

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Tumorbilogie

Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen aus Patienten mit testikulären Keimzelltumoren

Dissertation

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

vorgelegt von:

Refik Kavsur
aus Köln

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.01.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. S. Riethdorf

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. F. Honecker

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
1.1	Metastasierung	1
1.1.1	Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)	1
1.1.2	Minimale residuale Krebserkrankung	2
1.1.3	Bedeutung des Transkriptionsfaktors <i>Grainyhead-like-2</i> für die EMT	3
1.2	Zirkulierende Tumorzellen (CTC)	4
1.2.1	CTC-Detektion	4
1.2.1.1	Immunzytochemische Detektion nach Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation	4
1.2.1.2	<i>Cellsearch</i>-System	5
1.2.2	Klinische Relevanz der CTC-Detektion	6
1.2.3	Zielgerichtete Krebstherapien (<i>targeted therapy</i>)	7
1.3	Testikuläre Keimzelltumoren	8
1.3.1	Epidemiologie	8
1.3.2	Risikofaktoren und Symptomatik	8
1.3.3	Diagnostik und Klassifikation	9
1.3.4	Histologie	11
1.3.5	Prognose und Therapie	12
1.3.6	Entwicklung der Cisplatin-Resistenz	13
1.3.7	Immunhistologische Marker der Keimzelltumoren	14
1.3.7.1	CD30 (Ki-1)	15
1.3.7.2	Glypican-3	16
1.3.8	CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren	17
1.4	Aufgabenstellung	18
2	<i>MATERIAL</i>	20
2.1	Patientenproben	20
2.2	Zelllinien	22
2.3	Chemikalien und Reagenzien	23
2.4	Kitsysteme (Kits)	24
2.5	Antikörper	25
2.6	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	26

2.6.1	Kulturmedien	26
2.6.2	Puffer und Lösungen	27
2.7	Verbrauchsmaterial und Zubehör	29
2.8	Geräte	29
3	METHODEN	31
3.1	Zellkulturmethoden	31
3.1.1	Auftauen und Einfrieren der Zelllinien	31
3.1.2	Passagieren der Zelllinien	31
3.1.3	Herstellung der <i>Zytospins</i>	32
3.2	Analyse der Proteinexpression	32
3.2.1	Western-Blot	32
3.2.1.1	Herstellung der Zelllysate	32
3.2.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.2.1.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
3.2.1.3	Semidry-Elektrotransfer	34
3.2.1.4	Blockierung und Immunodetektion	34
3.2.1.5	Ladekontrollen	34
3.2.2	Immunhistochemische Analysen an in Paraffin eingebettetem Gewebe	35
3.2.3	Immunzytochemische Analysen	36
3.2.4	Expressionsanalyse an <i>Zytospins</i> durch Immunfluoreszenz	37
3.3	Anreicherung mononukleärer Zellen aus Blutproben mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation	37
3.4	Detektion von CTC über Immunfluoreszenz unter Verwendung des Antikörpercocktails (GPC-3/CD30)	38
3.5	Statistische Auswertung	39
4.	ERGEBNISSE	40
4.1	Charakterisierung von testikulären Keimzelltumorkomponenten zur Bestimmung neuer CTC-Detektionsmarker	40
4.1.1	Analyse epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Marker durch das Western-Blot-Verfahren	40
4.1.2	<i>Grainyhead-like-2</i> -Expression in testikulären Keimzelltumoren	43
4.2	Detektion von CTC durch die Keimzelltumormarker CD30 und Glypican-3	47
4.2.1	Statistische Auswertung des Nachweises CD30/GPC-3-positiver CTC in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern	52

4.2.2	CTC im Blut der <i>Vena testicularis</i>	56
5.	DISKUSSION	58
5.1	Einfluss der Heterogenität der Keimzelltumoren auf die Detektion von CTC.....	59
5.1.1	Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in nicht-seminomatösen Keimzelltumorkomponenten.....	60
5.1.2	Bedeutung der CD30- und GPC-3-Expression für die Detektion von CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren.....	63
5.2	Bedeutung der verwendeten Marker für die Entwicklung der Cisplatin-Resistenz in Keimzelltumorzelllinien	64
5.3	GRHL2-Expression in Keimzelltumorzellen.....	65
5.4	Methodische Aspekte bei der immunzytochemischen Detektion von CTC	66
5.5	CTC-Detektion aus der <i>Vena testicularis</i>	70
5.6	Klinische Relevanz des CTC-Nachweises bei Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren	70
5.8	Ausblick.....	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	74
7.	LITERATURVERZEICHNIS	75
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
9.	DANKSAGUNG	91
10.	LEBENS LAUF	92
11.	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	93

1 EINLEITUNG

1.1 Metastasierung

Krebserkrankungen sind in den westlichen Industrienationen die zweithäufigste Todesursache und nehmen mit dem Altern der menschlichen Population stetig an Bedeutung zu. Der größte Anteil der Krebserkrankungen wird von soliden Tumoren verursacht, die aus epithelialen Geweben gebildet werden (Jemal et al., 2011). Sie werden als Karzinome bezeichnet und entstehen durch epitheliale Körperzellen, die Wachstumskontrollen entgehen und sich durch Fehlregulationen autonom teilen. Diese Zellen zeichnen sich durch das Potenzial zur praktisch unbegrenzten Zellteilung aus und überwinden Barrieren, wie etwa die der Organgrenze. Durch Streuung in entfernte Organe sind sie außerdem in der Lage, Metastasen zu bilden (Wagener & Müller, 1999). Die Streuung gelingt den Zellen durch die Infiltration von Lymph- oder/und Blutgefäßen. Über die Gefäße verlassen die Tumorzellen ihr Ursprungsgewebe und nisten sich in entfernten Organen ein, um Metastasen zu bilden. Man unterscheidet daher zwischen lymphatischer und hämatogener Disseminierung (Pantel & Brakenhoff, 2004). Der Nachweis von Metastasen weist auf ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium hin und spricht für einen ungünstigen Krankheitsverlauf. In 90% der Fälle ist die Metastasierung die Ursache für den letalen Ausgang einer soliden Krebserkrankung (Gupta & Massagué, 2006).

1.1.1 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Der Prozess der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen beginnt mit der Zersetzung der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran durch Proteasen (Ahmad & Hart, 1996). Nach Infiltration der Blutgefäße überleben die Tumorzellen, die den Scherkräften der Blutzirkulation standhalten und dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgehen. Apoptose kann initiiert werden, wenn Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix Interaktionen verloren gehen (Jakóbisiak et al., 2003). Die Anpassung an neue Umgebungsbedingungen gelingt den zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) durch Mechanismen, wie der epithelialen-mesenchymalen

Transition (EMT). Die EMT beschreibt die Transdifferenzierung einer epithelialen Zelle in eine eher mesenchymale Zelle (Thiery, 2002). Erstmals im Jahr 1982 von Hay beschrieben, gehört die EMT zu den physiologischen Mechanismen in der Embryogenese und der Wundheilung. Nach stattgefundenener EMT werden epitheliale Eigenschaften, wie z.B. die Expression des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, in der Zelle herunterreguliert und mesenchymale Proteine, wie das Adhäsionsmolekül N-Cadherin oder das Zytoskelettmolekül Vimentin, verstärkt exprimiert. Damit geht einher, dass die Zelle ihre basal-apikale Polarität verliert und eine spindelförmige Morphologie erhält (Micalizzi et al., 2010). Durch die verringerte Expression des epithelialen Zell-Adhäsionsmoleküls EpCam (*epithelial cell adhesion molecule*) und der epithelialen Keratine (*cytokeratin*, CK) erreicht die Zelle zudem eine höhere Plastizität (Anpassungsfähigkeit) (Mikolajczyk et al., 2011). Die EMT ist ein reversibler Prozess. Die Rückumwandlung wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet und ermöglicht den zirkulierenden Tumorzellen die Infiltration entfernter Organe. Die disseminierten Zellen (*disseminated tumor cell*, DTC) sind in der Lage, in ihrer neuen Umgebung zu Mikro- und anschließend zu gefährlichen Makrometastasen heranzuwachsen (Chambers et al., 2002).

1.1.2 Minimale residuale Krebserkrankung

Es wird angenommen, dass neben den disseminierten Tumorzellen, die durch Apoptose untergehen, der Hauptanteil (95%) der DTC einen dormanten (inaktiven) Zustand entwickelt (Luzzi et al., 1998). Dormante Tumorzellen bleiben klinisch unauffällig, bis sie beginnen zu proliferieren und zu Metastasen heranwachsen. Die minimale residuale Erkrankung (*minimal residual disease*, MRD) beschreibt den Zustand, in dem Patienten nach erfolgter Krebstherapie dormante Tumorzellen im Körper enthalten, die klinisch unentdeckt bleiben. So können klinisch geheilte Krebspatienten auch Jahre später ein Rezidiv (Wiederkehr) der Krebserkrankung entwickeln (Demicheli, 2001; Aguirre-Ghiso, 2007). Während dormante CTC und DTC einen Arrest der Proliferation aufzeigen, besteht in dormanten Mikrometastasen ein Gleichgewicht zwischen apoptotischen und proliferierenden Zellen (Holmgren et al., 1995). Dieses Gleichgewicht kann u.a. durch den Einfluss angiogenetischer

Faktoren oder durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen gestört werden. Ein Ungleichgewicht zugunsten der Zellproliferation kann die Entstehung von Metastasen begünstigen (Koebel et al., 2007; Almog et al., 2009).

1.1.3 Bedeutung des Transkriptionsfaktors *Grainyhead-like-2* für die EMT

Grainyhead-like-2 (GRHL2) ist ein Transkriptionsfaktor aus der *Grainyhead-like* Familie, der regulatorische Funktionen in der Embryonalentwicklung ausübt (Bray & Kafatos, 1991). Mäuse ohne GRHL2-Gen entwickeln Neuralrohrfehlbildungen und sterben frühzeitig. GRHL2 reguliert u.a. die epitheliale Differenzierung und moduliert die Expression des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin (Werth et al., 2010). Ferner konnte an Leber- und Brustkrebszellen gezeigt werden, dass GRHL2 eine große Bedeutung in der epithelialen-mesenchymalen Transition und der Metastasierung besitzt. Tumorzellen mit einer GRHL2-Überexpression zeigten invasives Verhalten und ein erhöhtes Metastasierungspotenzial (Tanaka et al., 2008; Werner et al., 2013). GRHL2 gilt zudem als ein Suppressor der EMT. So verursacht der Verlust der GRHL2-Expression in Brustkarzinomzelllinien phänotypische Veränderungen, die dem Prozess der EMT entsprechen. Obwohl generell die erhöhte Zellproliferation ein bedeutendes Charakteristikum von Tumorzellen darstellt, wird angenommen, dass die Hyperproliferation während der Disseminierung schädliche Auswirkungen auf das Überleben der Tumorzellen haben könnte (Evdokimova et al., 2009; Werner et al., 2013). Der mesenchymale Phänotyp nach erfolgter EMT könnte eine bedeutende Voraussetzung dafür sein, dass eine Metastasierung in entfernte Organe stattfindet. Es ist anzunehmen, dass Moleküle wie GRHL2, die regulatorische Funktionen in der EMT/MET und der Zellproliferation erfüllen, wichtige Kandidatengene repräsentieren, die eine essentielle Bedeutung in der Entstehung von Metastasen besitzen könnten (Werner et al., 2013).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

1.2.1 CTC-Detektion

Es wird angenommen, dass CTC und DTC in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Darüber hinaus gelten sie als potenzielle Biomarker einer MRD (Ignatiadis & Reinholz, 2011). Für DTC ist häufig das Knochenmark ein Reservoir. Zur DTC-Detektion werden daher Proben über die Knochenmarkbiopsie entnommen (Pantel & Brakenhoff, 2004; Braun et al., 2005). Weniger invasiv sind die Probenentnahmen zur CTC-Detektion, da hier einfache Blutentnahmen genügen. Weil die Konzentrationen an CTC im Blut jedoch äußerst gering sind, werden vor den meisten CTC-Detektionsmethoden Verfahren angewendet, die zur Anreicherung der Tumorzellen führen sollen. Die Anreicherung wird u.a. durch die Dichtegradientenzentrifugation, immunmagnetische Separation oder die Größenfiltration erreicht (Alix-Panabières et al., 2008). Die anschließende CTC-Detektion erfolgt hauptsächlich einerseits durch immunologische Verfahren unter Verwendung von Antikörpern, mit denen CTC von hämatopoetischen Zellen separiert werden, und andererseits durch die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit der gewebespezifische RNA im Blut nachgewiesen wird (Pantel et al., 2008).

1.2.1.1 Immunzytochemische Detektion nach Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll-Plaque™ Plus ist eine Methode zur Anreicherung von Tumorzellen aus Blutproben. In diesem Verfahren werden durch die unterschiedlichen Zelldichten mononukleäre Zellen und die möglicherweise vorhandenen Tumorzellen von restlichen Blutzellen separiert. Die Unterscheidung zwischen CTC und mononukleären Blutzellen gelingt anschließend unter der Verwendung von Antikörpern, mit deren Hilfe die CTC immunzytochemisch markiert werden. In der CTC-Forschung werden hierbei hauptsächlich monoklonale Antikörper benutzt, die an epithelspezifische Antigene binden, wie z.B. Keratin und

EpCam. Des Weiteren bietet die CTC-Detektion unter Anwendung immunzytochemischer Verfahren die Möglichkeit, gleichzeitig die Morphologie der CTC und die zelluläre Lokalisation der Immunreaktion zu evaluieren (Pantel et al., 1994; 2008; Riethdorf & Pantel, 2010).

1.2.1.2 Cellsearch-System

Ein weiteres immunzytochemisches CTC-Detektionsverfahren ist das *Cellsearch*-System (Veridex). Die Vorteile des *Cellsearch*-Systems gegenüber herkömmlichen Verfahren sind die automatische Prozessierung und die Standardisierung der Durchführung. Diese Eigenschaften sind von Bedeutung, damit ein routinierter Einsatz im klinischen Alltag ermöglicht werden kann. So ist das *Cellsearch*-System bisher die einzige CTC-Detektionsmethode, die von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen ist (Cristofanilli et al., 2004; Riethdorf et al., 2007). Die Anreicherung der Tumorzellen findet mit Hilfe von magnetischen Partikeln statt, die mit Antikörpern gegen EpCam ummantelt sind. Zellen, die an diese Antikörper binden, werden durch magnetische Felder isoliert. Die anschließende Unterscheidung zwischen epithelialen CTC und Leukozyten erfolgt unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen epithelspezifische Keratine (8, 18 und 19) und gegen das leukozytenspezifische Oberflächenmolekül CD45. So werden Zellen als CTC gewertet, die positiv für Keratine und negativ für CD45 sind (Allard et al., 2004). Die automatisierte Anwendung ausschließlich epithelialer Marker hat den Nachteil, dass CTC, in denen diese Marker nicht exprimiert sind, vom System unerkant bleiben (Riethdorf & Pantel, 2010). Riethdorf und Mitarbeiter konnten in einer Studie zur Validierung des *Cellsearch*-Systems an Patienten mit metastasierten Mammakarzinomen verdeutlichen, dass dieses Verfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist. Des Weiteren wurde die Methode bereits in bedeutenden CTC-Studien an Blutproben von Patienten mit metastasierten Brust-, Kolon- und Prostatakarzinomen angewendet (Hayes et al., 2006; Riethdorf et al., 2007; Cohen et al., 2008; de Bono et al., 2008).

1.2.2 Klinische Relevanz der CTC-Detektion

Der klinische Einsatz des CTC/DTC-Nachweises als Tumormarker bei Patienten mit Mammakarzinomen wurde in den Empfehlungen der *American Society of Oncology* (ASCO) erstmalig im Jahr 2007 erwähnt (Harris et al., 2007). In einer multizentrischen Studie von Bidard et al. (2014), in der Daten zu 1944 Patienten mit Mammakarzinomen ausgewertet wurden, konnte die prognostische Bedeutung des CTC-Befundes eindrücklich verdeutlicht werden. Obwohl der Hauptfokus der CTC-Forschung auf CTC aus Mammakarzinomen liegt, zeigte sich die klinische Relevanz des CTC-Nachweises auch für andere Tumorentitäten (Pantel et al., 2009). So wurde u.a. bei Patienten mit metastasierten Kolorektal- und Prostatakarzinomen nachgewiesen, dass der CTC-Nachweis mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist (Cohen et al., 2008; de Bono et al., 2008). Ein prognostischer Wert der CTC-Detektion konnte zudem bei Patienten ohne Metastasen bestätigt werden (Bidard et al., 2010; Rink et al., 2011; Rack et al., 2014). Neben der Funktion eines prognostischen Markers hat der CTC-Befund zusätzlich das Potenzial, als Tumormarker zu dienen, der die Entstehung einer erstmaligen Krebserkrankung, eines Rezidivs oder einer MRD nachweist. So könnten beispielsweise Patienten, die ein okkultes (verborgenes) Rezidiv entwickeln, durch den CTC-Nachweis von einer frühzeitigen Therapie profitieren (Ignatiadis & Reinholz, 2011). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der CTC-Technologie liegt in der individuellen Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit einer Krebsbehandlung. Der CTC-Befund könnte als Verlaufsmarker eingesetzt werden, mit dem man durch einen einfachen Bluttest bewerten kann, ob ein Krebspatient auf seine Therapie adäquat anspricht (Müller et al., 2005). Hierzu konnte anhand repetitiver Bluttests im Therapieverlauf bei Patienten mit Brustkrebs in einer Studie gezeigt werden, dass Patienten mit stabilen oder remittierenden Tumoren seltener CTC aufweisen als Patienten mit fortschreitenden Tumoren (Müller et al., 2005). Weitere Studien zu dem Thema bestätigten, dass der CTC-Nachweis nach erfolgter Therapie ein Indiz für die Ineffizienz der Behandlung darstellt (Liu et al., 2009; Rack et al., 2010; Goldkorn et al., 2014). Die Entwicklung optimierter CTC-Detektionsverfahren stellt in Aussicht, dass der sensitive Nachweis einzelner Tumorzellen im Blutgemisch aus Millionen

Leukozyten eine zusätzliche Möglichkeit der Tumorbiopsie darstellen könnte (*liquid biopsy*). Diese Biopsie hätte große Vorteile in der praktischen Anwendbarkeit und hat das Potenzial die Diagnostik und Behandlung von Krebserkrankungen zu revolutionieren (Alix-Panabières & Pantel, 2013).

1.2.3 Zielgerichtete Krebstherapien (*targeted therapy*)

In der zielgerichteten Krebstherapie (*targeted therapy*) richtet sich die Behandlung gegen phäno- oder genotypische Charakteristika der Tumorzellen. Die Bestimmung eines spezifischen Zielmoleküls erfolgt hauptsächlich durch die Analyse des Primärtumorgewebes. Studien konnten zeigen, dass sich die spezifischen Charakteristika der Primärtumorzellen und der metastatischen Zellen unterscheiden können. Daher ist anzunehmen, dass die Analysen von metastatischen Zellen zusätzliche Informationen liefern könnten, die bedeutenden Einfluss auf die zielgerichteten Krebstherapien haben (Pantel & Alix-Panabières, 2010; Alix-Panabières & Pantel, 2013). Durch die immunzytochemische Charakterisierung von CTC können potenziell tumorspezifische Marker bestimmt werden, die für eine zielgerichtete Krebstherapie in Frage kommen. Ein Beispiel ist die Nutzung des humanisierten Antikörpers Trastuzumab gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2. Die Bestimmung der HER2-Expression in CTC könnte einen bedeutenden Einfluss auf die Therapie bei Patienten mit Brustkrebs haben (Alix-Panabières & Pantel, 2013). Hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass CTC und Primärtumorzellen eines Patienten Unterschiede in der HER2-Expression aufweisen können. So besteht die Möglichkeit, dass ein Patient, bei dem HER2-positive CTC nachweisbar sind, trotz negativem HER2-Status im Primärtumor von einer Anti-HER2-Antikörper-Therapie profitieren könnte (Riethdorf et al., 2010). Neben der Optimierung der gezielten Therapie hat die Charakterisierung von CTC das Potenzial wichtige Informationen zu liefern, die zum besseren Verständnis der Metastasierung, EMT und Tumordormanz beitragen könnten. Zu den Methoden der Charakterisierung gehören u.a. immunzytochemische, PCR-basierte und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung(FISH)-basierte Verfahren (Swennenhuis et al., 2009; Riethdorf & Pantel, 2010; Lianidou & Markou, 2011).

1.3 Testikuläre Keimzelltumoren

1.3.1 Epidemiologie

Mit 55000 neuen Krankheitsfällen pro Jahr bilden Hodentumoren 0,7% der Krebserkrankungen bei Männern. Am häufigsten sind junge, kaukasische Männer zwischen 15 und 39 Jahren betroffen. Die höchsten Inzidenzraten sind in den entwickelten Regionen und vor allem in Europa zu finden, während in Asien und Afrika deutlich geringere Inzidenzraten vorliegen. Als Konsequenz besserer Überlebensraten waren lediglich 2200 der insgesamt 10000 Todesfälle, die im Jahr 2012 durch Hodenkrebs verursacht wurden, in entwickelten Ländern zu beobachten (Ferlay et al., 2015). In 98% der Fälle besteht der Hodentumor aus einem Keimzelltumor, der bei Männern zwischen 15 und 44 Jahren die häufigste Krebserkrankung darstellt und seit Jahrzehnten eine steigende Inzidenzrate aufweist (Ghazarian et al., 2014).

1.3.2 Risikofaktoren und Symptomatik

Zu den drei gesicherten Risikofaktoren für testikuläre Keimzelltumoren gehören der Hodenhochstand (*maldescensus testis*), der kontralaterale Keimzelltumorbefall und die positive Familienanamnese. Des Weiteren wird vermutet, dass Patienten mit Infertilität, Zwillingsschaft oder testikulärer Atrophie ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben (Dieckmann & Pichlmeier, 2004). 90-95% der Patienten mit Keimzelltumoren präsentieren sich mit primären Hodentumoren (5-10% mit extragonadalen Tumoren). Die schmerzlose Größenzunahme des Hodens ist mit 70% das häufigste Leitsymptom. Zu den weiteren möglichen Symptomen gehören u.a. uncharakteristische Schmerzen in den Hoden (10-20%) und die Gynäkomastie (vergrößerte Brustdrüsen beim Mann), die durch die β -hCG(β -Untereinheit des humanen Choriongonadotropins)- oder Östrogenproduktion des Tumors verursacht werden kann. Ferner werden in 10% der Fälle extratestikuläre Symptome angegeben (z.B. Rückenschmerzen), die durch Metastasen entstehen. Die Metastasierung erfolgt v.a. lymphogen in retroperitoneale Lymphknoten, im weiteren

Verlauf beidseits retroperitoneal, supradiaphragmal oder hämatogen meist pulmonal (ca. 10%). Leber-, Knochen- oder Gehirnmetastasen liegen dagegen seltener vor (Schmelz et al., 2006). Die Erkrankung an einem Keimzelltumor ist in der Regel ein Zufallsbefund. Daher weisen etwa 40% der Patienten bei der Erstdiagnose Metastasen auf (Germà-Lluch et al., 2002).

1.3.3 Diagnostik und Klassifikation

Bei testikulären Keimzelltumoren ist die klinische Untersuchung des Patienten ein wesentlicher Bestandteil der Diagnostik. Hierbei werden u.a. die Hoden nach intraskrotalen Wucherungen und Lymphknoten nach schmerzlosen Vergrößerungen abgetastet (Albers et al., 2005). Bei bestehendem Verdacht ist der nächste diagnostische Schritt die Ultraschall-Sonographie beider Hoden. Mit Hilfe der Sonographie kann beurteilt werden, ob eine Wucherung intra- oder extratestikulär liegt. Eine intratestikuläre Wucherung wird bis zur Erbringung eines Gegenbeweises als Hodentumor gewertet (Bosl & Motzer, 1997; Shaw, 2008). Die Bestimmung der Tumormarker alpha-1-Fetoprotein (AFP), humanes Choriongonadotropin (hCG) und Laktatdehydrogenase (LDH) im Blutserum ist ein weiteres diagnostisches Mittel. Zusätzlich haben diese Tumormarker eine prognostische Relevanz und dienen gleichzeitig als Verlaufsparemeter der Behandlung. Daher werden sie vor, während und nach der Therapie gemessen. Normwertige Tumormarker schließen dabei eine Erkrankung nicht aus (Germà-Lluch et al., 2002; Albers et al., 2005). Bei jedem Patienten mit einer verdächtigen testikulären Wucherung folgt die explorative Freilegung des Hodens. Während dieser inguinalen Operation wird eine Schnellschnittdiagnostik durchgeführt, in der das testikuläre Gewebe histologisch untersucht wird. Bestätigt sich hierbei die Malignität des fraglichen Gewebes, folgt die operative Entfernung des Hodens (Orchiektomie). Zusätzlich wird meist der kontralaterale Hoden histologisch auf testikuläre intraepithelialen Neoplasien (TIN) überprüft, um die Entwicklung eines kontralateralen Tumors auszuschließen. Bevor eine adäquate Therapie geplant werden kann, ist die Klassifikation des Tumorstadiums erforderlich (Staging). Mit Hilfe der Computertomographie wird hierzu die Tumorausbreitung beurteilt (Albers et al., 2005). Die UICC-Klassifikationen

nach histologischen und die LUGANO-Klassifikation nach klinischen Kriterien werden in Tabellen 1.1 bzw. 1.2 aufgeführt (Cavalli et al., 1980; Sobin & Wittekind, 2002). Bei Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren erfolgt zusätzlich die Einteilung in Prognosegruppen anhand der Richtlinien der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) (Wilkinson & Read, 1997).

