

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Aus dem Institut für Pathologie**

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Heterogenität des Y-Chromosomverlustes  
in Seminomen des Hodens**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:  
Britta Gnauck  
aus Alfeld (Leine)

Hamburg, 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. T. Schlomm

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Fisch

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. DAS HODENKARZINOM.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE .....	5
1.1.2. ÄTIOLOGIE.....	6
1.1.3. PATHOGENESE UND MOLEKULARE PATHOLOGIE .....	7
1.1.4. KLINIK .....	10
1.1.5. DIAGNOSTIK .....	11
1.1.6. MORPHOLOGIE .....	12
1.1.7. TNM-KLASSIFIKATION .....	15
1.1.8. THERAPIE.....	15
<b>1.2. DAS Y-CHROMOSOM.....</b>	<b>18</b>
1.2.1. AUFBAU UND FUNKTION DES Y-CHROMOSOMS .....	18
1.2.2. Y-CHROMOSOMVERLUSTE BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN .....	20
<b>1.3. ZIEL DER DOKTORARBEIT .....</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. DATENBANK UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. TISSUE MICRO ARRAY (TMA) .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. TMA-HERSTELLUNG .....	25
2.2.2. HODEN-TMA .....	28
<b>2.3. IMMUNHISTOCHEMIE (IHC).....</b>	<b>29</b>
2.3.1. IHC-ARBEITSSCHRITTE UND LABORPROTOKOLL .....	30
2.3.2. IHC-AUSWERTUNG .....	33
<b>2.4. FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG (FISH).....</b>	<b>34</b>
2.4.1. FISH-ARBEITSSCHRITTE UND LABORPROTOKOLL .....	34
2.4.2. FISH-AUSWERTUNG .....	37
<b>2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</b>	<b>38</b>
<b>3. RESULTATE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. TECHNISCHE AUSWERTBARKEIT .....</b>	<b>39</b>

<b>3.2. Y-CHROMOSOMVERLUSTE .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. ZUSAMMENHANG MIT PATHOLOGISCH-ANATOMISCHEN PARAMETERN....</b>	<b>44</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>49</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>50</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>57</b>
<b>7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>57</b>
<b>7.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>58</b>
<b>7.3. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>58</b>
<b>8. DANKSAGUNG .....</b>	<b>59</b>
<b>9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>60</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. DAS HODENKARZINOM

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIE

Das Hodenkarzinom ist zwar mit einem Anteil von 1-2 % aller Krebsneuerkrankungen selten im Vergleich zu anderen malignen Tumoren, besitzt aber dennoch eine große Relevanz, weil es der häufigste maligne Tumor bei Männern zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr ist.

Die Inzidenz zeigt auffällige geographische Unterschiede. So werden in Deutschland, Dänemark, Norwegen, der Schweiz und Ungarn mit etwa 8-10 Fällen auf 100.000 die höchsten Inzidenzraten verzeichnet, während diese sich auf dem afrikanischen Kontinent und in Asien mit weniger als 2 Fällen pro 100.000 auf einem wesentlich niedrigeren Niveau bewegen (Woodward 2004).

Insgesamt ist die Inzidenz von Hodenkarzinomen in den letzten Jahrzehnten gestiegen (Coleman et al 1993; Oosterhuis & Looijenga 2005). In der weißen Bevölkerung verdoppelt sich die Inzidenzrate etwa alle 30 Jahre, wobei die Ursachen der Zunahme nicht abschließend geklärt sind (Woodward 2004).

Allen Bevölkerungsgruppen gleich ist die Altersverteilung der Hodenkarzinome. Anders als die meisten anderen Krebsarten kommt der Hodentumor gehäuft bei jungen Männern vor. Die Inzidenz steigt langsam nach Einsetzen der Pubertät, erreicht ihren Gipfel bei Männern am Ende der zweiten bzw. Anfang der dritten Lebensdekade und nimmt danach wieder ab, so dass bei Männern über 60 Jahren nur noch äußerst selten Hodentumoren beobachtet werden (Moller 1993; Oosterhuis & Looijenga 2005).

Grundsätzlich unterscheidet man Keimzelltumoren, die etwa 95 % der Hodentumoren ausmachen, von Stromatumoren. In der Gruppe der Keimzelltumoren haben nicht-seminomatöse Keimzelltumoren ihren Altersgipfel im Schnitt etwa 10 Jahre früher als Seminome (25 Jahre bzw. 35 Jahre), möglicherweise auf Grund eines aggressiveren Wachstums und einer schnelleren hämatogenen Metastasierung (Moller 1993). Bei einem Hodentumor im höheren Alter handelt es sich in den meisten Fällen um ein spermatozytisches Seminom, eine Sonderform des Seminoms mit einem vermutlich anderen Entstehungsmechanismus (Bergner et al 1980; Talerman 1980).

---

Dottersacktumoren und Teratome, beide aus der Gruppe der nicht-seminomatösen Keimzelltumoren, zeigen einen zweiten Altersgipfel im Kindesalter (Brosman 1979; Kaplan et al 1988; Ross et al 2002).

### 1.1.2. ÄTIOLOGIE

Als gesicherte Risikofaktoren für das Auftreten eines Hodentumors gelten der Kryptorchismus und die Gonadendysgenese, inklusive testikulärer Feminisierung und Klinefelter-Syndrom. So zeigen Männer mit einem Kryptorchismus eine drei- bis fünffach erhöhte Inzidenz für das Auftreten eines Hodentumors (Woodward 2004). Dabei ist sowohl der uni- als auch der kontralaterale Hoden betroffen (Moller et al 1996). Ein niedriges Geburtsgewicht sowie eine für das Gestationsalter zu geringe Körpergröße – beides auch mit Kryptorchismus assoziiert (Weidner et al 1999) – weist auf eine intrauterine Wachstumsverzögerung als möglichen Risikofaktor hin (Akre et al 1996; Moller & Skakkebaek 1997).

Für eine genetische Disposition als Risikofaktor sprechen eine familiäre Häufung in einigen Fällen sowie die Unterschiede in der Inzidenz zwischen der weißen und schwarzen Bevölkerung. Allerdings scheint dieser Risikofaktor keine wesentliche Rolle zu spielen, weil nur etwa 1,5-2 % der Keimzelltumoren diese familiäre Häufung aufweisen. Das mögliche „Prädispositionsgen“ wurde auf dem Chromosom Xq27 identifiziert und sorgt für eine Risikosteigerung um das ca. 4-fache für den Vater bzw. für den Sohn und um das ca. 8-fache für den Bruder des Trägers (Czene et al 2002; Leahy et al 1995; Rapley et al 2000). Jedoch kann diesem Gen nicht die alleinige Verantwortung für eine Keimzelltumorentstehung übertragen werden, da es vermutlich eher das Zusammenspiel von genetischen Veränderungen und Umwelteinflüssen zu sein scheint, das den Hodentumor schließlich bedingt. Andere für die Entstehung eines Hodentumors wichtige genetische Veränderungen werden in Kapitel 1.1.3. benannt.

Ein weiterer Risikofaktor stellt die Exposition mit Östrogenen und antiandrogenen Substanzen dar. Ursprünglich wurde angenommen, dass endogene Östrogene verantwortlich sind, inzwischen geht man aber davon aus, dass es eher sogenannte Umweltöstrogene sind, die zur Entstehung eines Hodentumors beitragen können. Dieser Zusammenhang scheint allerdings schwach und darüber hinaus auch von anderen Faktoren abhängig zu sein (Sharpe & Skakkebaek 1993).

### 1.1.3. PATHOGENESE UND MOLEKULARE PATHOLOGIE

Für das Verständnis der Pathogenese ist es zunächst sinnvoll, sich die gängigen Einteilungen der Keimzelltumoren zu verinnerlichen.

In der WHO-Klassifikation von 2004 werden die Hodentumoren nach ihrer histologischen Erscheinung wie folgt eingeteilt:

**Tabelle 1:** Histologische Klassifikation von Hodentumoren (modifiziert nach: Woodward 2004)

<b>Tumoren eines histologischen Typen (reine Formen)</b>
Seminom Seminom mit synzytiotrophoblastischen Zellen
Spermatozytisches Seminom Spermatozytisches Seminom mit Sarkom
Embryonales Karzinom
Dottersacktumor
Trophoblastische Tumoren Chorionkarzinom Trophoblastische Neoplasien (außer Chorionkarzinom) Monophasisches Chorionkarzinom Plazentärer trophoblastischer Tumor
Teratom Dermoidzyste Monodermales Teratom Teratom mit somatischen Malignomen
<b>Tumoren mit mehr als einem histologischen Typen (gemischte Formen)</b>
Gemischtes embryonales Karzinom und Teratom
Gemischtes Teratom und Seminom
Chorionkarzinom und Teratom/ embryonales Karzinom
Andere

Daneben existiert eine Einteilung, die die oben aufgeführten histologischen Subtypen in 5 verschiedene Entitäten gruppiert und dabei auf die Epidemiologie, Histologie, Klinik sowie auf die chromosomale Konstitution der Tumoren Bezug nimmt (Oosterhuis & Looijenga 2005). Zudem werden hier die unterschiedlichen Pathogenesetheorien berücksichtigt. Die Gruppen IV und V beinhalten ausschließlich Keimzelltumoren des weiblichen Geschlechts und werden in der folgenden tabellarischen Übersicht daher nicht aufgeführt.

**Tabelle 2:** Übersicht über Subgruppen der testikulären Keimzelltumoren (aus: Woodward 2004)

Alter des Patienten bei der klinischen Präsentation	Histologie des Tumors	Klinisches Verhalten	Chromosomale Imbalancen
0 - 5 Jahre	Teratom und/ oder Dottersacktumor	benigne maligne	- Verlust von 6q, Zugewinn von 1q, 20q, 22
Jugendliche und Erwachsene (15-45 Jahre)	Seminom Nicht-Seminom	maligne maligne	aneuploid und Verlust von 11, 13, 18, Y, Zugewinn von <b>12p</b> , 7, 8, X
Ältere Erwachsene (über 50 Jahre)	spermatozytisches Seminom	Benigne, kann aber mit einem Sarkom assoziiert sein	Zugewinn von 9

Zunächst soll es um die Pathogenese der Keimzelltumoren der Gruppe II gehen, die – wie obiger Tabelle zu entnehmen ist – sowohl die Seminome als auch die Nicht-Seminome (embryonales Karzinom, Teratom, Dottersacktumor und Chorionkarzinom) beinhaltet. Die anderen beiden Gruppen werden der Vollständigkeit halber nur am Rande erwähnt.

In der gängigen Theorie wird davon ausgegangen, dass sich alle Gruppe-II-Keimzelltumoren aus einem Vorläufer, einem Carcinoma in situ, entwickeln (Skakkebaek 1972). Das Carcinoma in situ des Hodens wird auch intratubuläre Keimzelle Neoplasie (*engl.* intratubular germ cell neoplasia unclassified, ITGCNU) oder auch testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) genannt (Loy & Dieckmann 1990; Mostofi et al 1987). Um Verwirrungen zu vermeiden, werde ich in dieser Arbeit den Terminus „TIN“ verwenden.

Der Zusammenhang zwischen der TIN und dem invasiven Hodentumor ist sehr stark. So sind in dem den Keimzelltumor umgebenden Gewebe nahezu immer TIN-Zellen zu finden (Oosterhuis et al 2003). Zudem ist die Inzidenz für eine TIN gleich dem Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Keimzelltumors (Giwerzman et al 1991), was bedeutet, dass das Carcinoma in situ immer in ein invasives Karzinom übergeht. Bei 50 % der Patienten geschieht das innerhalb von 5 Jahren, bei 70 % innerhalb von 7 Jahren (Giwerzman & Skakkebaek 1993).

In mehreren Studien konnte eine große Ähnlichkeit zwischen TIN-Zellen und primordialen Keimzellen (*engl.* primordial germ cell, PGC) bzw. neoplastischen Gonozyten hinsichtlich des Phänotyps (Rajpert-De Meyts et al 2003), des genetischen Imprintings (van Gurp et al 1994), der Telomeraseaktivität (Albanell et al 1999) sowie der Genexpression (Almstrup et al 2004) gezeigt werden, so dass man davon ausgehen

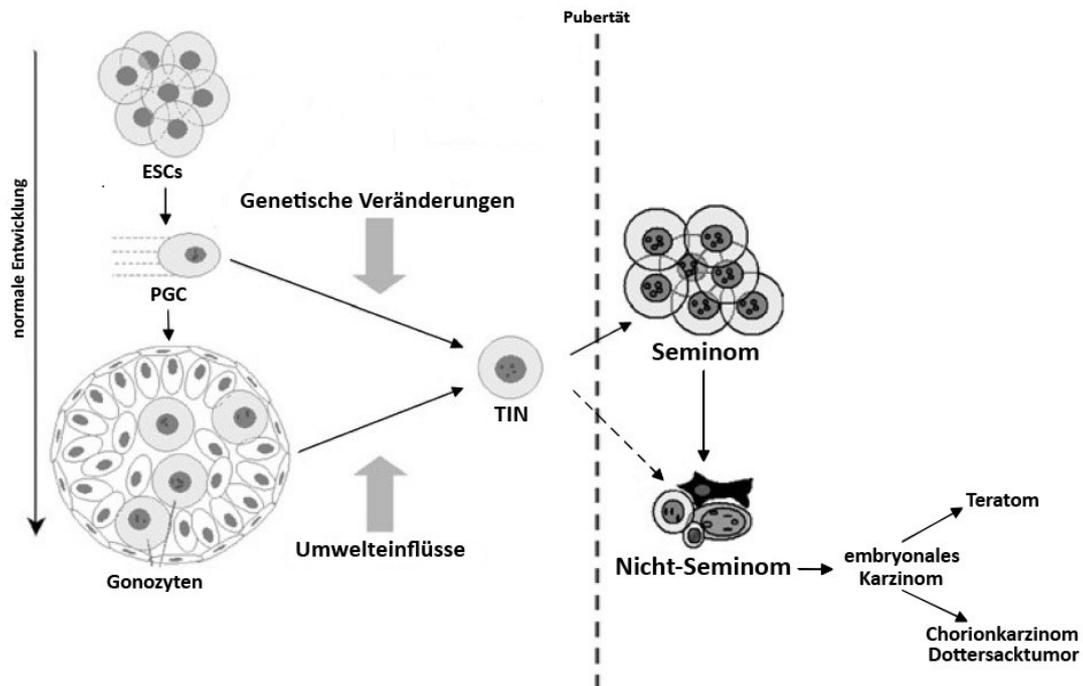
kann, dass die prämaligne TIN-Zelle ihren Ursprung in einer neoplastischen primordialen Keimzelle bzw. einem neoplastischen Gonozyten hat.

Das initiale, zu einer TIN-Zelle führende Ereignis findet bereits in utero statt und ist wahrscheinlich auf eine verzögerte oder blockierte Reifung der primordialen Keimzelle zurückzuführen (Skakkebaek et al 1998). In den betroffenen Keimzellen kann eine Tetraploidie beobachtet werden, die eine genomische Instabilität zur Folge hat und zu genetisch heterogenen Keimzelltumoren führt. So sind Seminome im Durchschnitt hypertriploid, während Nicht-Seminome im Durchschnitt hypotriploid sind – wahrscheinlich auf Grund von stärkeren Verlusten an Chromosomenmaterial während der Krebsprogression (Oosterhuis et al 1989).

Bei Keimzelltumoren konnten diverse Chromosomenverluste und -zugewinne beobachtet werden. Verluste sind vor allem bei Chromosom 4, 5, 11, 13, 18 und dem Y-Chromosom (siehe Kapitel 1.2.2. und 3.2.) und Zugewinne bei Chromosom 7, 8, 12 und X zu verzeichnen (Oosterhuis & Looijenga 2005).

Mit Abstand am wichtigsten ist in diesem Zusammenhang der Zugewinn an Chromosomenmaterial des Chromosom 12 – genauer des kurzen Armes des Chromosom 12 (12p) –, weil es die konstanteste chromosomale Veränderung bei Keimzelltumoren ist. In 80 % der Fälle tritt dieses Chromosom als Isochromosom (i12p) auf, in den übrigen 20 % der Fälle ist der Zugewinn durch eine 12p-Amplifikation bedingt. In beiden Fällen scheint 12p jedenfalls eine wichtige Rolle für die Veränderung einer TIN hin zu einem invasiven Tumor zu spielen (Atkin & Baker 1982; Looijenga et al 2003), wobei das verantwortliche Gen noch nicht ausgemacht werden konnte. Als Kandidatengene kommen beispielsweise KRAS, CCND2, EK11, BCAT1, LDHB, NANOG und STELLAR in Frage (Oosterhuis & Looijenga 2005).

Bei dem aus der TIN entstehenden invasiven Karzinom handelt es sich in den meisten Fällen zunächst um ein Seminom, was durch die morphologische Ähnlichkeit zwischen TIN- und Seminomzellen verdeutlicht wird. Durch Aktivierung der Pluripotenz in Seminom- oder in TIN-Zellen selber entsteht ein embryonales Karzinom, das sich seinerseits weiter differenzieren kann – zum einen auf dem Weg der somatischen Differenzierung zum unreifen bzw. reifen Teratom, zum anderen auf dem Weg der extraembryonalen Differenzierung zum Chorion- bzw. Dottersackkarzinom (Oosterhuis & Looijenga 2005).



**Abbildung 1:** Schema für die Entstehung von Keimzelltumoren (modifiziert nach: Almstrup et al 2006)

Die Pathogenese der beiden anderen Gruppen (I und III) unterscheidet sich von oben beschriebener Entstehung der Gruppe-II-Keimzelltumoren hinsichtlich der Ursprungszelle. Während für die Gruppe I – auf Grund eines nur partiell gelöschten oder sogar noch vorhandenen biparentalen Imprintingmusters (Bussey et al 2001) – eine weniger gereifte primordiale Keimzelle als Ursprungszelle angenommen wird, geht man bei den Gruppe-III-Keimzelltumoren (spermatozytisches Seminom) von einem Spermatozyten als Ursprungszelle aus, was mit der Morphologie und dem paternalen Imprintingmuster gut zu vereinbaren ist (Oosterhuis & Looijenga 2005).

