

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -

Analyse genetischer Aberrationen in testikulären Keimzelltumoren
mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Kleine, Anna Katharina
aus Freiburg
2005

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Herbst
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. N. Müller-Lantzsch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Herbst
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. N. Müller-Lantsch

Analyse genetischer Aberrationen in testikulären Keimzelltumoren mit Hilfe der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH)

Anna Katharina Kleine

Zusammenfassung

Testikuläre Keimzelltumoren (TKZT) sind die häufigste Krebserkrankung junger Männer. In dieser Altersgruppe sind maligne Erkrankungen oft mit onkogenen Viren assoziiert. Genprodukte endogener Retroviren der Familie HERV-K konnten in TKZT regelmäßig nachgewiesen werden. Ihr Bezug zu chromosomalen Aberrationen ist unklar.

Es wurden 21 Seminome, 19 Nichtseminome und 6 Spermatozytische Seminome mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert. Diese zytogenetische Methode erlaubt auch an Archivmaterial relative Gewinne und Verluste des Genoms zu identifizieren, die durch Amplifikation, Deletion oder unbalancierte Translokation verursacht werden.

Die durchschnittliche Anzahl der Aberrationen war vom histologischen Typ abhängig. So wiesen nichtseminomatöse Tumoren durchschnittlich 9,5, Seminome 8,4 und spermatozytische Seminome 5,7 Aberrationen pro Fall auf.

Seminome und nichtseminomatöse Tumoren zeigten ähnliche, charakteristische Aberrationen: Zugewinne auf den Chromosomen 7, 8, 12 und X sowie Verluste auf den Chromosomen 4, 5, 11, 13q und 18. Spermatozytische Seminome waren durch spezifische chromosomale Veränderungen in Form von Zugewinnen auf den Chromosomen 6 und 9 charakterisiert und unterstrichen damit ihre Abgrenzung zu den klassischen Seminomen als eigene Entität.

Die Analyse der Gemischten Keimzelltumoren zeigte identische chromosomale Aberrationen innerhalb der einzelnen histologischen Kompartimente.

Ein Vergleich der durch CGH analysierten chromosomalen Aberrationen mit den Chromosomen, auf denen HERV-K Proviren integriert sind, zeigte keine schlüssige Korrelation. Chromosomale Aberrationen von mehr als 50% wurden bei den HERV-K Proviren tragenden Chromosomen bzw. chromosomalen Armen 7p, 11q und 12q ebenso entdeckt wie bei den HERV-K negativen Chromosomen 7q, 8, 12p, 18, 21 und X. Dies kann als Hinweis darauf gelten, dass die in TKZT zu beobachtende Expression von HERV-K nicht zwingend strukturelle Veränderungen voraussetzen oder zur Folge hat und dass für die Karzinogenese testikulärer Keimzelltumoren neben endogenen Retroviren weitere Faktoren in Betracht kommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Testikuläre Keimzelltumoren	7
1.2	Virusassoziierte Malignome	10
	1.2.1 Endogene Retroviren der Gruppe HERV-K	12
1.3	Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)	15
1.4	Fragestellung	16

2. Material und Methode

2.1	Untersuchungsmaterial	17
2.2	Mikrodissektion	18
2.3	DNA Extraktion aus der Tumorgewebeprobe	18
2.4	Gewinnung von Referenz-DNA	22
2.5	Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)	23
	2.5.1 Extraktion der genomischen DNA aus der Tumorgewebeprobe und aus Normal-DNA	24
	2.5.2 Präparation der Zielchromosomen aus kultivierten Lymphozyten	24
	2.5.3 DNA-Markierung mittels Nick-Translation	27
	2.5.3.1 Berechnung der DNA-Menge zur Nick-Translation	27
	2.5.3.2 Ansetzen des Nick-Translations-Gemischs	28
	2.5.3.3 Chromatographische Aufreinigung der Nick-translatierten DNA über Sephadex-G50-Säulen oder Quiagen-Säulen	29
	2.5.3.4 Filtertest	30
	2.5.4 Hybridisierung	31
	2.5.5 Waschung und Detektion	32
	2.5.6 Mikroskopie und digitale Bildanalyse	34
	2.5.7 Auswertung, Schwellenwerte und Kontrollen	36
	2.5.8 Statistische Analysen	37