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation der *International Union Against Cancer (UICC)*

T: Primärtumor			
T0: kein Anhalt für einen Primärtumor			
Tis: TIN			
T1: Tumor beschränkt auf den Hoden und Nebenhoden, keine Gefäß- oder Lymphinvasion			
T2: Tumor beschränkt auf den Hoden und Nebenhoden mit Gefäß- /Lymphinvasion oder Infiltration der Tunica vaginalis			
T3: Invasion des Samenstrangs			
T4: Invasion des Skrotums			
N: Lymphknotenbefall			
N0: keine befallenen Lymphknoten (Lk)			
cN1: radiologisch vergrößerte Lk kleiner als 2cm; pN1: weniger als 5 Lymphknotenmetastasen unter 2 cm			
cN2: radiologisch vergrößerte Lk zwischen 2–5 cm; pN2: mehr als 5 befallene Lk unter 2 cm, oder extranodale Infiltration der Lymphknotenmetastase			
N3: Lk-Metastasen größer als 5 cm			
M: Fernmetastasen			
M0: keine Metastasen vorhanden.			
M1: Metastasen vorhanden.			
S: Serumentumormarker			
	LDH (IE/l)	βHCG (mIE/ml)	AFP (ng/ml)
S1	<1,5fach und	<5000 und	<1000
S2	1,5- bis 10fach oder	5000–50000 oder	1000–10000
S3	>10fach oder	>50000 oder	>10000

Abk.: T – Primärtumor, Lk – Lymphknoten, N – Nodus, cN – klinisch nachgewiesener Lymphknotenbefall, pN – mikroskopisch nachgewiesener Lymphknotenbefall, M – Metastase, S – Serumentumormarker, LDH – Lactatdehydrogenase, βHCG – humanes Choriongonadotropin, AFP – Alpha-1-Fetoprotein

Tabelle 1.2 LUGANO-Klassifikation

Stadium	Klinik
I	Keine Lymphknoten-/Organmetastasen nachweisbar
II a	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen <2 cm
II b	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen 2-5 cm
II c	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen >5 cm
III	Supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen und/oder hämatogene Organmetastasen

1.3.4 Histologie

Keimzelltumoren werden in Seminome und Nichtseminome unterteilt, die beide jeweils ungefähr 50% der Krankheitsfälle ausmachen. Nichtseminome bestehen häufig aus unterschiedlichen Tumorkomponenten, die auch seminomatöse Anteile enthalten können. Für Seminome hingegen gilt die Voraussetzung, dass neben seminomatösen Anteilen keine weiteren Tumorkomponenten vorhanden sein dürfen (Bosl & Motzer, 1997). Zu den Nichtseminomen werden die Embryonalkarzinome, Dottersacktumoren, Chorionkarzinome und Teratome gezählt. Eine Besonderheit dieser Keimzelltumoren ist, dass Differenzierungsvorgänge ablaufen, die der normalen Embryogenese ähneln. Während Embryonalkarzinome undifferenziert und totipotent sind, weisen Dottersacktumoren und Chorionkarzinome eine extraembryonale und reife Teratome eine somatisch intraembryonale Differenzierung auf (vgl. Abbildung 1.1). Seminomatöse Tumorzellen sind ebenfalls totipotent und gleichen Urkeimzellen (primordialen Keimzellen) (Ulbright, 2005). Für Patienten mit Nichtseminomen wurden ungünstigere Überlebensraten als für Patienten mit Seminomen beschrieben. Nichtseminompatienten benötigen daher meist eine aggressive Therapie. Des Weiteren liegt der Häufigkeitsgipfel für Nichtseminome in der dritten Lebensdekade, während Seminome am häufigsten in der vierten Lebensdekade auftreten. Weitere Unterschiede zwischen den beiden Keimzelltumorgruppen finden sich in den Tumormarkern. Die Erhöhung der AFP-Konzentration im Serum beschränkt sich auf die Nichtseminome und wird in 40-60% der Fälle beobachtet. Die β HCG-Erhöhung liegt bei Seminomen in 15-20% der Fälle und bei Nichtseminomen in 40-60% der Fälle vor. Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ist zwar weniger spezifisch, hat jedoch einen

prognostischen Nutzen. Die LDH-Konzentration ist im Serum bei 60% der Nichtseminome und bei 80% der Seminome erhöht (Bosl et al., 1986; Mencil et al., 1994; Bosl & Motzer, 1997).

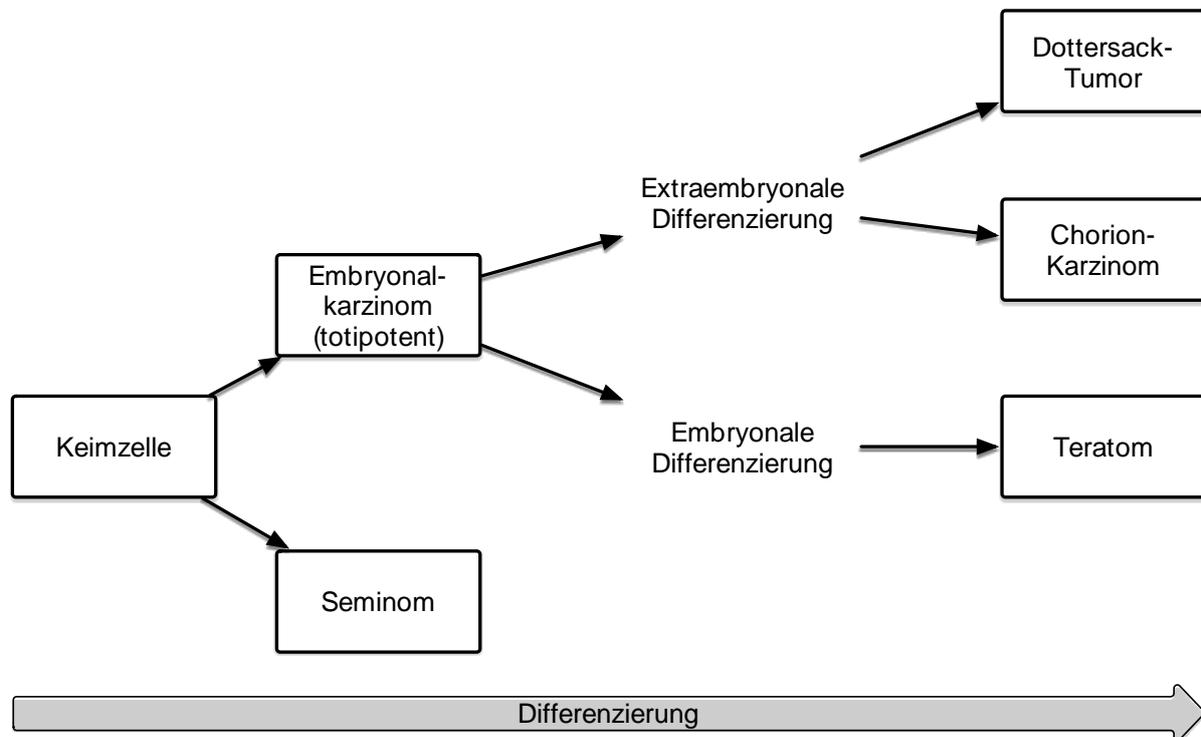


Abbildung 4.1: Entwicklung des Keimzelltumors (nach Ulbright, 2005). Keimzelltumore werden in Seminome und Nichtseminome eingeteilt. Zu den Nichtseminomen gehören das undifferenzierte Embryonalkarzinom, der Dottersacktumor, das Chorionkarzinom und das Teratom.

1.3.5 Prognose und Therapie

Seit der Zulassung des Chemotherapeutikums Cisplatin im Jahr 1979 stiegen die Überlebensraten der Patienten mit Keimzelltumoren auf Werte, die in Deutschland bei keiner anderen malignen Tumorentität auch nur annähernd erreicht wurden (Einhorn & Donohue, 1977; Wahrendorf et al., 1998). Nach der Orchiektomie gehören zu den therapeutischen Optionen die Strahlen- und die (meist Cisplatin-basierte) Chemotherapie. Die Mortalitätsrate bei Keimzelltumoren hängt stark vom Krankheitsstadium und der Histologie ab. Patienten im ersten Stadium haben nach adäquater Therapie eine 5-Jahres-Überlebensrate von 99% bei Seminomen bzw.

95% bei Nichtseminomen (Albers et al., 2005). Sind bereits retroperitoneale Lymphknotenmetastasen vorhanden, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 93% (Chung et al., 2004). Ferner zeigen Patienten mit Keimzelltumoren, die Gehirnetastasen aufweisen, eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 30-40% (Fosså et al., 1999). Da Keimzelltumoren vor allem junge Männer betreffen, droht dem Patienten durchschnittlich ein Verlust von 35 Lebensjahren - ca. 10 Jahre mehr als bei anderen Tumorentitäten (Horm & Sondik, 1989). Nach erfolgter Behandlung wird in der Nachsorge des Patienten kontrolliert, ob durch die Chemotherapie Komplikationen aufgetreten sind. Zu den möglichen Komplikationen gehören Infertilität, durch Bleomycin verursachte Lungenfibrosen, durch Etoposid verursachte Neuropathien, durch Cisplatin verursachte Nieren- oder Ohrschäden und kardiale Erkrankungen. Außerdem haben Patienten mit Keimzelltumoren, die eine Chemotherapie durchgemacht haben, ein erhöhtes Risiko, an einem Zweitmalignom (z.B. Leukämie) zu erkranken. Des Weiteren dient die Nachsorge zur frühzeitigen Erkennung einer möglichen Rezidiv-Erkrankung, die bei Keimzelltumoren meist in den ersten zwei Jahren entsteht. Die Rezidiv-Kontrollen sollten für mindestens 10 Jahre einmal jährlich durchgeführt werden (Howard et al., 2005; Shaw, 2008).

1.3.6 Entwicklung der Cisplatin-Resistenz

Cisplatin (cis-Diamminedichloroplatinum II) ist ein Chemotherapeutikum mit einem breiten Anwendungsspektrum. Zu den soliden Tumoren, bei denen es therapeutisch angewandt wird, gehören u.a. Keimzelltumoren, Lungen-, Ovarial-, Zervix-, Kolorektal- und Blasenkarzinome (Lebwohl & Canetta, 1998; Galanski, 2006). Cisplatin hat eine zytotoxische Wirkung, indem es unter anderem an die Zell-DNA bindet, die DNA-Struktur ändert und die Transkription hemmt (Jamieson & Lippard, 1999). Dadurch wird ein Arrest des Zellzyklus erreicht, der zur Apoptose führt (Jordan & Carmo-Fonseca, 2000). Tumorzellen sind jedoch in der Lage, eine Cisplatin-Resistenz zu entwickeln und der apoptotischen Wirkung des Chemotherapeutikums zu entgehen. Durch die Resistenz, die entweder nach einer Cisplatin-Therapie gebildet wird oder bereits intrinsisch vorbesteht, wird die Wirksamkeit von Cisplatin limitiert. Zur Analyse der Resistenz-Mechanismen werden

Cisplatin-sensible Tumorzelllinien mit ihren Cisplatin-resistenten Klonen verglichen. So konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, dass die Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz multifaktoriell bedingt ist. Zu den Mechanismen gehören die reduzierte intrazelluläre Akkumulation, verstärkte Entgiftung, verbesserte DNA-Reparatur, höhere Toleranz gegenüber DNA-Schäden und Veränderungen in der Regulierung der Apoptose (Kartalou & Essigmann, 2001; Rabik & Dolan, 2007). Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die klinische Relevanz dieser Mechanismen bisher ungeklärt. Ein besseres Verständnis der Cisplatin-Resistenz ist erforderlich, damit neue Therapie-Strategien entwickelt werden können, die die Entstehung der Resistenz verhindern könnten (Köberle et al., 2010).

Unter den soliden Tumoren zeigen Keimzelltumoren die höchste Cisplatin-Sensitivität. Mit Hilfe einer Cisplatin-basierten Chemotherapie können ca. 80% der Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren und 20-25% der Patienten mit rezidierten Keimzelltumoren geheilt werden. Patienten mit Keimzelltumoren, die Cisplatin-resistent sind und auf die Therapie nicht adäquat ansprechen, haben eine äußerst schlechte Überlebensprognose (Nichols et al., 1994; Kollmannsberger et al., 2006). Da Keimzelltumorzelllinien ebenfalls eine hohe Cisplatin-Sensitivität aufzeigen, könnte der Vergleich zwischen Cisplatin-sensiblen Keimzelltumorzelllinien mit ihren Cisplatin-resistenten Klonen wichtige Ergebnisse liefern, die zum Verständnis der Resistenz-Mechanismen beitragen (Köberle et al., 1997).

1.3.7 Immunhistologische Marker der Keimzelltumoren

Aufgrund der hohen Heterogenität der Keimzelltumorgruppen wird eine Vielzahl von molekularen Markern verwendet, damit eine möglichst spezifische Identifizierung der einzelnen Tumorkomponenten erreicht werden kann. Zu den immunhistologischen Markern gehören u.a. PLAP (Plazentare Alkalische Phosphatase), OCT3/4, SALL4 (*Sal-like protein 4*), AFP (Alpha-1-Fetoprotein), CD117 (C-KIT), HLA-G, CD30 und GPC-3 (Glypican-3) (Eble et al., 2004; Zynger et al., 2006; Cao et al., 2009). Die keimzelltumorspezifische Einteilung dieser Marker wird in Tabelle 1.3 aufgeführt.

Tabelle 1.3 Immunhistochemie der Keimzelltumoren (nach Sesterhenn & Davis, 2004; Zynger et al., 2006; Cao et al., 2009)

Keimzelltumorkomponenten	Diagnostische Marker
Seminome	PLAP, CD117, OCT3/4, SALL4
Embryonale Karzinome	AFP, OCT4, CD30, PLAP, SALL4
Dottersacktumoren	AFP, PLAP, GPC-3, SALL4
Teratome	AFP, PLAP, gewebespez. M., SALL4
Chorionkarzinome	hCG, PLAP, GPC-3, HLA-G, SALL4

Abk.: PLAP – Plazentare Alkalische Phosphatase, AFP – Alpha-1-Fetoprotein, GPC-3 – Glypican-3, hCG – humanes Choriongonadotropin, gewebespez. M. – gewebespezifische Marker, SALL4 – Sal-like protein 4

1.3.7.1 CD30 (Ki-1)

Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNF-R)-Superfamilie ist ein System von Ligand- und Rezeptorproteinen, die wichtige regulatorische Funktionen in der immunologischen Abwehr und der entzündlichen Reaktion erfüllen. Das Protein CD30 gehört zu den TNF-Rezeptoren und ist vor allem bekannt als Marker in der Diagnostik von Lymphomen. So ist die verstärkte CD30-Expression u.a. in Stern-Berg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms und in Zellen des anaplastisch-großzelligen Lymphoms zu beobachten (Stein et al., 1985; Smith et al., 1994). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die CD30-Expression in humanen embryonalen Stammzellen mit dem Zellwachstum und der Inhibition der Apoptose assoziiert ist (Chung et al., 2010).

Bei Keimzelltumoren ist CD30 ein sensibler Marker in der Diagnostik des Embryonalkarzinoms (Pallesen & Hamilton-Dutoit, 1988). Bei einem Teil der Patienten mit CD30-positiven Embryonalkarzinomen zeigt sich nach einer Chemotherapie jedoch ein Verlust der CD30-Expression bei Metastasen/Rezidiven.

Die hohe Sensitivität von CD30 beim Nachweis von Embryonalkarzinomen beschränkt sich daher auf Patienten, die noch keine Chemotherapie erhalten haben (Berney et al., 2001; Sung et al., 2006). Giannatempo und Mitarbeiter konnten außerdem feststellen, dass Embryonalkarzinome, die die CD30-Expression auch noch nach einer Chemotherapie aufweisen, mit ungünstigen Überlebensraten der Patienten korrelieren (Giannatempo et al., 2013). Mit Brentuximab Vedotin existiert ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD30, der bereits bei Patienten mit rezidivierten/therapierefraktären Hodgkin-Lymphomen oder anaplastisch-großzelligen Lymphomen angewendet wird (Pro et al., 2012; Younes et al., 2012). CD30 ist daher ein potenzieller Marker für die gezielte Krebstherapie des chemotherapierefraktären Embryonalkarzinoms.

1.3.7.2 Glypican-3

Glypican-3 (GPC-3) gehört zu den Heparansulfat-Proteoglykanen, denen eine Funktion in der Regulation des Zellwachstums beigemessen wird. Die physiologische GPC-3-Expression ist in Trophoblasten und in mehreren fetalen Geweben verstärkt vorhanden, während sie in adultem Gewebe sehr limitiert vorliegt. Als Marker wird GPC-3 v.a. für die Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms, Hepatoblastoms und Wilms-Tumors eingesetzt. Bei Keimzelltumoren wird GPC-3 als sensitiver Marker in der Diagnostik des Dottersacktumors und Chorionkarzinoms verwendet. Bei Dottersacktumoren konnte gezeigt werden, dass der GPC-3-Nachweis als Marker eine höhere Sensitivität aufweist als AFP. Da die GPC-3-Expression zudem auch in geringen Anteilen in Teratomen und unreifen Embryonalkarzinomen nachgewiesen werden konnte, ist sie jedoch nicht sehr spezifisch (Zynger et al., 2006; 2010; Preda et al., 2011).

Beim hepatozellulären Karzinom konnte bereits gezeigt werden, dass die GPC-3-Expression mit ungünstigeren Überlebensraten der Patienten korreliert (Shirakawa et al., 2009). Es stehen einige Antikörper gegen GCP-3 zur Verfügung, die sich für den therapeutischen Einsatz bei hepatozellulären Karzinomen in der Entwicklung befinden. GC33 (klinische Phase-2-Studien) und YP7 (präklinisch) sind humanisierte Maus-Antikörper, während MDX-1414 (präklinisch) und HN3 (präklinisch) voll

humane Antikörper darstellen (Feng et al., 2013; Zhu et al., 2013; Feng & Ho, 2014). Wegen der sensitiven Expression in Dottersacktumoren und Chorionkarzinomen ist GPC-3 daher ein potenzieller Marker der gezielten Krebstherapie bei Keimzelltumoren.

1.3.8 CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren

Ein Fokus bisheriger Arbeiten zu CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren lag auf dem CTC-Nachweis in Produkten der Stammzellapharese. Die autologe periphere Blutstammzelltransplantation wird u.a. durchgeführt, wenn die Blutbildung der Patienten durch eine hochdosierte Chemotherapie gestört ist. Es wurde vermutet, dass CTC, die in peripheren Blutstammzellproben von Patienten mit Keimzelltumoren nachgewiesen werden konnten, nach einer autologen Transplantation einen Einfluss auf die Überlebensrate haben könnten (Fan et al., 1998; Hildebrandt et al., 2000; Bokemeyer et al., 2001). Diese These konnten Bokemeyer und Mitarbeiter jedoch nicht bestätigen. Sie haben gezeigt, dass der CTC-Nachweis in peripheren Blutstammzellproben, die zur autologen Transplantation bei Patienten mit Keimzelltumoren verwendet wurden, nicht mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert war (Bokemeyer et al., 2001). Ferner beschränkte sich ein Teil der bisherigen Arbeiten zu CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren auf den Nachweis von mRNA der Marker AFP bzw. β hCG über die Anwendung der *Reverse Transkriptase*-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) (Yuasa et al., 1999; Hautkappe et al., 2000). Auf diese Weise konnten bei 26,5% (89 von 336) der Blutproben positive PCR-Resultate erzielt werden. Außerdem wurde festgestellt, dass Patienten mit Nichtseminomen eine höhere CTC-Rate zeigten (Hautkappe et al., 2000).

In unserer Arbeitsgruppe gelang erstmalig die immunzytochemische Detektion von CTC bei einer größeren Kohorte von Patienten mit Keimzelltumoren. Die CTC-Detektion erfolgte zum einen über Immunfärbungen unter Verwendung epithelialer und keimzelltumorspezifischer Antikörper nach Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation und zum anderen über die Anwendung des *Cellsearch*-Systems. So konnten CTC in den Blutproben von 17,5% (25 von 143) der

Patienten mit Keimzelltumoren nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde deutlich, dass der CTC-Nachweis mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium, einem höheren Metastasierungsrisiko und erhöhten Tumormarkern korrelierte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CTC-positive Patienten häufiger an Nichtseminomen erkrankt waren als an Seminomen. Neben peripheren Blutproben wurden Blutproben aus der *Vena testicularis* untersucht, die das Blut aus den Hoden in die untere Hohlvene drainiert. Die Untersuchung ergab, dass in Blutproben aus der *Vena testicularis* eine höhere CTC-Anzahl detektiert werden konnte als in peripheren Blutproben. Die Studie machte außerdem deutlich, dass für eine sensitive CTC-Detektion bei Patienten mit Keimzelltumoren neben epithelialen Detektionsmarkern die zusätzliche Verwendung von keimzelltumorspezifischen Markern erforderlich ist (Nastały et al., 2014).

1.4 Aufgabenstellung

Obwohl testikuläre Keimzelltumoren mit einer Cisplatin-basierten Therapie meist erfolgreich therapiert werden können, zeigen v.a. Patienten mit fortgeschrittenen Metastasen oder Rezidiven einen ungünstigen Krankheitsverlauf. Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) könnte dazu beitragen, dass okkulte Keimzelltumoren frühzeitig erkannt werden. Aufgrund der Heterogenität der testikulären Keimzelltumoren, die vor allem bei den Nichtseminomen hauptsächlich durch den unterschiedlichen Anteil verschiedener nichtseminomatöser Tumorzellkomponenten bedingt ist, wird die Entwicklung einer möglichst sensitiven Methode zur CTC-Detektion erschwert.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Keimzelltumorkomponenten auf ihre Expression epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Marker untersucht werden, um neue Marker-Kandidaten zu bestimmen, die die CTC-Detektion bei Patienten mit testikulären Keimzelltumoren verbessern könnten. Zusätzlich sollte die Expression dieser Marker in korrespondierenden Cisplatin-resistenten Zellen untersucht werden, um eine mögliche Relevanz in der Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz überprüfen zu können.

Ein besonderes Augenmerk galt der Expression des Transkriptionsfaktors GRHL2,

dem eine regulatorische Bedeutung in der epithelialen-mesenchymalen Transition und der Embryogenese beigemessen wird. Es sollte die Rolle von GRHL2 in Keimzelltumorzellen untersucht werden.

Anschließend sollten neue Marker-Kombinationen zur immunzytochemischen Detektion von CTC aus Blutproben einer Kohorte von Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren verwendet werden. Die CTC-Befunde sollten zusammen mit den klinisch-pathologischen Patientendaten ausgewertet werden, um die prognostische Relevanz des CTC-Status zu beurteilen. Des Weiteren sollte der Nachweis von CTC mit dem entwickelten Antikörpercocktail aus Blutproben der *Vena testicularis* zeigen, ob Unterschiede in den CTC-Befunden aus peripherem und proximalem Blut bestehen.

2 MATERIAL

2.1 Patientenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von 51 Patienten untersucht, bei denen ein nicht-seminomatöser Hodentumor diagnostiziert wurde. Die Blutproben wurden in folgenden Einrichtungen im Zeitraum von Oktober 2011 bis Juli 2013 mit dem Einverständnis der Patienten und des zuständigen Ethikkomitees entnommen und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt:

Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Urologie

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Urologie

Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Urologie

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Onkologie, Hämatologie mit der Sektion Pneumologie

Neben den peripheren Blutentnahmen wurden zusätzlich 4 Blutproben während der Orchiektomie aus der Vena testicularis gewonnen. Alle Proben wurden von Paulina Nastały aus dem Institut für Tumorbologie durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Plaque™ Plus aufgearbeitet (siehe Kapitel 3.3) und zur Verfügung gestellt. Die Charakterisierung des Patientenkollektivs nach Patientendaten, klinischen und pathologischen Parametern wird in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Des Weiteren wurden Gewebeschnitte untersucht, die aus den Primärtumoren von 10 Patienten derselben Kohorte stammten. Die Operationspräparate wurden zuvor vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf bereitgestellt und von der Medizinisch-Technischen Assistentin Malgorzata Stoupiec geschnitten. Außerdem wurde ein *tissue microarray* (TMA) mit in Paraffin eingebetteten tumorösen und normalen Gewebeproben nach der GRHL2-Expression immunhistochemisch ausgewertet. Das TMA enthielt 3143 Tumorstanzen von 99 unterschiedlichen Tumortypen und wurde ebenfalls vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. Guido Sauter zur Verfügung gestellt. Die Proben stammten aus Gewebepräparaten, die im Institut

für Pathologie für diagnostische Zwecke in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg entnommen wurden. Die TMA-basierte Untersuchung der menschlichen Gewebeproben erfolgte unter Einhaltung der ethischen Prinzipien zur medizinischen Forschung, die in der Deklaration des Weltärztebundes (*World Medical Association*) in Helsinki erlassen wurden.