Auch die chromosomalen Veränderungen unterscheiden sich von Gruppe-II-Keimzelltumoren. Teratome aus Gruppe I haben einen normalen Chromosomensatz, Dottersacktumore hingegen sind aneuploid, was auf diverse Chromosomenverluste (1p, 4, 6q) und -zugewinne (1q, 12p13, 20q, 22) zurückzuführen ist (Oosterhuis & Looijenga 2005). Bei den spermatozytischen Seminomen ist der Zugewinn an Chromosom 9 die einzige konstante chromosomale Imbalance (Rosenberg et al 1998).

#### 1.1.4. KLINIK

In der Regel präsentiert sich ein Hodentumor als schmerzlose Schwellung oder Knoten. Nur etwa ein Drittel der Patienten bemerken einen dumpfen Schmerz oder ein Füllegefühl im Skrotum bzw. Abdomen.

Bei etwa 10 % der Patienten führen Metastasen zu den vordergründigen Symptomen wie Rücken- oder Abdominalschmerzen, gastrointestinalen Beschwerden, Meläna, Hämatemesis oder Hämoptysis, Husten und Dyspnoe, Anämie oder zentralnervösen Störungen (Woodward 2004).

### **1.1.5. DIAGNOSTIK**

Als einfachste diagnostische Maßnahme steht neben Anamnese und Inspektion/ Palpation die Sonographie als bildgebendes Verfahren zur Verfügung. Es zeigte sich, dass die Ultraschalluntersuchung eine Sensitivität von fast 100 % für die Entdeckung eines testikulären Tumors aufweist. Neben der Lokalisation des Tumors (intra- bzw. extratestikulär) lässt die Untersuchung eine nähere Charakterisierung der Masse zu (Benson et al 1989; Carroll & Gross 1983; Rifkin et al 1985).

Liegt ein intratestikulärer Tumor vor, der darüber hinaus eine solide Struktur zeigt, so besteht der dringende Verdacht auf ein malignes Geschehen. Sobald der Verdacht besteht, sollte die Masse entfernt und pathologisch untersucht werden, um gegebenenfalls therapeutische Maßnahmen einzuleiten.

Die Tumoren haben auf Grund ihrer großen morphologischen Unterschiede (siehe Kapitel 1.1.6.) kein einheitliches sonographisches Erscheinungsbild. Die Mehrheit der Tumoren zeigt sich echoarm zum umgebenden Parenchym, heterogene oder echoreiche Muster kommen aber auch vor. In einigen Tumoren findet man Kalzifikationen und/oder zystische Strukturen (Benson et al 1989; Carroll & Gross 1983; Grantham et al 1985; Hamm 1997; Rifkin et al 1985; Schwerk et al 1987).

Andere bildgebende Verfahren spielen nur eine untergeordnete Rolle. Ein MRT kann bei der genaueren Charakterisierung eines extratestikulären Tumors, wenn er mit der Sonographie nicht ausreichend dargestellt werden kann, hilfreich sein. Das CT wird nur für das Staging des Tumors benötigt (Cramer et al 1991; Serra et al 1998).

Neben den bildgebenden Verfahren kann die Bestimmung von Serumentumormarkern für die Diagnose und die Verlaufsbeobachtung hilfreich sein.

Alfafetoprotein (AFP), das normalerweise vom Dottersack sowie der fetalen Leber produziert wird, ist in 50-70 % der Keimzelltumoren erhöht, insbesondere bei Patienten mit einem Dottersackkarzinom bzw. einem Teratom. Der zweite Marker ist das humane Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), das im Normalfall von plazentaren Trophoblasten sezerniert wird. Eine  $\beta$ -HCG-Erhöhung findet man in Tumoren mit synzytiotrophoblastischen Zellen, also immer in Choriokarzinomen, aber auch in ca.

10-25 % der Seminome. Insgesamt zeigen etwa 50 % der Keimzelltumoren eine Erhöhung (Klein 1993).

Die oben beschriebenen Tumormarker sind auf Grund der niedrigen Spezifität für die Diagnose nur eingeschränkt nützlich – vor allem weil normale Level nicht unbedingt mit einer Tumorfreiheit gleichzusetzen sind –, allerdings stellen sie hervorragende Verlaufparameter für die Kontrolle der Erkrankung dar.

### **1.1.6. MORPHOLOGIE**

Die Morphologie von Keimzelltumoren ist sehr unterschiedlich und hängt in erster Linie vom histologischen Subtypen ab.

Die Zellen einer TIN sind größer als normale Spermatogonien und weisen typische Merkmale maligner Zellen auf, wie zum Beispiel große, entrundete und hyperchromatische Zellkerne mit großen und irregulären Nukleoli, sowie viele zum Teil abnorme Mitosen. Das Zytoplasma ist klar und sehr glykogenreich (PAS-positiv). Normalerweise befinden sich die TIN-Zellen an der Basalmembran zwischen normalen Spermatogonien und Sertoli-Zellen.

Ein Seminom ist makroskopisch als homogener grauweißer Knoten mit glatter Schnittfläche zu erkennen, der an einigen Stellen oftmals Blutungen und/oder Nekrosen aufweist. Seminomzellen ähneln im Wesentlichen den oben beschriebenen TIN-Zellen. Sie sind groß, rundlich, hyperchromatisch, mit glykogenreichem Zytoplasma und deutlichen Nukleoli im Zellkern. Mehrere Zellen werden durch bindegewebige Septen zu Gruppen formiert. Typischerweise enthält der Tumor viele Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophile Granulozyten und manchmal ist die entzündliche Reaktion so heftig, dass man von einem „ausgebrannten“ Seminom spricht. Desweiteren kann ein Seminom synzytiotrophoblastische Riesenzellen enthalten, die  $\beta$ -HCG produzieren (siehe Kapitel 1.1.5.).

Vom Seminom im klassischen Sinne ist auf Grund seiner Pathogenese das spermatozytische Seminom abzugrenzen (siehe Kapitel 1.1.3.). Morphologisch ist es durch das Auftreten von Zellen variierender Größe und Form charakterisiert. So kommen neben kleinen lymphozytenartigen Zellen, die an Spermatozyten erinnern, mittelgroße und auch mehrkernige Tumorrisenzellen vor. Im tumorumgebenden Gewebe ist keine TIN vorhanden.

Die Zellen eines embryonalen Karzinoms sind lichtmikroskopisch nur schwer von Seminomen zu unterscheiden. Das histologische Bild ist jedoch bunter: Es können

solide Arreale oder aber tubuläre oder papilläre Formationen vorherrschend sein. Die Tumorzellen sind undifferenziert und ähneln der inneren Zellmasse eines frühen Embryos. Sie sind groß, unregelmäßig und enthalten sehr polymorphe Kerne mit prominenten Nucleoli. Die Zellgrenzen sind relativ undeutlich, so dass es häufig aussieht als würden die Zellen verschmelzen oder überlappen. Zudem können Nekrosen, Kalzifikationen, Blutungen und Zysten vorkommen, was bei der makroskopischen Ansicht sichtbar wird.

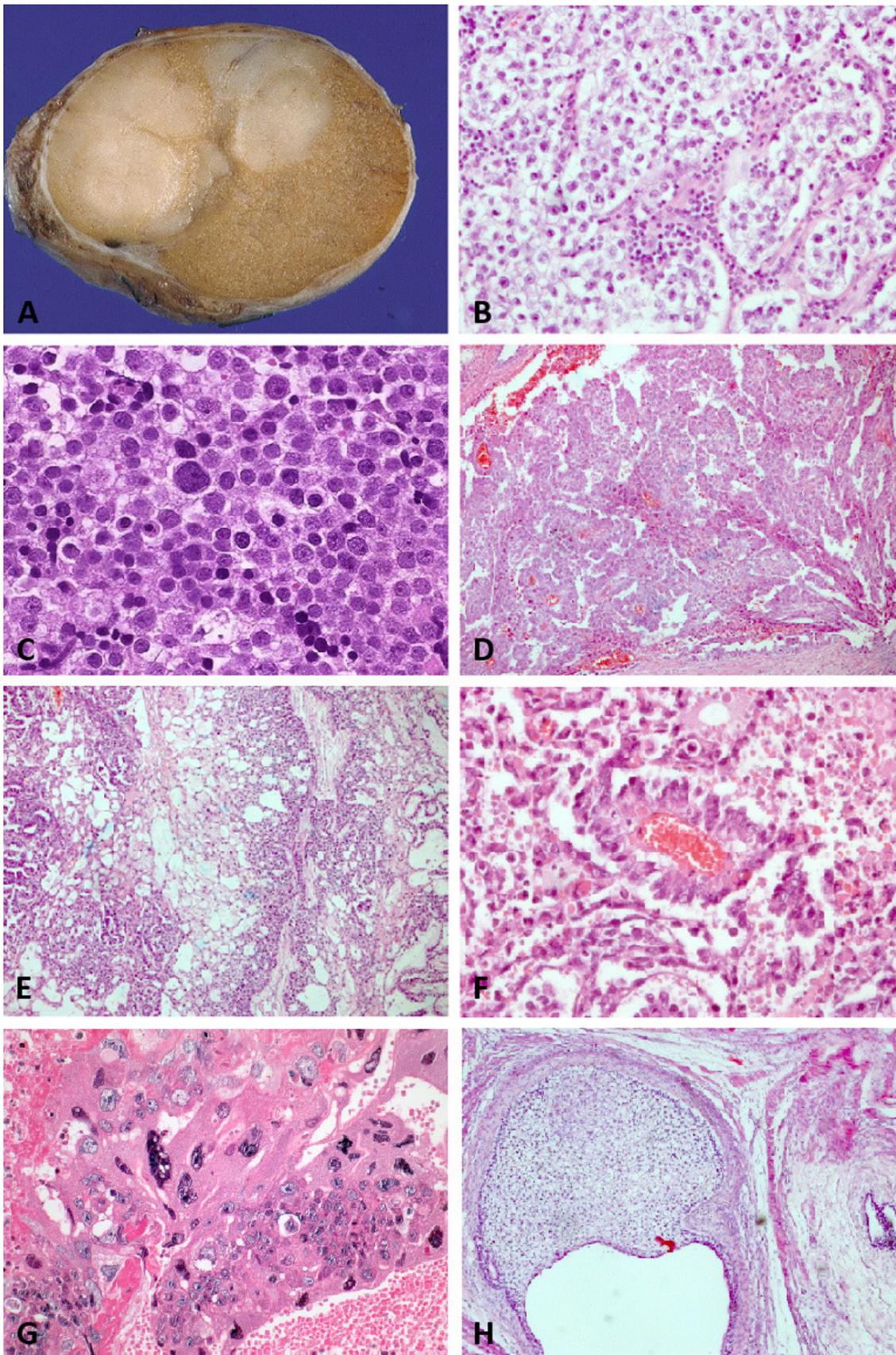
Der Dottersacktumor fällt makroskopisch durch seine oftmals eigenartig schleimige Beschaffenheit auf. Das mikroskopische Bild ist durch eine Zusammensetzung von sehr verschiedenen Wachstumsmustern – von mikro- und makrozytären über solide, glandulär-alveoläre und endodermalsinusartige bis zu drüsig-papillären, myxomatösen und hepatoiden Strukturen – charakterisiert. Typisch für einen Dottersacktumor sind die sogenannten Schiller-Duval-Körperchen, wobei es sich um einen Kranz aus atypischen Epithelien handelt, der sich um ein von lockerem Bindegewebe umgebenes Blutgefäß legt.

Das Chorionkarzinom ist aus synzytiotrophoblastischen und zytotrophoblastischen Zellen aufgebaut. Synzytiotrophoblastische Zellen sind mehrkernig, die Kerne groß, unregelmäßig, und hyperchromatisch. Dementgegen sind zytotrophoblastische Zellen nur einkernig. Typisch für das makroskopische Aussehen sind kleine hämorrhagisch-nekrotische Knoten. Oftmals ist allerdings einzig eine grau-weißliche Tumornarbe zu sehen.

Bei Teratomen kann man die reife und die unreife Form unterscheiden. Insgesamt lässt sich festhalten, dass das Aussehen sehr variabel ist, entsprechend der Gewebeart, die das Teratom enthält. Die Schnittfläche kann unter anderem sowohl schleimige als auch knorpelige oder knochige Strukturen zeigen. Das histologische Bild ist ebenso heterogen. Ein reifes Teratom enthält eine bunte Mischung aus Gewebearten aller drei Keimblätter, bestehend zum Beispiel aus Haut und Hautanhangsgebilden, Darm- und Bronchialschleimhaut, Knorpel, Knochen und Muskulatur. Bei unreifen Teratomen findet man weniger differenziertes Gewebe.

Ein Tumor enthält nicht zwingend nur einen histologischen Subtypen. In ca. 30-50 % der Fälle setzt der Tumor sich aus den verschiedenen oben beschriebenen Subtypen zusammen und wird dann als gemischter Keimzelltumor bezeichnet.

(Riede 2004; Woodward 2004)



**Abbildung 2:** Morphologie der Keimzelltumoren. A – Seminom, makroskopisch; B – Seminom, HE-Färbung; C – spermatozytisches Seminom, HE-Färbung; D – embryonales Karzinom, HE-Färbung; E – Dottersacktumor, HE-Färbung; F – Dottersacktumor mit Schiller-Duval-Körperchen, HE-Färbung; G – Chorionkarzinom, HE-Färbung; H – Teratom, HE-Färbung

### 1.1.7 TNM-KLASSIFIKATION

**Tabelle 3:** TNM-Klassifikation (aus: Wittekind 2010)

pT – Primärtumor	
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor (z.B. histologische Narbe im Hoden)
pTis	<i>Intratubuläre Keimzellneoplasie</i> (Carcinoma in situ)
pT1	Tumor begrenzt auf <i>Hoden und Nebenhoden</i> , <b>keine</b> Blut-/Lymphgefäßinvasion (Tumor kann die Tunica albuginea infiltrieren, nicht aber die Tunica vaginalis)
pT2	Tumor begrenzt auf <i>Hoden und Nebenhoden</i> , <b>mit</b> Blut-/Lymphgefäßinvasion oder Tumor mit Ausdehnung durch die Tunica albuginea mit Befall der <i>Tunica vaginalis</i>
pT3	Tumor infiltriert <i>Samenstrang</i> (mit/ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)
pT4	Tumor infiltriert <i>Skrotum</i> (mit/ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)
pN – Regionale Lymphknoten	
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	≤ 2 cm in größter Ausdehnung und ≤ 5 <i>Lymphknoten</i> befallen
pN2	2-5 cm in größter Ausdehnung oder > 5 <i>Lymphknoten</i> befallen oder <i>extranodale Tumorausbreitung</i>
pN3	> 5 cm in größter Ausdehnung
M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	<i>Fernmetastasen</i>
M1a	<i>Nichtregionäre Lymphknoten- oder Lungenmetastase(n)</i>
M1b	<i>Andere Fernmetastase(n)</i>

### 1.1.8. THERAPIE

Die Therapie von Hodentumoren erfolgt stadienspezifisch und interdisziplinär. Unter strenger Einhaltung der stadienspezifischen Therapieempfehlungen, deren Grundlage die Leitlinien der Europäischen Konsensuskonferenz bilden (Krege et al 2008a; Krege et al 2008b), werden hohe Kurationsraten von ca. 90 % erzielt. Dabei sind die Ziele der Therapieempfehlungen auf der einen Seite gute Heilungsraten und auf der anderen Seite die Minimierung von Langzeitschäden.

Die primäre Therapie eines Hodentumors stellt die inguinale Ablatio testis dar. Bereits der Verdacht auf einen malignen Hodentumor muss durch eine Hodenfreilegung und schnellschnittgesteuerte Diagnostik überprüft werden. Bei einem benignen Tumor wird in jedem Fall eine organerhaltende Operation angestrebt und auch bei einem malignen

Keimzelltumor wird mit einer Enukleationsresektion und anschließender Bestrahlung in erster Linie organschonend bzw. -erhaltend vorgegangen.

Die weitere Therapieplanung richtet sich nun nach dem klinischen Stadium, das nach zwei unterschiedlichen Klassifikationen bestimmt werden kann: nach der Klassifikation der International Germ Cell Cancer Collaboration Group (IGCCCG) und nach der Lugano-Klassifikation.

Die IGCCCG-Klassifikation definiert sich durch die Histologie (Seminom oder Nicht-Seminom), die Serumkonzentration der Tumormarker AFP,  $\beta$ -HCG und LDH sowie die Ausdehnung der Metastasierung. Man unterscheidet drei Prognosegruppen: „good prognosis“, „intermediate prognosis“ und „poor prognosis“ (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Prognosegruppen entsprechend der IGCCCG-Klassifikation (aus: Heidenreich et al 2009)

„Good prognosis“		
Nicht-Seminom	Hoden-/ retroperitonealer Tumor und „good“ Marker und keine nicht pulmonalen viszerale Metastasen	„Good“ Marker: AFP < 1000 ng/ml und HCG < 1000 ng/ml und LDH < 1,5 xn
Seminom	Jede Primärlokalisation und jeder Marker und keine nicht pulmonalen viszerale Metastasen	
„Intermediate prognosis“		
Nicht-Seminom	Hoden-/ retroperitonealer Tumor und „intermediate“ Marker und keine nicht pulmonalen viszerale Metastasen	„Intermediate“ Marker: AFP < 1000-10000 ng/ml oder HCG < 1000-10000 ng/ml oder LDH < 1,5-10 xn
Seminom	Jede Primärlokalisation und jeder Marker und nicht pulmonale viszerale Metastasen	
„Poor prognosis“		
Nicht -Seminom	Primär mediastinaler Tumor oder Hoden-/ retroperitonealer Tumor und nicht pulmonale viszerale Metastasen oder „poor“ Marker	„Poor“ Marker: AFP > 10000 ng/ml oder HCG > 10000 ng/ml oder LDH > 10 xn

Die Lugano-Klassifikation hingegen berücksichtigt nur den Metastasierungsstatus. Im Stadium I sind keine Metastasen vorhanden, im Stadium II kommen retroperitoneale Metastasen vor (IIa: < 2 cm, IIb: 2-5 cm, IIc: > 5 cm) und das Stadium III liegt bei Vorhandensein von Metastasen oberhalb des Zwerchfells vor. In der Praxis wird bei Vorhandensein von lymphogenen oder systemischen Metastasen bzw. ab dem Lugano-Stadium IIc die IGCCCG-Klassifikation verwendet.