3. Ergebnisse

3.1	Histologische Typisierung der untersuchten Keimzelltumoren	38
3.2	Immunhistochemie	42
3.3	Patientendaten	43
3.4	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	46
	3.4.1 Seminome	46
	3.4.2 Spermatozytische Seminome	48
	3.4.3 Embryonale Karzinome	50
	3.4.4 Dottersacktumoren	51
	3.4.5 Gemischte testikuläre Keimzelltumoren	53
	3.4.5.1 Analyse der Aberrationen pro Fall	53
	3.4.5.2 Analyse der Aberrationen der einzelnen histologischen Komponenten	55
	3.4.6 Uterines Choriokarzinom	56
3.5	Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit von der Tumorentität	61
3.6	Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Seminomen (SE), Nichtseminomen (NS) und Spermatozytischen Seminomen (SpSE)	62
3.7	Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Embryonalen Karzinomen (EC) und Dottersacktumoren (YST)	64
3.8	Spezifische Lokalisation von Aberrationen „reiner“ Keimzelltumoren und ihrer Anteile in Gemischten Keimzelltumoren	66
	3.8.1 Seminome und seminomatöse Anteile Gemischter Keimzelltumoren	66
	3.8.2 Embryonale Karzinome und embryonal-karzinomatöse Anteile Gemischter Keimzelltumoren	66
	3.8.3 Dottersacktumore und dottersacktumoröse Anteile Gemischter Keimzelltumoren	66
3.9	Lokalisation chromosomaler Aberrationen und HERV-K Lokalisation bei testikulären Keimzelltumoren	67

4.	Diskussion	
4.1	Untersuchte testikuläre Keimzelltumoren	69
4.2	Anzahl der chromosomalen Aberrationen	69
4.3	Lokalisation chromosomaler Aberrationen	70
	4.3.1 Seminome	70
	4.3.2 Spermatozytische Seminome	71
	4.3.3 Embryonalen Karzinome	71
	4.3.4 Dottersacktumoren	72
	4.3.5 Gemischte Keimzelltumoren	72
	4.3.6 Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Seminomen (SE), Nichtseminomen (NS) und Spermatozytischen Seminomen (SpSE)	74
4.4	Lokalisation chromosomaler Aberrationen und HERV-K Lokalisation bei testikulären Keimzelltumoren	76
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literaturverzeichnis	79
7.	Danksagung	83
8.	Lebenslauf	84

1. Einleitung

1.1 Testikuläre Keimzelltumoren

Testikuläre Keimzelltumoren sind in der Altersklasse zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr die häufigste Krebserkrankung des Mannes. Insgesamt machen sie weniger als 1% aller malignen Tumoren der männlichen Bevölkerung aus. Weltweit ist die Inzidenz der testikulären Keimzelltumoren unterschiedlich. Dänemark zeigt die höchste altersspezifische Inzidenzrate von 23/100 000/Jahr in der Gruppe der Männer zwischen 20 und 30 Jahren. In Deutschland liegt die Inzidenz der Hodentumoren bei 6,5 /100 000/Jahr [3]. Gemäß einer dänischen Studie hat sich die Inzidenz der Keimzelltumoren in den letzten 50 Jahren mehr als verdoppelt [22].

Als bekannte Risikofaktoren für Keimzelltumoren gelten Kryptorchismus (bei etwa 15% der Erkrankten) und ein Keimzelltumor im kontralateralen Hoden.

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Inzidenz werden in den letzten Jahren auch einige andere Faktoren erwogen, wie Chemikalien, Bestrahlung, Wärme und virale oder bakterielle Infektionen [10]. Das Keimepithel gilt als das sensibelste Gewebe des Körpers, was toxische Schäden betrifft. Darüberhinaus lässt ein familiär gehäuftes Auftreten von Hodentumoren auch an genetische Ursachen denken [36].

Histologisch, immunhistochemisch und klinisch werden testikuläre Keimzelltumoren in Seminome und Nichtseminome unterteilt. Zu den Nichtseminomen gehören das Embryonale Karzinom, der Dottersacktumor, das Teratom und das Choriokarzinom. Das spermatozytische Seminom bildet eine separate Entität.

Die Keimzellentwicklung beim Mann läuft in der Embryonal- und Fetalperiode von primordialen Gonozyten über Gonozyten zu Prospermatogonien. Postpartal entwickeln sich aus letzteren Germinalzellen, aus denen sich in der Adoleszenz die Spermatogenese entwickelt (Vgl. Abb. 1).

Nach neueren Vorstellungen entwickeln sich Seminome und Nichtseminome aus primordialen Gonozyten über eine *in situ*-Vorstufe, die testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN; Synonyma: testikuläres *Carcinoma in situ*, intratubuläre Keimzellneoplasie). Unklar ist, ob die Onkogenese maligner Teratome direkt von Gonozyten oder über Formationen eines *Carcinoma in situ* läuft. Spermatozytische Seminome entstehen dagegen im späteren Leben unmittelbar aus Keimzellen (Spermatogonien).