Tabelle 2.1 Auflistung klinischer und pathologischer Parameter der Patientenkohorte

Parameter		vollständiges Kollektiv (n=51)	
		Anzahl	% Anteil
Alter [in Jahren] Mittelwert: 33,7 Median: 32,5 (19 bis 53)	< 33,7	24	50,0
	≥ 33,7	24	50,0
Tumorgröße [in mm] Mittelwert: 38,5 Median: 33,0 (1 bis 112)	< 38,5	24	60,0
	≥ 38,5	16	40,0
Tumorseite	rechts	26	57,8
	links	19	42,2
Tumorhistologie	≥ 1% Seminom	12	10,9
	≥ 1% Embryonalkarzinom	37	33,6
	≥ 1% Teratom	29	26,4
	≥ 1% Yolk-Sac Tumor	21	19,1
	≥ 1% Chorionkarzinom	11	10,0
Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN)	positiv	31	81,6
	negativ	7	18,4
Kontralaterale TIN	positiv	1	97,4
	negativ	37	2,6
Tumorstadium	pT1	23	56,1
	pT2	15	36,6
	pT3	3	7,3
Infiltration des rete testis	positiv	11	71,8
	negativ	28	28,2
Infiltration der tunica albuginea	positiv	7	31,8
	negativ	15	68,2
Invasion von lymphatischen Gefäßen	positiv	11	37,9
	negativ	18	62,1

Invasion von Blutgefäßen	positiv	10	29,4
	negativ	24	70,6
Klinisches Stadium	I	26	53,1
	II	12	24,5
	III	11	22,4
AFP [in ng/ml]	normal (< 7)	21	42,9
	erhöht (≥ 7)	28	57,1
βhCG [in U/l]	normal (< 1)	18	37,5
	erhöht (≥ 1)	30	62,5
LDH [in U/l]	normal (< 250)	33	73,3
	erhöht (≥ 250)	12	26,7
Prognose nach <i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i> (IGCCCG)	gut	2	14,3
	intermediär	5	35,7
	schlecht	7	50,0

2.2 Zelllinien

Folgende Keimzelltumor-Zelllinien wurden von Christine Jacobsen aus der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Dr. med. Friedemann Honecker, ehemals II. Medizinische Klinik des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, zur Verfügung gestellt:

<u>Zelllinie</u>	<u>Typ</u>	<u>Tumorart des Ursprungsgewebes</u>	<u>Literatur</u>
2102Ep	nullipotent EC	testikuläres TC + YST	Wang et al., 1980 Andrews et al., 1980
NCCIT	pluripotent EC	mediastinale EC + Seminom	Damjanov et al., 1993
NT2	pluripotent EC	Lungenmetastase eines ECs	Andrews, 1984
TCam-2	Seminom	testikuläres Seminom	Mizuno et al., 1993

Abk.: EC – Embryonales Karzinom, TC – Teratokarzinom, YST – Dottersacktumor

Des Weiteren wurden die korrespondierenden Cisplatin-resistenten Zelllinienklone NTERA-2-R (NT2-R), 2102EP-R, NCCIT-R in die Untersuchungen einbezogen.

Außerdem wurden Zelllysate/*Zytospins* folgender Mammakarzinom-Zelllinien als Positiv- und/oder Negativkontrollen verwendet: MCF-7 (Soule et al., 1973), MDA-MB-468 (Cailleau et al., 1978), MDA-MB-231 (Cailleau et al., 1974), ZR-75-1 (Engel et al., 1978).

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien

Hersteller

AB-Serum	BioRad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich
Aceton	J.T. Baker, Deventer NL
Acrylamidgel	National Diagnostic, Atlanta USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Farbstoffkonzentrat	
Dako REAL™	Dako, Glostrup DK
Antikörperversdünnungsmittel	
Dako REAL™ Envision™	Dako, Glostrup DK
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking-Lösung	Dako, Glostrup DK
DAPI VectaShield Medium	Vector Laboratories, Burlingame USA
3,3`-Diaminobenzidin DAB	Dako, Glostrup DK
Dimethylsulfoxid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Life Technologies , Paisley UK
Ethanol	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	PAA GmbH, Pasching
Full Range Rainbow RPN800	GE Healthcare, Freiburg

Ficoll-Plaque™ Plus	GE Healthcare, Uppsala SWE
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hanks` Salt Solution	Biochrom AG, Berlin
H-Lysepuffer	R & D Systems, Minneapolis USA
200 mM L-Glutamine	Invitrogen, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, München
Mayers Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer NL
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
Penicillin Streptomycin (10,000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin Peroxidase Lösung	Dako, Glostrup DK
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
0,25% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Paisley UK
Tween 20	Promega Corporation, Madison USA
Xylol	J.T. Baker, Deventer NL
Zitrat-Puffer	BioGenex, Fremont USA

2.4 Kitsysteme (Kits)

Verwendete Kits

Dako REAL™ *Detection System*

Dako REAL™ *EnVision™ Detection System*

Hersteller

Dako, Glostrup DK

Dako, Glostrup DK

2.5 Antikörper

<u>Antigen (monoklonal)</u>	<u>Klon</u>	<u>Wirt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Primärantikörper:				
CD30	Ber-H2	Maus	Dako, Glostrup DK	1:10 (ICC); 1:500 (WB); 1:20 (IHC)
CD45, konjugiert mit Alexa Fluor 488	H130	Maus	BioLegend, San Diego US	1:150 (ICC)
E-Catherin	36/E- Cadher- in	Maus	BD Transduction Laboratories, San Jose US	1:10000 (WB)
Epithelspezifisches Antigen (EpCAM)	VU-1D9	Maus	Novocastra, Bucks UK	1:1000 (WB)
Glypican-3 (GPC-3)	1G12	Maus	BioMosaics, Burlington US	1:500 (ICC); 1:1000 (WB); 1:50 (IHC)
GRHL2 (polyklonal)	BOM- P2	Kaninchen	— *	1:300 (IHC); 1:200 (ICC)
HSC70	B-6	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1000000 (WB)
IgG1 κ	MOPC- 21	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis US	1:500 (ICC)
N-Catherin	EPR179 -2Y	Kaninchen	Novus Biologicals, Cambridge UK	1:20000 (WB)
Pan-Keratin (CK8,18,19)	A45- B/B3	Maus	Micromet AG, München	1:500 (WB)
Vimentin	RV202	Maus	BD Pharmingen, San Jose US	1:100000 (WB)

Material

Keratin 7	OV- TL12/30	Maus	Dako, Glostrup DK	1:10000 (WB)
Keratin 8	Ks 8.7	Maus	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	1:50000 (WB)
Keratin 18	Ks 18.04	Maus	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	1:1000 bzw. 1:50000 (WB)
Keratin 19	Ks 19.1	Maus	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	1:10000 (WB)

Sekundärantikörper:

Alexa Fluor 555 Maus IgG <i>Biotinylated</i> <i>Secondary Mouse</i> <i>Antibodies</i>		Ziege	Life Technologies, Eugene US	1:200 (ICC)
		Kaninchen	Dako, Glostrup DK	1:1 (IHC)
Maus-Immunglobuline, HRP konjugiert (polyklonal)		Kaninchen	Dako, Glostrup DK	1:2000 (WB)
Kaninchen-Ig, HRP konjugiert (polyklonal)		Schwein	Dako, Glostrup DK	1:2000 (WB)

*Hinweis: Der Anti-GRHL2-Antikörper wurde freundlicher Weise von Dr. rer. nat. V. Assmann, Institut für Tumorbologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

2.6 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

2.6.1 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der Kulturmedien bestand aus:

- 88% (v/v) Standard-Medium: RPMI für TCam-2; DMEM für alle anderen Zelllinien
- 10% (v/v) FCS
- 1% (v/v) 200 mM L-Glutamine
- 1% (v/v) Penicillin Streptomycin (10,000 U/ml)

2.6.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden Puffer und Lösungen aufgeführt, die wie folgt zusammengesetzt wurden:

Blockierungslösung:

Waschpuffer	1x
Milchpulver	5% (w/v)

ECL-Lösung:

Luminol	100 µl
P-Cumarinsäure	44 µl
H ₂ O	18 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,5)	2 ml
30% H ₂ O ₂	6 µl

Laemmli-Laufpuffer:

Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)
Tris/HCl (pH 8,3)	25 mM

NP-40-Lysepuffer:

NaCl	150 mM
Nonidet P-40	1% (w/v)
Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM

Probepuffer:

SDS	2% (w/v)
Glycerol	20% (w/v)
Tris-HCL (pH 6,8)	120 mM
Bromphenolblau	0,01% (w/v)

Material

Sammelgel:

H ₂ O	2,7 ml
Acrylamid	670 µl
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	500 µl
10% SDS	40 µl
10% Ammoniumpersulfat	40 µl
Temed	4 µl

TBS:

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Tris/HCl(pH 8,0)	50 mM

Transferpuffer:

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,04% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

Trenngel:

Zusammensetzung:	6%	8%	10%
H ₂ O	2,6 ml	2,3 ml	2,0 ml
Acrylamid	1,0 ml	1,3 ml	1,6 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl
10% Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	50 µl
Temed	4 µl	3 µl	2 µl

Waschpuffer:

PBS	1x
Tween-20	0,05%

2.7 Verbrauchsmaterial und Zubehör

<u>Verbrauchsmaterial/Zubehör</u>	<u>Hersteller</u>
<i>DakoPen</i>	Dako, DK
Hybond-ECI Nitrozellulose-Membran	GE-Healthcare, Freiburg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Objektträger	In vitro diagnostic, Sondheim
15-ml-Röhrchen	VWR, Darmstadt
SE250 Minigelkammern	GE-Healthcare, Freiburg
T25-Zellkulturflasche	Nunc, Wiesbaden
Whatmann-Filter	VWR, Darmstadt
8-ml-ZYTO-Kammern	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlengern
ZYTO Spannplatte	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlengern

2.8 Geräte

<u>Laborgeräte</u>	<u>Hersteller</u>
AGFA Curix Filmentwickler	AGFA-Healthcare, Belgien
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Dampfdruckinkubator	Biocare Medical, USA
Gelhalteapparatur	Amersham Biosciences Corp, San Francisco USA
Hera150-Brutschrank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Rotofix 32 Zentrifugen	Hettich Holding GmbH & Co. oHG, Kirchlengern
PS3002 Elektrophorese-Gerät	Life Technologies , Paisley UK
Trans-Blot Transferapparat	BioRad, München
Trockenschrank	Medite GmbH, Burgdorf
Zentrifuge Heraeus 3S-R	Kendro, Langselbold

Als Mikroskop wurde das Axioplan 2 *imaging* Mikroskop mit eingebauter AxioCam MRc Kamera und HXP 120 Lampe (Carl Zeiss, Jena) verwendet.

3 METHODEN

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Auftauern und Einfrieren der Zelllinien

Die Zelllinien wurden mit Dimethylsulfoxid versetzt in Kryoröhrchen bei – 80 °C gelagert. Um die in diesen Röhrchen konservierten Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie für wenige Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit Kulturmedium vermischt und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Das Kulturmedium stoppte die toxische Wirkung des Dimethylsulfoxids. Nach Zentrifugation für 3 min bei 1200 rpm wurde das Zellpellet, nachdem man den Überstand verworfen hatte, mit 3 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und in eine zuvor mit 5 ml Kulturmedium aufgefüllte T25-Zellkulturflasche hineingegeben. Zur Kultivierung wurden die Kulturflaschen im Hera150-Brutschrank bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ für TCam-2 bzw. 10% CO₂ für die restlichen Zelllinien gelagert. Das Einfrieren erfolgte in umgekehrter Reihenfolge. Dabei wurde ein Kryoröhrchen mit 1 ml Zellsuspension und 100 µl Dimethylsulfoxid gefüllt.

3.1.2 Passagieren der Zelllinien

Im Abstand von 3-4 Tage wurde überprüft, ob die Zellsaat im Inkubationsschrank einen Konfluenzgrad von über 80% erreicht hat. Wenn dies zutraf, wurde ein Teil der Zellen einer Kulturflasche in eine neue Flasche überführt. Hierfür wurde zuerst das Medium mit *Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline* (PBS) abgespült. Anschließend wurden 1 ml für T25-Kulturflaschen bzw. 2 ml für T70 Kulturflaschen Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 2-5 min wurde die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden im Lichtmikroskop überprüft und die Enzymreaktion durch die Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension in einem 15-ml-Röhrchen für 3 min bei 1200 rpm. Der Überstand konnte verworfen und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert werden. Zuletzt wurde je nach Pelletgröße ein Teil der Suspension in eine neue Kulturflasche pipettiert, zusätzlich Kulturmedium hinzugegeben und die

Kulturflasche in den entsprechenden Brutschrank zur Inkubation gelegt. Bei einem Konfluenzgrad unter 80% reichte es aus, das alte Medium durch neues zu ersetzen.

3.1.3 Herstellung der *Zytospins*

Zur Herstellung von *Zytospins* der Zelllinien wurden die gleichen Arbeitsschritte wie beim Passagieren (siehe Kapitel 3.1.2) angewandt, um ein Zellpellet zu erhalten. Dieses wurde dann mit 10 ml PBS suspendiert. Die Objektträger wurden in der ZYTO Spannplatte zusammen mit 8-ml-ZYTO-Kammern über die Spannringe befestigt. In diese Kammern wurden dann nach Zelldichte je 100 – 600 µl Zellsuspension pipettiert und in Rotofix 32 Zentrifugen für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen der Restflüssigkeit aus den Kammern wurden die *Zytospins* herausgenommen und nach dem Trocknen je 2 Objektträger Rücken an Rücken bei – 80 °C in Aluminiumfolie umwickelt gelagert.

3.2 Analyse der Proteinexpression

3.2.1 Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren, mit dem bestimmte Proteine in Zelllysaten nachgewiesen werden können. Sie ermöglicht gleichzeitig eine Beurteilung der Expression dieser Proteine. Via Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) erreicht man die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die spezifischen Proteinbanden werden mit Hilfe von Primär- und Sekundärantikörpern sichtbar gemacht.

3.2.1.1 Herstellung der Zelllysate

Zur Herstellung des Zellextraktes für die Western-Blot-Analyse wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst. In einem 1,5-ml-

Reaktionsgefäß wurde die Zellsuspension für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Bei einer Inkubationszeit von 20-30 min auf Eis und gelegentlichem Schwenken des Reaktionsgefäßes konnte das Zellpellet nun mit dem NP-40-Lysepuffer lysiert werden. Das Volumen des Puffers richtete sich hierbei nach der Zelldichte. Nach Zentrifugation für mindestens 10 min mit 13200 rpm bei 4 °C wurde das aus Zelltrümmern bestehende Sediment verworfen. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 90 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Da die Proben für die Western-Blot-Analyse ähnliche Proteinmengen enthalten sollten, musste die Proteinkonzentration ermittelt werden. Hierfür wurden 2 µg Lysat mit 798 µl Natronlauge und 200 µl Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat versetzt, bevor die Extinktion photometrisch bei 595 nm gemessen wurde. Über die Extinktion konnte dann die Konzentration durch die Eichkurvengleichung bestimmt werden.

3.2.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zuerst das Trenngel angesetzt, dessen Polyacrylamid-Gehalt sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins richtete. Nach dem Vermischen mit TEMED wurde der Ansatz in die SE250 Minigelkammern zur Aushärtung gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser verworfen, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm zwischen die Platten eingetaucht. Anschließend wurde die Gelelektrophorese-Halteapparatur zusammengesetzt und mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt, sodass je 30 µg der zuvor erneut bei 95 °C für 5 min denaturierten Proben in die Taschen pipettiert werden konnten. Zusätzlich diente der Molekulargewichtsstandard Full Range Rainbow RPN800 zur Bestimmung der Molekulargewichte. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel für ca. 60 min, bis

die blaue Lauffront ausgelaufen war.

3.2.1.3 Semidry-Elektrotransfer

Im nächsten Schritt wurden die Proteine im Semidry-Blotverfahren aus dem Gel auf eine proteinbindende Hybond-ECL Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierfür wurden die Nitrozellulose-Membran und vier Whatmann-Filter auf Gelmaße zugeschnitten und mit Transferpuffer equilibriert. Auf die Anodenplatten des Transferapparates wurden auf zwei Whatmann-Filter die Nitrozellulose-Membran und darauf das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurde das Gel mit den restlichen zwei Whatmann-Filtern bedeckt und der Elektrotransfer für 2 h bei 40 mA pro Blot durchgeführt.

3.2.1.4 Blockierung und Immunodetektion

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper wurde nach erfolgtem Transfer die Membran für 1 h in Blockierungslösung eingelegt. Danach wurde sie mit dem Primär-Antikörper (verdünnt in Blockierungslösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer für je 5 min wurde die Membran von Restbeständen des Antikörpers befreit und konnte anschließend mit dem Sekundär-Antikörper nach entsprechender Verdünnung mit Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubieren. Erneut wurden Restbestände 4x mit Waschpuffer für je 5 min ausgewaschen. Bevor der Röntgenfilm in der Dunkelkammer aufgelegt werden konnte, wurde die Membran in ECL-Lösung für 5 min inkubiert.

3.2.1.5 Ladekontrollen

Nach erfolgter Entwicklung des Röntgen-Films wurde die Membran zur Ladekontrolle vorbereitet. Mit diesem Verfahren wurde kontrolliert, ob in jede Geltasche die gleiche Proteinmenge pipettiert wurde. Hierfür wurden zuerst die an der Membran haftenden Antikörperbestände mit Waschpuffer für 30 min

weitestgehend entfernt. Anschließend wurden die Arbeitsschritte ab Kapitel 3.2.1.4 wiederholt. Als Primärantikörper wurde der Anti-HSC70 Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000000 benutzt, der an das konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein HSC70 bindet. Gleichstarke Banden im Röntgenbild galten als hinreichender Beweis dafür, dass die angewandten Proteinmassen keine groben Unterschiede aufwiesen, die die vorherigen Ergebnisse verfälschen könnten.

3.2.2 Immunhistochemische Analysen an in Paraffin eingebettetem Gewebe

Neben dem Western-Blot-Verfahren erfolgten weitere Proteinexpressionsanalysen durch immunhisto- und immunzytochemische Färbungen (IHC bzw. ICC) von paraffinierten Gewebepreparaten bzw. *Zytospins*. Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Kitsysteme *Dako REAL™ Detection* bzw. *Dako REAL™ EnVision™ Detection* verwendet.

Die immunhistochemische Färbung der Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte erfolgte in drei Schritten: Entparaffinierung, Vorbehandlung und Färbung. Zum Herauslösen des Paraffins wurden die Gewebeschnitte im Trockenschrank für 2 h bei 60 °C erhitzt und anschließend in folgender absteigender Alkoholreihe rehydriert: 2 x 10 min Xylol, 2 x 2 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 96% Ethanol, 2 x 80% Ethanol, destilliertes Wasser. Danach wurden die Schnitte zur Vorbehandlung im dem Dampfdruckinkubator für 5 min bei 125 °C in Zitrat-Puffer inkubiert. Abgekühlt wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und für 5 min mit TBS + 0.05% (v/v) Tween 20 (TBS-T) gewaschen. Damit war die Vorbehandlung abgeschlossen.

Für die Nutzung des *Dako REAL™ EnVision™ Detection* Kitsystems erfolgte anschließend die Blockierung endogener Peroxidase durch die Inkubation mit *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking-Lösung* für 5 min. Restbestände wurden daraufhin für 5 min mit TBS-T abgewaschen. Der Primär-Antikörper wurde mit *Dako REAL™* Antikörper-Verdünnungsmittel verdünnt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug antikörperspezifisch für Anti-GRHL2 60 min und für GPC-3 30 min. Nachdem Rückstände des Antikörpers mit TBS-T dreimal für je 3 min abgewaschen wurden, konnten die Gewebeschnitte für 15 min mit *Dako REAL™*

Envision™ inkubiert werden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T für je 3 min wurde zur Detektion für 15 min im Verhältnis 1:50 verdünntes DAB (3,3'-Diaminobenzidin) verwendet. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 2 sec in Mayers Hämalaun-Lösung gelegt und 1 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurde in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und mit *Eukitt®* eingedeckelt.

Für die Nutzung des *Dako REAL™ Detection* Kitsystems folgte nach der Vorbehandlung die Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min. Daraufhin wurde 3x mit TBS-T für je 3 min gewaschen und für 30 min mit der *Biotinylated Secondary Antibodies* Lösung des Kits inkubiert. Anschließend fand nach erneutem Waschvorgang die Blockierung mit *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking-Lösung* für 5 min statt. Nachdem auch hier gewaschen wurde, wurden die Gewebeschnitte für 10 min mit der Streptavidin Peroxidase Lösung inkubiert. Abschließend konnten die Behandlung mit DAB, die Gegenfärbung und das Eindeckeln folgen.

3.2.3 Immunzytochemische Analysen

Für die immunhistochemische Färbung der *Zytospins* wurden die Zellen nach dem Auftauen zur Fixierung für 15 min mit 4% Paraformaldehyd/PBS inkubiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch 1% Triton-X/PBS für 5 min. Nachdem die Reste 3x mit PBS für je 3 min gewaschen wurden, wurde für 5 min mit der Peroxidase-Blocking-Lösung inkubiert. Der dreimalige Waschvorgang mit TBS-T für je 3 min wurde hier und auch nach jedem der folgenden Schritte wiederholt. Der Primärantikörper wurde zur Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Anschließend wurden die weiteren Schritte mit dem *Dako REAL™ EnVision™ Detection* Kitsystems ausgeführt. Es wurde mit der *Dako REAL™ Envision™-Lösung* für 15 min inkubiert und anschließend wurde DAB, 1:50 verdünnt, für 10 min aufgetragen. Die *Zytospins* konnten nun in destilliertes Wasser überführt werden. Die Gegenfärbung erfolgte in 20% Mayers Hämalaun/H₂O für 20 sec. Nach Passierung der aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 x 2 min: 80%, 96%, 100% Ethanol, Xylol) wurden die Objektträger mit *Eukitt®* eingedeckelt.

3.2.4 Expressionsanalyse an *Zytopins* durch Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Zelllinienpräparaten wurden diese vorerst für 30 min in Raumtemperatur aufgetaut und der Bereich um die Zellen kreisförmig mit dem wasserabweisenden *DakoPen* markiert, damit sichergestellt war, dass im späteren Verlauf die Antikörperlösungen auf dem Objektträger verblieben. Die Zellen wurden anschließend mit Aceton für 5 min fixiert und mit PBS für 3 min gewaschen. Es folgten die Permeabilisierung mit Triton-X und ein erneuter Waschvorgang, bevor für 20 min mit 10% AB-Serum/PBS inkubiert wurde. Danach wurde für 45 min der mit AB-Serum verdünnte Primärantikörper hinzugegeben, 3x mit PBS für je 3 min gewaschen und für 45 min der ebenfalls mit AB-Serum im Verhältnis 1:200 verdünnte Alexa Fluor 555 Antikörper aufgetragen. Hierbei war darauf zu achten, dass die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und alle folgenden Schritte im Dunkeln stattfanden. Nachdem auch hier der nicht gebundene Antikörperanteil abgespült wurde, folgten die Gegenfärbung mit DAPI VectaShield Medium und das Eindeckeln per Fixation der Ränder des Deckgläschens mit herkömmlichem Nagellack.

3.3 Anreicherung mononukleärer Zellen aus Blutproben mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

Die Anreicherung von Tumorzellen aus Patientenblut erfolgte durch Paulina Nastalą über die Aufarbeitung von Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Plaque™ Plus. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit Blut von gesunden Personen aufgearbeitet. Diese Blutproben wurden teilweise mit Tumorzellen aus Zellliniensuspensionen versetzt und dienten zur Kontrolle für die Effizienz der Immunfärbemethoden. Das Blut wurde mit 4°C kalter *Hanks` Salt* Lösung auf 50 ml verdünnt und anschließend bei 1400 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand beinhaltete das Blutplasma und konnte entfernt werden. Das Zellsediment wurde mit PBS auf 30 ml aufgefüllt und resuspendiert, mit 20 ml Ficoll-Plaque™ Plus vorsichtig überschichtet und für 30 Minuten bei 4°C und 1400 rpm mit langsamem Anlauf und ohne Bremse zentrifugiert, sodass der Inhalt nach der Dichte

in folgende drei Schichten aufgetrennt wurde, ohne dass sie sich vermischten: Serumreste im Überstand, mononukleäre Zellen in der Interphase, Erythrozyten und Granulozyten in der unteren Phase/im Sediment. Überstand und Interphase wurden entfernt und erneut in PBS für 10 min bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert. Restliche Erythrozyten wurden unter drei minütigem Schwenken mit 1 ml H-Lysepuffer lysiert und nach Zentrifugation für 10 min bei 1400 rpm und 4°C als Überstand verworfen. Das Sediment konnte nun mit 10 ml PBS verdünnt werden. Mit den Zellsuspensionen wurden daraufhin *Zytospins* hergestellt (siehe Kapitel 3.2.1.1).

3.4 Detektion von CTC über Immunfluoreszenz unter Verwendung des Antikörpercocktails (GPC-3/CD30)

Zur Detektion von vereinzelt Tumorzellen auf *Zytospins*, die nach der Aufarbeitung des Bluts (siehe Kapitel 3.3) weitestgehend mononukleäre Zellen enthielten, wurde ein Primärantikörpercocktail eingesetzt, der aus Anti-Glypican-3 (GPC-3) und Anti-CD30 Antikörper zusammengesetzt wurde. Beide Antikörper werden bei testikulären Keimzelltumoren in der klinischen Routine zu diagnostischen Zwecken verwendet. Das Heparansulfat-Proteoglykan Glypican-3 ist ein Marker, der im Dottersacktumor, Chorionkarzinom und seltener im Embryonalkarzinom und Teratom exprimiert ist (Zynger et al., 2006). Die Expression der Tumornekrosefaktor-Rezeptors CD30 liegt v.a. im Embryonalkarzinom vor (Pallesen & Hamilton-Dutoit, 1988). Die Arbeitsschritte zur Immunfluoreszenzfärbung entsprachen denen, die im Kapitel 3.2.4 aufgeführt wurden. Damit Leukozyten, die CD30 oder GPC-3 positiv waren, von markierten Tumorzellen unterschieden werden konnten, erfolgte eine weitere Immunfärbung, die nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt wurde. Es wurde der Primärantikörper gegen das leukozytenspezifische Oberflächenprotein CD45 aufgetragen. Zellen, die positiv für CD45 waren, wurden als Leukozyten und Zellen, die GPC-3- u./o. CD30-positiv und CD45-negativ waren, wurden als Tumorzellen gewertet.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS Statistics ver. 20.0 (International Business Machines Corporation, USA). Korrelationen zwischen unabhängigen Merkmalen wurden durch den Exakten Test nach Fisher ermittelt, der einen exakten Chi-Quadrat-Test für einen kleinen Stichprobenumfang ermöglichte. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt ($p < 0,05$). Die Datenerfassung und die Erstellung von Tabellen und Diagrammen erfolgten mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2010 ver. 14.0 (Microsoft Corporation, USA).

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von testikulären Keimzelltumorkomponenten zur Bestimmung neuer CTC-Detektionsmarker

In unserer Arbeitsgruppe gelang erstmalig die Detektion von CTC bei einer größeren Kohorte von Patienten mit testikulären Keimzelltumoren (Nastały et al., 2014). Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit jedoch deutlich, dass sich die Detektion von CTC für diese Tumorart im Vergleich zu einigen anderen Karzinomarten als schwierig darstellte. Dies war der stärkeren Heterogenität dieser Tumorentität zuzuschreiben, die häufig aus verschiedenen Tumorkomponenten besteht. An diese Arbeit anknüpfend war es das Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens, neue Proteinmarker zu bestimmen, die die immunzytochemische Methode zur CTC-Detektion ergänzen sollten. Die Wahl der Marker erfolgte über die Charakterisierung von vier Keimzelltumorzelllinien durch Western-Blot-Analyse und Immunzytochemie. Hierbei waren sowohl keimzelltumorspezifische als auch epitheliale und mesenchymale Marker von Interesse.