Ein Seminom im klinischen Stadium I wird in 80 % der Fälle bereits durch die Orchiektomie alleine geheilt. Adjuvante postoperative Maßnahmen werden risikoadaptiert angeschlossen. Als Risikofaktoren gelten eine Tumorgröße > 4 cm und/oder eine Infiltration des Rete testis. Wenn ein niedriges Rückfallrisiko angenommen werden kann, wird nur eine ausgeprägte Nachbeobachtung empfohlen (Surveillance). Bei hohem Risiko wird eine retroperitoneale Radiotherapie mit 20 Gy oder eine carboplatin-basierte Chemotherapie (ein Zyklus) durchgeführt.

Die Standardtherapie für Seminome im Stadium IIa ist eine Radiotherapie mit 30 Gy, im Stadium IIb mit 36 Gy. Alternativ kann im Stadium IIb eine cisplatin-basierte Chemotherapie (PEB-Schema: Cisplatin, Etoposid, Bleomycin) mit drei bis vier Zyklen vorgenommen werden.

Auch ein Nicht-Seminom des Stadium I wird risikoadaptiert behandelt, wobei als Risikofaktoren hier vaskuläre Invasion, Gesamttumor mit mehr als 50 % embryonalem Karzinom und ein MIB-1-Proliferationsindex von > 70 %<sup>1</sup> gelten. Bei geringem Risiko wird auch hier die Surveillancestrategie angewandt, während bei Vorliegen von Risikofaktoren eine adjuvante Chemotherapie nach dem PEB-Schema mit zwei Zyklen vorgenommen wird.

Nicht-seminomatöse Tumore im Stadium IIa werden bei fehlenden positiven Tumormarkern mit einer nervschonenden retroperitonealen Lymphadenektomie, einer engmaschigen bildgebenden Verlaufskontrolle oder einer primären Chemotherapie nach dem PEB-Schema (drei Zyklen) behandelt. Das Stadium IIb wird immer mit drei bis vier Zyklen Chemotherapie behandelt.

Basierend auf der IGCCCG-Klassifikation werden Patienten mit guter Prognose mit drei Zyklen cisplatin-basierter Chemotherapie behandelt. Bei Patienten mit intermediärer Prognose wird die Zyklenanzahl erhöht (vier Zyklen), was zu einer Langzeitüberlebensrate von ca. 80 % führt. Die Therapie der Wahl für Patienten mit schlechter Prognose umfasst ebenfalls vier Zyklen. Leider zeigt sich hier mit ca. 50 % ein deutlich schlechteres Langzeitüberleben. Andere Therapieprotokolle konnten in klinischen Studien jedoch leider noch keine besseren Ergebnisse vorweisen.

(Heidenreich et al 2009)

---

<sup>1</sup> MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper zur immunhistochemischen Anfärbung des KI-67-Proteins, einem Proliferationsmarker; Index = MIB-1 positive Zellen/ 100 Tumorzellen → je höher der Index ist, desto höher ist die Proliferationsaktivität des Tumorgewebes

## 1.2. DAS Y-CHROMOSOM

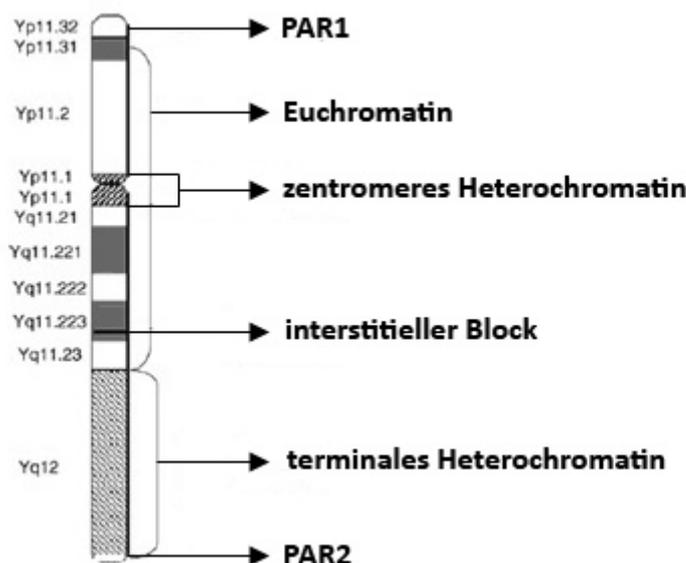
### 1.2.1. AUFBAU UND FUNKTION DES Y-CHROMOSOMS

Das Y-Chromosom ist eines von zwei Gonosomen (Geschlechtschromosomen) und spielt somit eine wichtige Rolle für die Geschlechtsdetermination und die Steuerung der männlichen Fertilität. Bei Vorhandensein des Y-Chromosoms kommt es im Regelfall zur Ausbildung des männlichen Phänotyps.

Mit etwa 60 Millionen Basenpaaren ist das Y-Chromosom eines der kleinsten Chromosomen. Es nimmt nur 2-3 % des haploiden Chromosomensatzes ein und beherbergt nach Angaben der aktuellen Genomannotation des Ensembl Servers nur 41 bekannte proteinkodierende Gene (Ensembl Genome Browser, Stand: April 2011).

Man kann das Y-Chromosom in drei Abschnitte gliedern: die beiden pseudoautosomalen Regionen PAR1 und PAR2 und die y-spezifische Region (YSR).

Die beiden pseudoautosomalen Regionen befinden sich jeweils am distalen Ende des langen (q-) bzw. kurzen (p-)Arms und machen insgesamt nur etwa 5 % des gesamten Y-Chromosoms aus. Während der Meiose kommt es in diesen Regionen zur Verbindung und Rekombination mit homologen Bereichen des anderen Gonosoms, des X-Chromosoms.

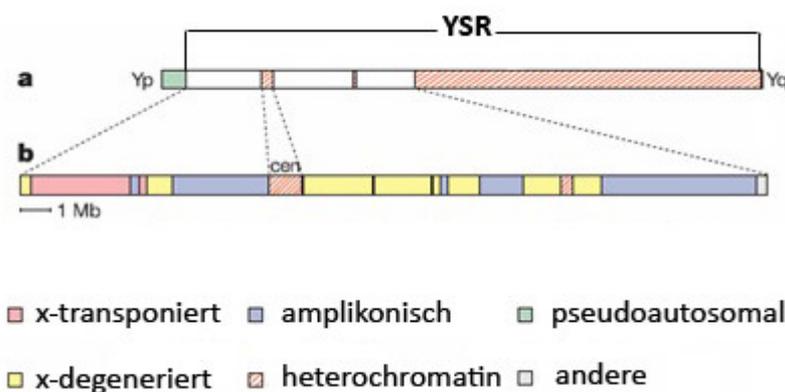


**Abbildung 3:** Y-Chromosom. Lokalisation von PAR1, PAR2, euchromatischer, interstitieller und terminaler heterochromatischer Region (aus: Bianchi et al 2006)

Die restlichen 95 % des Y-Chromosoms nimmt die y-spezifische Region (YSR) ein. Da diese Region während der Meiose nicht an Rekombinationsvorgängen beteiligt ist, wird sie auch als „non-recombinig region“ bzw. „male specific region“ bezeichnet.

Die YSR besteht aus euchromatinen und heterochromatinen Regionen. Die euchromatine Region erstreckt sich über ca. 8 Millionen Basenpaare auf dem proximalen kurzen Arm und über ca. 14,5 Millionen Basenpaare auf dem proximalen langen Arm des Y-Chromosoms. Unterbrochen wird die euchromatine Region nur durch den heterochromatinen Abschnitt um das Zentromer sowie durch einen kleinen, etwa 125 Basenpaare großen, interstitiellen Block. An die distale Grenze der euchromatinen Region schließt sich auf dem langen Arm der massive heterochromatine Block an, der etwa 34,5 Millionen Basenpaare umfasst (siehe Abbildung 3).

In den heterochromatinen Bereichen konnten bis jetzt keine Gene bzw. Transkriptionseinheiten auffindig gemacht werden. Alle 156 gefundenen Transkriptionseinheiten, von denen nur die Hälfte proteinkodierend ist, sind in den euchromatinen Sequenzen lokalisiert. Diese euchromatinen Sequenzen können in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: die x-transponierten, die x-degenerierten und die amplikonischen Gene (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Y-spezifische Region. a – schematische Darstellung des gesamten Y-Chromosoms, b – vergrößerte Darstellung der euchromatinen Sequenzen der YSR (aus: Skaletsky et al 2003)

Die x-transponierten Sequenzen sind in einem evolutionären Prozess vor 3-4 Millionen Jahren entstanden, in dem es zunächst zu einer Transposition eines DNA-Segments des X-Chromosoms auf das Y-Chromosom und einer anschließenden Inversion dieses

Blocks kam. Daher weisen die x-transponierten Gene eine Identität von 99 % zu homologen Bereichen auf dem Xq21-Chromosom, der ursprünglichen Herkunftssequenz, auf, ohne dass es zwischen diesen Bereichen zur Rekombination kommen kann. In den x-transponierten Segmenten ist mit zwei identifizierten Genen die niedrigste Gendichte des euchromatinen Bereichs zu verzeichnen, dafür befinden sich hier aber viele verstreute repetitive Sequenzen.

Auch unter den x-degenerierten Sequenzen gibt es Bereiche, die große Ähnlichkeiten mit Bereichen auf dem X-Chromosom haben. Diese Homologien liegen zwischen 66 und 96 %. 13 von den 27 dort vorkommenden Genen sind sogenannte Pseudogene, das heißt, die Gensequenz ähnelt der homologen Sequenz auf dem X-Chromosom, dient aber nicht als Vorlage für ein funktionelles Protein. Die restlichen 14 Gene liegen als Single-Copy-Gene vor, die zwar homologe Sequenzen auf dem X-Chromosom haben, aber trotzdem nicht für identische, sondern nur für Proteinisoformen kodieren.

Die ampliconischen Gene werden aus langen repetitiven Sequenzen, die zu 99,9 % mit anderen Sequenzen der YSR übereinstimmen, gebildet. Weiterhin kommen Palindrome mit hochsymmetrischen Armen und inverse repetitive Sequenzen vor. Die ampliconischen Sequenzen beinhalten die größte Dichte an Genen. Es konnten 9 proteinkodierende Genfamilien entdeckt werden, die insgesamt rund 60 Transkriptionseinheiten beinhalten. Darüber hinaus kommen weitere 75 nicht-kodierende Transkriptionseinheiten vor.

Bemerkenswert ist, dass die Expression der ampliconischen Gene spezifisch für den Hoden ist, während die Gene aus der x-degenerierten Sequenzgruppe mit einer Ausnahme (SRY) ubiquitär exprimiert werden.

(Bianchi et al 2006; Skaletsky et al 2003)

### **1.2.2. Y-CHROMOSOMVERLUSTE BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN**

Y-Chromosomverluste wurden bei zahlreichen malignen Tumoren beschrieben, wobei die Häufigkeit typischerweise zwischen 10 und 90 % schwankt. Beispielsweise wurden beim Harnblasenkarzinom Y-Chromosomverluste zwischen 20 und 50 % beschrieben (Fadl-Elmula et al 2000; Minner et al 2010; Neuhaus et al 1999; Powell et al 1990; Sauter et al 1997; Sauter et al 1998; Sauter et al 1995; Smeets et al 1987), beim Magenkarzinom zwischen 15 und 80 % (Castedo et al 1992; Espinoza et al 1999; Ochi et al 1986; Saal et al 1993; van Dekken et al 2001; van Dekken et al 1990; Wada et al 1987), beim Ösophaguskarzinom je nach histologischem Subtypen (Barett-Ösophagus,

Adeno- bzw. Plattenepithelkarzinom) zwischen 10 und 90 % (Beuzen et al 2000; Garewal et al 1989; Hunter et al 1993; Krishnadath et al 1995; Menke-Pluymers et al 1996; Rao et al 1993; Rosenblum-Vos et al 1993), beim Lungenkarzinom zwischen 20 und 60 % (Berker-Karauzum et al 1998; Berrieman et al 2004; Center et al 1993), beim Kolonkarzinom zwischen 50 und 80 % (Bottarelli et al 2007; Muleris et al 1990), beim Pankreaskarzinom zwischen 30 und 70 % (Kowalski et al 2007; Missiaglia et al 2002; Wallrapp et al 2001) und beim Nierenzellkarzinom zwischen 30 und 85 % (Kovacs et al 1991; Kovacs et al 1987; van den Berg et al 1993; Wolman et al 1988). Ursache für diese Diskrepanzen dürfte insbesondere die Nachweismethode sein. Bei klassischen zytogenetischen Untersuchungen war typischerweise ein eher höherer Wert von Y-Chromosomverlusten beschrieben worden, was mit einem gehäuften Verlust von Y-Chromosomen unter Kulturbedingungen erklärt werden könnte. FISH-Untersuchungen variieren in ihren Häufigkeitsangaben auch deswegen, weil das Kriterium für einen Y-Chromosomverlust nicht in allen Studien gleich ist.

Interne Untersuchungen am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf haben kürzlich unter Verwendung identischer Bedingungen und Kriterien an Tissue-Micro-Arrays Y-Chromosomverluste für Ösophaguskarzinome in 25,4 %, für Lungenkarzinome in 23,9 %, für Kolonkarzinome in 30,6 %, für Pankreaskarzinome in 11,6 %, für Nierenzellkarzinome in 15,5 % und für Harnblasenkarzinome in 22,2 % der Fälle gefunden. Lediglich beim Prostatakarzinom war ein Y-Chromosomverlust nur in 0,6 % der Fälle nachweisbar (Kilgué 2011). Diese deutlich geringere Häufigkeit von Y-Chromosomverlusten beim Prostatakarzinom führte zur Hypothese, dass Prostataepithelzellen vital von der Funktion von mindestens einem Gen des Y-Chromosoms abhängen.

Für Hodenkarzinome bestehen bisher keine bzw. nur geringe Informationen zu Y-Chromosomverlusten. Lediglich in einer Studie von Peltomaki et al wurde unter Verwendung der quantitativen Southern Hybridisierung bei 3 von 9 Patienten (33 %) mit einem Keimzelltumor eine Imbalance bezüglich der Geschlechtschromosomen, mit einem relativen Mangel von DNA mit y-chromosomalem Ursprung und einer gleichzeitigen relativen Erhöhung von x-chromosomalen DNA-Fragmenten im Vergleich zur normalen DNA desselben Patienten, beobachtet (Peltomaki et al 1989). Diese Beobachtung konnte in einer größeren Studie bei 12 von 31 Patienten (39 %) bestätigt werden (Peltomaki et al 1991). Castedo et al führten in den Jahren 1988 und 1989 zytogenetische Analysen von Keimzelltumoren durch, bei denen

Y-Chromosomverluste auffielen. In der Studie von 1988, in der es in erster Linie um i(12p)-negative Keimzelltumoren ging, fanden Castedo et al interessanterweise bei 3 von 7 Patienten (43 %) Y-Chromosomverluste (Castedo et al 1988). In der folgenden zytogenetischen Analyse von 10 Seminomen trat nur in einem Fall (10 %) ein Y-Chromosomverlust auf (Castedo et al 1989b), während in der Analyse von 14 Nicht-Seminomen bei 2 Patienten (14 %) ein Y-Chromosomverlust beobachtet wurde (Castedo et al 1989a). Muroya et al untersuchten 1999 mittels Southern Hybridisierung und PCR-Technik den y-chromosomalen Genotypen eines Patienten mit einem Gonadoblastom und einem gemischten Keimzelltumor, wobei auffiel, dass das y-chromosomale Material im Gonadoblastom erhalten, aber im Keimzelltumor verloren worden war (Muroya et al 1999). Diverse andere zytogenetische Studien an Hodentumoren sehen das Auftreten von zwei X-Chromosomen und einem Y-Chromosom (XXY) als häufigste Konstitution der Geschlechtschromosomen an (Atkin & Baker 1985; Gibas et al 1986; Oosterhuis et al 1986; Parrington et al 1987). Angesichts der Befunde beim Prostatakarzinom wäre es denkbar, dass auch beim Hodenkarzinom Y-Chromosomverluste besonders selten vorkommen. Dieses wäre dann zu erwarten, wenn die Spermiogenese von mindestens einem Y-assoziierten Gen kritisch abhängen würde.

### **1.3. ZIEL DER DOKTORARBEIT**

Das Ziel der Arbeit ist, zu klären, ob Y-Chromosomverluste bei Seminomen des Hodens vorkommen bzw. wie häufig sie im Falle des Vorkommens sind und ob das Vorhandensein von Y-Chromosomverlusten mit dem pathologisch-anatomischen Stadium des Tumors bzw. mit Gefäß- und/oder Rete-testis-Infiltrationen assoziiert ist. Letztere Analysen haben das Ziel, zu klären, ob Y-Chromosomverluste mit der Progression des Seminoms in Zusammenhang stehen könnten.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. DATENBANK UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die Datenbank, die die Grundlage für diese Arbeit bildet, fasst alle Hodentumore zusammen, die im Zeitraum von 1992 bis Ende 2009 im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht worden sind.

