstat-tung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf [Stand: 23.10.2010, 15:45].
- Rodriguez E, Houldsworth J, Reuter VE, Meltzer P, Zhang J, Trent JM, Bosl GJ, Chaganti RS **(1993)** Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 8:230-6.

- Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Lu YJ, Huddart R, Cooper CS, Clark J, Looijenga LH, Shipley JM **(2003)** Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*. 22:1880-91.
- Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, Zafarana G, van Oorschot M, van Gurp RJ, Gillis AJ, Stoop H, Beverloo B, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH **(2000)** Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. *American Journal of Pathology*. 157:1155-66.
- Ross JS, Fletcher JA **(1998)** The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist*. 3:237-252.
- Sabatier L, Ricoul M, Pottier G, Murnane JP **(2005)** The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Molecular Cancer Research*. 3:139-50.
- Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF **(1996)** Reviews of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenetics and genes in testicular tumors. *The Journal of Urology*. 155:1531-56.
- Satge D, Sasco AJ, Cure H, Leduc B, Sommelet D, Vekemans MJ **(1997)** An excess of testicular germ cell tumors in Down's syndrome: three case reports and a review of the literature. *Cancer*. 80:929-35.
- Schwab M **(1998)** Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays*. 20:473-9.
- Schwab M **(1999)** Oncogene amplification in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology*. 9:319-25.
- Sharpe RM **(2003)** The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *International Journal of Andrology*. 26:2-15.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE **(1993)** Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet*. 341:1392-5.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE **(2008)** Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertility and Sterility*. 89:e33-8.
- Skakkebaek NE **(1972)** Possible carcinoma-in-situ of the testis. *The Lancet*. 2:516-7.
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J **(1987)** Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types

of germ cell tumours except spermatocytoma. *International Journal of Andrology*. 10:19-28.

Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, Tannapfel A **(2005)** Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *International Journal of Cancer*. 113:329-35.

Song H, Xu Y **(2007)** Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways. *Cell Cycle*. 6:1570-3.

Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN, Robboy SJ, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Kaufman RH, Adam E, Herbst AL, Hatch EE **(2001)** Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *Journal of the National Cancer Institute*. 93:545-51.

Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Meloni AM, Parrington JM, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Sandberg AA, Geurts van Kessel A **(1993)** Overrepresentation of chromosome 12p sequences and karyotypic evolution in i(12p)-negative testicular germ-cell tumors revealed by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 70:85-93.

Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Weghuis DE, Roque L, Forus A, Stellink F, Siepman A, van de Kaa C, Soares J, Geurts van Kessel A **(1994)** Amplification of chromosome subregion 12p11.2-p12.1 in a metastasis of an i(12p)-negative seminoma: relationship to tumor progression? *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 78:145-52.

Summersgill B, Osin P, Lu YJ, Huddart R, Shipley J **(2001)** Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *British Journal of Cancer*. 85:213-20.

Talerman A **(1985)** Germ cell tumours. *Annales de Pathologie*. 5:145-57.

van Echten J, Oosterhuis JW, Looijenga LH, van de Pol M, Wiersema J, te Meerman GJ, Schaffordt Koops H, Sleijfer DT, de Jong B **(1995)** No recurrent structural abnormalities apart from i(12p) in primary germ cell tumors of the adult testis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 14:133-44.

Weir HK, Marrett LD, Kreiger N, Darlington GA, Sugar L **(2000)** Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer. *International Journal of Cancer*. 87:438-43.

Wiechno P, Demkow T, Kubiak K, Sadowska M, Kamińska J **(2007)** The quality of life and hormonal disturbances in testicular cancer survivors in Cisplatin era. *European Urology*. 52:1448-54.

Winter E, Perucho M **(1986)** Oncogene amplification during tumorigenesis of established rat fibroblasts reversibly transformed by activated human ras oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*. 6:2562-70.

- Wu CC, Hsu HY, Liu HP, Chang JW, Chen YT, Hsieh WY, Hsieh JJ, Hsieh MS, Chen YR, Huang SF **(2008)** Reversed mutation rates of KRAS and EGFR genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications. *Cancer*. 113:3199-208.
- Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Olsson PG, Elstrodt F, Stoop H, Millan JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH **(2002)** Coamplification of DAD-R, SOX5, and EKI1 in human testicular seminomas, with specific overexpression of DAD-R, correlates with reduced levels of apoptosis and earlier clinical manifestation. *Cancer Research*. 62:1822-31.
- Zafarana G, Grygalewicz B, Gillis AJ, Vissers LE, van de Vliet W, van Gurp RJ, Stoop H, Debiec-Rychter M, Oosterhuis JW, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Looijenga LH, Veltman JA **(2003)** 12p-amplicon structure analysis in testicular germ cell tumors of adolescents and adults by array CGH. *Oncogene*. 22:7695-701.
- Zhu C, Mills KD, Ferguson DO, Lee C, Manis J, Fleming J, Gao Y, Morton CC, Alt FW **(2002)** Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell*. 109:811-21.

8 DANKSAGUNG

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter und an meinen Betreuer PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, an meine Ansprechpartner Antje Krohn, Frederik Holst, Dr. rer. nat. Pierre Tennstedt sowie den Mitarbeitern des Institutes der Pathologie. Auch möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Sonja sowie meinem Freund Marcel Waschow bedanken die mich aufgebaut, tatkräftig unterstützt und nie den Glauben an mich verloren haben. Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Freundin Maria Kowalski aussprechen, die mir während der gesamten Zeit stets zur Seite stand und mir eine große Hilfe war.

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.



SEBASTIAN PASZKOWIAK