4.1.1 Analyse epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Marker durch das Western-Blot-Verfahren

Die Bestimmung der Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern in den vier Keimzelltumorzelllinien und drei Zelllinienklonen erfolgte über eine Western-Blot-Analyse. Hierfür wurden die Zelllysate und Antikörper gegen 7 epitheliale und 2 mesenchymale Proteine eingesetzt. Die Ladekontrollen zeigten keine größeren Unterschiede in den verwendeten Proteinmengen.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse epithelialer Marker werden in Abbildung 4.1 dargestellt. Für E-Cadherin ist ersichtlich, dass dieser Marker in der Zelllinie 2102Ep exprimiert war, während in den restlichen Zelllinien keine Expression nachgewiesen werden konnte. EpCam war besonders stark in der Zelllinie 2102Ep, vergleichsweise weniger stark in der Zelllinie TCam-2 und schwach in den restlichen Zelllinien exprimiert. Die Anwendung des Anti-Pan-Keratin

Antikörpers A45-B/B3 ergab, dass alle getesteten Zelllinien Keratine exprimieren. Die Analyse unter Verwendung der Antikörper gegen die Keratine 7, 8, 18, 19 hat gezeigt, dass die Keratine 18, 19 in der Zelllinie 2102Ep exprimiert waren, während die Keratine 7 und 8 in den verwendeten Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnten.

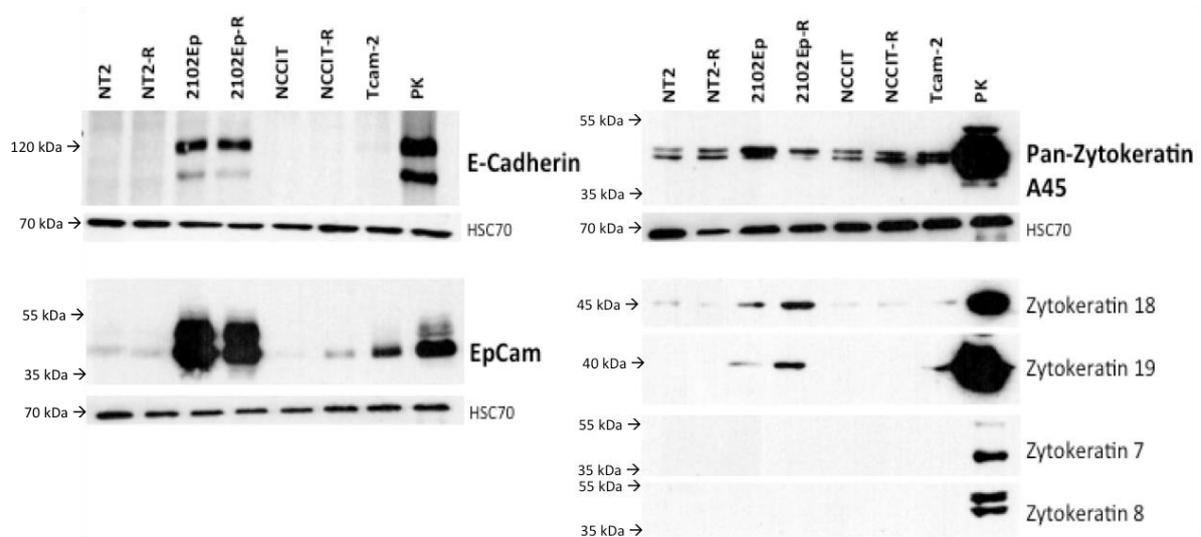


Abbildung 4.1: Western-Blot-Analyse epithelialer Marker in Zellextrakten der untersuchten Keimzelltumorzelllinien. Die Kontrolle der geladenen Proteinmenge erfolgte über Western-Blot-Analyse des HSC70-Proteins. Abk.: PK – Positivkontrolle

Die Resultate der Western-Blot-Analysen der mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin werden in Abbildung 4.2 aufgezeigt. Während das Protein N-Cadherin in allen untersuchten Zelllinien exprimiert war, ergab die Analyse des Proteins Vimentin keine Expression in der Zelllinie 2102Ep. Des Weiteren zeigte sich in der Zelllinie NT2 eine schwächere Vimentin-Expression als im Cisplatin-resistenten Zelllinienklon NT2-R. In der Zelllinie NCCIT hingegen war das Protein Vimentin stärker als im Cisplatin-resistenten Zelllinienklon NCCIT-R exprimiert.

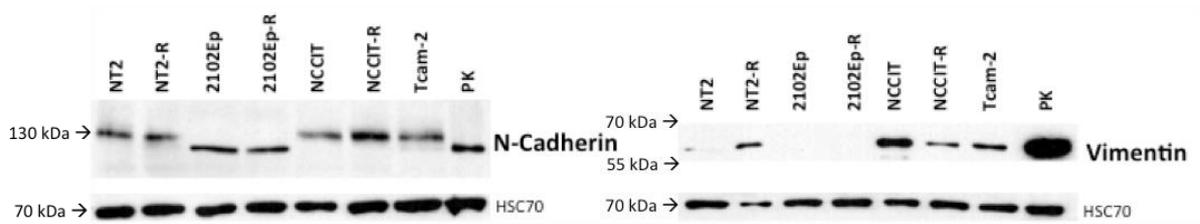


Abbildung 4.2: Western-Blot-Analyse der Expression mesenchymaler Marker. Expression von N-Cadherin und Vimentin in Zellextrakten der gezeigten Zelllinien. Zur Ladekontrolle erfolgte die Western-Blot-Analyse des HSC70-Proteins. Abk.: PK – Positivkontrolle

Als weitere Marker-Kandidaten galten die Proteine Glypican-3 und CD30, welche unter anderem in der Diagnostik von Keimzelltumoren Anwendung finden. Die Western-Blot-Analysen ergaben, dass das Protein Glypican-3 verstärkt in den Zelllinien NT2 und NCCIT und das Protein CD30 vor allem in den Zelllinien 2102Ep und NT2 exprimiert waren (vgl. Abbildung 4.4). Für Glypican-3 war ein Schmiereffekt von 120 kDa bis ca. 250 kDa zu beobachten. Dieser entstand durch die unterschiedliche Glykosylierung des Proteins (Capurro et al., 2005). Des Weiteren wurde festgestellt, dass CD30 in den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen nicht nachweisbar war.

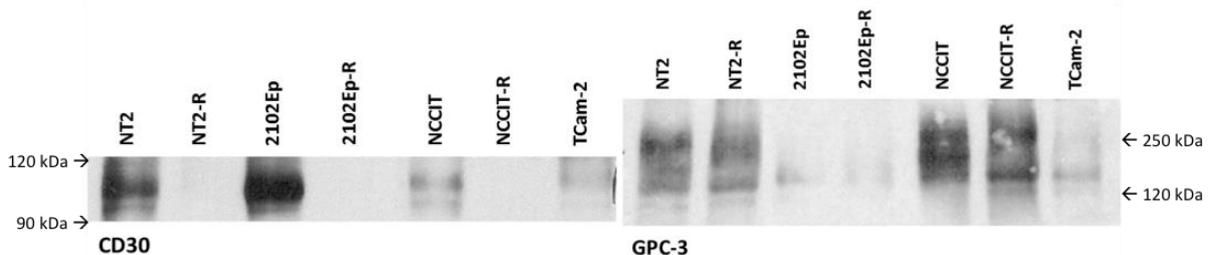


Abbildung 4.3: Western-Blot-Analyse der Keimzelltumormarkern CD30 und GPC-3 in Zellextrakten der gezeigten Zelllinien. In den nicht-seminomatösen Zelllinien (NT2, 2102Ep u. NCCIT) wurde mindestens eines der beiden Markerproteine nachgewiesen.

4.1.2 *Grainyhead-like-2*-Expression in testikulären Keimzelltumoren

Ein besonderes Augenmerk galt dem Protein *Grainyhead-like-2* (*GRHL2*), dem eine große Bedeutung in der epithelialen-mesenchymalen Transition von Mammakarzinoma beigemessen wird (Werner et al., 2013). Die *GRHL2*-Expression in Keimzelltumoren sollte unter Anwendung immunhistochemischer Analysen von Keimzelltumorzelllinien und Patientenproben beurteilt werden.

Die Optimierung des Protokolls der immunhistochemischen Färbung unter Verwendung des Anti-*GRHL2*-Antikörpers erfolgte an Tumorgewebeschnitten von zehn Hodenkrebspatienten und einem Non-Hodgkin-Patienten, der als Negativkontrolle diente. Eine Probe galt als positiv, wenn über 30% der Zellen gefärbt waren. Die Farbsignale der Zellen unterschieden sich in ihrer Intensität, sodass die Auswertung vorgenommen wurde, indem eine repräsentative Anzahl an Tumorzellen eines Präparates (ca. 120 bis 250 pro Objektträger) entsprechend der Intensität der Immunreaktion als stark, moderat oder schwach klassifiziert wurde. Diese Einteilung wird in Abbildung 4.4 an immungefärbten Zellen der Keimzelltumorzelllinien beispielhaft dargestellt.

Diese immunhistochemische Auswertung der zehn Patientenproben ergab, dass ein Präparat eine starke, fünf eine moderate und vier eine schwache Farbintensität aufwiesen.

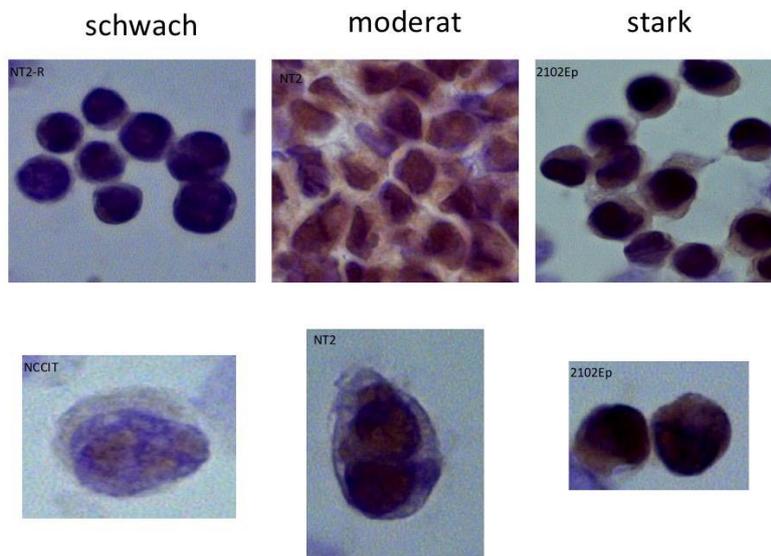


Abbildung 4.4: Klassifikation der Intensität der Immunreaktion.

Immunhistochemisch gefärbte Zellen zeigten unterschiedlich starke nukleäre GRHL2-spezifische Signale. Beispielhaft sind Zellen der Keimzelltumorzelllinien dargestellt, die eine schwache, moderate oder starke Farbintensität aufwiesen. Braun – nukleäre GRHL2- Expression; blau – Gegenfärbung des Zellkerns mit Hämalaun.

Die Analyse der GRHL2-Expression in den Keimzelltumorzelllinien NT2, NCCIT, 2102Ep, TCam-2 und den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen NT2-R, NCCIT-R und 2102Ep-R erfolgte durch die immunhistochemische Färbung von *Zytospins*. Die *Zytospins* der Zelllinien wurden hergestellt, indem die Zellen der Zellsuspensionen durch Zentrifugation auf Objektträger fixiert wurden (siehe Kapitel 3.1.3).

Die Auswertung der Intensität der Immunreaktion wird in Abbildung 4.5 aufgeführt. Sie zeigt, dass die Zelllinien 2102Ep und 2102Ep-R eine stärkere GRHL2-Expression aufwiesen als die anderen untersuchten Zelllinien. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Expression im Cisplatin-resistenten Zelllinienklon 2102Ep-R schwächer war als in der Zelllinie 2102Ep.

A

Zelllinie	% Intensität der Immunreaktion		
	schwach	moderat	stark
TCam-2	53	47	0
NT2	51	44	6
NT2-R	42	56	2
NCCIT	47	54	0
NCCIT-R	69	25	6
2102Ep	9	51	40
2102Ep-R	9	82	9
MCF7	0	42	58

B

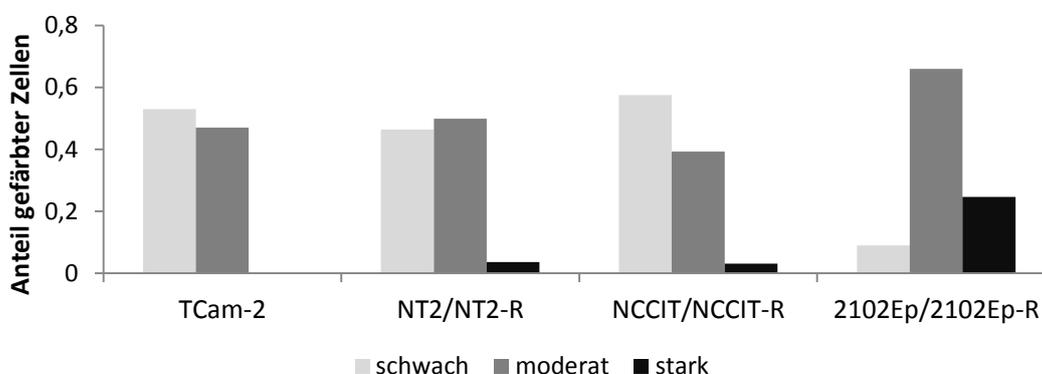


Abbildung 4.5: GRHL2-Expression in Keimzelltumorzelllinien. A, Auswertung der immunhistochemischen Farbintensität. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie MCF7. B, Schematische Darstellung der Anteile an schwacher, moderater und starker Farbintensität der *Zytospins*. Die Zelllinie 2102Ep zeigte einen höheren Anteil an moderater und starker GRHL2-Expression.

Zur Analyse der GRHL2-Expression in testikulären Keimzelltumoren erfolgte neben der Untersuchung der Keimzelltumorzelllinien die immunhistochemische Auswertung von 155 Gewebeproben eines *tissue-microarray*. Insgesamt waren 85 von 155 (55%) Proben positiv für GRHL2. Von diesen 85 positiven Proben waren 29 von 49 (59%) Teratome, 38 von 77 (49%) Seminome und 18 von 29 (62%) Nichtseminome. Bis auf 18 (12%) Proben, die moderat gefärbt waren, wurde bei allen Proben eine schwache Farbintensität beobachtet. Diese 18 Proben setzten sich aus 14 Teratomen, 2 Seminomen und 2 Nichtseminomen zusammen. Während also der Anteil an positiven Proben für alle drei Tumorkomponenten keine großen Unterschiede erkennen ließ besaßen die positiven Zellen der Teratome eine stärkere

Farbintensität als seminomatöse und nicht-seminomatöse Zellen (vgl. Abbildung 4.6).

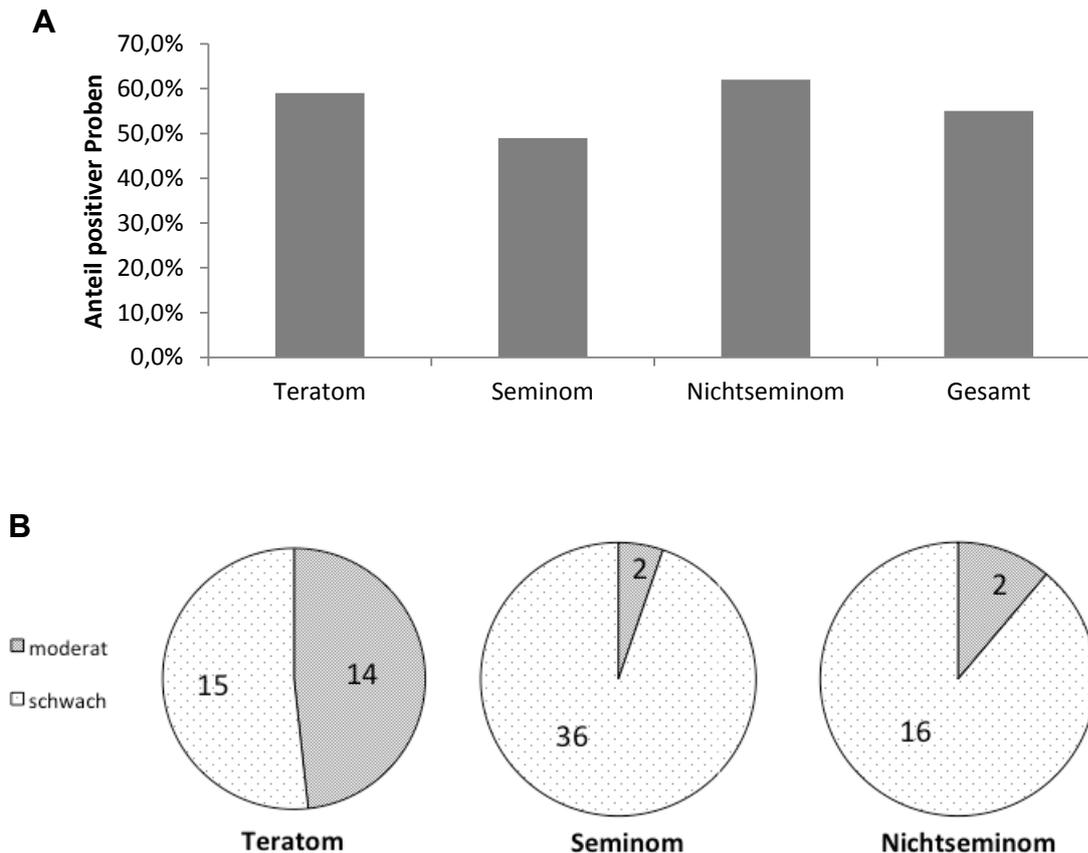


Abbildung 4.6: Immunhistochemische Auswertung der GRHL2-Expression in 155 Patientenproben. A, Darstellung der Anteile positiver Befunde. Insgesamt waren 55% der Proben GRHL2-positiv. Die Anteile positiver Proben unter den drei Keimzelltumorarten variieren von 49-62%. B, Darstellung der Anteile moderat und schwach gefärbter Proben unter den positiven Befunden. Das Teratom zeigte eine stärkere GRHL2-Expression als Seminome und Nichtseminome.

4.2 Detektion von CTC durch die Keimzelltumormarker CD30 und Glypican-3

Nachdem im ersten Teil der Promotionsarbeit die Analyse der Expression epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Proteine in Keimzelltumoren durchgeführt wurde, folgte im zweiten Teil die Verwendung der Marker CD30 und GPC-3 zur Detektion von CTC in den Blutproben des Patientenkollektivs.

Nach Optimierung des Protokolls der Immunfärbung mit Hilfe des Primärantikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 und des Primärantikörpers CD45 wurde eine Reihe von Tests durchgeführt, bevor das Verfahren an Blutproben des Patientenkollektivs angewandt werden konnte.

Der erste Test bestand aus der Analyse der Expression der Proteine CD30 und GPC-3 in den Keimzelltumorzelllinien NT2, NCCIT, 2102Ep und TCam-2 durch die Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 (vgl. Abbildung 4.7). Das Resultat stimmte mit dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 4.1.1) überein. So war in den nicht-seminomatösen Zelllinien NT2, NCCIT und 2102Ep die Expression der Proteine CD30 und/oder GPC-3 nachzuweisen. Die seminomatöse Zelllinie TCam-2 zeigte sich CD30-/GPC-3-negativ. Die Untersuchung einer repräsentativen Anzahl an Zellen (100-150 Zellen pro Objektträger) hat ergeben, dass NT2-Zellen zu 90%, NCCIT-Zellen zu 73% und 2102Ep-Zellen zu 78% CD30- und/oder GPC-3-positiv waren. Alle verwendeten Zelllinien waren gleichzeitig CD45-negativ.

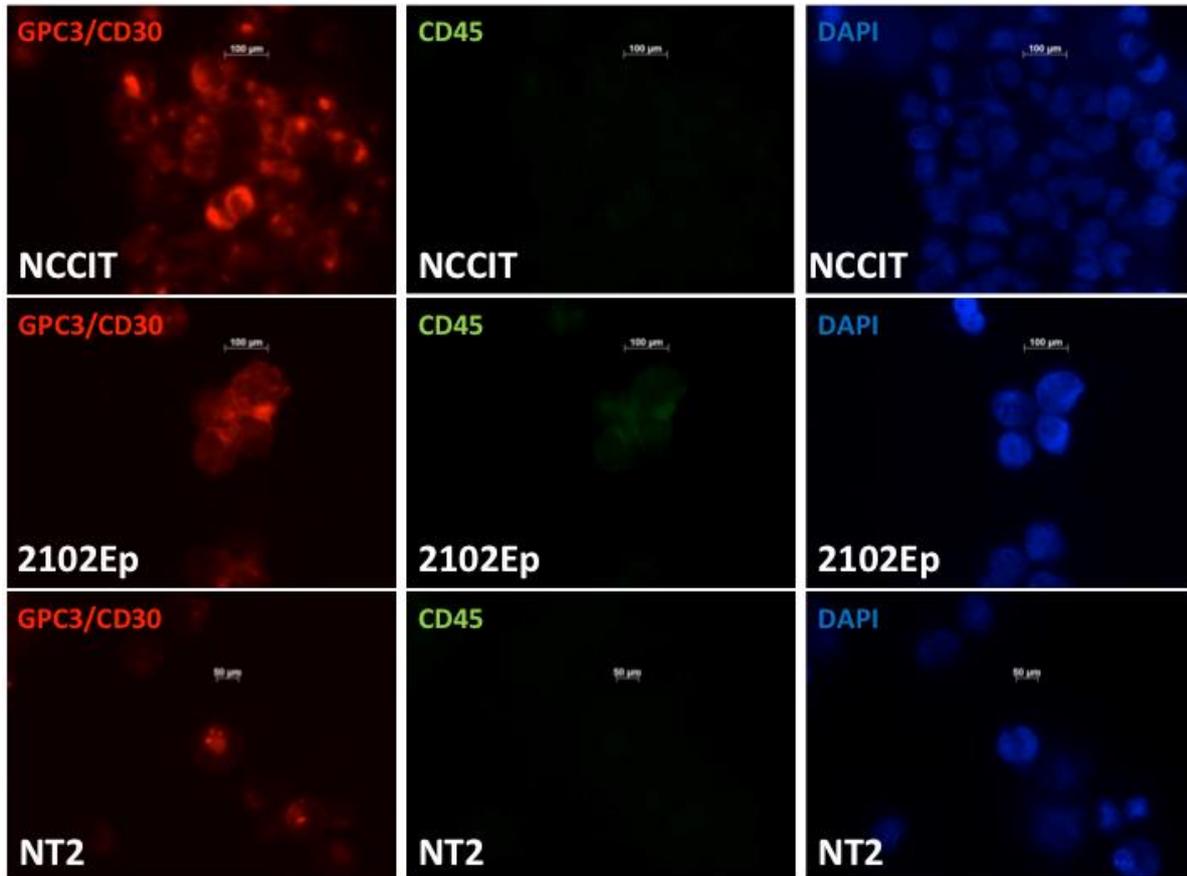


Abbildung 4.7: Immunfluoreszenzfärbung an *Zytospins* der untersuchten nicht-seminomatösen Zelllinien. Die Zelllinien NCCIT, 2102Ep und NT2 sind CD30/GPC-3-positiv und CD45-negativ. Die DNA-Färbung erfolgte durch DAPI.

Da beide Antikörper (Anti-CD30 u. Anti-GPC-3) aus Mäusen stammten, war eine Differenzierung der Proteinexpression mit Hilfe von zwei verschiedenen Sekundärantikörpern nicht möglich. Die Immunfluoreszenz-Färbung ergab jedoch, dass die Expression von CD30 vor allem an der Zellmembran lokalisiert war und GPC-3 zusätzlich granulär-zytoplasmatische Anteile aufwies (Kim & Kang, 2013; Alimchandani et al., 2014). Die Unterscheidung zwischen CD30- und GPC-3-Expression konnte somit stattdessen - soweit es eindeutig möglich war - anhand der morphologischen Fluoreszenzverteilung vorgenommen werden (vgl. Abbildung 4.8).

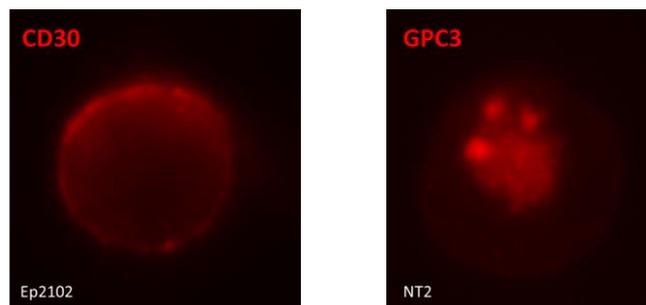


Abbildung 4.8: Vergleich der Fluoreszenzsignale. Die Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Antikörpercocktail Anti-CD30/Anti-GPC-3 verdeutlicht, dass CD30-positive Zellen meist ein Fluoreszenzsignalbild entlang der Zellmembran und GPC-3-positive Zellen granulös-zytoplasmatische Signale aufweisen.

Die Differenzierung nach der CD30- und GPC-3-Expression in den gefärbten Zelllinien hat äquivalent zu den Western-Blot-Ergebnissen ergeben, dass die Zelllinien Ep2102 und NT2 positiv für CD30, die Zelllinien NT2, NT2-R und NCCIT positiv für GPC-3 und die Zelllinie TCam-2 negativ für beide Proteine waren.