In oben genanntem Zeitraum konnten unter allen Einsendungen 573 Hodenkarzinome identifiziert und in die Datenbank aufgenommen werden. Dabei handelt es sich um:

- 332 Seminome (57,9 %)
- 47 embryonale Karzinome (8,2 %)
- 8 Dottersacktumore (1,4 %)
- ein Chorionkarzinom (0,2 %)
- 23 Teratome (4,0 %)
- 162 gemischte Tumoren (28,3 %)

Weiterhin wurden, sofern in den Befunden vorhanden, folgende Angaben in die Datenbank aufgenommen: Alter des Patienten, TNM-Stadium, maximaler Tumordurchmesser, Anzahl positiver Lymphknoten, Infiltration von Lymphgefäßen, Infiltration von Blutgefäßen, Infiltration der Tunica albuginea, Infiltration des Rete testis, Resttumor, Vorhandensein einer TIN, sowie die wichtigsten immunhistochemischen Parameter.

Für die weiteren Untersuchungen wurden alle Schnitte der Seminomfälle aus den Archiven des Pathologischen Instituts herausgesucht (siehe Abbildung 5), um von verschiedenen Pathologen noch einmal untersucht werden zu können. Dabei lag das Augenmerk auf folgenden Fragestellungen: *Handelt es sich um ein reines Seminom? Wenn nicht, welche Zusatzkomponenten gibt es? Gibt es spermatozytische Anteile? Gibt es eine TIN? Ist das Rete testis infiltriert?* Desweiteren wurden die Tumor- bzw. TIN-Areale eingezeichnet und anschließend von mir vermessen und in die Datenbank integriert. Insgesamt wurden dem Review 198 Fälle unterzogen. Davon sind 192 sicher reine Seminome, bei den anderen 6 Fällen ist es fraglich. In 130 von 192 Fällen ist eine TIN vorhanden, diese ist allerdings nur in 97 Fällen potentiell stanzbar.



**Abbildung 5:** links – Paraffinblöcke mit zugehörigen Schnitten; rechts – Archiv

## 2.2. TISSUE MICRO ARRAY (TMA)

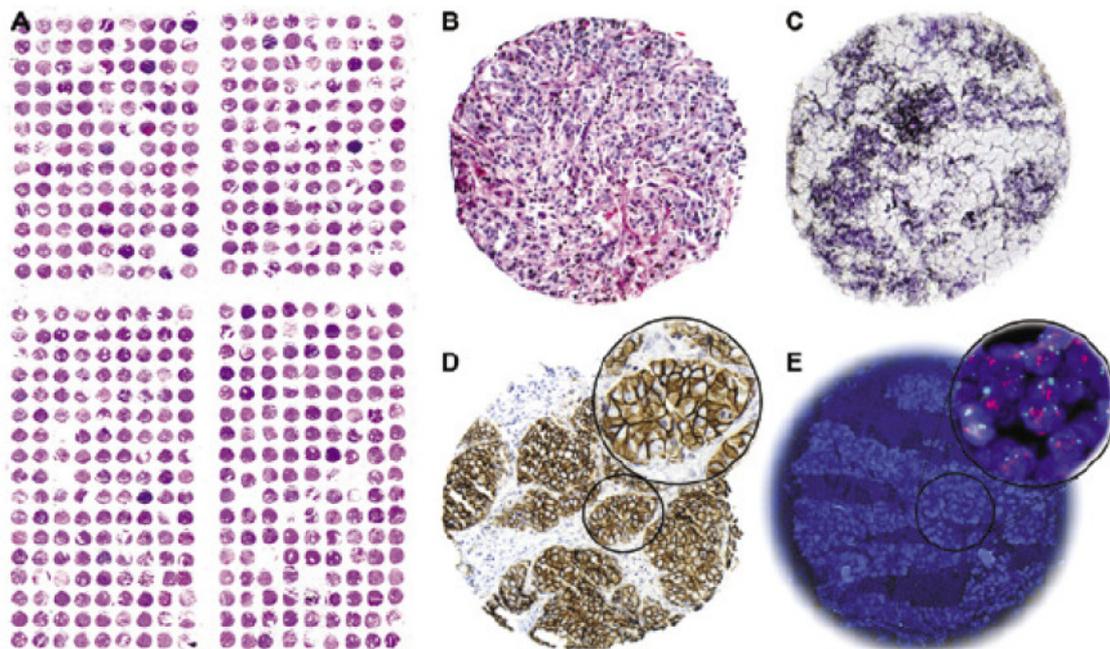
Die Tissue-Micro-Array-Technologie ist mittlerweile ein etabliertes und weltweit akzeptiertes Standardverfahren (Simon & Sauter 2002).

Bis zu 1000 Gewebeproben können in einem TMA gleichzeitig untersucht werden. Dabei ergeben sich die entscheidenden Vorteile der Technologie: die Möglichkeit, schnell und vor allem kostengünstig zu arbeiten. Die neue sogenannte Hochdurchsatzforschung bietet die Möglichkeit viele verschiedene Messgrößen an vielen in einem TMA zusammengefassten Einzelproben zu erheben und damit eine hohe Vergleichbarkeit auf Grund der standardisierten Bedingungen zu erzielen.

Diese Art der Untersuchung spielt zum Beispiel in der Krebsforschung eine große Rolle. Krebserkrankungen beruhen auf vielfältigen genetischen Veränderungen und ein großes Ziel der medizinischen Forschung ist es, diese molekulargenetischen Veränderungen zu entschlüsseln, um gegebenenfalls neue therapeutische Ansätze zu entwickeln und zu etablieren. Hierfür sind in-situ-Methoden wie die Immunhistochemie

(siehe Kapitel 2.3.), RNA-in-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (siehe Kapitel 2.4.) besonders geeignet. Die Anwendung dieser Methoden bei herkömmlichen Großflächenschnitten war weitaus umständlicher, zeit- und kostenintensiver. Zudem ging sie mit einem erheblichen Verbrauch von wertvollem Gewebematerial einher. Mit Hilfe der TMA-Technologie lässt sich die Anzahl der Proben, die man aus einem Paraffinblock gewinnen kann, erheblich steigern, da man dem Block jeweils nur ein Gewebestück von ca. 0,6 mm entnehmen muss. Das Verfahren wird im nächsten Unterkapitel genauer erläutert. Der fertige TMA beinhaltet viele hunderte jeweils ca. 0,6 mm große Gewebesots, die mit oben genannten in-situ-Verfahren simultan untersucht werden können (siehe Abbildung 6).

Die anfänglichen Zweifel bezüglich fehlender repräsentativer Möglichkeiten der nur 0,6 mm großen Gewebesots (Kononen et al 1998) konnten in verschiedenen Studien inzwischen überzeugend widerlegt werden (Bubendorf et al 2001; Torhorst et al 2001).



**Abbildung 6:** TMA und seine Möglichkeiten. A – Ausschnitt aus einem TMA (hier: Gallenblasen-TMA) in HE-Färbung; B – Vergrößerung eines HE-Spots; C – RNA-in-situ-Hybridisierung; D – Immunhistochemie; E – Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (aus: Simon et al 2004)

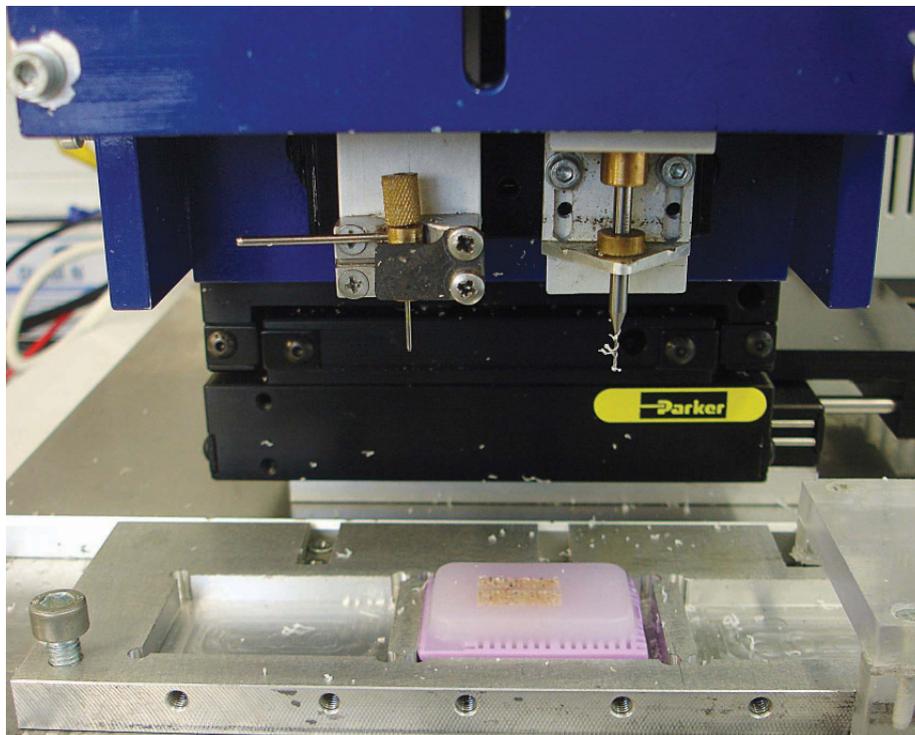
### 2.2.1. TMA-HERSTELLUNG

Eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung eines Tissue Micro Arrays ist die Auswahl von geeignetem Gewebe. In der Datenbank des Pathologischen Instituts wird zunächst potenziell in Frage kommendes Gewebe identifiziert und anschließend werden

die zugehörigen Schnitte aus den Archiven herausgesucht. Diese werden einem Pathologen zur erneuten Begutachtung vorgelegt. Er zeichnet Tumorareale, gegebenenfalls Areale mit Carcinoma in situ und den Normalgewebereich ein. Zum Stanzen müssen die Areale eine gewisse Mindestgröße mitbringen, um für einen TMA geeignet zu sein. Zu den für einen TMA geeigneten Schnitten werden die zugehörigen Paraffinblöcke herausgesucht (siehe auch Kapitel 2.1. und Abbildung 5).

Nach oben beschriebener Vorbereitungsphase, die den Großteil der Arbeit ausmacht, kann die eigentliche Herstellung des Tissue Micro Arrays beginnen.

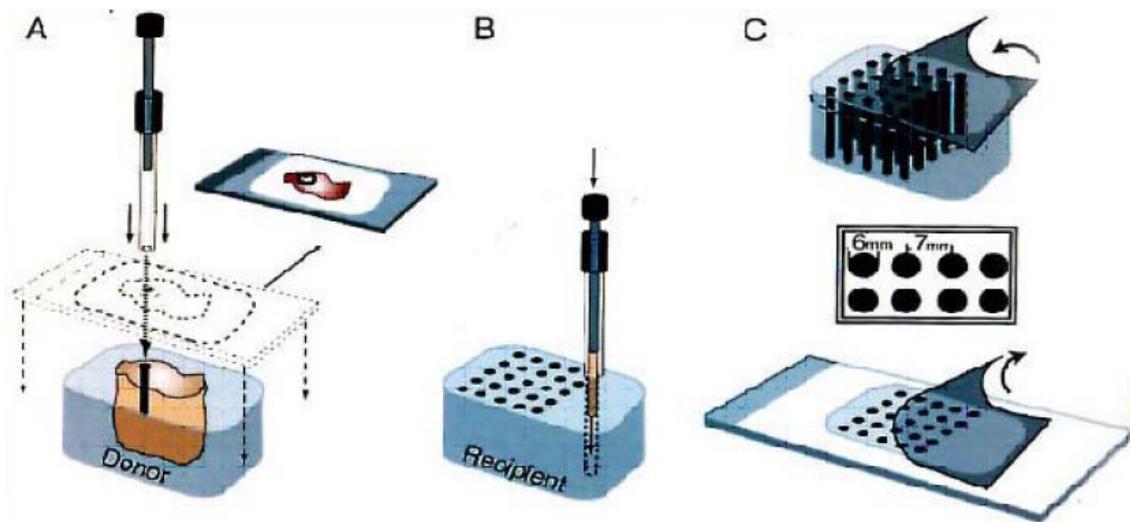
Das wichtigste Gerät für die Herstellung ist das Array-Stanzgerät, das in Abbildung 7 dargestellt ist.



**Abbildung 7:** Array-Stanzgerät

Das Kernstück des Array-Stanzgerätes ist eine Hohl- und eine äußere Hohl- oder Führungsnadel mit einem Innendurchmesser von 0,6 mm, welche zum Stanzen in Paraffinblöcke geeignet ist. In dieser Hohl- und Führungsnadel befindet sich ein genau passender Stahldraht, der die Einbringung der aus den Paraffinblöcken gewonnenen Proben in die Löcher eines Empfängerblocks ermöglicht. Die Löcher wurden zuvor durch einen Bohrer mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm hergestellt. Die Positionen von Bohrer und Nadel lassen sich mit präzisen Schrauben genau einstellen.

Abbildung 8 veranschaulicht die wesentlichen Schritte der TMA-Herstellung im Einzelnen:



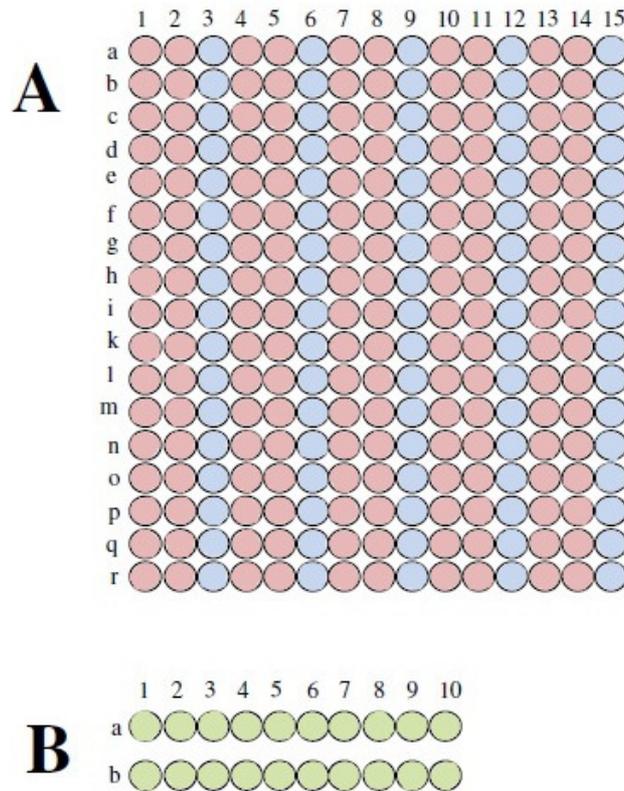
**Abbildung 8:** Tissue Micro Array Technologie. A – ein Gewebezyylinder wird aus dem Spenderblock gestanzt; B – Einfügen des Gewebezyinders in den Empfängerblock; C – Schneiden des TMA-Blocks und Fixieren des Schnittes auf dem Objektträger (aus: Kononen et al 1998)

Aus den ausgewählten Gewebeblöcken (Donor) wird mit Hilfe der Hohlzylinder-Nadel ein Stanzzyylinder entnommen (Abbildung 8 A), der anschließend mit Hilfe des Drahtes in die vorgefertigten Löcher des Empfängerblocks (Rezipient) eingebracht wird (Abbildung 8 B). Diese beiden Schritte werden je nach gewünschter Probenanzahl bis zu tausendmal wiederholt. Dabei ist die Position für jede einzelne Probe im Vorfeld genau festgelegt, indem man dieser in der sogenannten *Punchfile* (deutsch: Stanzdatei) jeweils eine Koordinate zuordnet (siehe Abbildung 9).

Aus dem fertigen TMA-Block können mit Hilfe eines Mikrotoms etwa 4-5  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt werden. Dazu wird auf dem TMA-Block ein Klebetape befestigt (Abbildung 8 C), an dem der Schnitt haften bleibt. Der Schnitt wird auf einen speziellen Klebe-Slide (Objektträger) aufgebracht und unter UV-Licht ausgehärtet. Das Klebetape kann nun entfernt werden (Abbildung 8 C) und der fertige TMA-Objektträger wird bei Raumtemperatur getrocknet.

(Simon et al 2005)

Der entstandene TMA-Objektträger steht nun für verschiedene Untersuchungen zur Verfügung (Kapitel 2.2. und Abbildung 6).



**Abbildung 9:** Punchfile. Rot – Tumorspots; Blau – TIN-Spots; Grün – Referenzgewebesspots

### 2.2.2. HODEN-TMA

Der TMA besteht aus 85 Seminomen mit dazugehörigen testikulären intraepithelialen Neoplasien von 85 verschiedenen Patienten. Die passenden Gewebe wurden aus der zuvor von mir erstellten Datenbank (siehe Kapitel 2.1.) ermittelt.

Aus jedem Tumor wurden je zwei Gewebezyylinder, zwischen denen ein größtmöglicher Abstand lag, entnommen und im TMA verarbeitet. Aus der zugehörigen TIN wurde ein Gewebezyylinder gestanzt. Zusätzlich enthält der TMA Kontrollgewebe/ Normalgewebe (10 x Hoden, 2 x Prostata, 2 x Lymphknoten, 2 x Haut, 2 x Leber, 2 x Niere). Der TMA besteht insgesamt also aus 275 Spots (ergibt sich aus 2 x 85 Tumorspots, 1 x 85 TIN-Spots und 20 x Referenzgewebesspots), vergleiche Abbildung 9.

Für jeden Patienten sind die folgenden klinischen bzw. pathologischen Daten vorhanden: Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, pT-Stadium, durchschnittliche Tumorgöße, Infiltration der Tunica albuginea, des Rete testis und des Samenstranges, sowie die Infiltration der Blut- und Lymphgefäße.

### **2.3. IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)**

Die Immunhistochemie gehört, wie schon erwähnt, zu den in-situ-Verfahren, weil die immunhistochemische Reaktion direkt im Gewebe stattfindet.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird ein spezifischer Antikörper, der an das im Gewebe vorhandene Antigen bindet, sichtbar gemacht. Man kann bestimmen, in welchem Gewebe bzw. sogar in welchem Kompartiment einer Zelle das Zielantigen vorkommt. Beispielsweise werden bei der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die im Nucleus lokalisiert sind, auch nur die Zellkerne angefärbt, während bei membranständigen Proteinen nur Teile der Membran sichtbar gemacht werden.

Die Immunhistochemie hat allerdings auch ihre Grenzen. So wird das Ergebnis in hohem Maße von äußeren Bedingungen wie zum Beispiel der Fixierungsart und -dauer, der Einbettungsmethode, der Vorbehandlungsmethode der Präparate und auch der Bedingungen bei der Antigen-Antikörper-Reaktion wie Temperatur, Konzentration der Reagenzien, Inkubationszeit, pH-Wert und Umgebungsmilieu beeinflusst, wodurch unter Umständen verhindert wird, dass die einzelnen immunhistochemischen Proben miteinander vergleichbar sind. Um Fehler dieser Art zu verhindern, kann man einen TMA benutzen, in dem alle Einzelproben unter denselben standardisierten Bedingungen behandelt werden.

Für diese Studie wurden Antikörper gegen PLAP (plazentare alkalische Phosphatase), SALL4 und c-Kit verwendet, um auf dem TMA-Spot das Vorhandensein neoplastischer Zellen nachzuweisen.

PLAP ist ein Enzym, das physiologischerweise ab der neunten Schwangerschaftswoche von den Synzytiotrophoblasten der fetalen Membran sezerniert wird. Es ist am Transport von IgG-Molekülen aus dem mütterlichen in den fetalen Kreislauf beteiligt, indem es als Membranrezeptor fungiert. In der immunhistologischen Untersuchung ist PLAP ein etablierter Marker für den Nachweis von Keimzelltumoren des Hodens. Auf Grund der höheren Intensität der PLAP-Expression in Seminomen im Vergleich zu weniger differenzierten Keimzelltumoren besteht die Annahme, dass PLAP in primitiven Keimzellen exprimiert wird und ein Marker für die Differenzierung ist (Burke & Mostofi 1988; Dabare et al 1999).

Während PLAP also sowohl in Seminomen und deren Vorstufen als auch zu unterschiedlichen Graden in den Nicht-Seminomen exprimiert wird, ist c-Kit in erster

Linie ein Marker für Seminome und bringt eine hohe Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die Abgrenzung des Seminoms von den anderen Keimzelltumoren mit. C-Kit ist ein transmembraner Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, der den Stammzellofaktor bindet, wozu es zur Autophosphorylierung und Dimerisation des Kit-Rezeptors kommt. Dieser Kit-Signalweg ist für die Proliferation und das Überleben von Keimzellen elementar wichtig. C-Kit ist ein guter immunhistochemischer Parameter für die Unterscheidung zwischen Seminomen und embryonalen Karzinomen. Während das c-Kit-Gen in Seminomen eine membranöse Expression zeigt, ist die immunhistologische Reaktion im embryonalen Karzinom zum einen in einem viel geringeren Anteil der Zellen zu verzeichnen und zum anderen eher im Zytoplasma lokalisiert. Die Herabregulierung der c-Kit-Expression könnte neben anderen genetischen Veränderungen ein entscheidender Schritt für die Progression und Differenzierung von Seminomen zu den aggressiveren Nicht-Seminomen darstellen (Bokemeyer et al 1996; Iczkowski et al 2008; Izquierdo et al 1995; Lau et al 2007).

SALL4, ein relativ neuer diagnostischer Marker für Keimzelltumoren, spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen, ebenso wie die vielleicht bekannteren Marker OCT4, NANOG und SOX-2. In diesem regulatorischen Netzwerk nimmt das Zinkfingerprotein SALL4 Einfluss auf die Transkription von OCT4. Alle Arten von Keimzelltumoren lassen sich immunhistochemisch mit SALL4 nachweisen. Vor allem für die TIN, Seminome, embryonale Karzinome und Dottersacktumoren liegt die Sensitivität bei 100 %, bei gleichzeitig hoher Spezifität von 96-100 % (Cao et al 2009).

Alle drei oben genannten Marker sind also auf Grund der hohen Sensitivität und Spezifität hervorragend dazu geeignet, neoplastische Zellen mit Hilfe der Immunhistochemie auf dem TMA zu identifizieren. Im folgenden Unterkapitel wird das Vorgehen bei der Immunhistochemie genauer erläutert.

### **2.3.1. IHC-ARBEITSSCHRITTE UND LABORPROTOKOLL**

Für die Immunhistochemie wurden 5 µm dicke Schnitte benutzt.

Für den Nachweis der Expression von SALL4, PLAP und c-Kit wurde das indirekte Standard-Immunoperoxidase-Verfahren benutzt.

In diesem indirekten Verfahren wird im ersten Schritt ein spezieller unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper eingesetzt, der mit dem Antigen im Gewebe reagiert. Anschließend wird in einem zweiten Schritt ein Enzym-gekoppelter oder Farbstoff-

markierter Sekundärantikörper hinzugefügt, der sich gegen die Antigene des Primärantikörpers richtet und die Zielstruktur so sichtbar macht.

Die immunhistochemische Analyse wurde mit monoklonalen SALL4-Antikörpern von der Maus (*Klon 6E3, ab57577-100, Abcam, Cambridge, UK*), polyklonalen c-Kit-Antikörpern vom Kaninchen (*A4502, DAKO, Hamburg D*) und monoklonalen PLAP-Antikörpern von der Maus (*M7191, DAKO, Hamburg, D*) durchgeführt. Für beste Färbegergebnisse wurden die Antikörper im Verhältnis 1 : 100 (SALL4), 1 : 400 (c-Kit) bzw. 1 : 25 (PLAP) gemischt.

Die Schnitte werden in Xylol entparaffiniert und in einem Autoklaven bei einem pH-Wert von 7,8 zur Antigendemaskierung vorbehandelt. Anschließend wird der Primärantikörper in angegebener Verdünnung hinzugefügt und im letzten Schritt mit einem Chromogen sichtbar gemacht.

Nachfolgend sind die Arbeitsschritte und das Laborprotokoll für die Immunhistochemie aufgeführt:

- 1) *Paraffinpretreatment und Antigendemaskierung*
- 2) *Antikörper-Inkubation*
- 3) *Visualisierung mit Chromogen*

### ***Schritt 1: Paraffinpretreatment und Antigendemaskierung***

Die Schnitte werden mit Xylol entparaffiniert und zur Antigendemaskierung vorbehandelt.

#### ***Verwendete Materialien:***

- Xylol (*Chem solute 326.2500*)
- Ethanol (100 %, 96 %, 80 %)
- Wasser
- Citratpuffer (zur Vorbehandlung für PLAP-IHC, *ProTaqS 7400300692*)
- Tris-EDTA-Citratpuffer (TEC; zur Vorbehandlung für c-Kit-IHC; Zusammensetzung: 5 g Tris-Base (*Merck 108382*), 10 g EDTA-Titriplex III (*Merck 108418*) und 6,4 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat (*Merck 106430*) mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und als Gebrauchslösung im Verhältnis 1 : 20 mit destilliertem Wasser verdünnen)
- Waschpuffer (*DAKO S3006*)

*Laborprotokoll:*

1. TMA-Schnitte für mindestens 30 min oder über Nacht bei 60 °C im Brutschrank backen
2. TMA-Schnitte 3 × 5 min in Xylol entparaffinieren
3. TMA-Schnitte 2 × 2 min in Ethanol (100 %) stellen
4. TMA-Schnitte 2 × 2 min in Ethanol (96 %) stellen
5. TMA-Schnitte 2 × 2 min in Ethanol (80 %) stellen
6. TMA-Schnitte in Leitungswasser spülen
7. *Vorbehandlung:*
  - a. *PLAP:* TMA-Schnitte 20 min bei einem pH-Wert von 6 mit Citratpuffer im Dampfgarer (Braun Multigourmet) inkubieren
  - b. *c-Kit:* TMA-Schnitte 20 min bei einem pH-Wert von 7,8 mit TEC (selbst angesetzt (siehe oben)) im Dampfgarer (Braun Multigourmet) inkubieren
  - c. *SALL4:* Schritte 1-9 entfallen für die SALL4-IHC, da diese Schritte im vollautomatischen Färbeautomat Bond-maX stattfinden (Vorbehandlung findet im Bond-maX mit Bond-Puffer für 30 min bei einem pH-Wert von 9 statt)
8. TMA-Schnitte 20 min abkühlen lassen
9. TMA-Schnitte mit Waschpuffer spülen

***Schritt 2: Antikörper-Inkubation***

Im zweiten Schritt werden die TMA-Schnitte mit den verdünnten Antikörpern im Färbeautomat (Dako-Autostainer bzw. Bond-maX) inkubiert.

*Verwendete Materialien:*

- Peroxidase-Blocking-Solution (*DAKO S2023*)
- PLAP-Antikörper (*DAKO M7191*)
- c-Kit-Antikörper (*DAKO A4502*)
- SALL4-Antikörper (*Abcam ab57577-100*)
- Verdünnungsmedium (*DAKO S2022*)

*Laborprotokoll:*

1. TMA-Schnitte für 5 min mit Peroxidase-Blocking-Solution zum Block der endogenen Peroxidase inkubieren

2. Antikörper entsprechend ihrer Packungsbeilage mit dem Verdünnungsmedium verdünnen
  - a. *PLAP* – 1 : 25
  - b. *c-Kit* – 1 : 400
  - c. *SALL4* – 1 : 100
3. TMA-Schnitte werden
  - a. *PLAP*: im DAKO-Autostainer mit entsprechendem Antikörper für 10-25 min inkubiert
  - b. *c-Kit*: im DAKO-Autostainer mit entsprechendem Antikörper für 10-25 min inkubiert
  - c. *SALL4*: im Bond-maX-Färbeautomat mit entsprechendem Antikörper inkubiert

### ***Schritt 3: Visualisierung mit Chromogen***

Zur Visualisierung wurde eine Diaminobenzidin (DAB) und Chromogen enthaltende Substrat-Arbeitslösung verwendet, die am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens eine Braunfärbung verursacht. Hier sind die Arbeitsschritte für den Dako-Autostainer aufgezeichnet. Für den Bond-maX entfällt eine detaillierte Beschreibung, da die Vorgänge bei gleichem Prinzip vollautomatisch durchgeführt werden.

#### *Verwendete Materialien:*

- Substrat-Arbeitslösung (*Dako Detection System K5007*, Mischung aus 20 µl *Dako DAB+Chromogen-Lösung K5007* und 1 ml *Dako Substrate Buffer*)
- Hematoxylin (*DAKO S2020*)
- destilliertes Wasser

#### *Laborprotokoll:*

1. TMA-Schnitte 2 × 3 min mit Substrat-Arbeitslösung inkubieren
2. Hematoxylin im Verhältnis 1 : 5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnen und TMA-Schnitte zur Gegenfärbung (nukleäre Blaufärbung) 1-2 min inkubieren

### **2.3.2. IHC-AUSWERTUNG**

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte getrennt für jeden der drei Antikörper. Es wurden zum einen die Farbintensität in vier Stufen (0, 1+, 2+, 3+) und zum anderen der Anteil der positiven (gefärbten) Zellen abgeschätzt (0-100 %).

Aus den beiden erhobenen Informationen kann eine Einteilung in folgende Kategorien vorgenommen werden:

- negativ: keine Färbung erkennbar (Intensität 0, Anteil 0 %)
- schwach positiv: Intensität 1+ in  $\leq 70$  % der Tumorzellen oder  
Intensität 2+ in  $\leq 30$  % der Tumorzellen
- moderat positiv: Intensität 1+ in  $> 70$  % der Tumorzellen oder  
Intensität 2+ in  $> 30$  % aber  $\leq 70$  % der Tumorzellen oder  
Intensität 3+ in  $\leq 30$  % der Tumorzellen
- stark positiv: Intensität 2+ in  $> 70$  % der Tumorzellen oder  
Intensität 3+ in  $> 30$  % der Tumorzellen

In der vorliegenden Studie wurde allerdings auf eine quantitative Auswertung verzichtet, da der alleinige Zweck der Immunhistochemie darin lag, das Vorliegen von Seminomzellen zu belegen. Alle drei Antikörper gelten als spezifisch für neoplastische Keimzellen.

## **2.4. FLUORESZENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG (FISH)**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, mit der kleinste strukturelle Chromosomveränderungen und Genabnormalitäten detektiert werden können, was insbesondere in der Tumordiagnostik und Krebsforschung wegweisende neue Erkenntnisse geliefert hat. Dabei ist die FISH früheren Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel der Karyotypisierung oder auch dem Chromosomenbanding, weit voraus.

Das Verfahren basiert auf einsträngigen fluoreszenz-markierten DNA-Sonden, die sich an eine komplementäre Zielsequenz anlagern. Diese Hybridisierung kann mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Man bezeichnet die Methode als *in situ*-Verfahren, weil die Hybridisierung direkt im Präparat nachweisbar ist.

Die Methode wird nachfolgend im Einzelnen beschrieben.

### **2.4.1. FISH-ARBEITSSCHRITTE UND LABORPROTOKOLL**

Für die FISH-Analyse wurden 4  $\mu\text{m}$  dicke TMA-Schnitte verwendet. Diese wurden entparaffiniert und gemäß des Protokolls des Paraffin Pretreatment Reagent Kit (*Abbott Laboratories, USA*) proteolytisch vorbehandelt. Zur Hybridisierung wurde die

kommerziell erhältliche *AneuVysion Vysis CEP 18/X/Y*-Sondenmischung (*Abbott Laboratories, USA*) benutzt. Diese Sondenmischung färbt die D18Z1-, DXZ1- und DYZ3-Regionen der Chromosomen 18, X und Y spezifisch an, was anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Dabei wird das X-Chromosom im Grün-Filter sichtbar, das Y-Chromosom im Orange-Filter und das Chromosom 18 im Aquablau-Filter.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte sowie das Laborprotokoll zur Durchführung der FISH dargestellt. Diese umfassen:

- 1) *Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte*
- 2) *Hybridisierung*
- 3) *Posthybridisierungs-Waschschritte*
- 4) *Detektion der Signale*

### ***Schritt 1: Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung***

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

#### *Verwendete Materialien:*

- destilliertes Wasser
- Ethanol (70 %, 80 %, 96 %)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (Vysis)
- Xylol

#### *Laborprotokoll:*

1. TMA-Schnitte zur Vorbehandlung 3 × 10 min in Xylol-Bad tauchen
2. TMA-Schnitte 2 × 5 min in Ethanol (96 %) entparaffinieren
3. TMA-Schnitte 3 min auf Heizplatte (48 °C) lufttrocknen
4. TMA-Schnitte 15 min in Pretreatment-Reagent bei 80 °C im Wasserbad enzymatisch vorbehandeln
5. TMA-Schnitte kurz in dH<sub>2</sub>O waschen
6. TMA-Schnitte 45 min in Proteaselösung bei 37 °C andauern (kann auf 150 bis maximal 300 min verlängert werden)
7. TMA-Schnitte 2 min in Ethanol (70 %) stellen
8. TMA-Schnitte 2 min in Ethanol (80 %) stellen

9. TMA-Schnitte 2 min in Ethanol (96 %) stellen
10. TMA-Schnitte 3 min auf Heizplatte (48 °C) lufttrocknen

### **Schritt 2: Hybridisierung**

Die Hybridisierung wurde mit der kommerziellen *AneuVysion Vysis CEP 18/X/Y*-Sonde (Abbott Laboratories, USA) durchgeführt.

Die Sonde wird auf die TMA-Schnitte gegeben, bei 72 °C für 5 Minuten denaturiert und über Nacht bei 37 °C hybridisiert. Sowohl für die Denaturierung, als auch für die Hybridisierung wird der Thermobrite/Hybrite (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, D) benutzt.

#### *Verwendete Materialien:*

- 10-20 µl Sonde (richtet sich nach Größe des TMA-Schnittes)
- Fixogum

#### *Laborprotokoll:*

1. 10-20 µl Sonde luftblasenfrei auf den TMA-Schnitt pipettieren
2. Deckgläschen auf Probe geben und blasenfrei verteilen
3. Deckgläschen mit Fixogum versiegeln
4. Bei 72 °C für 5 min denaturieren und über Nacht (14-18 h) bei 37 °C im Hybrite hybridisieren

### **Schritt 3: Waschen**

Im Anschluss an die Hybridisierung – am zweiten Tag also – wurden die TMA-Schnitte gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

#### *Verwendete Materialien:*

- Waschpuffer (2 x SSC/ 0,3 % NP 40)
- Destilliertes Wasser
- NP 40
- DAPI I-Gegenfärbung (2 x 500 µl) (Zusammensetzung: 1000 ng/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) in Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Glycerin und Puffer)

#### *Laborprotokoll:*

1. Fixogum und Deckgläschen von TMA-Schnitten entfernen
2. TMA-Schnitte in den Waschpuffer bei einem pH-Wert von 7,2-7,4 hineinstellen

3. TMA-Schnitte 2 min bei 72 °C im Waschpuffer waschen
4. TMA-Schnitte kurz mit dH<sub>2</sub>O spülen und im Dunkeln lufttrocknen
5. Probe mit 10 µl (20 µl bei größeren Arrays) DAPI I gegenfärben und mit Deckgläschen versehen
6. TMA-Schnitte mit DAPI I lichtgeschützt behandeln.