Anschließend folgte die Analyse der Expression der Proteine CD30 und GPC-3 in Blutzellen gesunder Probanden. Hierfür wurden die mononukleären Blutzellen von Proben gesunder Probanden isoliert und auf Objektträger fixiert. Es konnte davon ausgegangen werden, dass diese Objektträger keine Tumorzellen enthielten. Es folgte die Immunfluoreszenz-Färbung an diesen Objektträgern. Die Auswertung ergab, dass durchschnittlich $33/7 \times 10^5$ gesunde Blutzellen für CD30 und $8/7 \times 10^5$ gesunde Blutzellen für GPC-3 positiv waren. Diese Zellen waren jedoch gleichzeitig deutlich positiv für das Protein CD45 (vgl. Abbildung 4.9). Anschließend wurden zwei *Zytospins* untersucht, bei denen vorher das gesunde Blut mit Tumorzellen aus Zellliniensuspensionen versetzt wurde. Die Tumorzellen konnten nach der Färbung deutlich als solche identifiziert werden.

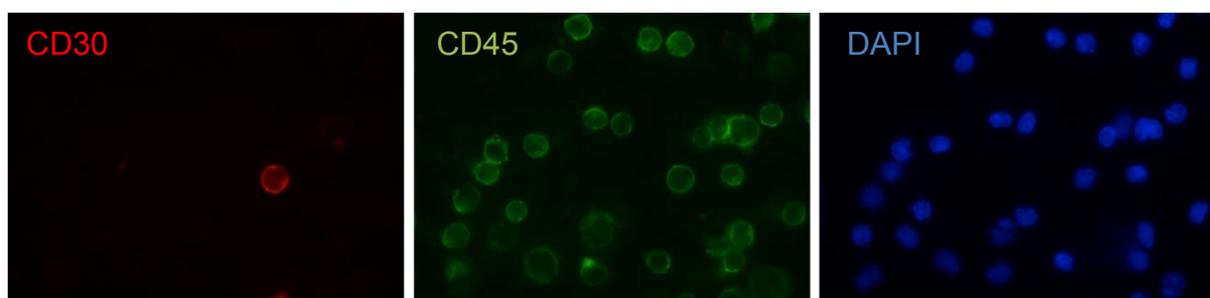


Abbildung 4.9: Darstellung einer CD30- und CD45-positiven Zelle. Die Färbung von tumorfreien *Zytospins* hat gezeigt, dass nicht-tumoröse Zellen, in denen CD30/GPC-3 exprimiert war, positiv für CD45 waren.

Die immunzytochemische Detektion von CTC im peripheren Blut von Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren erfolgte unter Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3. Eine CD30- und/oder GPC-3-positive Zelle wurde als Tumorzelle gewertet, wenn sie gleichzeitig negativ für CD45 war. Auf diese Weise wurde bei 25,5% der Patienten (13 von 51) CTC nachgewiesen. Die weitere Differenzierung ergab, dass 4 Patienten sowohl CD30 als auch GPC-3-positive Zellen, 3 Patienten ausschließlich GPC-3-positive Zellen und 5 Patienten ausschließlich CD30-positive Zellen enthielten. In einem Fall war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Der Median der Anzahl detektierter CTC betrug 5 in $1,4 \times 10^6$ MNC (Spanne von 1 bis 11).

Tabelle 4.1 Liste der CTC-positiven Patienten

Fallnummer	Klinisches Stadium	Histologie	Tumormarker	CTC/ $1,4 \times 10^6$ MNC
1	III	80% EC, 20% T	LDH 334 U/l	2
3	I	20% S, 80% T	AFP 12 ng/ml	11
9	I	12% S, 85% EC, 1% YS, 1% T, 1% CC	AFP 34 ng/ml, β hCG 451 U/l	3
19	I	5% EC, 95% T	AFP 54 ng/ml, β hCG 15 U/l	5
22	II c	50% S, 3% EC, 7% YS, 40% T	AFP 704 ng/ml, β hCG 1099 U/l	4
29	I	100% T	AFP 12 ng/ml	6
30	n.a.	83% EC, 17% T	AFP 93 ng/ml, β hCG 525 U/l	2
33	II c	100% EC	AFP 13 ng/ml, β hCG 4 U/l, LDH 446 U/l	7
42	III	50% EC, 50% YS	AFP 17 ng/ml	6

Ergebnisse

45	III	100% YS	AFP 1589 ng/ml	4
52	III	20% EC, 80% T	β hCG 792 U/l	1
54	III	50% EC, 50% CC	β hCG 10000 U/l	6
57	II c	25% EC, 25% YS, 25% T, 25% CC	nicht erhöht	11

Abk.: EC – Embryonales Karzinom, TC – Teratokarzinom, YST – Dottersacktumor, S – Seminom, MNC – Mononukleare Zellen

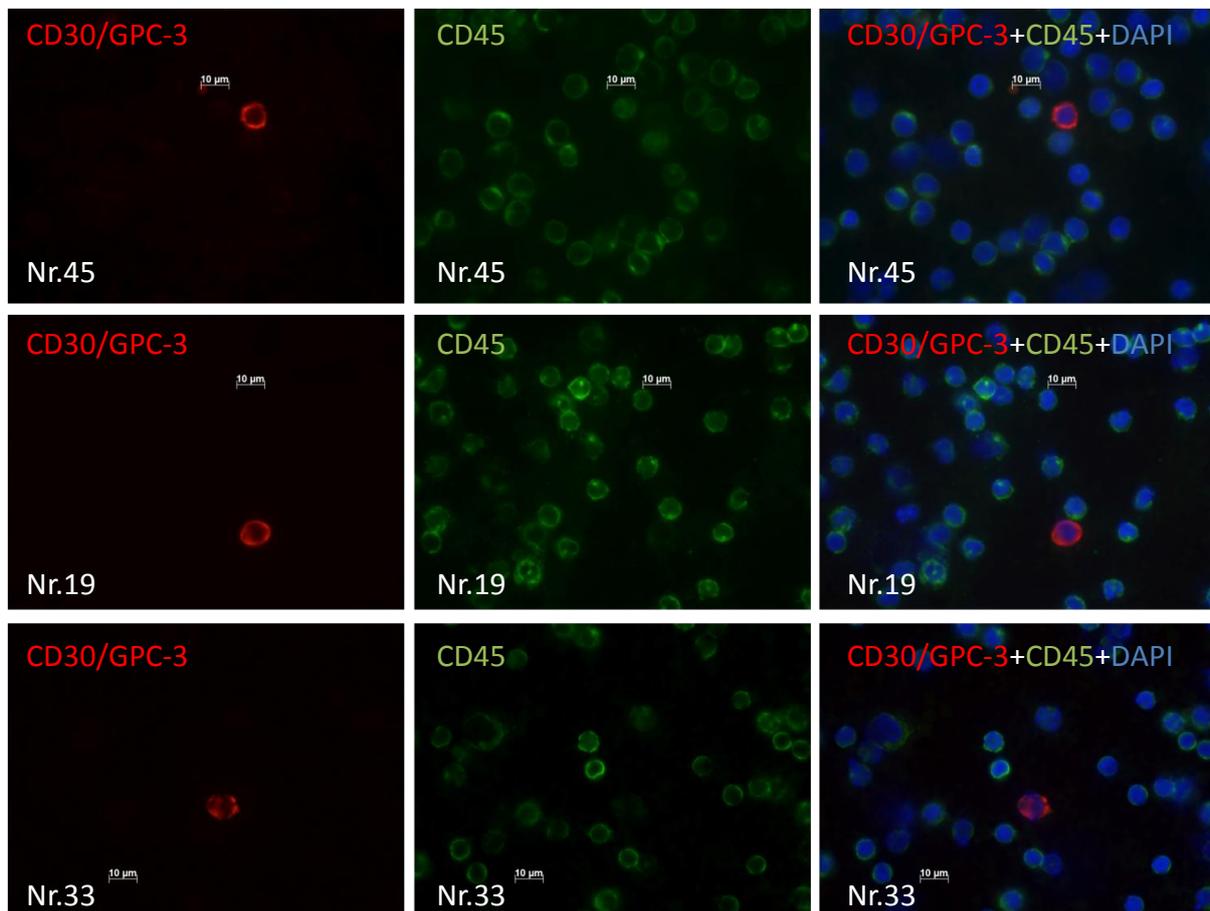


Abbildung 4.10: CD30/GPC-3-positive Tumorzellen in peripherem Blut der Patienten Nr. 19, 33 u. 45. Beispielhafte Darstellung von CD30/GPC-3-positiven Zellen, die gleichzeitig CD45 negativ waren.

4.2.1 Statistische Auswertung des Nachweises CD30/GPC-3-positiver CTC in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Nach der Detektion von CTC erfolgte die statistische Auswertung, um die klinische Relevanz der CTC-Status-Erhebung zu analysieren. Diese Auswertung wird in Tabelle 4.2 aufgezeigt. Es ist ersichtlich, dass für zwei Parameter eine signifikante Korrelation mit dem CTC-Status ermittelt werden konnte ($p=0,042$ bzw. $p=0,019$; Exakter Chi-Quadrat-Test nach Fisher, 2-seitig). Es bestand eine Korrelation zwischen positivem CTC-Status und einer erhöhten Primärtumorgröße ($p=0,042$). Die Abschätzung der Krankheitsprognose nach der Klassifizierung der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) war für 14 Patienten bekannt. Vier von 6 (67%) CTC-positiven Patienten und 3 von 8 (38%) CTC-negativen Patienten hatten nach dieser Einteilung eine schlechte Prognose ($p=0,019$). Außerdem korrelierte der CTC-Status mit dem Vorhandensein von Metastasen bzw. Rezidiven ($p=0,040$) und die Detektion von CD30-positiven CTC mit dem Nachweis vaskulärer Invasion des Primärtumors ($p=0,048$).

Tabelle 4.2 Statistik des CD30/GPC-positiven CTC-Status der Patientenkohorte

Parameter		positiv für CD30/GPC-3- positive CTC (n=13)		negativ für CD30/GPC- 3-positive CTC (n=38)		p-Wert
		Anzahl	% gültiger Fälle	Anzahl	% gültiger Fälle	
Alter [in Jahre]	< 33,7	5	41,3	21	58,3	0,341
	≥ 33,7	7	58,3	15	41,3	
Tumorgröße [in mm] Mittelwert: 38,5 Median: 33,0 (1 bis 112)	< 38,5	2	25,0	22	68,8	0,042
	≥ 38,5	6	75,0	10	31,2	
Tumorseite	rechts	6	60,0	20	57,1	1,000
	links	4	40,0	15	42,9	
Tumorhistologie	≥ 1% Seminom	3 von 13	23,1	9 von 38	23,7	1,000
	≥ 1% Embryonalkarzinom	10 von 13	76,9	27 von 38	71,1	1,000
	≥ 1% Teratom	9 von 13	69,2	20 von 38	52,6	0,348
	≥ 1% Yolk-Sac Tumor	5 von 13	38,5	16 von 38	42,1	1,000
	≥ 1% Chorionkarzinom	3 von 13	23,1	8 von 38	21,1	1,000
Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN)	positiv	5	71,4	26	83,9	0,592
	negativ	2	28,6	5	16,1	

Ergebnisse

Kontralaterale TIN	positiv	0	0,0	1	3,2	1,000
	negativ	7	100,0	30	96,8	
Tumorstadium	pT1	3 von 8	37,5	20 von 33	60,6	0,365
	pT2	4 von 8	50,0	11 von 33	33,3	
	pT3	1 von 8	12,5	2 von 33	6,1	
Infiltration des rete testis	positiv	1	14,3	10	31,2	0,649
	negativ	6	85,7	22	68,8	
Infiltration der tunica albuginea	positiv	3	50,0	4	25,0	0,334
	negativ	3	50,0	12	75,0	
Invasion von lymphatischen Gefäßen	positiv	2	33,3	9	39,1	1,000
	negativ	4	66,7	14	60,9	
Invasion von Blutgefäßen	positiv	4	57,1	6	22,2	0,157
	negativ	3	42,9	21	77,8	
Klinisches Stadium	I	4 von 12	33,3	22 von 37	59,5	0,141
	II	3 von 12	25,0	9 von 37	24,3	
	III	5 von 12	45,5	6 von 37	16,2	
AFP [in ng/ml]	normal (< 7)	2	18,2	19	50,0	0,087
	erhöht (≥ 7)	9	81,8	19	50,0	
βhCG [in U/l]	normal (< 1)	4	37,4	14	37,8	1,000
	erhöht (≥ 1)	7	63,6	23	62,2	
LDH [in U/l]	normal (< 250)	5	55,6	28	77,8	0,219
	erhöht (≥ 250)	4	44,4	8	22,2	
Prognose nach <i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i> (IGCCCG)	gut	2	33,3	0	0	0,019
	intermediär	0	0,0	5	62,5	
	schlecht	4	66,7	3	37,5	

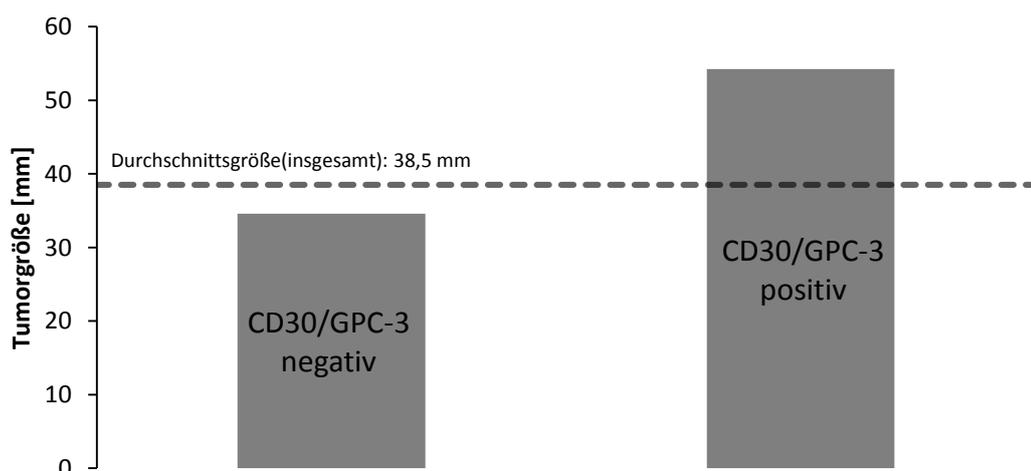


Abbildung 4.11: Assoziation zwischen CTC-Befund und Tumorgröße. Die Tumorgröße bei Patienten mit CD30/GPC-3-positiven CTC ist signifikant höher als bei Patienten mit negativem CTC-Status ($p=0,042$).

Die CTC-Detektion über die Verwendung der Antikörper Anti-CD30/Anti-GPC-3 wurde mit den Befunden unter Verwendung der Antikörper gegen EpCam, Keratin, SALL4 und OCT3/4 verglichen und zusammengefasst. Von den elf positiven CTC-Befunden, die unter Verwendung der Antikörper gegen EpCam, Keratin, SALL4 und OCT3/4 immunzytochemisch nachgewiesen wurden, konnten sechs unter Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 bestätigt werden. Die Ergebnisse beider Arbeiten, die durch immunzytochemische Verfahren nach Dichtegradientenzentrifugation entstanden waren, korrelieren miteinander ($p=0,023$). Es besteht jedoch keine signifikante Korrelation der Ergebnisse bei Miteinbeziehung der CTC-Nachweise, die unter Verwendung der *Cellsearch*-Methode erhalten wurden ($p=0,093$). Durch die Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/GPC-3 wurden insgesamt bei sechs zusätzlichen Patienten CTC nachgewiesen, die zuvor unter Verwendung der Antikörper gegen EpCam, Keratin, SALL4 und OCT3/4 und des *Cellsearch*-Systems als CTC-negativ eingestuft wurden (Nastaly et al., 2014).

Fasst man die Resultate der verschiedenen Detektionsmethoden zusammen, wurden CTC bei 23 von 51 (45,1%) Patienten identifiziert (18 über immunzytochemische Färbemethoden nach Dichtegradientenzentrifugation; 9 über die *Cellsearch*-Methode). Es folgte eine statistische Auswertung der zusammengefassten CTC-Befunde in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern (vgl. Tabelle 4.3). Erneut zeigte sich eine Korrelation des CTC-Status mit der Tumorgroße ($p=0,018$). Außerdem korrelierte der CTC-Befund mit dem klinischen Stadium der Erkrankung ($p=0,002$) und einem erhöhten LDH-Wert ($p=0,034$). Des Weiteren wurde die signifikante Korrelation des positiven CTC-Status mit dem Vorhandensein von mindestens einer Metastase oder eines Rezidivs untermauert ($p = 0,001$). Alle Patienten mit einem Rezidiv (6 von 6) und die Patienten, die in dem Zeitraum verstorben sind (3 von 3), waren positiv für CTC.

Tabelle 4.3 Statistik des CTC-Status in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern

Parameter		CTC positiv (n=23)		CTC negativ (n=28)		p-Wert
		Anzahl	% gültiger Fälle	Anzahl	% gültiger Fälle	
Alter [in Jahre]	< 33,7	11	50,0	15	57,7	0,772
	≥ 33,7	11	50,0	11	42,3	
Tumorgröße [in mm] Mittelwert: 38,5 Median: 33,0 (1 bis 112)	< 38,5	5	33,3	19	76,0	0,018
	≥ 38,5	10	66,7	6	24,0	
Tumorseite	rechts	11	57,9	15	57,7	1,000
	links	8	42,1	11	42,3	
Tumorhistologie	≥ 1% Seminom	4 von 23	17,4	8 von 28	28,6	0,509
	≥ 1% Embryonalkarzinom	17 von 23	73,9	20 von 28	71,4	1,000
	≥ 1% Teratom	16 von 23	69,6	13 von 28	46,4	0,155
	≥ 1% Yolk-Sac Tumor	11 von 23	47,8	10 von 28	35,7	0,408
	≥ 1% Chorionkarzinom	5 von 23	21,7	6 von 28	21,4	1,000
Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN)	positiv	10	76,9	21	84,0	0,672
	negativ	3	23,1	4	16,0	
Kontralaterale TIN	positiv	0	0,0	1	4,2	1,000
	negativ	14	100,0	23	95,8	
Tumorstadium	pT1	7 von 15	46,7	16 von 26	61,5	0,101
	pT2	5 von 15	33,3	10 von 26	38,5	
	pT3	3 von 15	20,0	0 von 26	0,0	
Infiltration des rete testis	positiv	4	28,6	7	28,0	1,000
	negativ	10	71,4	18	72,0	
Infiltration der tunica albuginea	positiv	4	57,1	3	20,0	0,145
	negativ	3	42,9	12	80,0	
Invasion von lymphatischen Gefäßen	positiv	4	40,0	7	36,8	1,000
	negativ	6	60,0	12	63,2	
Invasion von Blutgefäßen	positiv	5	41,7	5	22,7	0,271
	negativ	7	58,3	17	77,3	
Klinisches Stadium	I	6 von 22	27,3	20 von 27	74,1	0,002
	II	7 von 22	31,8	5 von 27	18,5	
	III	9 von 22	40,9	2 von 27	7,4	
AFP [in ng/ml]	normal (< 7)	6	28,6	15	53,6	0,144
	erhöht (≥ 7)	15	71,7	13	46,4	
βhCG [in U/l]	normal (< 1)	6	30,0	12	42,9	0,546
	erhöht (≥ 1)	14	70,0	16	57,1	
LDH [in U/l]	normal (< 250)	9	52,9	24	85,7	0,034
	erhöht (≥ 250)	8	47,1	4	14,3	

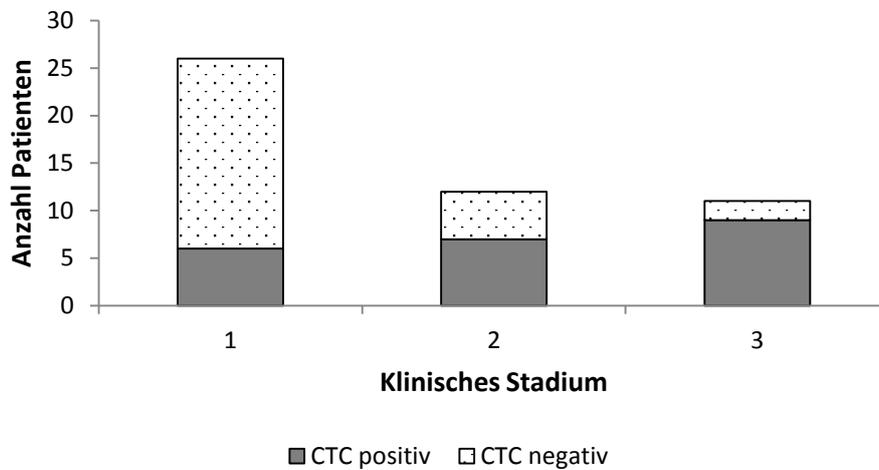


Abbildung 4.12: Korrelation des CTC-Befundes mit dem klinischen Stadium. Der positive CTC-Status ist mit einem erhöhtem Tumorstadium assoziiert ($p=0,002$).

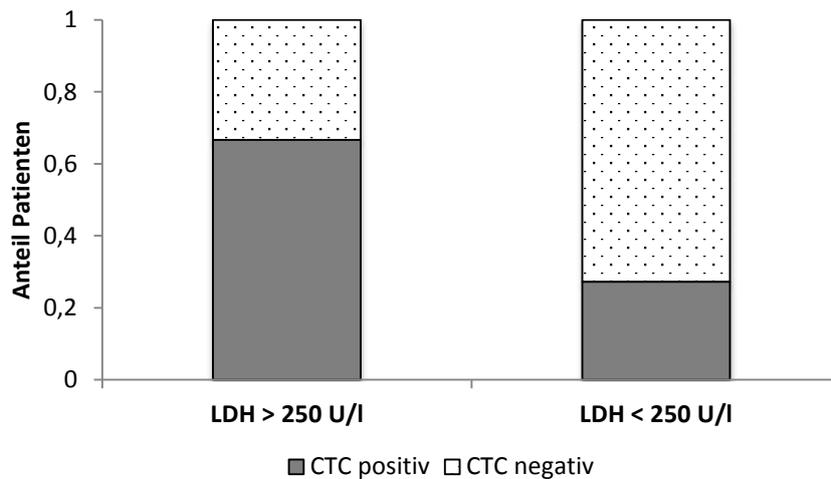


Abbildung 4.13: Korrelation des CTC-Befundes mit dem LDH-Wert. Der positive CTC-Status ist mit einem erhöhtem LDH-Wert im Patientenserum assoziiert ($p=0,034$).

4.2.2 CTC im Blut der *Vena testicularis*

Zusätzlich zur Detektion von CTC im peripheren Patientenblut wurden über CD30/Glypican-3 vier Blutproben, die während der Orchiektomie des Patienten aus der *Vena testicularis* entnommen wurden, auf CTC untersucht. Bei einer der vier

Blutproben aus der *Vena testicularis* konnten CD30/GPC-3-positive CTC detektiert werden. Es handelte sich um den Patienten #1, der auch im peripherem Blut CTC aufwies (vgl. Tabelle 4.1). Es wurden mit 37 pro $1,4 \times 10^6$ MNC deutlich mehr CTC im Blut der *Vena testicularis* identifiziert als im peripherem Blut (2 pro $1,4 \times 10^6$ MNC). Außerdem lagen die CTC im Blut der *Vena testicularis* in sieben 3er bis 5er Gruppen geclustert vor. Darüber hinaus waren die CTC im Blut der *Vena testicularis* deutlich größer (vgl. Abbildung 4.14).

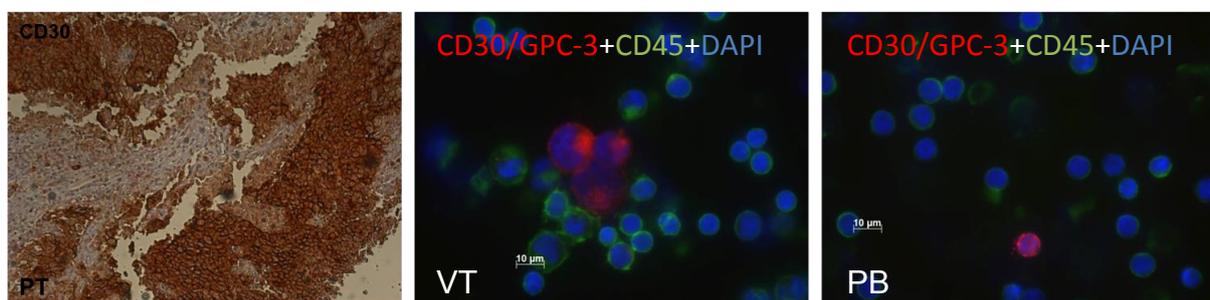


Abbildung 4.14: CTC aus dem Blut der *Vena testicularis*. Bei Patient #1 wurden positive Zellen für CD30 bzw. GPC-3 im paraffinierten Gewebe, im Blut aus der *Vena testicularis* und im peripheren Blut detektiert. Die Tumorzellen in der *Vena testicularis* lagen häufig als Cluster vor und waren größer als im peripheren Blut. Abk.: PT – Primärtumorgewebe, VT – Blut aus der *Vena testicularis*, PB – Peripheres Blut. Braun – CD30-Expression; blau – Gegenfärbung mit Hämalaun.

5. DISKUSSION

Die häufigste Krebserkrankung bei Männern zwischen 25 und 45 Jahren ist der Hodenkrebs, der in ca. 95% der Fälle aus entarteten Keimzellen entsteht. Während die Inzidenz des Hodenkarzinoms seit Jahrzehnten steigt, sinkt dessen Mortalität. Durch den Einsatz des Chemotherapeutikums Cisplatin ist es gelungen, eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 95% zu erreichen (Husmann et al., 2010). Patienten mit Keimzelltumor droht jedoch ein Verlust von durchschnittlich 35 Lebensjahren. Dieser Verlust an Lebensjahren ist um über zehn Jahre höher als bei anderen Krebsarten (Horm & Sondik, 1989). In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung liegt die Heilungsrate durch adäquate Therapien bei 70-80%. Mit einem späteren Zeitpunkt der Diagnose und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium sinken die Heilungschancen. Die histologische Entität spielt für die Prognose ebenfalls eine Rolle. Der nicht-seminomatöse gilt im Vergleich zum seminomatösen Keimzelltumor als der aggressivere. Nach der Klassifizierung der „*International Germ Cell Cancer Collaborative Group*“ wird die Heilungsprognose von Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren in gut, intermediär und schlecht eingeteilt. Die schlechte Prognose ist hiernach ausschließlich für Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren vorgesehen. Die Heilungsrate dieser Patienten liegt bei ca. 50% (Wilkinson & Read, 1997; Motzer et al., 2009). Nicht selten erleiden Keimzelltumorpatienten nach erfolgreicher Behandlung ein Rezidiv – ein erneutes Auftreten der Erkrankung. Die Rezidiv-Rate liegt bei ca. 10-30% und hängt vom Stadium der Ersterkrankung ab. Die meisten Rezidive erfolgen in den ersten zwei Jahren nach erfolgter Therapie und werden mit angepasster Behandlung therapiert (Howard et al., 2005). In 2-3% der Fälle wird ein Rezidiv nach mehr als 2 Jahren tumorfreier Zeit beobachtet. Diese Spät-Rezidive zeigen sich im Mittel nach ca. 6 Jahren (Wilkinson & Read, 1997). Teilweise leiden die Patienten jedoch noch Jahrzehnte später an ihnen. So beschrieben Mukhtar und Mitarbeiter einen Fall mit einem Spät-Rezidiv nach 48 Jahren tumorfreier Zeit (Mukhtar et al., 2011). Rezidive der Keimzelltumorpatienten entstehen am häufigsten im Retroperitoneum und werden erst spät klinisch auffällig. Das erste Anzeichen ist oft ein erhöhter AFP-Wert, der in der Nachsorge routinemäßig kontrolliert wird. In ca. 58% der Rezidiv-Fälle

sind die Tumormarker jedoch normwertig (Baniel et al., 1995). Trotz Nachsorge bleibt daher eine Ungewissheit für den Patienten bestehen. Hier kann die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) über eine Blutprobe einen wichtigen Beitrag leisten. Neben der Funktion eines Diagnose- und Verlaufsparmeters hat der Nachweis von CTC das Potenzial, die Entstehung eines gefährlichen Rezidivs im frühen Stadium aufzuzeigen, sodass eine frühzeitige Therapie die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten verbessern könnte.

5.1 Einfluss der Heterogenität der Keimzelltumoren auf die Detektion von CTC

Aktuelle Arbeiten zeigen für Karzinomentitäten, wie Brust-, Kolorektal- und Prostatakarzinome, dass eine Detektion von CTC im Patientenblut mit einer schlechten Prognose korreliert (Hayes et al., 2006; Cohen et al., 2008; de Bono et al., 2008). Über CTC im Blut von Patienten mit Keimzelltumoren ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt. Bisherige Arbeiten beschäftigten sich vor allem mit der Frage nach CTC in Produkten der Stammzellapharese und mit dem Einfluss dieser Zellen auf die Prognose nach einer autologen peripheren Stammzelltransplantation bei Patienten mit Keimzelltumoren, die eine hochdosierte Chemotherapie erhielten (Fan et al., 1998; Hildebrandt et al., 2000; Bokemeyer et al., 2001). Andere Arbeiten beschränkten sich auf den Nachweis von mRNA der Keimzelltumormarker AFP bzw. β hCG über die Anwendung der *Reverse Transkriptase*-Polymerase-Kettenreaktion (Yuasa et al., 1999; Hautkappe et al., 2000). 2014 gelang in unserer Arbeitsgruppe die Detektion von CTC bei einer größeren Kohorte von Patienten durch die kombinierte Verwendung epithelialer (Anti-EpCam, Anti-Keratin) und keimzelltumorspezifischer (Anti-OCT3/4, Anti-SALL4) Antikörper (Nastały et al., 2014). Die Schwierigkeiten beim Auffinden von CTC scheinen auf den vergleichsweise sehr heterogenen Charakter der Keimzelltumoren zurückzuführen zu sein, die häufig aus verschiedenen Tumorkomponenten bestehen. Zelllinien, die aus unterschiedlichen Keimzelltumorarten entstammen, zeigen in den Western-Blot-Analysen nur geringere Übereinstimmungen hinsichtlich der Expression epithelialer und mesenchymaler Marker. Dies verdeutlicht einen

Unterschied dieser Tumorentität zu anderen klassisch epithelialen Karzinomen. Während bei Mamma-, Kolorektal- und Prostatakarcinomen epitheliale Marker (EpCam, Keratin) zur Verfügung stehen, die vom Großteil der Tumorzellen exprimiert werden (Hayes et al., 2006; Cohen et al., 2008; de Bono et al., 2008), ist für eine effektive Detektion von Keimzelltumorzellen die Verwendung mehrerer epithelialer und keimzelltumorspezifischer Marker in Kombination erforderlich.

Ferner kann die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) zum Verlust von epithelialen Eigenschaften führen, sodass angenommen wird, dass bei der Verwendung epithelialer Marker zur CTC-Detektion einige Tumorzellen unerkannt bleiben (Thiery, 2002). Ein Ziel des Promotionsvorhabens war es daher, Keimzelltumorkomponenten durch Western-Blot-Analysen epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Marker zu charakterisieren, um neue Marker bzw. Marker-Kombinationen zur CTC-Detektion bei Patienten mit Keimzelltumoren zu finden.

5.1.1 Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in nicht-seminomatösen Keimzelltumorkomponenten

EpCam ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches mit einer erhöhten Proliferation und der Entdifferenzierung epithelialer Zellen assoziiert ist (Balzar et al., 1999). Eine verstärkte EpCam-Expression ist an der Oberfläche der meisten Karzinome nachweisbar, sodass dem Protein eine Bedeutung in der Karzinogenese beigemessen wird (Went et al., 2004). Da zur CTC-Detektion allgemeine tumorspezifische Antigene fehlen, werden häufig epitheliale Marker, wie EpCam, verwendet. Daher nimmt es eine wichtige Rolle in der CTC-Forschung ein und wird in der automatisierten Detektionsmethode *Cellsearch* als Anreicherungsmarker verwendet (Allard et al., 2004). Innerhalb der Keimzelltumoren zeigt sich eine erhöhte EpCam-Expression vor allem in Dottersacktumoren und Chorionkarzinomen (Schönberger et al., 2013). Die Western-Blot-Analyse hat ergeben, dass EpCam besonders stark in der Zelllinie 2102Ep exprimiert war, deren Ursprungsgewebe aus Teratom- und Dottersacktumoranteilen besteht. In den anderen nicht-seminomatösen Zelllinien NT2 und NCCIT war hingegen letztlich eine schwache

EpCam-Expression nachweisbar. Der Nachweis von CTC unter Verwendung von EpCam verdeutlicht, dass die Tumoren aller Patienten mit EpCam-positiven CTC Anteile von Teratokarzinom- bzw. Dottersacktumorzellen enthalten (Nastały et al., 2014). Die Ergebnisse deuten an, dass durch die Verwendung von EpCam als CTC-Detektionsmarker vor allem Zellen dieser Tumorkomponenten identifiziert werden und dass für eine sensitive CTC-Detektion weitere Marker erforderlich sind.

Neben EpCam nehmen die Keratine, die in epithelialen Zellen als Intermediärfilamente vorhanden sind, eine zentrale Stellung in der CTC-Detektion bei Karzinomen ein. So dienen sie beispielsweise als Detektionsmarker im *Cellsearch*-System (Allard et al., 2004). Aus bisherigen Veröffentlichungen geht hervor, dass die Keratin-Expression in Keimzelltumoren unterschiedlich stark bzw. negativ sein kann (Fogel et al., 1990; Mercer et al., 1991). Für die CTC-Detektion werden häufig die Keratine 8, 18 und 19 eingesetzt (Allard et al., 2004; Riethdorf & Pantel, 2010). Battifora und Mitarbeiter haben festgestellt, dass in Seminomen die Keratine 9, 10 und 14 nicht exprimiert sind (Battifora et al., 1984). Ferner zeigten Cheville und Mitarbeiter durch immunhistochemische Analysen von Keimzelltumorproben, dass Keratin 7 in geringen Anteilen der seminomatösen Proben exprimiert sein können und Embryonalkarzinomzellen sich häufig Keratin-7-positiv zeigen. Keratin 20 hingegen konnte in Seminom- und Embryonalkarzinomzellen nicht nachgewiesen werden (Cheville et al., 2000). Die Western-Blot-Analyse der vorliegenden Promotionsarbeit zeigte ein heterogenes Bild der Keratin-Expression. Während die Analyse unter Verwendung des Pan-Keratin Antikörpers A45-B/B3 in den Keimzelltumorzelllinien ergab, dass in allen fünf Zelllinien Keratine exprimiert werden, konnte die Keratin-Expression unter Verwendung der Antikörper gegen die Keratine 7, 8, 18 und 19 ausschließlich in der nicht-seminomatösen Zelllinie 2102Ep nachgewiesen werden. Aus bisherigen Arbeiten geht hervor, dass in Keimzelltumoren besonders häufig die Keratine 8 und 18 exprimiert sind (Fogel et al., 1990; Cheville et al., 2000). Keratin 8 und 18 sind außerdem die ersten beiden Keratine, die in der Embryogenese von Mäusen exprimiert werden (Jackson et al., 1981). Außerdem gehören sie zu den Keratinen, die im *Cellsearch*-System als Detektionsmarker dienen (Riethdorf & Pantel, 2010). Es ist anzunehmen, dass die Keratine 8 und 18 im Vergleich zu anderen Keratinen

am besten geeignet sind, um als CTC-Detektionsmarker bei Keimzelltumoren verwendet zu werden. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass unter Verwendung von Keratinen 8 und 18 als CTC-Detektionsmarker v.a. nicht-seminomatöse Tumorzellen nachgewiesen werden können. Gleichzeitig verdeutlicht die Heterogenität in der Keratin-Expression jedoch, dass unter Verwendung der Anti-Keratin Antikörper wahrscheinlich ein hoher Anteil an CTC unerkannt bleiben.

Des Weiteren wurde die Expression des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin analysiert. Der Verlust der E-Cadherin-Expression gehört zu den Mechanismen der epithelialen-mesenchymalen Transition (Wheelock et al., 2008). Die Western-Blot-Analyse hat ergeben, dass E-Cadherin in der nicht-seminomatösen Zelllinie 2012Ep exprimiert ist, während in der seminomatösen Zelllinie TCam-2 keine Expression nachweisbar ist. Dies entspricht den Ergebnissen bisheriger Arbeiten, in denen über immunhistochemische Verfahren an Tumorgewebeproben festgestellt wurde, dass E-Cadherin in Seminomen im Gegensatz zu Nichtseminomen lediglich gering bzw. gar nicht exprimiert ist. Außerdem wird angenommen, dass die E-Cadherin-Expression in Keimzelltumorzellen mit dem Grad der Zell-Differenzierung korreliert (Saito et al., 2000; Honecker et al., 2004). Diese Assoziation wird auch in den Western-Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit sichtbar, da die nullipotente Zelllinie 2102Ep eine starke E-Cadherin-Expression aufweist, während die N-Cadherin-Expression in den pluripotenten Zelllinien NCCIT u. NT2 nicht nachweisbar ist.

Im Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition werden u.a. epitheliale Keratine und das Adhäsionsmolekül E-Cadherin durch die mesenchymalen Proteine Vimentin bzw. N-Cadherin ersetzt (Micalizzi et al., 2010). Diese mesenchymalen Proteine werden mit einer aggressiveren Invasivität und Metastasierung des Tumors assoziiert und ihre Expression sollte daher im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit in den Keimzelltumorzelllinien untersucht werden (Hazan et al., 2000; Hu et al., 2004). Während Bremmer und Mitarbeiter in ihrer Arbeit über immunhistochemische Verfahren keine N-Cadherin-Expression in der Zelllinie NT2 nachweisen konnten, zeigt die Western-Blot-Analyse der vorliegenden Arbeit eine N-Cadherin-Expression in allen fünf Keimzelltumorzelllinien (Bremmer et al., 2012). Somit werden zwei ältere Arbeiten bestätigt, die ebenfalls verdeutlichen, dass N-Cadherin in der Zelllinie NT2 exprimiert ist (Pleasure & Lee, 1993;

Ackerman et al., 1994).

Die Western-Blot-Analysen verdeutlichen außerdem die Expression des mesenchymalen Intermediärfilaments Vimentin in den Zelllinien NT2, NCCIT und TCam-2, was den Ergebnissen bisheriger Arbeiten entspricht (Pleasure et al., 1992; Damjanov et al., 1993; de Jong et al., 2008). In der Zelllinie 2102Ep hingegen ist kein Vimentin nachweisbar, obwohl Damjanov und Mitarbeiter gezeigt haben, dass ca. 5-10% der 2102Ep-Zellen Vimentin-positiv sind. In ihrer Publikation wird jedoch zudem festgestellt, dass die Vimentin-Expression verstärkt vorliegt, wenn die 2102Ep-Zellen in geringer Dichte kultiviert werden (Damjanov et al., 1984). Eine mögliche Erklärung ist die verstärkte Differenzierung von 2102Ep-Zellen, die in geringer Dichte kultiviert werden (Andrews, 1982). Daher besteht die Möglichkeit, dass in der vorliegenden Promotionsarbeit die Vimentin-Expression in der Zelllinie 2102Ep durch eine hohe Zelldichte während der Kultivierung herabreguliert wurde.

Da in den Zelllinien NT2, NCCIT und TCam-2 der epitheliale Marker E-Cadherin nicht nachzuweisen war, ist der Nachweis von N-Cadherin und Vimentin ein Indikator für die EMT in diesen Tumorzelllinien.

5.1.2 Bedeutung der CD30- und GPC-3-Expression für die Detektion von CTC bei Patienten mit Keimzelltumoren

Wie bei Nastały et. al beschrieben, ist für eine sensitive CTC-Detektion bei Keimzelltumorpatienten eine Ergänzung der epithelialen Detektionsmarker mit keimzelltumorspezifischen Markern notwendig (Nastały et al., 2014). In der vorliegenden Promotionsarbeit sind die Proteine CD30 und GPC-3 von Interesse, die u.a. in der Diagnostik nicht-seminomatöser Tumoranteile Einsatz finden (Pallesen & Hamilton-Dutoit, 1988; Zynger et al., 2006). Um beurteilen zu können, ob diese zwei Proteine als erfolgsversprechende Detektionsmarker in Frage kommen, wurde ihre Expression in den Keimzelltumorzelllinien NT2, NCCIT, 2102Ep und TCam-2 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass in den vier nicht-seminomatösen Zelllinien mindestens eines der beiden Proteine exprimiert ist (vgl. Kapitel 4.1.1). Dadurch wird angedeutet, dass die Verwendung von CD30 und GPC-3 ein breites Spektrum an nicht-seminomatösen Tumorzellen abdeckt. Dennoch ist eine eingeschränkte

Aussagekraft der Zelllinien-Experimente zu beachten. Die CD30/GPC-Expression in Tumorzelllinien kann sich von der CD30/GPC-Expression in Tumorzellen *in vivo* unterscheiden. Zu den Vorteilen der Zelllinien-Experimente hingegen gehört, dass Zelllinien durch eine hohe Lebensdauer und durch Passagieren über Jahre hinweg nutzbar sein können.

Bisherige Arbeiten zeigen, dass die CD30-Expression in Proben von Embryonalkarzinomen und Dottersacktumor vorhanden ist (Suster et al., 1998). Glypican-3 ist in Dottersacktumoren, Chorionkarzinomen und in geringeren Tendenzen in Teratomen und Embryonalkarzinomen nachweisbar (Zynger et al., 2006). Diese Ergebnisse untermauern, dass mit beiden Markern ein breites Spektrum der nicht-seminomatösen Keimzelltumorkomponenten abgedeckt wird. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die kombinierte Verwendung beider Marker für die CTC-Detektion bei Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren nützlich sein könnte.

5.2 Bedeutung der verwendeten Marker für die Entwicklung der Cisplatin-Resistenz in Keimzelltumorzelllinien

Die Entwicklung der Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen hat große Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf und auf die Überlebenschance der Patienten (Lebwohl & Canetta, 1998). Um zu beurteilen, ob die verwendeten epithelialen, mesenchymalen und keimzelltumorspezifischen Proteine eine Bedeutung im Prozess der Cisplatin-Resistenzentwicklung einnehmen, wurde die Expression dieser Marker in den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen analysiert und mit der Expression in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien verglichen. So konnte nachgewiesen werden, dass zwischen Keimzelltumorzelllinien und den korrespondierenden Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen in der EpCam-, E-Cadherin-, N-Cadherin- und GPC-3-Expression keine Unterschiede bestehen. Für Vimentin ist bekannt, dass Adriamycin- und Vinblastin-resistente Mammakarzinomzelllinien eine verstärkte Expression aufzeigen (Sommers et al., 1992). In Keimzelltumorzelllinien scheint Vimentin ebenfalls eine Bedeutung in der Resistenz-Entwicklung einzunehmen, da es in den Zelllinien NT2, NCCIT und in den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen jeweils

unterschiedlich stark exprimiert ist. Die unterschiedliche Expression in Cisplatin-sensitiven Zelllinien und korrespondierenden Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen wurde auch für CD30 beobachtet. So war CD30 in den nicht-seminomatösen Zelllinien exprimiert, während in den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen keine CD30-Expression vorlag. Der Verlust der CD30 Expression zeigt sich auch in 40-65% der Patienten mit metastasierten Embryonalkarzinomen nach Chemotherapie (Berney et al., 2001; Sung et al., 2006) und scheint eine besondere Bedeutung in der Entwicklung der Cisplatin-Resistenz von Keimzelltumorzellen einzunehmen. Für die Detektion von CTC unter Verwendung von CD30 bedeutet dies, dass der CTC-Nachweis bei Patienten, die eine Cisplatin-basierte Chemotherapie erhalten haben, durch den möglichen Verlust der CD30-Expression erschwert sein könnte.

5.3 GRHL2-Expression in Keimzelltumorzellen

Das *Grainyhead-like-2*-Protein, ein Transkriptionsfaktor aus der *Grainyhead-like* Familie, besitzt wichtige Funktionen in der Embryonalentwicklung (Bray & Kafatos, 1991). Es moduliert u.a. die E-Cadherin-Expression und reguliert die epitheliale Differenzierung. So entstehen bei Mäusen mit GRHL2-Genmutationen u.a. Neuralrohrdefekte (Werth et al., 2010). Jüngste Arbeiten haben gezeigt, dass GRHL2 zusätzlich eine Rolle in der Karzinogenese einnimmt. So ist u.a. für das hepatozelluläre Karzinom und das Mammakarzinom eine Assoziation zwischen GRHL2-Expression und der Krebsentstehung gezeigt worden (Tanaka et al., 2008; Werner et al., 2013). GRHL2 wird eine bedeutende Funktion in der epithelialen-mesenchymalen-Transition beigemessen. In Burstkarzinomzelllinien führt der Verlust der GRHL2-Expression zu morphologischen Veränderungen, die dem Prozess der EMT entsprechen. Diese Zellen zeigen eine bessere Überlebensfähigkeit und eine höhere Invasivität. Durch die Reexpression von GRHL2 durchlaufen die Zellen den umgekehrten Prozess der MET (Werner et al., 2013). Werner und Mitarbeiter haben gezeigt, dass eine geringere oder fehlende GRHL2-Expression beim Mammakarzinom mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und mit der Lymphknotenmetastasierung korreliert (Werner et al., 2013). Im Gegensatz dazu haben Xiang und Mitarbeiter verdeutlicht, dass eine erhöhte GRHL2-Expression mit

einer schlechteren Überlebensrate und einem höheren Metastasierungsrisiko einhergeht (Xiang et al., 2012). Ein polyklonaler Anti-GRHL2-Antikörper, der in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Assmann, Institut für Tumorbilogie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, hergestellt wurde, wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendet, um die GRHL2-Expression in Keimzelltumoren zu untersuchen (Werner et al., 2013). Seminome und Embryonalkarzinome enthalten pluripotente Zellen, die eine relativ gering ausgeprägte Zell-Differenzierung aufzeigen. Deshalb teilen sie viele Gemeinsamkeiten mit normalen embryonalen Stammzellen. Dottersacktumore, Chorionkarzinome und Teratome sind die differenzierteren Keimzelltumorarten (Looijenga et al., 2011). Die nullipotente, nicht-seminomatöse Zelllinie 2012Ep, deren Ursprungsgewebe aus Dottersacktumor- und Teratom-Komponenten bestand, weist eine stärkere GRHL2-Expression auf als die restlichen, pluripotenten Zelllinien, sodass vermutet wird, dass GRHL2 die Differenzierung der Keimzelltumorzellen regulieren kann. Neben den Keimzelltumorzelllinien wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit erstmalig die GRHL2-Expression in Keimzelltumorproben einer größeren Kohorte von Patienten untersucht (155 Proben eines TMA). Auch hierbei zeigen die differenzierteren Teratomzellen eine stärkere GRHL2-Expression als andere nicht-seminomatöse und seminomatöse Zellen. Insgesamt weisen die Keimzelltumorzellen jedoch eine schwache Expression auf und sind lediglich zu 55% positiv für GRHL2. Erwartungsgemäß enthalten die Seminome, die Keimzelltumorart mit geringer Zell-Differenzierung, den geringsten Anteil an GRHL2-positiven Zellen. Zwischen den Cisplatin-sensitiven Zelllinien und den Cisplatin-resistenten Zelllinienklonen waren keine größeren Unterschiede in der GRHL2-Expression zu beobachten. GRHL2 scheint für Keimzelltumoren somit keine besondere Bedeutung in der Entwicklung der Resistenz gegen Cisplatin zu besitzen.

5.4 Methodische Aspekte bei der immunzytochemischen Detektion von CTC

Die CTC-Forschung steht vor der technischen Herausforderung der Isolierung und des Nachweises einiger einzelner Tumorzellen aus einem Gemisch mit Millionen Leukozyten und Erythrozyten (ca. 10×10^6 Leukozyten und 5×10^6 Erythrozyten in

1 ml Blut) (Paterlini-Bréchet & Benali, 2007). Damit geht die Notwendigkeit einher, dass die Methode zur Detektion dieser zirkulierenden Tumorzellen höchst sensitiv und spezifisch sein muss. Zum einen muss eine hohe Sensitivität gewährleistet sein, damit die wenigen CTC einer Blutprobe identifiziert werden können. Zum anderen wird durch eine hohe Spezifität sichergestellt, dass es sich bei den nachgewiesenen Zellen auch tatsächlich um Tumorzellen handelt, da ein fälschlich positiver Befund schwerwiegende Folgen haben könnte. Vermeintliche CTC, bei denen die Verwechslung mit normalen Blutzellen nicht mit höchster Sicherheit ausgeschlossen ist, können die Detektionsraten verfälschen. Die Testung der im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierten, immunzytochemischen Detektionsmethode unter Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 hat gezeigt, dass auch normale, mononukleare Blutzellen positiv für diese Proteine sein können. Diese Zellen sind jedoch im Gegensatz zu den Tumorzellen positiv für den Leukozyten-Marker CD45 (Charbonneau et al., 1988), sodass durch die zusätzliche Verwendung des Antikörpers gegen das Oberflächenprotein CD45 die Spezifität der Methode erhöht wird. Zellen, die positiv für CD30/GPC-3 und gleichzeitig negativ für CD45 sind, werden in diesem Verfahren als CTC gewertet. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei der Immunfärbemethode mit Anti-CD45 keine Sensitivität von 100% gegeben ist. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass im Blut weitere Zellarten mit diesem Expressionsmuster vorhanden sein könnten. Die Kontrollen von Blutproben gesunder Probanden haben ergeben, dass alle Zellen, die CD30/GPC-3 enthalten, gleichzeitig positiv für CD45 sind. Zudem fanden Zellen, deren Fluoreszenz-Signale nicht eindeutig für CD30/GPC-3 positiv und für CD45 negativ sind, keinen Eingang in die Statistik. Trotzdem ist davon auszugehen, dass die Spezifität dieser Detektionsmethode möglicherweise nicht 100% entspricht und dass Zellen fälschlicher Weise als CTC gewertet werden. In der Arbeit von Nastaly et al. erfolgte die Bestätigung der Keimzelltumor-Abstammung einiger identifizierter Zellen über die Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Nastaly et al., 2014). Es wurde die keimzelltumorspezifische Amplifikation der Chromosomen-Region 12p11.2–p12.1 nachgewiesen. Dieser Nachweis wäre ebenfalls für die CTC-Befunde der vorliegenden Promotionsarbeit eine sinnvolle Folgearbeit und eine Möglichkeit, die Spezifität der Methode zu

bestätigen.

Die Detektionsrate der Methode hängt neben der Spezifität vor allem davon ab, wie stark die Marker-Proteine in CTC eines Patienten exprimiert sind. Es ist von einer starken Plastizität und Heterogenität dieser Zellpopulation auszugehen. Somit kann angenommen werden, dass einige Zellen ihr Expressionsmuster ändern und von den Detektionsmarkern nicht miterfasst werden können (Riethdorf & Pantel, 2010). Hinzu kommt, dass bei der Aufarbeitung der Blutprobe und der Isolierung (siehe Kapitel 3.3) CTC verloren gehen können (Griwatz et al., 1995). Des Weiteren ist für die Qualität der Methode von Bedeutung, dass sie reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Reproduzierbarkeit konnte auf Grund der Begrenztheit der Proben nicht validiert werden. Der Vergleich der CTC-Befunde der vorliegenden Promotionsarbeit mit den Resultaten der immunzytochemischen Verfahren unter Verwendung der Antikörper gegen EpCam, Keratine, SALL4 und OCT3/4 bei der selben Kohorte von Patienten hat gezeigt, dass die Ergebnisse beider Arbeiten miteinander korrelieren (Nastały et al., 2014). Trotz der unterschiedlichen Methoden wird durch die signifikante Korrelation der Ergebnisse die Reproduzierbarkeit unterstrichen.