#### ***Schritt 4: Detektion der Signale***

Zur Detektion von Deletionen wurden die einzelnen Spots mit einem Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Dabei wurden alle drei Filter eingesetzt: der grüne für das X-Chromosom, der orangene für das Y-Chromosom und der aquablaue für Chromosom 18, das in dieser Untersuchung als Referenz galt.

#### **2.4.2. FISH-AUSWERTUNG**

Die Signale wurden, sofern möglich, in mindestens 80 Nuclei pro Tumorspot gezählt. In TIN-Spots wurden nahezu alle Zellen auf Y-Chromosomverluste inspiziert. Dabei wurden nur intakte Nuclei, die sich nicht überlappen, gezählt. Geteilte Zentromersignale wurden als eins gezählt und verminderte Zentromersignale wurden unberücksichtigt gelassen. Nur Zellen mit mindestens einem eindeutigen und hell sichtbaren Signal in einem der drei Filter wurden gezählt, um zu vermeiden, dass Artefakte, zum Beispiel auf Grund von insuffizienter Hybridisierung, in die Auswertung aufgenommen werden. Ein Y-Chromosomverlust wurde dann angenommen, wenn ein Tumor keine Signale für das Y-Chromosom in den Tumorzellen zeigte, während in der Umgebung vorkommende Lymphozyten eine normale Y-Chromosom-Zahl aufwiesen.

Da die meisten Tumoren in hohem Maße von Lymphozyten infiltriert waren und die meisten TIN-Proben anteilig Normalgewebe enthielten, was in der Fluoreszenzfärbung nur schwer zu differenzieren ist, wurde jeder TMA-Spot unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut und zugehöriger TMA-Spot in der immunhistochemischen Färbung mit Hilfe eines Lichtmikroskops damit abgeglichen.

Um falsche Resultate aus technischen Gründen zu vermeiden und die Reproduzierbarkeit der Zählung gewährleisten zu können, wurden zwei unabhängige Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen durchgeführt und beide zweimal gezählt.

## **2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Für die statistischen Berechnungen und Auswertungen wurde die Software JMP 5.1 (*SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA*) verwendet.

Um den Zusammenhang zwischen den FISH-Ergebnissen und den klinisch-pathologischen Parametern wie Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, TNM-Stadium, Infiltration von Blut- bzw. Lymphgefäßen und Infiltration des Rete testis zu klären, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dabei wurden p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3. RESULTATE

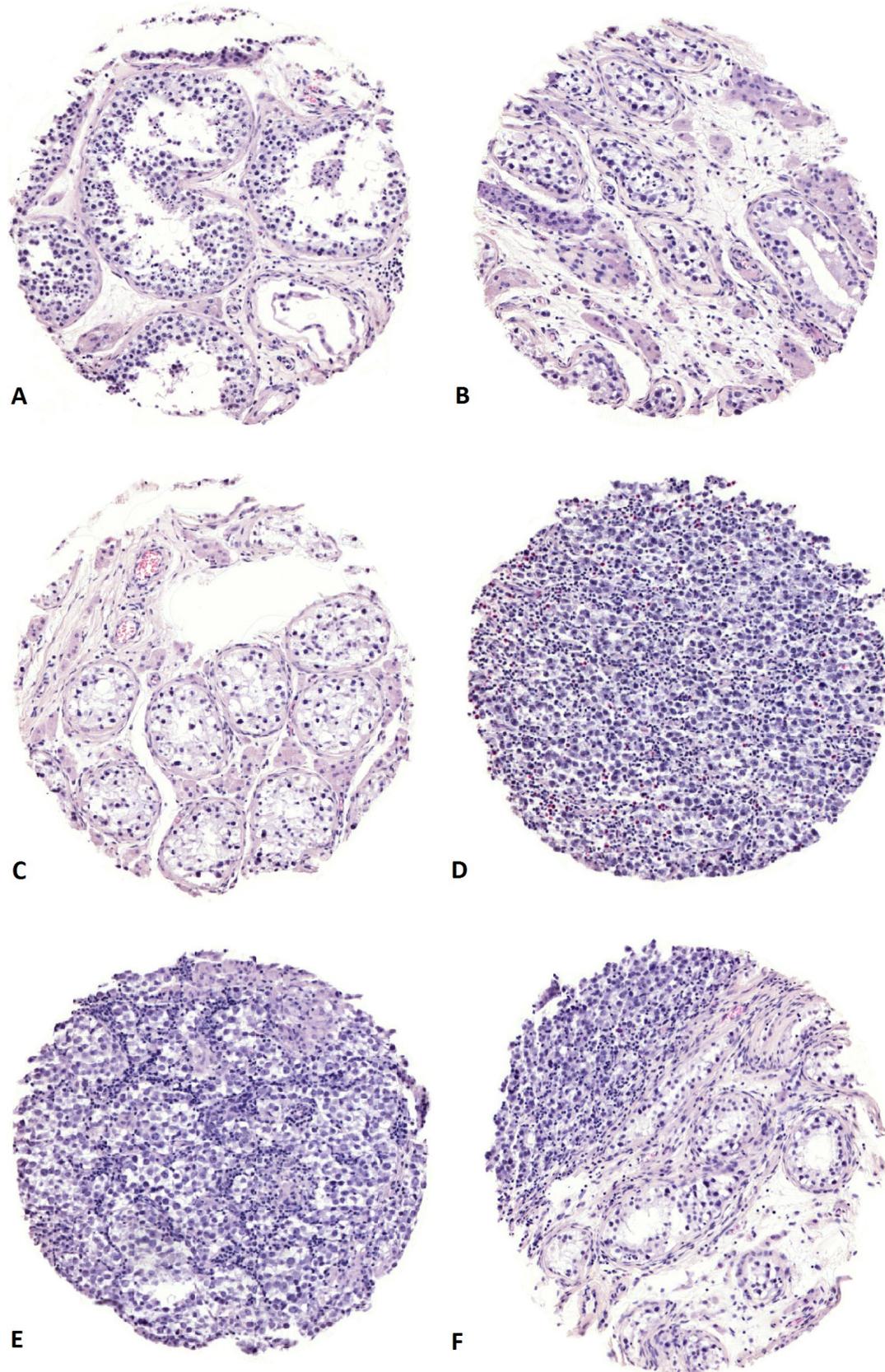
#### 3.1. TECHNISCHE AUSWERTBARKEIT

Von dem im Rahmen des Projektes hergestellten Tissue Micro Array waren letztlich die Proben von 58 von 85 Patienten (68,2 %) vollständig auswertbar. Davon hatten 50 Patienten (86,2 %) zwei auswertbare TMA-Spots und 8 Patienten (13,8 %) nur einen auswertbaren Spot.

Gründe für nicht auswertbare TMA-Proben waren der fehlende Nachweis von Seminomzellen bei 6 von 85 Patienten (7,1 %) bzw. fehlende X- und Y-Chromosom-Signale (auch in tumorinfiltrierenden Lymphozyten) durch insuffiziente Färbung bzw. Hybridisierung in der FISH-Analyse bei 21 der übrigen 79 Patienten (26,6 %).

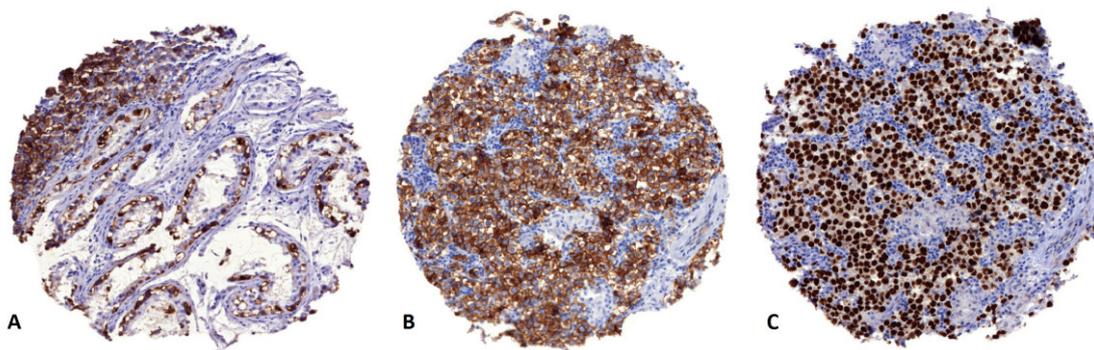
Die immunhistochemische Untersuchung von SALL4, c-Kit und PLAP wurde ausschließlich durchgeführt, um zu zeigen, dass in den einzelnen Spots auch Tumorzellen vorliegen. Dies kann in Einzelfällen an kleinen Biopsien, wie im TMA, rein morphologisch schwierig sein. Das Vorhandensein von Seminomzellen wurde nur in Fällen angenommen, bei denen mindestens einer der Marker positiv war und eine TIN morphologisch ausgeschlossen werden konnte.

Die Abbildung 10 A stellt ein Beispiel für eine „Fehlstanzung“ dar. In diesem TMA-Spot sind keine Tumorzellen, sondern lediglich einige Lymphozyten und atrophe Hodenkanälchen sichtbar. Abbildungen 10 B und 10 C zeigen TMA-Spots, die eine TIN enthalten, während Abbildung 10 D ein Beispiel für einen erfolgreich gestanzten, invasive Seminomzellen enthaltenden TMA-Spot ist. Ein weiteres Beispiel für einen korrekt gestanzten Tumor-Spot ist in Abbildungen 10 E erkennbar. Hier wird auch am kleinen TMA-Spot deutlich, dass die Semine typischerweise von lymphozytären Infiltraten durchsetzt sind. Abbildung 10 F beinhaltet ein Fallbeispiel mit gleichzeitigem Vorliegen einer TIN und invasiven Karzinomanteilen.



**Abbildung 10:** Verschiedene Beispiel-Spots aus dem Hoden-TMA. A – Fehlstanzung (keine Tumorzellen); B, C – TIN; D, E – Seminom; F – Seminom und TIN

Die Abbildungen 11 A bis 11 C zeigen immunhistochemische Färbungen der TMA-Spots mit PLAP, c-Kit und SALL4. Bei dem in Abbildung 11 A dargestellten Spot handelt es sich um den gleichen Spot wie in Abbildung 10 F. Durch die immunhistochemische Färbung mit dem Marker PLAP lassen sich Seminom und TIN hervorragend darstellen. Abbildungen 11 B und 11 C zeigen die immunhistochemischen Färbungen des Tumorspots aus Abbildung 10 E. Auch diese Illustrationen verdeutlichen, dass die genannten Färbungen zur Identifikation von Seminomzellen geeignet sind.



**Abbildung 11:** Beispiele für immunhistochemische Färbung der Hoden-TMA-Spots. A – PLAP; B – c-Kit; C – SALL4

### 3.2. Y-CHROMOSOMVERLUSTE

Y-Chromosomverluste waren bei 4 von 58 Patienten (6,9 %) nachweisbar. Dabei war der Y-Chromosomverlust immer komplett, das heißt, dass das entsprechende Präparat keine Y-Chromosom-haltigen Seminomzellen enthielt. Lediglich die Begleitentzündung, die sich bei Seminomen durch die kleinere Größe der Lymphozyten leicht von den Tumorzellen abgrenzen lässt, zeigte X- und Y-Chromosomen. Die typische Durchdringung von Seminomzellen durch lymphozytäre Zellen stellt eine hervorragende interne Kontrolle für die FISH-Untersuchung dar. In lymphatischen Geweben war in keiner der untersuchten Gewebeproben ein Y-Chromosomverlust in einer signifikanten Anzahl der Zellen nachweisbar.

In allen 4 Seminomen mit Y-Chromosomverlusten waren beide beurteilbaren Proben bezüglich des Y-Befundes gleich, beide zeigten also jeweils im gesamten zur Verfügung stehenden Gewebe einen Y-Chromosomverlust in allen großen „seminomartigen“

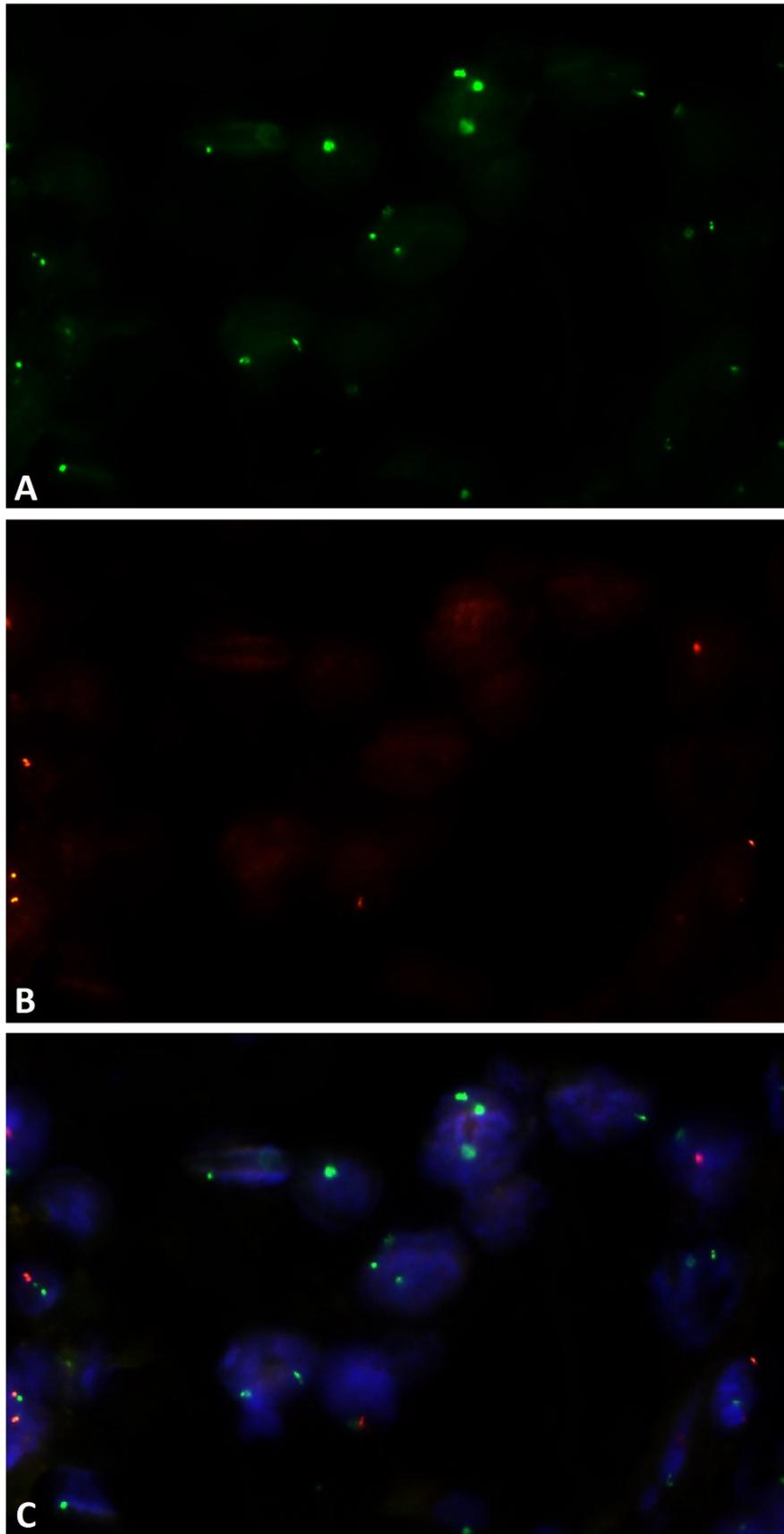
Zellkernen, während in den kleinen „lymphozytenartigen“ Zellen immer auch Y-Chromosom-Signale neben X-Chromosom-Signalen sichtbar waren.

Ein Beispiel eines Falles mit Y-Chromosomverlust ist in den Abbildungen 12 A bis 12 C dargestellt.

Man sieht in Abbildung 12 A einen Ausschnitt eines TMA-Spots mit jeweils einem X-Chromosomen (grünes Signal) pro Zellkern, wobei einzelne Zellkerne auch keinen und andere zwei X-Chromosomen aufzuweisen scheinen. Diese Probleme sind schnittbedingte Artefakte. In einzelnen Zellen entsteht immer ein X-Chromosom-Signalverlust, weil die Schnittdicke nur 4 µm beträgt, so dass ein Teil des über 10 µm großen Zellkernes bei der Untersuchung „weggeschnitten“ wird und die FISH-Untersuchung somit ein „negatives“ Resultat ergibt. Der Eindruck von zwei X-Chromosom-Signalen pro Zellkern entsteht durch überlappende Zellkerne, welche in der HE-Untersuchung deutlich besser erkennbar sind als in der FISH-Untersuchung, in der die Zellmorphologie nur eingeschränkt beurteilbar ist.

Die Beurteilung des in Abbildung 12 A gezeigten Präparats wird durch die gleichzeitige Betrachtung des in Abbildung 12 B dargestellten Präparats deutlich erleichtert. Abbildung 12 B stellt die gleiche Zellgruppe wie Abbildung 12 A dar, allerdings bei Verwendung des Orangefilters. Hier fällt auf, dass die großen zentral gelegenen Zellkerne alle keine umschriebenen orangenen Y-Chromosom-Signale aufweisen. Solche Y-Chromosom-Signale sind nur in einzelnen peripher im Bild erkennbaren kleineren Zellkernen zu sehen. Diese Zellkerne dürften Lymphozyten entsprechen.

Abbildung 12 C zeigt eine Überlagerung der Bilder 12 A und 12 B zusammen mit einer DAPI-Gegenfärbung, wobei die Zellkerne besser zur Darstellung kommen. Hier wird noch besser erkennbar, dass die Zellen, welche auch ein orangenes Y-Chromosom-Signal aufweisen, kleinen runden Zellen entsprechen und somit Lymphozyten sein müssen. Die großen Zellkerne zeigen entweder kein Signal oder nur ein grünes X-Chromosom-Signal und stellen einen Y-Chromosomverlust somit gut dar.