Die Heterogenität der Keimzelltumoren setzt voraus, dass eine relativ große Anzahl an unterschiedlichen Markern vorhanden ist, um eine zufriedenstellende Identifizierung der CTC zu gewährleisten. Gleichzeitig soll die Detektionsmethode jedoch einfach und wirtschaftlich sein, damit sie Eingang in die Klinik finden kann. Die Etablierung einer möglichst sensitiven CTC-Detektionsmethode, die die genannten Kriterien erfüllt, stellt für Keimzelltumoren eine große Herausforderung dar. Im Gegensatz zu anderen Karzinomentitäten reicht die alleinige Anwendung der automatisierten *Cellsearch*-Methode für eine zufriedenstellende CTC-Detektion gegenwärtig nicht aus (Nastały et al., 2014).

Zum gegenwärtig etablierten Reservoir an Markern, die für die Identifizierung von CTC im Blut von Patienten mit Keimzelltumoren eingesetzt werden können, gehören die epithelialen Proteine EpCam und Keratin und die keimzelltumorspezifischen Proteine SALL4 und OCT3/4. Die Kombination dieser Marker ergab einen positiven CTC-Befund bei 17% (25 von 143) der Patienten mit seminomatösen und nicht-seminomatösen Keimzelltumoren. Reduziert man diese Kohorte auf die Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumorkomponenten, sind es 33% (17 von 51)

CTC-positive Patienten, die über diese Marker bestimmt werden (Nastały et al., 2014). Über die Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 waren in derselben Kohorte bei 13 von 51 Patienten (25%) CTC nachweisbar. Mit der alleinigen Anwendung dieses Antikörpercocktails wurde somit eine ähnlich hohe Detektionsrate erzielt. Über SALL4 wurde eine Detektionsrate von 10% (5 von 51), über OCT3/4 eine Rate von 6% (3 von 51), über die epithelialen Marker (EpCam, Keratin) zusammen eine Rate von 31% (16 von 51) (Nastały et al., 2014), über CD30 eine Rate von 18% (9 von 51) und über Glypican-3 eine Rate von 14% (7 von 51) erreicht. Dieser Vergleich macht deutlich, dass die Ergänzung des bisherigen Marker-Reservoirs durch CD30 und GPC-3 zur Optimierung der CTC-Detektion bei Patienten mit Keimzelltumoren beitragen würde. Das Zusammenfassen der Ergebnisse beider Arbeiten ergibt eine CTC-Detektionsrate von 45% (23 von 51 Patienten). Solch eine hohe Rate ist für Keimzelltumoren bisher unerreicht und ist vergleichbar mit Ergebnissen aus Arbeiten zu anderen Tumorentitäten, denen bereits eine große Bedeutung in der CTC-Forschung und klinischen Anwendung beigemessen wird. So wurde in einer multizentrischen Studie gezeigt, dass bei ca. 46,9% (911 von 1944) der untersuchten Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinomen ≥ 5 CTC im Blut nachgewiesen werden konnten (Bidard et al., 2014). Ferner wurde bei Patientinnen mit primären Mammakarzinomen ohne Fernmetastasen in einer weiteren Studie eine CTC-Detektionsrate von 21.5% (435 von 2026) ermittelt (Rack et al., 2014). Des Weiteren konnten Scher und Mitarbeiter bei ca. 55% (85 von 156) der Patienten mit metastasierten Prostatakarzinomen ≥ 5 CTC detektieren (Scher et al., 2009). Außerdem waren in einer Studie bei 26% (108 von 413) der Patienten mit metastasierten Kolorektalkarzinomen ≥ 3 CTC nachweisbar (Cohen et al., 2008). In einer vergleichbaren Arbeit zeigten Hildebrandt und Mitarbeiter über die immunzytochemische Anwendung des Pan-Keratin-Antikörpers A45-B/B3 CTC im Blut von 15% (3/20) der Patienten mit fortgeschrittenen oder rezidierten Keimzelltumoren (Hildebrandt et al., 1998). Für das Ovarialkarzinom stellten Poveda und Mitarbeiter unter der Verwendung des *Cellsearch*-Systems und der Antikörper gegen EpCam und Keratin bei einem Kollektiv von 216 Patienten in lediglich 14% der Proben CTC-Positivität fest (Poveda et al., 2011).

5.5 CTC-Detektion aus der *Vena testicularis*

Über die beiden *Vena testicularis* wird das desoxyginierte Blut von den Hoden in die untere Hohlvene gefördert (Kara et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass Venen, die proximal das Blut vom Primärtumor drainieren, eine höhere Konzentration an CTC aufweisen als periphere Venen. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Anzahl an detektierten CTC für das Mammakarzinom in Zentralvenen, für das Kolorektalekarzinom in Zentral- und Mesenterialvenen, das Pankreaskarzinom in der Portalvene, das Lungenkarzinom in Pulmonalvenen und zuletzt für Keimzelltumoren in den testikulären Venen erhöht ist (Okumura et al., 2009; Peeters et al., 2011; Rahbari et al., 2012; Denève et al., 2013; Bissolati et al., 2014; Nastały et al., 2014). Von 4 Blutproben aus der *Vena testicularis* war in unserer Studie lediglich eine Probe CTC-positiv. Die Untersuchung dieser Blutprobe ergab eine deutlich höhere Anzahl an CTC als im peripheren Blut desselben Patienten ($37/0,7 \times 10^6$ MNC). Außerdem waren diese Zellen größer und lagen in 3er bis 5er Gruppen geclustert vor. Die höhere Anzahl an CTC im Blut der *Vena testicularis* lässt vermuten, dass eine relativ hohe Anzahl an Keimzelltumorzellen aus dem Primärtumor ins Blut gelangt, jedoch ein großer Anteil dieser Zellen im Verlauf der Zirkulation untergeht bzw. gefiltert wird. Die Analyse größerer Studienkollektive ist zwingend erforderlich, um diese Hypothese zu überprüfen und neue Erkenntnisse zu Vorgängen der Zirkulation von Tumorzellen zu gewinnen. Da Blutproben aus der *Vena testicularis* nur während der operativen Orchiektomie gewonnen werden, ist die klinische Relevanz des CTC-Nachweises in Blutproben der *Vena testicularis* eingeschränkt.

5.6 Klinische Relevanz des CTC-Nachweises bei Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren

Trotz der großen Herausforderungen bei der Entwicklung sensitiver und spezifischer CTC-Detektionsmethoden zeigt sich in der CTC-Forschung ein Trend dahingehend, dass eine hohe Detektionsrate mit einer schlechteren Prognose, einem höheren Rezidiv-Risiko und einem undifferenzierten Charakter des Tumors assoziiert ist (Paterlini-Bréchet & Benali, 2007). Diesbezüglich ist für Keimzelltumoren

vergleichsweise wenig bekannt. Hautkappe und Mitarbeiter konnten über die Detektion von AFP- und/oder β hCG-mRNA in peripherem Blut von Patienten mit Keimzelltumoren eine Korrelation zwischen CTC-Status und Tumorstadium schlussfolgern (Hautkappe et al., 2000). Jüngst wurde in unserer Arbeitsgruppe bei einer größeren Kohorte aus 143 Patienten mit Keimzelltumoren nachgewiesen, dass ein positiver CTC-Befund mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, dem Vorhandensein von Metastasen, erhöhten Tumormarkern und der Größe des Primarius korrelierte. Außerdem wurde deutlich, dass die Detektionsrate für Nichtseminome im Vergleich zu Seminomen erhöht ist (Nastały et al., 2014). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit ausschließlich Blutproben von Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren untersucht.

Die CTC-Detektion unter der Anwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 ergab ebenfalls eine Korrelation zwischen CTC-Befund und der Größe des Primärtumors. Dies war zu erwarten, da die Tumorgöße als Risikofaktor für Metastasierung und Rezidivierung gilt (Warde et al., 2002; Valdevenito et al., 2007). Im klinischen Alltag wird die Prognose des Krankheitsverlaufes von Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren häufig nach der IGCCCG-Klassifikation in gut (*good*), intermedium (*intermediate*) und schlecht (*poor*) eingeteilt. Zu den Kriterien dieser Einteilung gehören die Art der Metastasierung und die Tumormarkerkonstellation. Nach der IGCCCG-Klassifikation haben 58% der Patienten mit Nichtseminomen eine gute, 28% eine intermediäre und 16% eine schlechte Prognose (Wilkinson & Read, 1997). Bei 67% der Patienten mit schlechter Prognose sind CD30/GPC-3-positive CTC nachweisbar (4 von 6). Es ist zu beachten, dass die Aussagen dieser und der folgenden Statistik durch den kleinen Stichprobenumfang (51 Patienten) limitiert sind. Nach Zusammenfassen der Ergebnisse (siehe Kapitel 4.2.1) zeigt sich eine Korrelation zwischen positivem CTC-Status und einem erhöhten Metastasierungsrisiko. Es ist daher anzunehmen, dass CTC im Blut auch für Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess einnehmen. Gleiches gilt für die Rezidivierung. Bei 6 von 6 Patienten, die an einem Rezidiv leiden, waren CTC im peripheren Blut nachweisbar. Außerdem ist zu beachten, dass alle drei Patienten, die im zeitlichen Rahmen der Arbeit an den Folgen der Krankheit verstorben sind,

CTC-positiv waren. Hierbei konnte wahrscheinlich auf Grund des kurzen Beobachtungszeitraums keine signifikante Korrelation ermittelt werden ($p=0,085$). Für genauere Aussagen über den Einfluss des CTC-Befundes auf die Überlebensrate sind daher weitere Langzeitstudien erforderlich. Der Vergleich der Resultate der vorliegenden Promotionsarbeit mit der Arbeit von Nastały et al. zeigt einige Unterschiede, die zum einen durch die Reduzierung der Patientenkohorte auf die Nichtseminome, zum anderen durch die Verwendung unterschiedlicher Marker und Methoden entstanden sein können (Nastały et al., 2014). So konnte unter Verwendung des Antikörpercocktails Anti-CD30/Anti-GPC-3 keine Korrelation zwischen CTC-Status und klinischem Stadium ermittelt werden, die jedoch zu erwarten ist, da die Stadien-Einteilung des Keimzelltumors über die Detektion lymphogener und hämatogener Streuung erfolgte (Cavalli et al., 1980). Insgesamt konnte jedoch eine signifikante Korrelation zwischen CTC-Befund und klinischem Stadium bestätigt werden ($p=0,002$). Korrelationen zwischen CTC-Befund und erhöhten Tumormarkern und die Assoziation des positiven CTC-Status mit einzelnen nicht-seminomatösen Tumorkomponenten konnten in der vorliegenden Promotionsarbeit nicht beobachtet werden (Nastały et al., 2014).

Trotz dieser Unterschiede deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der CTC-Nachweis bei Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren eine prognostische Relevanz besitzt und mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf einhergeht. Langzeitstudien zu diesem Thema werden benötigt, um den Einfluss des CTC-Befundes auf die Überlebensrate der Patienten umfassend zu klären.

5.8 Ausblick

Zur genaueren Evaluierung der immunzytochemischen Detektionsmethode nach Dichtegradientenzentrifugation sind weitere Langzeitstudien mit größeren Kohorten von Patienten notwendig, da der relativ kleine Stichprobenumfang und der kurze Beobachtungszeitraum nur eingeschränkte Aussagen zur klinischen Relevanz und Prognose zulassen. In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass CD30 und Glypican-3 geeignete Kandidaten sind, um den Pool an Detektionsmarkern für Keimzelltumoren zu erweitern. Die Detektion und die

Charakterisierung von CTC beinhalten das Potenzial der Identifizierung geeigneter Zielproteine für eine individualisierte Therapie (*targeted therapy*). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass sowohl für CD30 als auch für Glypican-3 therapeutische monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen (Feng et al., 2013; Zhu et al., 2013; Feng & Ho, 2014). CD30, welches vor allem in der Diagnose der Sternberg-Reed-Zellen beim Hodgkin-Lymphom angewendet wird (Irsch et al., 1998), gilt als ein unabhängiger Faktor für eine ungünstige Überlebensrate bei Patienten mit Chemotherapie-resistenten Embryonalkarzinomen (Giannatempo et al., 2013). Brentuximab Vedotin, ein monoklonaler Antikörper gegen CD30, ist seit 2011 in den USA und seit 2012 von der Europäischen Arzneimittelagentur in der Europäischen Union als Krebsmedikament zugelassen. Als Indikation gilt die Behandlung eines rezidivierten Hodgkin-Lymphoms nach autologer Stammzelltransplantation oder nach dem Versagen von zwei vorangegangenen Therapien (de Claro et al., 2012). Die Expression von Glypican-3 korreliert bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf (Shirakawa et al., 2009; Fu et al., 2013). Mit GC33, YP7, MDX-1414 und HN3 sind monoklonale therapeutische Antikörper gegen Glypican-3 in Entwicklung (Zhu et al., 2013; Feng et al., 2013; Feng & Ho, 2014). Es werden weitere Studien empfohlen, die die Möglichkeit der gezielten Krebstherapie überprüfen und die Verwendung der therapeutischen Antikörper gegen CD30 bzw. Glypican-3 an einem Kollektiv von Patienten mit therapieresistenten Keimzelltumoren testen, bei denen im Blut CD30- bzw. Glypican-3-positive CTC detektiert werden konnten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) bei Krebspatienten besitzt bereits für eine Vielzahl von Karzinomentitäten prognostische Relevanz. Zu CTC aus Patienten mit testikulären Keimzelltumoren gibt es dagegen nur wenige Untersuchungen. Die Detektion von CTC könnte ein zusätzliches Verfahren darstellen, damit okkulte Keimzelltumoren frühzeitig erkannt werden. Die Entwicklung sensitiver Detektionsmethoden wird jedoch durch die Heterogenität der nicht-seminomatösen Keimzelltumoranteile erschwert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Charakterisierung von Keimzelltumorkomponenten neue Detektionsmarker zu identifizieren, die anschließend zur CTC-Detektion bei 51 Patienten mit nicht-seminomatösen Keimzelltumoren verwendet werden sollten.

Hierfür wurden 4 Keimzelltumorzelllinien mit Hilfe des Western-Blottings und immunhistochemischer Verfahren auf die Expression bestimmter epithelialer, mesenchymaler und keimzelltumorspezifischer Marker untersucht. Die Analyse ergab, dass die Keimzelltumormarker Glypican-3 (GPC-3) und CD30 geeignete Kandidaten sind, um in Kombination als Marker zur CTC-Detektion eingesetzt zu werden. Die anschließende immunzytochemische Detektion von CTC in Blutproben, die zuvor durch die Dichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet worden waren, erfolgte unter Verwendung eines Anti-CD30/Anti-GPC-3-Antikörpercocktails.

Auf diese Weise konnten CTC bei 25,5% (13 von 51) der Patienten nachgewiesen werden. Die Anzahl an CTC betrug im Mittel 5 pro $1,4 \times 10^6$ mononuklearer Zellen. Der CTC-Befund korrelierte mit der Größe des Primärtumors ($p=0,042$). Außerdem konnten CTC häufiger bei Patienten mit Metastasen bzw. Rezidiven detektiert werden ($p=0,040$). Obwohl die prognostische Relevanz des CTC-Befundes angedeutet werden konnte, sind für Aussagen zu Überlebensraten weitere Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen und größeren Kohorten notwendig. Es lässt sich jedoch feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass GPC-3 und CD30 geeignet sind, um das Reservoir an Markern zur CTC-Detektion bei Patienten mit Keimzelltumoren zu erweitern. Zudem sind GPC-3 und CD30 von besonderem Interesse, da gegen beide Marker therapeutische monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen. So könnte der Nachweis von GPC-3-/CD30-positiven CTC den Einsatz dieser Antikörper zur gezielten Krebstherapie begründen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman, S.L., Knowles, B.B. & Andrews, P.W. (1994). Gene regulation during neuronal and non-neuronal differentiation of NTERA2 human teratocarcinoma-derived stem cells. *Brain research. Molecular brain research*. 25 (1-2). pp. 157–162.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*. 7 (11). pp. 834–846.
- Ahmad, A. & Hart, I.R. (1996). Biology of tumor micrometastasis. *Journal of hematotherapy*. 5 (5). pp. 525–535.
- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cohn-Cedermark, G., Horwich, A., Klepp, O., Laguna, M.P. & Pizzocaro, G. (2005). Guidelines on Testicular Cancer. *European urology*. 48 (6). pp. 885–894.
- Alimchandani, M., Wang, Z.-F. & Miettinen, M. (2014). CD30 expression in malignant vascular tumors and its diagnostic and clinical implications: a study of 146 cases. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 22 (5). pp. 358–362.
- Alix-Panabières, C. & Pantel, K. (2013). Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clinical chemistry*. 59 (1). pp. 110–118.
- Alix-Panabières, C., Riethdorf, S. & Pantel, K. (2008). Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 14 (16). pp. 5013–5021.
- Allard, W.J., Matera, J., Miller, M.C., Repollet, M., Connelly, M.C., Rao, C., Tibbe, A.G.J., Uhr, J.W. & Terstappen, L.W.M.M. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 10 (20). pp. 6897–6904.
- Almog, N., Ma, L., Raychowdhury, R., Schwager, C., Erber, R., Short, S., Hlatky, L., Vajkoczy, P., Huber, P.E., Folkman, J. & Abdollahi, A. (2009). Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer research*. 69 (3). pp. 836–844.
- Andrews, P.W. (1982) Human embryonal carcinoma cells in culture do not synthesize fibronectin until they differentiate. *International journal of cancer*. 30(5). pp. 567–71.
- Andrews, P.W. (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental biology*. 103(2). pp. 285–93.
- Andrews, P.W., Bronson, D.L., Benham, F., Strickland, S. & Knowles, BB. (1980). A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *International journal of cancer*. 26(3). pp. 269–80.
- Balzar, M., Winter, M.J., De Boer, C.J. & Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17–1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine*. 77 (10). pp. 699–712.

- Baniel, J., Foster, R.S., Gonin, R., Messemer, J.E., Donohue, J.P. & Einhorn, L.H. (1995). Late relapse of testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 13 (5). pp. 1170–1176.
- Battifora, H., Sheibani, K., Tubbs, R.R., Kopinski, M.I. & Sun, T.T. (1984). Antikeratin antibodies in tumor diagnosis. Distinction between seminoma and embryonal carcinoma. *Cancer*. 54 (5). pp. 843–848.
- Berney, D.M., Shamash, J., Pieroni, K. & Oliver, R.T. (2001). Loss of CD30 expression in metastatic embryonal carcinoma: the effects of chemotherapy? *Histopathology*. 39 (4). pp. 382–385.
- Bidard, F.-C., Mathiot, C., Delalogue, S., Brain, E., Giachetti, S., de Cremoux, P., Marty, M. & Pierga, J.-Y. (2010). Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 21 (4). pp. 729–733.
- Bidard, F.-C., Peeters, D.J., Fehm, T., Nolé, F., Gisbert-Criado, R., Mavroudis, D., Grisanti, S., Generali, D., Garcia-Saenz, J.A., Stebbing, J., Caldas, C., Gazzaniga, P., Manso, L., Zamarchi, R., de Lascoiti, A.F., De Mattos-Arruda, L., Ignatiadis, M., Lebofsky, R., van Laere, S.J., Meier-Stiegen, F., Sandri, M.T., Vidal-Martinez, J., Politaki, E., Consoli, F., Bottini, A., Diaz-Rubio, E., Krell, J., Dawson, S.-J., Raimondi, C., Rutten, A., Janni, W., Munzone, E., Carañana, V., Agelaki, S., Almici, C., Dirix, L., Solomayer, E.-F., Zorzino, L., Johannes, H., Reis-Filho, J.S., Pantel, K., Pierga, J.-Y. & Michiels, S. (2014). Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet. Oncology*. 15 (4). pp. 406–414.
- Bissolati, M., Sandri, M.T., Burtulo, G., Zorzino, L., Balzano, G. & Braga, M. (2014). Portal vein-circulating tumor cells predict liver metastases in patients with resectable pancreatic cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. pp. 1–6.
- Bokemeyer, C., Gillis, A.J., Pompe, K., Mayer, F., Metzner, B., Schleucher, N., Schleicher, J., Pflugrad-Jauch, G., Oosterhuis, J.W., Kanz, L. & Looijenga, L.H. (2001). Clinical impact of germ cell tumor cells in apheresis products of patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 19 (12). pp. 3029–3036.
- Bosl, G.J. & Motzer, R.J. (1997). Testicular germ-cell cancer. *New England Journal of Medicine*. 337(19). pp. 1403
- Bosl, G.J., Gluckman, R. & Geller, N.L., Golbey, R.B., Whitmore, W.F., Herr, H., Sogani, P., Morse, M., Martini, N., Bains, M. & McCormack, P. (1986). VAB-6: an effective chemotherapy regimen for patients with germ-cell tumors. *Journal of clinical oncology*. pp. 4(10):1493-9
- Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.-Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.-F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G.Y.C., Bliss, J., Vincent-Salomon, A. & Pantel, K. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 353 (8). pp. 793–802.
- Bray, S.J. & Kafatos, F.C. (1991). Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*. *Genes & development*. 5 (9). pp. 1672–1683.

- Bremmer, F., Hemmerlein, B., Strauss, A., Burfeind, P., Thelen, P., Radzun, H.J. & Behnes, C.L. (2012). N-cadherin expression in malignant germ cell tumours of the testis. *BMC clinical pathology*. 12. p. 19.
- Cailleau, R., Olivé, M. & Cruciger, Q.V.J. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In vitro*. 14 (11). pp. 911–915.
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. & Reeves, W.J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*. 53 (3). pp. 661–674.
- Cao, D., Li, J., Guo, C.C., Allan, R.W. & Humphrey, P.A. (2009). SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *The American journal of surgical pathology*. 33(7). pp. 1065–77
- Capurro, M.I., Shi, W., Sandal, S. & Filmus, J. (2005). Processing by convertases is not required for glypican-3-induced stimulation of hepatocellular carcinoma growth. *The Journal of biological chemistry*. 280 (50). pp. 41201–41206.
- Cavalli, F., Monfardini, S. & Pizzocaro, G. (1980). *Report on the international workshop on staging and treatment of testicular cancer*. *European Journal of Cancer*. 16(10). pp. 1367–72.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*. 2 (8). pp. 563–72.
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Walsh, K.A. & Fischer, E.H. (1988). The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85 (19). pp. 7182–7186.
- Cheville, J.C., Rao, S., Iczkowski, K.A., Lohse, C.M. & Pankratz, V.S. (2000). Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. *American journal of clinical pathology*. 113 (4). pp. 583–588.
- Chung, P., Gospodarowicz, M.K. & Panzarella, T. (2004). Stage II testicular seminoma: patterns of recurrence and outcome of treatment. *European urology*. 45(6):754–59
- Chung, T.L., Turner, J.P., Thaker, N.Y., Kollé, G., Cooper-White, J.J., Grimmond, S.M., Pera & M.F., Wolvetang, E.J. (2010). Ascorbate promotes epigenetic activation of CD30 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 28(10). pp. 1782–93.
- Cohen, S.J., Punt, C.J.A., Iannotti, N., Saidman, B.H., Sabbath, K.D., Gabrail, N.Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M.C., Doyle, G.V., Tissing, H., Terstappen, L.W.M.M. & Meropol, N.J. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 26 (19). pp. 3213–3221.
- Cristofanilli, M., Budd, G.T. & Ellis, M.J. Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., Hayes, D.F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 351(8). pp. 781–91
- Damjanov, I., Clark, R.K. & Andrews, P.W. (1984). Cytoskeleton of human embryonal carcinoma cells. *Cell differentiation*. 15 (2–4). pp. 133–139.

- Damjanov, I., Horvat, B. & Gibas, Z. (1993). Retinoic acid-induced differentiation of the developmentally pluripotent human germ cell tumor-derived cell line, NCCIT. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 68 (2). pp. 220–232.
- de Bono, J.S., Scher, H.I., Montgomery, R.B., Parker, C., Miller, M.C., Tissing, H., Doyle, G.V., Terstappen, L.W.W.M., Pienta, K.J. & Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 14 (19). pp. 6302–6309.
- de Claro, R.A., McGinn, K., Kwitkowski, V., Bullock, J., Khandelwal, A., Habtemariam, B., Ouyang, Y., Saber, H., Lee, K., Koti, K., Rothmann, M., Shapiro, M., Borrego, F., Clouse, K., Chen, X.H., Brown, J., Akinsanya, L., Kane, R., Kaminskis, E., Farrell, A. & Pazdur, R. (2012). U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 18 (21). pp. 5845–5849.
- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A.J.M., Hersmus, R., van Gurp, R.J.H.L.M., van de Geijn, G.-J.M., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Schneider, D.T., Sherlock, J.K., Baeten, J., Kitazawa, S., van Zoelen, E.J., van Roozendaal, K., Oosterhuis, J.W. & Looijenga, L.H.J. (2008). Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes, chromosomes & cancer*. 47 (3). pp. 185–196.
- Demicheli, R. (2001). Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Seminars in cancer biology*. 11 (4). pp. 297–306.
- Denève, E., Riethdorf, S., Ramos, J., Nocca, D., Coffy, A., Daurès, J.P., Maudelonde, T., Fabre, J.M., Pantel, K. & Alix-Panabières, C. (2013). Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*. 59(9). pp. 1384–92.
- Dieckmann, K.-P. & Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World journal of urology*. 22 (1). pp. 2–14.
- Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I. & Sesterhenn, I.A. (2004). Pathology and Genetics: Tumors of the urinary system and male genital organs. WHO classification of tumors. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon. pp. 217–250.
- Einhorn, L.H. & Donohue, J.P. (1977). Improved chemotherapy in disseminated testicular cancer. *The Journal of urology*. 117 (1). pp. 65–69.
- Engel, L.W., Young, N.A., Tralka, T.S., Lippman, M.E., O'Brien, S.J. & Joyce, M.J. (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer research*. 38 (10). pp. 3352–3364.
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T. & Sorensen, P. (2009). Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell cycle*. 8(18). pp. 2901–6
- Fan, Y., Einhorn, L., Saxman, S., Katz, B., Abonour, R. & Cornetta, K. (1998). Detection of germ cell tumor cells in apheresis products using polymerase chain reaction. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 4 (1). pp. 93–98.
- Feng, M. & Ho, M. (2014). Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer. *FEBS letters*. 588 (2). pp. 377–382.

- Feng, M., Gao, W., Wang, R., Chen, W., Man, Y.-G., Figg, W.D., Wang, X.W., Dimitrov, D.S. & Ho, M. (2013). Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (12). pp. E1083–91.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 136 (5). pp. E359–86.
- Fogel, M., Mercer, B.L., Moll, R., Kushnir, I., Jacob, N., Waldherr, R., Livoff, A., Franke, W.W. & Czernobilsky, B. (1990). Heterogeneity of intermediate filament expression in human testicular seminomas. *Differentiation; research in biological diversity*. 45 (3). pp. 242–9.
- Fosså, S.D., Bokemeyer, C., Gerl, A., Culine, S., Jones, W.G., Mead, G.M., Germa-Luch, J.R., Pont, J., Schmoll, H.J. & Tjulandin, S. (1999). Treatment outcome of patients with brain metastases from malignant germ cell tumors. *Cancer*. 85(4). pp. 988–97
- Fu, S.-J., Qi, C.-Y., Xiao, W.-K., Li, S.-Q., Peng, B.-G. & Liang, L.-J. (2013). Glypican-3 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery*. 154 (3). pp. 536–544.
- Galanski, M. (2006). Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 1(2). pp. 285–95.
- Germà-Lluch, J.R., del Muro, X.G., Maroto, P., Paz-Ares, L., Arranz, J.A., Gumà, J., Alba, E., Sastre, J., Aparicio, J., Fernández, A., Barnadas, A., Terrassa, J., Sáenz, A., Almenar, D., López-Brea, M., Climent, M.A., Sánchez, M.A., Lasso de la Vega, R., Berenguer, G. & Pérez, X. (2002). Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: the experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). *European urology*. 42(6). pp. 553-62
- Ghazarian, A.A., Trabert, B., Devesa, S.S. & McGlynn, K.A. (2014). Recent trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Andrology*. [Epub ahead of print].
- Giannatempo, P., Paolini, B., Miceli, R., Raggi, D., Nicolai, N., Farè, E., Catanzaro, M., BIASONI, D., Torelli, T., Stagni, S., Piva, L., Mariani, L., Salvioni, R., Colecchia, M., Gianni, A.M. & Necchi, A. (2013). Persistent CD30 expression by embryonal carcinoma in the treatment time course: prognostic significance of a worthwhile target for personalized treatment. *The Journal of urology*. 190 (5). pp. 1919–1924.
- Goldkorn, A., Ely, B., Quinn, D.I., Tangen, C.M., Fink, L.M., Xu, T., Twardowski, P., Van Veldhuizen, P.J., Agarwal, N., Carducci, M.A., Monk, J.P., Datar, R.H., Garzotto, M., Mack, P.C., Lara, P., Higo, C.S., Hussain, M., Thompson, I.M., Cote, R.J. & Vogelzang, N.J. (2014). Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 32 (11). pp. 1136–1142.
- Griwatz, C., Brandt, B., Assmann, G. & Zänker, K.S. (1995). An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *Journal of immunological methods*. 183 (2). pp. 251–265.

- Gupta, G.P. & Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127 (4). pp. 679–695.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast, R.C. American Society of Clinical Oncology (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 25 (33). pp. 5287–5312.
- Hautkappe, A.L., Lu, M., Mueller, H., Bex, A., Harstrick, A., Roggendorf, M. & Ruebben, H. (2000). Detection of germ-cell tumor cells in the peripheral blood by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for alpha-fetoprotein-messenger RNA and beta human chorionic gonadotropin-messenger RNA. *Cancer research*. 60 (12). pp. 3170–3174.
- Hay, E.D. (1982). Interaction of embryonic cell surface and cytoskeleton with extracellular matrix. *American Journal of Anatomy*. 165 (1). pp. 1–12.
- Hayes, D.F., Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Miller, M.C., Matera, J., Allard, W.J., Doyle, G.V. & Terstappen, L.W.W.M. (2006). Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 12 (14 Pt 1). pp. 4218–4224.
- Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L. & Aaronson, S.A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology*. 148 (4). pp. 779–790.
- Hildebrandt, M., Rick, O., Salama, A., Siegert, W., Huhn, D. & Beyer, J. (2000). Detection of germ-cell tumor cells in peripheral blood progenitor cell harvests: impact on clinical outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 6 (12). pp. 4641–4646.
- Hildebrandt, M.O., Bläser, F., Beyer, J., Siegert, W., Mapara, M.Y., Huhn, D. & Salama, A. (1998). Detection of tumor cells in peripheral blood samples from patients with germ cell tumors using immunocytochemical and reverse transcriptase-polymerase chain reaction techniques. *Bone marrow transplantation*. 22 (8). pp. 771–775.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine*. 1 (2). pp. 149–153.
- Honecker, F., Kersemaekers, A.-M.F., Molier, M., Van Weeren, P.C., Stoop, H., De Krijger, R.R., Wolffenbuttel, K.P., Oosterhuis, W., Bokemeyer, C. & Looijenga, L.H.J. (2004). Involvement of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. *The Journal of pathology*. 204 (2). pp. 167–174.
- Horm, J.W. & Sondik, E.J. (1989). Person-years of life lost due to cancer in the United States, 1970 and 1984. *American journal of public health*. 79(11). pp. 1490–3
- Howard, G.C.W., Conkey, D.S., Peoples, S., McLaren, D.B., Hargreave, T.B., Tulloch, D.N., Walker, W. & Kerr, G.R. (2005). The management and outcome of patients with germ-cell tumours treated in the Edinburgh Cancer Centre between 1988 and 2002. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 17 (6). pp. 435–440.

- Hu, L., Lau, S.H., Tzang, C.-H., Wen, J.-M., Wang, W., Xie, D., Huang, M., Wang, Y., Wu, M.-C., Huang, J.-F., Zeng, W.-F., Sham, J.S.T., Yang, M. & Guan, X.-Y. (2004). Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 23 (1). pp. 298–302.
- Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Haberland, J., Kraywinkel, K. & Wolf, U. (2010). *Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends*. 7. Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin. pp. 76–79
- Ignatiadis, M. & Reinholz, M. (2011). Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 13 (5). p. 222.
- Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Küppers, R. & Radbruch, A. (1998). Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95 (17). pp. 10117–10122.
- Jackson, B.W., Grung, C., Winter, S., Franke, W.W. & Illmensee, K. (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation; research in biological diversity*. 20 (3). pp. 203–16.
- Jakóbisiak, M., Lasek, W. & Gołab, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology letters*. 90 (2-3). pp. 103–122.
- Jamieson, E.R. & Lippard, S.J. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical reviews*. 99(9). pp. 2467–98.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61 (2). pp. 69–90.
- Jordan, P. & Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 57(8-9). pp. 1229–35
- Kara, T., Younes, M., Erol, B. & Karcaaltincaba, M. (2012). Evaluation of testicular vein anatomy with multidetector computed tomography. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 34 (4). pp. 341–345.
- Kartalou, M. & Essigmann, J.M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*. 478(1-2). pp. 23–43.
- Kim, Y.H. & Kang, J.S. (2013). Expression of glypican-3 in mouse embryo stem cells and its derived hepatic lineage cells treated with diethylnitrosamine in vitro. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 14 (11). pp. 6341–6345.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J. & Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 450 (7171). pp. 903–907.
- Kollmannsberger, C., Nichols, C. & Bokemeyer, C. (2006). Recent advances in management of patients with platinum- refractory testicular germ cell tumors. *Cancer*. 106 (6). pp. 1217–1226.

- Köberle, B., Grimaldi, K.A. & Sunter, A. (1997). DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *International journal of cancer*. 70(5). pp. 551-5.
- Köberle, B., Tomicic, M.T., Usanova, S. & Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica acta*. 1806(2). pp. 172-82
- Lebwohl, D. & Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 34 (10). pp. 1522-1534.
- Lianidou, E.S. & Markou, A. (2011). Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical chemistry*. 57 (9). pp. 1242-1255.
- Liu, M.C., Shields, P.G., Warren, R.D., Cohen, P., Wilkinson, M., Ottaviano, Y.L., Rao, S.B., Eng-Wong, J., Seillier-Moiseiwitsch, F., Noone, A.-M. & Isaacs, C. (2009). Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27 (31). pp. 5153-5159.
- Looijenga, L.H.J., Gillis, A.J.M., Stoop, H., Biermann, K. & Oosterhuis, J.W. (2011). Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *International journal of andrology*. 34 (4 Pt 2). pp. e234-51.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. & Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American journal of pathology*. 153 (3). pp. 865-873.
- Mencel, P.J., Motzer, R.J., Mazumdar, M., Vlavis, V., Bajorin, D.F. & Bosl, G.J. (1994). Advanced seminoma: treatment results, survival, and prognostic factors in 142 patients. *Journal of clinical oncology*. 12(1). pp. 120-6
- Mercer, B.L., Fogel, M., Moll, R., Jacob, N., Kushnir, I., Livoff, A., Waldherr, R., Franke, W.W. & Czernobilsky, B. (1991). Intermediate filament protein profiles of human testicular non-seminomatous germ cell tumors: correlation of cytokeratin synthesis to cell differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*. 48 (3). pp. 191-8.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M. & Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 15 (2). pp. 117-134.
- Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Tsinberg, P., Coutts, S.M., Zomorodi, M., Pham, T., Bischoff, F.Z. & Pircher, T.J. (2011). Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *Journal of oncology*. 2011 (4). pp. 252361-10.
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S. & Kitazawa, S. (1993) Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2). *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 84 (7). pp. 1211-8.

- Motzer, R.J., Agarwal, N., Beard, C., Bolger, G.B., Boston, B., Carducci, M.A., Choueiri, T.K., Figlin, R.A., Fishman, M., Hancock, S.L., Hudes, G.R., Jonasch, E., Kessinger, A., Kuzel, T.M., Lange, P.H., Levine, E.G., Margolin, K.A., Michaelson, M.D., Olencki, T., Pili, R., Redman, B.G., Robertson, C.N., Schwartz, L.H., Sheinfeld, J. & Wang, J. (2009). NCCN clinical practice guidelines in oncology: testicular cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 7 (6) pp. 672–693.
- Mukhtar, S., Beatty, J., Agrawal, S., Christmas, T.J., Jameson, C. & Huddart, R.A. (2011). Germ cell tumour: late recurrence after 43 years. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 93 (5). pp. e24–6.
- Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Jänicke, F. & Pantel, K. (2005). Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 11 (10). pp. 3678–3685.
- Nastały, P., Ruf, C., Becker, P., Bednarz-Knoll, N., Stoupiec, M., Kavsar, R., Isbarn, H., Matthies, C., Wagner, W., Höppner, D., Fisch, M., Bokemeyer, C., Ahyai, S., Honecker, F., Riethdorf, S. & Pantel, K. (2014). Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 20 (14). pp. 3830–3841.
- Nichols, C.R., Roth, B.J., Loehrer, P.J., Williams, S.D., Einhorn, L.H.. (1994). Salvage chemotherapy for recurrent germ cell cancer. *Seminars in oncology*. 21 (5 Suppl 12). pp. 102–108.
- Okumura, Y., Tanaka, F., Yoneda, K., Hashimoto, M., Takuwa, T., Kondo, N. & Hasegawa, S. (2009). Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients. *The Annals of thoracic surgery*. 87 (6). pp. 1669–1675.
- Pallesen, G. & Hamilton-Dutoit, S.J. (1988). Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *The American journal of pathology*. 133 (3). pp. 446–450.
- Pantel, K. & Alix-Panabières, C. (2010). Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in molecular medicine*. 16 (9). pp. 398–406.
- Pantel, K. & Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*. 4. pp. 448–456
- Pantel, K., Alix-Panabières, C. & Riethdorf, S. (2009). Cancer micrometastases. *Nature reviews. Clinical oncology*. 6 (6). pp. 339–351.
- Pantel, K., Brakenhoff, R.H. & Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*. 8 (5). pp. 329–340.
- Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B., Izbicki, J.R. & Riethmüller, G. (1994). Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *Journal of hematotherapy*. 3 (3). pp. 165–173.
- Paterlini-Bréchet, P. & Benali, N.L. (2007). Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer letters*. 253 (2). pp. 180–204.

- Peeters, D.J.E., Van den Eynden, G.G., van Dam, P.-J., Prové, A., Benoy, I.H., van Dam, P.A., Vermeulen, P.B., Pauwels, P., Peeters, M., Van Laere, S.J. & Dirix, L.Y. (2011). Circulating tumour cells in the central and the peripheral venous compartment in patients with metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. 104 (9). pp. 1472–1477.
- Pleasure, S.J. & Lee, V.M. (1993). NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *Journal of neuroscience research*. 35 (6). pp. 585–602.
- Pleasure, S.J., Page, C. & Lee, V.M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 12 (5). pp. 1802–1815.
- Poveda, A., Kaye, S.B., McCormack, R., Wang, S., Parekh, T., Ricci, D., Lebedinsky, C.A., Tercero, J.C., Zintl, P. & Monk, B.J. (2011). Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 122 (3). pp. 567–572.
- Preda, O., Nicolae, A., Fernández, J.A., Borda, A. & Nogales, F.F. (2011). Glypican 3 is a sensitive, but not a specific, marker for the diagnosis of yolk sac tumours. *Histopathology*. 58 (2). pp. 312–4.
- Pro, B., Advani, R., Brice, P., Bartlett, N.L., Rosenblatt, J.D., Illidge, T., Matous, J., Ramchandren, R., Fanale, M., Connors, J.M., Yang, Y., Sievers, E.L., Kennedy, D.A. & Shustov, A. (2012). Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *Journal of clinical oncology*. 30(18). pp. 2190–6.
- Rabik, C.A. & Dolan, M.E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*. 33(1). pp. 9–23.
- Rack, B., Schindlbeck, C., Andergassen, U., Schneeweiss, A., Zwingers, T., Lichtenegger, W., Beckmann, M., Sommer, H. L., Pantel, K., Janni, W. (2010). Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS trial. *J Clin Oncol*. 28. pp. 15
- Rack, B., Schindlbeck, C., Jückstock, J., Andergassen, U., Hepp, P., Zwingers, T., Friedl, T.W., Lorenz, R., Tesch, H., Fasching, P.A., Fehm, T., Schneeweiss, A., Lichtenegger, W., Beckmann, M.W., Friese, K., Pantel, K., Janni, W. (2014). Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 106 (5).
- Rahbari, N.N., Bork, U., Kircher, A., Nimitz, T., Schölch, S., Kahlert, C., Schmidt, T., Steinert, G., Ulrich, A.B., Reissfelder, C., Büchler, M.W., Koch, M. & Weitz, J. (2012). Compartmental differences of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 19 (7). pp. 2195–2202.
- Riethdorf, S. & Pantel, K. (2010). Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1210 (1). pp. 66–77.

- Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M. & Pantel, K. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13 (3). pp. 920–928.
- Riethdorf, S., Müller, V., Zhang, L., Rau, T., Loibl, S., Komor, M., Roller, M., Huober, J., Fehm, T., Schrader, I., Hilfrich, J., Holms, F., Tesch, H., Eidtmann, H., Untch, M., Minckwitz, von, G. & Pantel, K. (2010). Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 16 (9). pp. 2634–2645.
- Rink, M., Chun, F.K.H., Minner, S., Friedrich, M., Mauermann, O., Heinzer, H., Huland, H., Fisch, M., Pantel, K. & Riethdorf, S. (2011). Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU international*. 107 (10). pp. 1668–1675.
- Saito, T., Katagiri, A., Watanabe, R., Tanikawa, T., Kawasaki, T., Tomita, Y. & Takahashi, K. (2000). Expression of E-cadherin and catenins on testis tumor. *Urologia internationalis*. 65 (3). pp. 140–143.
- Scher, H.I., Jia, X., de Bono, J.S., Fleisher, M., Pienta, K.J., Raghavan, D. & Heller, G. (2009). Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a re-analysis of IMMC38 trial data. *The Lancet. Oncology*. 10 (3). pp. 233–9.
- Schmelz, H.U., Sparwasser, C. & Weidner, W. (2006). *Facharztwissen Urologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. pp. 258–281.
- Schönberger, S., Okpanyi, V., Calaminus, G., Heikaus, S., Leuschner, I., Nicholson, J.C., Stoecklein, N.H., Schneider, D.T. & Borkhardt, A. (2013). EPCAM-A novel molecular target for the treatment of pediatric and adult germ cell tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 52 (1). pp. 24–32.
- Sesterhenn, I.A. & Davis, C.J. (2004). Pathology of germ cell tumors of the testis. *Cancer Control*. 11(6). pp. 374–87.
- Shaw, J. (2008). Diagnosis and treatment of testicular cancer. *Am Fam Physician*. 77(4). pp. 469–74.
- Shirakawa, H., Suzuki, H., Shimomura, M., Kojima, M., Gotohda, N., Takahashi, S., Nakagohri, T., Konishi, M., Kobayashi, N., Kinoshita, T. & Nakatsura, T. (2009). Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*. 100 (8). pp. 1403–1407.
- Smith, C.A., Farrah, T. & Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 76(6). pp. 959–62.
- Sobin, L.H. & Wittekind, C.H. (2002). TNM classification of malignant tumours. 6. Auflage. Wiley-Liss, New York.
- Sommers, C.L., Heckford, S.E., Skerker, J.M., Worland, P., Torri, J.A., Thompson, E.W., Byers, S.W. & Gelmann, E.P. (1992). Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer research*. 52 (19). pp. 5190–5197.

- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 51 (5). pp. 1409–1416.
- Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'connor, N. & Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H., Schwarting, R. & Lennert, K. (1985). The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 66(4). pp. 848-58.
- Sung, M.-T., Jones, T.D., Beck, S.D., Foster, R.S. & Cheng, L. (2006). OCT4 is superior to CD30 in the diagnosis of metastatic embryonal carcinomas after chemotherapy. *Human pathology*. 37 (6). pp. 662–667.
- Suster, S., Moran, C.A., Dominguez-Malagon, H. & Quevedo-Blanco, P. (1998). Germ cell tumors of the mediastinum and testis: a comparative immunohistochemical study of 120 cases. *Human pathology*. 29 (7). pp. 737–742.
- Swennenhuis, J.F., Tibbe, A.G.J., Levink, R., Sipkema, R.C.J. & Terstappen, L.W.M.M. (2009). Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry Part A*. 75A (6). pp. 520–527.
- Tanaka, Y., Kanai, F., Tada, M., Tateishi, R., Sanada, M., Nannya, Y., Ohta, M., Asaoka, Y., Seto, M., Shiina, S., Yoshida, H., Kawabe, T., Yokosuka, O., Ogawa, S. & Omata, M. (2008). Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 49 (5). pp. 746–757.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2 (6). pp. 442–454.
- Ulbright, T.M. (2005). Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Modern Pathology*. 18. pp. 61–79
- Valdevenito, J.P., Gallegos, I., Fernández, C., Acevedo, C. & Palma, R. (2007). Correlation between primary tumor pathologic features and presence of clinical metastasis at diagnosis of testicular seminoma. *Urology*. 70 (4). pp. 777–780.
- Wagener, C. & Müller, O. (1999). *Molekulare Onkologie*. 1. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wahrendorf, J., Holzmeier, S. & Becker, N. (1998). *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland: Atlas of cancer mortality in the Federal Republic of Germany: 1981-1990*. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Wang, N., Trend, B., Bronson, D.L., Fraley, E.E. (1980) Nonrandom abnormalities in chromosome 1 in human testicular cancers. *Cancer research*. 40 (3). pp. 796-802.
- Warde, P., Specht, L., Horwich, A., Oliver, T., Panzarella, T., Gospodarowicz, M. & Maase, von der, H. (2002). Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 20 (22). pp. 4448–4452.
- Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G. & Dirnhofer, S. (2004). Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human pathology*. 35 (1). pp. 122–128.

- Werner, S., Frey, S., Riethdorf, S., Schulze, C., Alawi, M., Kling, L., Vafaizadeh, V., Sauter, G., Terracciano, L., Schumacher, U., Pantel, K. & Assmann, V. (2013). Dual roles of the transcription factor grainyhead-like 2 (GRHL2) in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*. 288 (32). pp. 22993–23008.
- Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schönheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M., Barasch, J., Rosenbauer, F., Luft, F.C. & Schmidt-Ott, K.M. (2010). The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development (Cambridge, England)*. 137 (22). pp. 3835–3845.
- Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K.R. (2008). Cadherin switching. *Journal of cell science*. 121(6). pp. 727–35
- Wilkinson, P.M. & Read, G. (1997). International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology*. 15(2). pp. 594–603.
- Xiang, X., Deng, Z., Zhuang, X., Ju, S., Mu, J., Jiang, H., Zhang, L., Yan, J., Miller, D. & Zhang, H.-G. (2012). Grhl2 determines the epithelial phenotype of breast cancers and promotes tumor progression. F. H. Sarkar (ed.). *PloS one*. 7 (12). p. e50781.
- Younes, A., Gopal, A.K., Smith, S.E., Ansell, S.M., Rosenblatt, J.D., Savage, K.J., Ramchandren, R., Bartlett, N.L., Cheson, B.D., de Vos, S., Forero-Torres, A., Moskowitz, C.H., Connors, J.M., Engert, A., Larsen, E.K., Kennedy, D.A., Sievers, E.L. & Chen, R. (2012). Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology*. 30(18). pp. 2183–9.
- Yuasa, T., Yoshiki, T., Tanaka, T., Isono, T. & Okada, Y. (1999). Detection of circulating testicular cancer cells in peripheral blood. *Cancer letters*. 143 (1). pp. 57–62.
- Zhu, A.X., Gold, P.J., El-Khoueiry, A.B., Abrams, T.A., Morikawa, H., Ohishi, N., Ohtomo, T. & Philip, P.A. (2013). First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19 (4). pp. 920–928.
- Zynger, D.L., Dimov, N.D., Luan, C., Teh, B.T. & Yang, X.J. (2006). Glypican 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. *The American journal of surgical pathology*. 30 (12). pp. 1570–1575.
- Zynger, D.L., McCallum, J.C., Luan, C., Chou, P.M. & Yang, X.J. (2010). Glypican 3 has a higher sensitivity than alpha-fetoprotein for testicular and ovarian yolk sac tumour: immunohistochemical investigation with analysis of histological growth patterns. *Histopathology*. 56(6). pp. 750–7

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abk.	Abkürzung
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
ASCO	<i>American Society of Oncology</i>
βhCG	β-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CK	Keratin (<i>cytokeratin</i>)
cm	Zentimeter
cN	klinisch nachgewiesener Lymphknotenbefall
CTC	zirkulierende Tumorzelle(n) (<i>circulating tumor cell/cells</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DK	Dänemark
DTC	disseminierte Tumorzelle(n) (<i>disseminated tumor cell/cells</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EC	Embryonales Karzinom (<i>embryonal carcinoma</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EpCam	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GPC-3	Glypican-3
GRHL2	<i>Granyhead-like 2</i>
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC70	Hitzeschockprotein mit der ungefähren Masse von 70 kDa (<i>heat shock cognate</i>)
ICC	Immunzytochemie (<i>immunocytochemistry</i>)
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

Lk	Lymphknoten
IE	international Einheiten
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
Ig	Immunglobuline
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
M	Molar
MNC	mononukleare Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M	Metastase
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRD	<i>minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N	Lymphknoten (<i>nodus</i>)
n	Anzahl
n.a.	nicht verfügbar (<i>not available</i>)
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
p.	Seite (<i>page</i>)
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle
PLAP	Plazentare Alkalische Phosphatase
pos.	positiv

pp.	Seiten (<i>pages</i>)
pN	mikroskopisch nachgewiesener Lymphknotenbefall
pT1-4	mikroskopische Tumorstadieneinteilungen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT-PCR	<i>Reverse Transkriptase</i> -Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR)
S	Serumtumormarker
SALL4	<i>Sal-like protein 4</i>
sec	Sekunde
SWE	Schweden
T	Primärtumor
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween 20
TC	Teratokarzinom (Teratocarcinoma)
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>Unit</i>)
u.	und
u.a.	unter anderem/n
UK	Vereinigtes Königreich (<i>United Kingdom</i>)
UICC	International Union Against Cancer
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem/n
v	Volumen
vgl.	vergleiche
w	Masse (<i>weight</i>)
WB	Western Blot
YST	Dottersacktumor (<i>Yolk-Sac Tumor</i>)
z.B.	zum Beispiel

9. **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Voran bedanke ich mich beim Leiter des Institutes für Tumorbilogie **Prof. Dr. Klaus Pantel** dafür, dass er mir die Promotionsarbeit in seinem Institut ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt **PD Dr. Sabine Riethdorf** für die Themenstellung, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Korrektur dieser Dissertation.

Des Weiteren danke ich **PD Dr. Dr. med. Friedemann Honecker** für seine Hilfe, die zur Entstehung meines Promotionsvorhabens geführt hat.

Außerdem danke ich **Paulina Nastaly** für die Bereitstellung der Patientenproben und für ihre betreuende Unterstützung während der experimentellen Arbeit.

Ich danke dem ganzen Team der Arbeitsgruppe von PD Dr. Sabine Riethdorf für die angenehme Zeit während der Promotionsarbeit. **Malgorzata Stoupiec** und **Oliver Mauermann** danke ich für ihre hervorragende Unterstützung während der Durchführung der Experimente. **Dr. Volker Assmann** danke ich für die Bereitstellung der GRHL2-Antikörper. Außerdem danke ich **Dr. Kai Bartkowiak**, **Sonja Santjer** und **Dr. Sabrina Frey** für ihre Hilfe bei Fragen zum Western-Blotting.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern für den starken Rückhalt. Ohne ihre mentale und materielle Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Abschließend danke ich meinen Freunden für den privaten Ausgleich und ihre moralische Unterstützung. Mark und Aris danke ich zudem für ihre Hilfe während der Erstellung der Dissertationsschrift.

10. LEBENSLAUF

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:


(Refik Kavsar)

Hamburg, den 26.4.15