**Abbildung 12:** Y-Chromosomverlust in der FISH-Untersuchung. A – Grünfilter zeigt X-Chromosomen; B – Orangefilter zeigt Y-Chromosom-Signalverlust im Zentrum; C – Überlagerung der Bilder A und B zeigt Y-Chromosomverluste in den zentral gelegenen Seminomzellen und vorhandene Y-Chromosom-Signale in den peripher gelegenen Lymphozyten

### **3.3. ZUSAMMENHANG MIT PATHOLOGISCH-ANATOMISCHEN PARAMETERN**

Die statistische Untersuchung zum Vergleich von pathologisch-anatomischen Parametern wie pT-Stadium, Blutgefäßinvasion, Lymphgefäßinvasion und Rete-testis-Invasion ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Y-Chromosomverlusten und den genannten Parametern. Dieser Befund ist angesichts der geringen Zahl von Y-Chromosomverlusten (N = 4) auch nicht weiter erstaunlich.

Ebenfalls fand sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen Patienten mit und ohne Y-Chromosomverlust. Patienten mit Y-Chromosomverlust waren im Mittel 37,8 Jahre (30-46 Jahre) alt, während Patienten ohne Y-Chromosomverlust im Mittel 37,7 Jahre (23-73 Jahre) alt waren.

Die Daten machen insgesamt aber deutlich, dass Y-Chromosomverluste in einer signifikanten Anzahl von Seminomen vorkommen (4 von 58 Patienten, 6,9 % der Fälle).

## 4. DISKUSSION

In zahlreichen Tumortypen sind Verluste des Y-Chromosoms in ca. 10-40 % der Fälle zu beobachten. Wegen der Auffälligkeit dieses Befundes in klassischen zytogenetischen Untersuchungen war diese Tatsache bereits in früheren Studien bei vielen Tumorarten klar geworden. So konnten mit Hilfe zytogenetischer Untersuchungen bereits in den 80er und 90er Jahren häufige Y-Chromosomverluste in diversen soliden Tumoren, beispielsweise im Barrett-, Adeno- sowie Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, im Adenokarzinom des Magens, im Lungen-, Kolon- und Nierenzellkarzinom, in Harnblasenkarzinomen, sowie in diversen hämatologischen Erkrankungen gezeigt werden (Berker-Karauzum et al 1998; Center et al 1993; Espinoza et al 1999; Garewal et al 1989; Kamada et al 1992; Kovacs et al 1991; Kovacs et al 1987; Menke-Pluymers et al 1996; Muleris et al 1990; Ochi et al 1986; Rao et al 1993; Rosenblum-Vos et al 1993; Saal et al 1993; Smeets et al 1987; Smith et al 1999; Suciú et al 1990; van den Berg et al 1993; Wolman et al 1988). Gerade bei Harnblasenkarzinomen war von Powell et al initial auf eine mögliche prognostische/ klinische Relevanz hingewiesen worden (Powell et al 1990). Dieser Zusammenhang konnte in weiteren Studien, beispielsweise einer Studie von Neuhaus et al an 67 Patienten, allerdings nicht bestätigt werden (Neuhaus et al 1999). Spätere Untersuchungen hatten dann auch Y-Chromosomverluste in Normalgeweben gezeigt, beispielsweise in Blutzellen, in Urothelien und im Nierenparenchym (Betz et al 1996; Casalone et al 1995; Guttenbach et al 1995; Kovacs & Brusa 1989; UKCCG 1992). Verschiedentlich war über eine Altersabhängigkeit des Y-Chromosomverlustes diskutiert worden, das heißt, einzelne Autoren hatten Y-Chromosomverluste in Normalgeweben vor allem bei älteren Patienten gefunden, während jüngere Patienten in den gleichen Studien keine oder weniger Y-Chromosomverluste aufwiesen (Guttenbach et al 1995; Hamerton et al 1965; Pierre & Hoagland 1972; UKCCG 1992). Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen einem Y-Chromosomverlust und dem Alter in malignen Erkrankungen beschrieben, zum Beispiel in einer großen zytogenetischen Studie von Knochenmarkszellen von 1907 männlichen leukämischen oder präleukämischen Patienten, wo ein stärkerer Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Y-Chromosomverlust als zwischen dem neoplastischen Geschehen und dem Y-Chromosomverlust bestand (Herens et al 1999). Eine mögliche Erklärung für einen altersabhängigen Verlust des Y-Chromosoms wäre die „Unnötigkeit“ von Y-Chromosom-assoziierten Genen in zahlreichen Geweben beim

älteren Patienten. Tatsächlich sind auf dem Y-Chromosom nur wenige (41) proteinkodierende Gene (Ensembl Genome Browser, Stand: April 2011) lokalisiert, welche zudem bei 50 % der Menschen offensichtlich nicht benötigt werden. Auch der häufige Verlust von Y-Chromosomen in Tumoren wurde teilweise damit erklärt, dass dem Y-Chromosom offenbar keine besondere Bedeutung bei adulten Geweben zukommt. Zudem könnten Zellen, welche alle Nukleinsäuren für die rasche Replikation der wichtigen Chromosomen benötigen, versucht sein, das nicht wirklich gebrauchte Y-Chromosom nicht mehr weiter zu replizieren. Für eine solche Hypothese spricht die Tatsache, dass Y-Chromosomverluste bei keinem einzigen Tumor in einer größeren Untersuchung mit einem klinisch relevanten Parameter assoziiert waren. Beispielsweise finden sich Y-Chromosomverluste gleich häufig in nicht-invasiven, nicht lebensbedrohlichen, ansonsten genetisch stabilen pTa-Harnblasenkarzinomen wie in muskelinvasiven, metastasierenden, ansonsten genetisch instabilen Urothelkarzinomen (Minner et al 2010).

Eigentlicher Auslöser dieses Projektes war ein kürzlich am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erhobener Befund, wonach bei mehr als 2000 untersuchten Prostatakarzinomen ein Y-Chromosomverlust nur in weniger als 1 % der untersuchten Tumoren gefunden werden konnte (Kilgué 2011). Dieser, gerade für einen „Alterskrebs“, unerwartete Befund ließ an die Möglichkeit denken, dass Prostataepithelzellen möglicherweise vital von der Expression von mindestens einem der 41 proteinkodierenden Y-Chromosom-Gene abhängen. Ein solcher Zusammenhang wäre insbesondere deswegen denkbar, weil Prostataepithelien generell nur bei Y-Chromosom-Trägern (Männern) auftreten.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Expression von einem oder mehreren Y-Chromosom-Genen für das Überleben von bestimmten Geweben von Männern Relevanz besitzen könnte, haben wir uns die Frage gestellt, ob nicht möglicherweise auch Hodentumoren bzw. Keimzellen Y-Chromosom-abhängig sein könnten und ihre Y-Chromosomen selbst im Falle einer rasch proliferativen Neoplasie ebenfalls behalten. Ein derartiger Befund wäre von potenziell großer klinischer Relevanz, wäre es doch denkbar, die selektive Abschaltung/ Inaktivierung eines Y-Chromosom-assoziierten Gens therapeutisch zu nutzen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigten nun aber, dass Y-Chromosomverluste bei Seminomen in relevanter Häufigkeit (etwa zehnmal häufiger als im Prostatakarzinom) auftreten, ähnlich wie bei anderen soliden Tumoren. Unter Anwendung des genau

gleichen Verfahrens (TMA, FISH-Probe (*AneuVysion Vysis CEP 18/X/Y*-Sondenmischung (*Abbott Laboratories, USA*))) hatten wir in internen Studien bei Harnblasenkarzinomen 22,2 %, bei Nierenzellkarzinomen 15,5 %, bei Ösophaguskarzinomen 25,4 %, bei Kolonkarzinomen 30,6 %, bei Pankreaskarzinomen 11,6 % und bei Lungenkarzinomen 23,9 % Y-Chromosomverluste gefunden (G. Sauter, persönliche Mitteilung). In keiner der genannten Voruntersuchungen war der Y-Chromosomverlust mit irgendeinem der untersuchten klinischen Parameter assoziiert. Es erstaunt somit nicht, dass auch der in Seminomen nachgewiesene Y-Chromosomverlust nicht signifikant mit einem der untersuchten pathologischen Parameter (pT, Rete-testis-Invasion, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion) korrelierte. Ebenso wie in allen anderen genannten Studien fand sich kein Zusammenhang zwischen einem Y-Chromosomverlust und einem fortgeschrittenen Patientenalter, sodass insgesamt wenige Anhaltspunkte für eine Altersabhängigkeit von Y-Chromosomverlusten bestehen, zumindest in Tumorgeweben. Es ist nicht auszuschließen, dass Y-Chromosomverluste in Normalgeweben altersabhängig sind, wobei ausgedehnte Untersuchungen zu Y-Chromosomverlusten an Normalgeweben bisher noch ausstehen.

Für die Untersuchung der genannten Fragestellungen war die Auswahl von Seminomen besonders günstig, da es sich um einen Tumor handelt, der insbesondere bei jungen Patienten auftritt und somit bei Altersabhängigkeit eigentlich nur selten Y-Chromosomverluste ausweisen sollte. Zudem handelt es sich um einen besonders rasch proliferierenden Tumor, der – falls unnötige Y-Chromosomen nur Ballast darstellen – eigentlich auch Y-Chromosomverluste aufweisen sollte.

Die Untersuchung machte darüber hinaus deutlich, dass Tissue Micro Arrays ein hervorragendes Forschungsinstrument darstellen. Gerade bei morphologisch homogenen Tumoren, wie es Seminome sind, ist es nicht erstaunlich, dass die Entnahme von ein bis zwei Gewebeproben pro Tumor zu relevanten Forschungsergebnissen führt. Die TMA-Technik wurde 1998 erstmals publiziert, wonach es zunächst zu einer umfassenden Diskussion über die Frage kam, ob die Untersuchung von Gewebefragmenten, welche im Durchmesser nur 0,6 mm messen, für die Untersuchung doch teilweise ziemlich großer Tumoren überhaupt repräsentativ sein könnte (Kononen et al 1998). Zahlreiche Studien haben in den Folgejahren aber gezeigt, dass bei Entnahme von nur einem einzigen 0,6 mm großen Fragment pro Tumor sämtliche in der Literatur etablierten Zusammenhänge zwischen molekularen

Parametern und klinischen/ pathologischen Merkmalen reproduziert werden konnten (Bubendorf et al 2001; Torhorst et al 2001). So wurde beispielsweise beim Nierenzellkarzinom der bekannte Zusammenhang zwischen Vimentinexpression und schlechter Prognose auch in Tissue Micro Arrays gefunden (Moch et al 1999). Bei Harnblasenkarzinomen wurden Zusammenhänge zwischen dem Differenzierungsgrad, dem Ki67-Labeling-Index und dem klinischen Verlauf bzw. den Tumorstadien auch am TMA gezeigt (Nocito et al 2001). Untersuchungen beim Mammakarzinom haben dargestellt, dass die Expression von bekannten Prognosemarkern (wie Östrogen-Rezeptor, Progesteron-Rezeptor, p53, HER-2 oder Ki67) an einem TMA mit dem klinischen Verlauf verglichen werden kann und dabei hochsignifikante Prognoseunterschiede entstehen. Auch die Untersuchungen von Genamplifikationen ergaben bei Mammakarzinomen am TMA zumindest für die Gene Cyklin-D1, HER-2 und c-Myc die erwarteten statistischen Zusammenhänge mit der Patientenprognose (Barlund et al 2000; Ruiz et al 2006; Torhorst et al 2001).

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Untersuchung gezeigt, dass Y-Chromosomverluste bei Seminomen des Hodens etwa genauso häufig vorkommen wie bei anderen soliden Tumoren. Es bestehen somit keine Anhaltspunkte, dass die Expression eines Gens auf dem Y-Chromosom für Keimzellen des Hodens eine vitale Bedeutung hat. Die Situation beim Seminom unterscheidet sich somit grundlegend von derjenigen beim Prostatakarzinom und gleicht derjenigen bei vielen anderen soliden Tumoren. Offenbar gehen Y-Chromosomen in Tumoren von männlichen Patienten zwar in 10-40 % der Fälle verloren, für eine besondere klinische Bedeutung dieses Phänomens fehlen jedoch weiterhin jegliche Anhaltspunkte.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Y-Chromosomverluste werden bei zahlreichen Tumorarten in ca. 10-40 % der Fälle gefunden. Die einzige bekannte Ausnahme hierfür ist das Prostatakarzinom, bei dem Y-Chromosomverluste nur in weniger als 1 % der Tumoren vorkommen. Es wurde deswegen spekuliert, dass die Expression von einem oder mehreren Y-Chromosom-Genen für das Überleben von Prostataepithelzellen von vitaler Bedeutung ist.

Y-Chromosomverluste wurden beim Seminom bisher noch in keiner Studie umfassend untersucht. Ausgehend von der Hypothese, dass auch das Seminom (wie das Prostatakarzinom ein „männlicher Tumor“) keine oder kaum Y-Chromosomverluste aufweisen könnte, da auch die Keimzellen des Hodens möglicherweise Y-Chromosom-abhängig sein könnten, wurde für dieses Projekt ein TMA hergestellt, bestehend aus jeweils zwei 0,6 mm messenden Proben von 85 Seminomen. Bei 58 von 85 Patienten wies der TMA einen oder zwei interpretierbare(n), seminomhaltige(n) Spot(s) auf. Schnitte des Tissue Micro Arrays wurden mit einer kommerziellen Sondenmischung (*AneuVysion Vysis CEP 18/X/Y-Sondenmischung (Abbott Laboratories, USA)*) mit Proben gegen das Y-Chromosom (orange), das X-Chromosom (grün) und Chromosom 18 (blau) gefärbt. Ausgewertet wurde lediglich das Y-Chromosom, wobei ein Y-Chromosomverlust als fehlender Nachweis von Y-Chromosomen in mindestens 80 % der eindeutig identifizierbaren Seminomzellen definiert wurde. Ein Y-Chromosomverlust fand sich bei 4 von 58 interpretierbaren Patienten (6,9 %). Es bestand kein Zusammenhang zwischen Y-Chromosomverlusten und pT-Stadium, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion oder Rete-testis-Invasion. Ebenso wenig bestand ein Zusammenhang mit dem Patientenalter. Patienten mit Y-Chromosomverlust in ihrem Seminom waren im Mittel 37,8 Jahre (30-46 Jahre) alt, während Patienten ohne Y-Chromosomverlust im Mittel 37,7 Jahre (23-73 Jahre) alt waren. Die Daten machen somit deutlich, dass Y-Chromosomverluste in Seminomen genauso häufig vorkommen wie in anderen Tumoren bei Männern. Es ergibt sich somit keine Möglichkeit Seminome mit selektiver Ausschaltung von Y-Chromosom-assoziierten Genen zu therapieren.

Wie bei allen anderen bisher umfassend untersuchten Tumorarten fand sich somit kein Zusammenhang zwischen Y-Chromosomverlusten und irgendeinem klinisch/pathologischen Parameter. Die Bedeutung von Y-Chromosomverlusten bei Seminomen und anderen Tumoren bleibt also unklar.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akre O, Ekblom A, Hsieh CC, Trichopoulos D, Adami HO. 1996. Testicular nonseminoma and seminoma in relation to perinatal characteristics. *J Natl Cancer Inst* 88:883-9
- Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, et al. 1999. Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 91:1321-6
- Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, et al. 2004. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 64:4736-43
- Atkin NB, Baker MC. 1982. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* 2:1349
- Atkin NB, Baker MC. 1985. Chromosome analysis of three seminomas. *Cancer Genet Cytogenet* 17:315-23
- Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, et al. 2000. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 92:1252-9
- Benson CB, Doubilet PM, Richie JP. 1989. Sonography of the male genital tract. *AJR Am J Roentgenol* 153:705-13
- Bergner DM, Duck GB, Rao M. 1980. Bilateral sequential spermatocytic seminoma. *J Urol* 124:565
- Berker-Karauzum S, Luleci G, Ozbilim G, Erdogan A, Kuzucu A, Demircan A. 1998. Cytogenetic findings in thirty lung carcinoma patients. *Cancer Genet Cytogenet* 100:114-23
- Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. 2004. Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Br J Cancer* 90:900-5
- Betz J, Meloni AM, Sandberg AA. 1996. FISH studies on the Y chromosome in male urinary cells. *Cancer Genet Cytogenet* 88:155-7
- Beuzen F, Dubois S, Flejou JF. 2000. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in-situ hybridization. *Histopathology* 37:241-9
- Bianchi NO, Richard SM, Pavicic W. 2006. Y chromosome instability in testicular cancer. *Mutat Res* 612:172-88
- Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, et al. 1996. Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:301-6
- Bottarelli L, Azzoni C, Necchi F, Lagrasta C, Tamburini E, et al. 2007. Sex chromosome alterations associate with tumor progression in sporadic colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 13:4365-70
- Brosman SA. 1979. Testicular tumors in prepubertal children. *Urology* 13:581-8
- Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. 2001. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195:72-9
- Burke AP, Mostofi FK. 1988. Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 19:663-70
- Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, Shu XO, Heerema NA, et al. 2001. SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* 32:342-52

- Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. 2009. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 33:1065-77
- Carroll BA, Gross DM. 1983. High-frequency scrotal sonography. *AJR Am J Roentgenol* 140:511-5
- Casalone R, Minelli E, Righi R, Granata P, Meroni E, et al. 1995. Clonal chromosome changes in non-neoplastic ureters. *Cancer Genet Cytogenet* 83:28-31
- Castedo SM, Correia C, Gomes P, Seruca R, Soares P, et al. 1992. Loss of Y chromosome in gastric carcinoma. Fact or artifact? *Cancer Genet Cytogenet* 61:39-41
- Castedo SM, de Jong B, Oosterhuis JW, Seruca R, Idenburg VJ, et al. 1988. i(12p)-negative testicular germ cell tumors. A different group? *Cancer Genet Cytogenet* 35:171-8
- Castedo SM, de Jong B, Oosterhuis JW, Seruca R, Idenburg VJ, et al. 1989a. Chromosomal changes in human primary testicular nonseminomatous germ cell tumors. *Cancer Res* 49:5696-701
- Castedo SM, de Jong B, Oosterhuis JW, Seruca R, te Meerman GJ, et al. 1989b. Cytogenetic analysis of ten human seminomas. *Cancer Res* 49:439-43
- Center R, Lukeis R, Vrazas V, Garson OM. 1993. Y chromosome loss and rearrangement in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 55:390-3
- Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H. 1993. Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ*:1-806
- Cramer BM, Schlegel EA, Thueroff JW. 1991. MR imaging in the differential diagnosis of scrotal and testicular disease. *Radiographics* 11:9-21
- Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. 2002. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* 99:260-6
- Dabare AA, Nouri AM, Cannell H, Moss T, Nigam AK, Oliver RT. 1999. Profile of placental alkaline phosphatase expression in human malignancies: effect of tumour cell activation on alkaline phosphatase expression. *Urol Int* 63:168-74
- Espinoza LA, Barbieri Neto J, Casartelli C. 1999. Pathological and karyotypic abnormalities in advanced gastric carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 109:45-50
- Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, et al. 2000. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 29:256-65
- Garewal HS, Sampliner R, Liu Y, Trent JM. 1989. Chromosomal rearrangements in Barrett's esophagus. A premalignant lesion of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 42:281-6
- Gibas Z, Prout GR, Pontes JE, Sandberg AA. 1986. Chromosome changes in germ cell tumors of the testis. *Cancer Genet Cytogenet* 19:245-52
- Giwerzman A, Muller J, Skakkebaek NE. 1991. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes from 399 men who died suddenly and unexpectedly. *J Urol* 145:77-80
- Giwerzman A, Skakkebaek NE. 1993. Carcinoma in situ of the testis: biology, screening and management. *Eur Urol* 23 Suppl 2:19-21
- Grantham JG, Charboneau JW, James EM, Kirschling RJ, Kvols LK, et al. 1985. Testicular neoplasms: 29 tumors studied by high-resolution US. *Radiology* 157:775-80

- Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M. 1995. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 57:1143-50
- Hamerton JL, Taylor AI, Angell R, McGuire VM. 1965. Chromosome investigations of a small isolated human population: chromosome abnormalities and distribution of chromosome counts according to age and sex among the population of Tristan da Cunha. *Nature* 206:1232-4
- Hamm B. 1997. Differential diagnosis of scrotal masses by ultrasound. *Eur Radiol* 7:668-79
- Heidenreich A, Bokemeyer C, Souchon R. 2009. [Stage-specific treatment for testicular germ cell tumours]. *Urologe A* 48:377-85
- Herens C, Brasseur E, Jamar M, Vierset L, Schoenen I, Koulischer L. 1999. Loss of the Y chromosome in bone marrow cells: results on 1907 consecutive cases of leukaemia and preleukaemia. *Clin Lab Haematol* 21:17-20
- Hunter S, Gramlich T, Abbott K, Varma V. 1993. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an in situ hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 8:172-7
- Iczkowski KA, Butler SL, Shanks JH, Hossain D, Schall A, et al. 2008. Trials of new germ cell immunohistochemical stains in 93 extragonadal and metastatic germ cell tumors. *Hum Pathol* 39:275-81
- Izquierdo MA, Van der Valk P, Van Ark-Otte J, Rubio G, Germa-Lluch JR, et al. 1995. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *J Pathol* 177:253-8
- Kamada N, Sakurai M, Miyamoto K, Sanada I, Sadamori N, et al. 1992. Chromosome abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma: a karyotype review committee report. *Cancer Res* 52:1481-93
- Kaplan GW, Cromie WC, Kelalis PP, Silber I, Tank ES, Jr. 1988. Prepubertal yolk sac testicular tumors--report of the testicular tumor registry. *J Urol* 140:1109-12
- Kilgué A. 2011. Verluste des Y-Chromosoms in urologischen Tumoren der Harnblase und Prostata. In *Med. Dissertation (in Progress)*. Hamburg, Universitätsklinikum, Eppendorf
- Klein EA. 1993. Tumor markers in testis cancer. *Urol Clin North Am* 20:67-73
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, et al. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844-7
- Kovacs G, Brusa P. 1989. Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 37:289-90
- Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF. 1991. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 3:249-55
- Kovacs G, Szucs S, De Riese W, Baumgartel H. 1987. Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 40:171-8
- Kowalski J, Morsberger LA, Blackford A, Hawkins A, Yeo CJ, et al. 2007. Chromosomal abnormalities of adenocarcinoma of the pancreas: identifying early and late changes. *Cancer Genet Cytogenet* 178:26-35
- Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, et al. 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. *Eur Urol* 53:478-96
- Krege S, Beyer J, Souchon R, Albers P, Albrecht W, et al. 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 II. *Eur Urol* 53:497-513
- Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Teijgeman R, et al. 1995. Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 55:1971-6
- Lau SK, Weiss LM, Chu PG. 2007. D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30. *Mod Pathol* 20:320-5
- Leahy MG, Tonks S, Moses JH, Brett AR, Huddart R, et al. 1995. Candidate regions for a testicular cancer susceptibility gene. *Hum Mol Genet* 4:1551-5
- Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, et al. 2003. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* 111:161-71; discussion 72-3
- Loy V, Dieckmann KP. 1990. Carcinoma in situ of the testis: intratubular germ cell neoplasia or testicular intraepithelial neoplasia? *Hum Pathol* 21:457-8
- Menke-Pluymers MB, van Drunen E, Vissers KJ, Mulder AH, Tilanus HW, Hagemeyer A. 1996. Cytogenetic analysis of Barrett's mucosa and adenocarcinoma of the distal esophagus and cardia. *Cancer Genet Cytogenet* 90:109-17
- Minner S, Kilgus A, Stahl P, Weikert S, Rink M, et al. 2010. Y chromosome loss is a frequent early event in urothelial bladder cancer. *Pathology* 42:356-9
- Missiaglia E, Moore PS, Williamson J, Lemoine NR, Falconi M, et al. 2002. Sex chromosome anomalies in pancreatic endocrine tumors. *Int J Cancer* 98:532-8
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, et al. 1999. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154:981-6
- Moller H. 1993. Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology. *Eur Urol* 23:8-13; discussion 4-5
- Moller H, Prener A, Skakkebaek NE. 1996. Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 7:264-74
- Moller H, Skakkebaek NE. 1997. Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 8:904-12
- Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ, Jr. 1987. Immunopathology of germ cell tumors of the testis. *Semin Diagn Pathol* 4:320-41
- Muleris M, Dutrillaux AM, Salmon RJ, Dutrillaux B. 1990. Sex chromosomes in a series of 79 colorectal cancers: replication pattern, numerical, and structural changes. *Genes Chromosomes Cancer* 1:221-7
- Muroya K, Ishii T, Nakahori Y, Asakura Y, Tachibana K, et al. 1999. Gonadoblastoma, mixed germ cell tumor, and Y chromosomal genotype: molecular analysis in four patients. *Genes Chromosomes Cancer* 25:40-5
- Neuhaus M, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, et al. 1999. Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 30:81-6
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, et al. 2001. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194:349-57
- Ochi H, Douglass HO, Jr., Sandberg AA. 1986. Cytogenetic studies in primary gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 22:295-307

- Oosterhuis JW, Castedo SM, de Jong B, Cornelisse CJ, Dam A, et al. 1989. Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Lab Invest* 60:14-21
- Oosterhuis JW, de Jong B, Cornelisse CJ, Molenaar IM, Meiring A, et al. 1986. Karyotyping and DNA flow cytometry of mature residual teratoma after intensive chemotherapy of disseminated nonseminomatous germ cell tumor of the testis: a report of two cases. *Cancer Genet Cytogenet* 22:149-57
- Oosterhuis JW, Kersemaekers AM, Jacobsen GK, Timmer A, Steyerberg EW, et al. 2003. Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS* 111:32-40; discussion 1-2
- Oosterhuis JW, Looijenga LH. 2005. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5:210-22
- Parrington JM, West LF, Povey S. 1987. Loss of heterozygosity in hypotriploid cell cultures from testicular tumours. *Hum Genet* 77:269-76
- Peltomaki P, Halme A, de la Chapelle A. 1989. Molecular studies of the sex chromosomes in human testicular cancer: pronounced changes in X and Y chromosome dosage in some tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1:42-7
- Peltomaki P, Lothe R, Borresen AL, Fossa SD, Brogger A, de la Chapelle A. 1991. Altered dosage of the sex chromosomes in human testicular cancer: a molecular genetic study. *Int J Cancer* 47:518-22
- Pierre RV, Hoagland HC. 1972. Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer* 30:889-94
- Powell I, Tyrkus M, Kleer E. 1990. Apparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 50:97-101
- Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, et al. 2003. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS* 111:267-78; discussion 78-9
- Rao PH, Mathew S, Lauwers G, Rodriguez E, Kelsen DP, Chaganti RS. 1993. Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2:264-8
- Rapley EA, Crockford GP, Teare D, Biggs P, Seal S, et al. 2000. Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nat Genet* 24:197-200
- Riede UN, Böcking A, Böhm N. 2004. Hoden, Neoplastische Läsionen, Keimzelltumoren. In *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Riede UN, Werner M, Schäfer HE (Hrg.). 5. Aufl.: Thieme, Stuttgart. pp. 920-925
- Rifkin MD, Kurtz AB, Pasto ME, Goldberg BB. 1985. Diagnostic capabilities of high-resolution scrotal ultrasonography: prospective evaluation. *J Ultrasound Med* 4:13-9
- Rosenberg C, Mostert MC, Schut TB, van de Pol M, van Echten J, et al. 1998. Chromosomal constitution of human spermatocytic seminomas: comparative genomic hybridization supported by conventional and interphase cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 23:286-91
- Rosenblum-Vos LS, Meltzer SJ, Leana-Cox J, Schwartz S. 1993. Cytogenetic studies of primary cultures of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 70:127-31
- Ross JH, Rybicki L, Kay R. 2002. Clinical behavior and a contemporary management algorithm for prepubertal testis tumors: a summary of the Prepubertal Testis Tumor Registry. *J Urol* 168:1675-8; discussion 8-9

- Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, et al. 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118:2190-4
- Saal K, Vollmers HP, Muller J, Kohler J, Hohn H, Muller-Hermelink HK. 1993. Cytogenetic differences between intestinal and diffuse types of human gastric carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64:145-50
- Sauter G, Gasser TC, Moch H, Richter J, Jiang F, et al. 1997. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res* 25 Suppl 1:S37-43
- Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC. 1998. Molecular cytogenetics of bladder cancer progression. *Eur Urol* 33 Suppl 4:9-10
- Sauter G, Moch H, Wagner U, Novotna H, Gasser TC, et al. 1995. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 82:163-9
- Schwerk WB, Schwerek WN, Rodeck G. 1987. Testicular tumors: prospective analysis of real-time US patterns and abdominal staging. *Radiology* 164:369-74
- Serra AD, Hricak H, Coakley FV, Kim B, Dudley A, et al. 1998. Inconclusive clinical and ultrasound evaluation of the scrotum: impact of magnetic resonance imaging on patient management and cost. *Urology* 51:1018-21
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-5
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G. 2004. Tissue microarrays. *Methods Mol Med* 97:377-89
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G. 2005. Tissue microarrays. *Methods Mol Med* 114:257-68
- Simon R, Sauter G. 2002. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol* 30:1365-72
- Skakkebaek NE. 1972. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2:516-7
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, et al. 1998. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 106:3-11; discussion 2
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825-37
- Smeets W, Pauwels R, Laarakkers L, Debruyne F, Geraedts J. 1987. Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 29:29-41
- Smith A, Watson N, Sharma P. 1999. Frequency of trisomy 15 and loss of the Y chromosome in adult leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 114:108-11
- Suciu S, Kuse R, Weh HJ, Hossfeld DK. 1990. Results of chromosome studies and their relation to morphology, course, and prognosis in 120 patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 44:15-26
- Talerman A. 1980. Spermatocytic seminoma: clinicopathological study of 22 cases. *Cancer* 45:2169-76
- Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, et al. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159:2249-56
- UKCCG. 1992. Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Genes Chromosomes Cancer* 5:83-8

- van Dekken H, Alers JC, Riegman PH, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. 2001. Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am J Pathol* 158:1961-7
- van Dekken H, Pizzolo JG, Kelsen DP, Melamed MR. 1990. Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *Cancer* 66:491-7
- van den Berg E, van der Hout AH, Oosterhuis JW, Storkel S, Dijkhuizen T, et al. 1993. Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. *Int J Cancer* 55:223-7
- van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH. 1994. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86:1070-5
- Wada M, Yokota J, Mizoguchi H, Terada M, Sugimura T. 1987. Y chromosome abnormality in human stomach and lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 78:780-3
- Wallrapp C, Hahnel S, Boeck W, Soder A, Mincheva A, et al. 2001. Loss of the Y chromosome is a frequent chromosomal imbalance in pancreatic cancer and allows differentiation to chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 91:340-4
- Weidner IS, Moller H, Jensen TK, Skakkebaek NE. 1999. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol* 161:1606-9
- Wittekind C, Meyer HJ. 2010. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Aufl.: Wiley-VHC, Weinheim
- Wolman SR, Camuto PM, Golimbu M, Schinella R. 1988. Cytogenetic, flow cytometric, and ultrastructural studies of twenty-nine nonfamilial human renal carcinomas. *Cancer Res* 48:2890-7
- Woodward P, Heidenreich A, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW, McLeod DG, Möller H, Manivel JC, Mostofi FK, Hailermariam S, Parkinson MC, Grigor K, True L, Jacobsen GK, Oliver TD, Talerman A, Kaplan GW, Ulbright TM, Sesterhenn IA, Rushton HG, Michael H, Reuter VE 2004. Germ cell tumours. In *WHO Classification of tumours. Pathology and Genetics of the Urinary System and Male Genital Organs*, ed. J Eble, G Sauter, JI Epstein, IA Sesterhann, pp. 217-78. Lyon: IARC Press

## 7. ANHANG

### 7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFP	- Alfafetoprotein
DAB	- Diaminobenzidin
DAPI	- 4,6-Diamidino-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	- destilliertes Wasser
DNA	- desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ESC	- embryonal stem cell (embryonale Stammzelle)
FISH	- Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IGCCCG	- International Germ Cell Cancer Collaboration Group
IgG	- Immunglobulin G
i(12p)	- Isochromosom 12p
IHC	- Immunhistochemie
ITGCNU	- intratubular germ cell neoplasia unclassified (intratubuläre Keimzellneoplasie)
LDH	- Laktatdehydrogenase
PAR1	- pseudoautosomale Region 1
PAR2	- pseudoautosomale Region 2
PAS	- Periodic Acid Schiff (Reaktion mit Perjodsäure und Schiff'schem-Reagenz)
PCR	- polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGC	- primordial germ cell (primordiale Keimzelle)
PLAP	- plazentare alkalische Phosphatase
RNA	- ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SRY	- sex determining region of Y-chromosome (geschlechtbestimmende Region)
TEC	- Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Citratpuffer
TIN	- testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TMA	- Tissue Micro Array
TNM	- Tumor Nodes Metastasen
WHO	- World Health Organization
YSR	- y-spezifische Region
β-HCG	- humanes Choriongonadotropin, β-Untereinheit

## 7.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Schema für die Entstehung von Keimzelltumoren .....	10
<b>Abbildung 2:</b> Morphologie der Keimzelltumoren.....	14
<b>Abbildung 3:</b> Y-Chromosom. Lokalisation von PAR1, PAR2, euchromatischer, interstitieller und terminaler heterochromatischer Region .....	18
<b>Abbildung 4:</b> Y-spezifische Region .....	19
<b>Abbildung 5:</b> Paraffinblöcke mit zugehörigen Schnitten, Archiv .....	24
<b>Abbildung 6:</b> TMA und seine Möglichkeiten .....	25
<b>Abbildung 7:</b> Array-Stanzgerät .....	26
<b>Abbildung 8:</b> Tissue Micro Array Technologie .....	27
<b>Abbildung 9:</b> Punchfile .....	28
<b>Abbildung 10:</b> Verschiedene Beispiel-Spots aus dem Hoden-TMA .....	40
<b>Abbildung 11:</b> Beispiele für immunhistochemische Färbung der Hoden-TMA-Spots.	41
<b>Abbildung 12:</b> Y-Chromosomverlust in der FISH-Untersuchung .....	43

## 7.3. TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Histologische Klassifikation von Hodentumoren.....	7
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über Subgruppen der testikulären Keimzelltumoren .....	8
<b>Tabelle 3:</b> TNM-Klassifikation .....	15
<b>Tabelle 4:</b> Prognosegruppen entsprechend der IGCCCG-Klassifikation .....	16

## **8. DANKSAGUNG**

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung über den gesamten Zeitraum hinweg. Ich war mir Ihrer Unterstützung stets sicher und Ihr Lob und Ihre konstruktive Kritik haben mich in der Fertigstellung dieser Arbeit sowie in meiner persönlichen Entwicklung bereichert.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Christina Koop für die hervorragende Unterstützung, die guten Ratschläge und die Hilfe bei der Organisation bedanken. Ohne Dich wäre die tägliche Arbeit sehr viel schwieriger zu bewältigen gewesen.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich dem Team aus dem TMA- sowie dem FISH-Labor aussprechen, ohne das die Fertigstellung dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. med. Eike Burandt und Herrn Dr. med. Daniel Koychev danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung und der Auswahl der Bilder.

Zuletzt möchte ich ein ganz persönliches Dankeschön an meine Familie aussprechen. Eure Unterstützung, eure Motivation und eure Ratschläge bedeuten mir sehr viel. Ihr seid großartig. Danke!

## **9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Unterschrift: .....