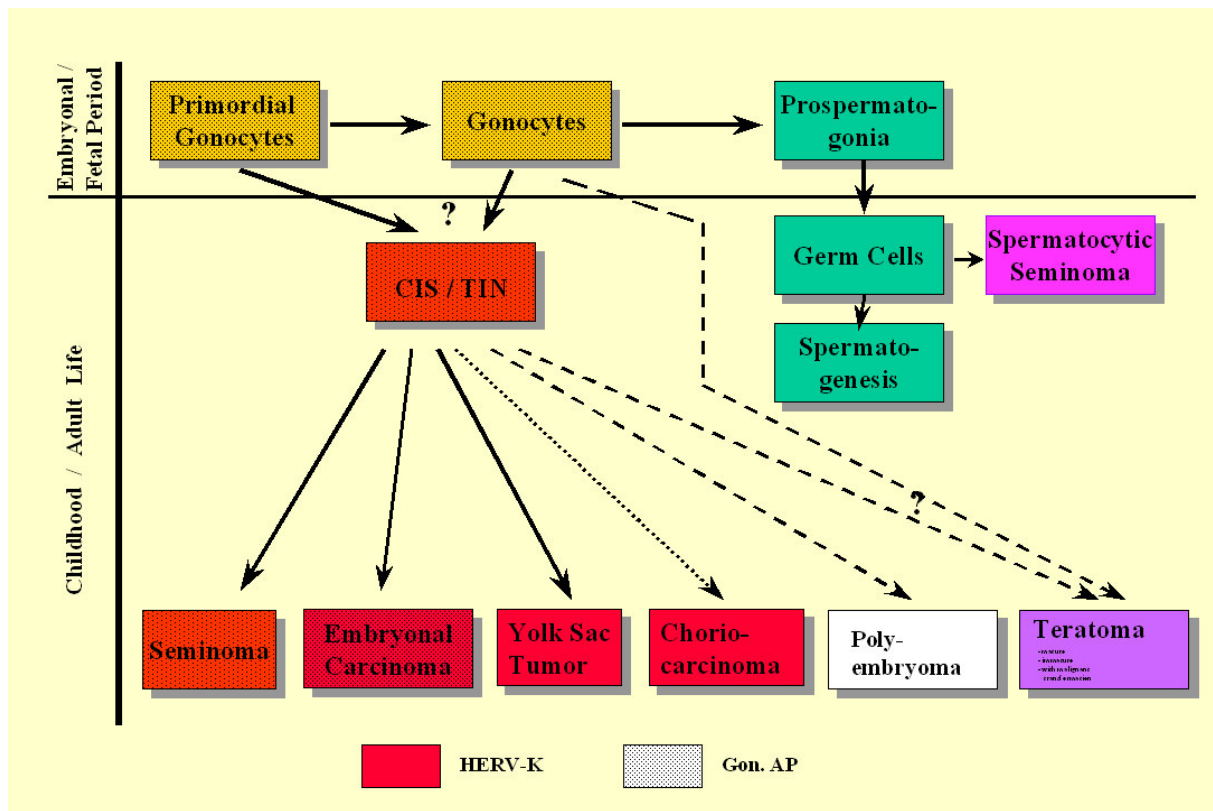


Abb.1: Histogenese der Keimzelltumoren

Nahezu die Hälfte aller Keimzelltumoren sind Seminome mit einem Altersgipfel der Patienten von 36 Jahren. Sie setzen sich aus Zellen zusammen, die den primordialen Keimzellen ähneln. Typisch für den Tumor ist auch die entzündliche Reaktion, die sich durch eingestreute Lymphozyten und Plasmazellen manifestiert. Die WHO-Klassifikation (vgl. Tab. 1) definiert als eine Variante der Seminome das Seminom mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen. Das Vorhandensein dieser β -HCG-positiven Zellen ändert nichts an der Diagnose eines Seminoms, sondern ist das morphologische Äquivalent der bei einem Teil der im Serum nachweisbaren erhöhten β -HCG-Spiegel [37].

Eine separate Entität stellt das spermatozytische Seminom dar. Es hat konventionell-histologisch eine große Ähnlichkeit zum Seminom, weicht aber in seiner Biologie und Histogenese prinzipiell von der anderer Keimzelltumoren ab. Es entwickelt sich offenbar aus Spermatogonien. Dieser Tumor ist selten und wird in einem weitaus höheren Lebensalter als die übrigen TKZT gefunden..

Die Nichtseminome sind mit etwa 30-35% die zweithäufigsten Keimzelltumoren mit einem Altersgipfel der Patienten von 27 Jahren. Bei Embryonalen Karzinom liegen die Tumorzellen

in strukturlosen Haufen oder bilden papilläre und drüsige Strukturen. Teratome sind aus Abkömmlingen aller drei Keimblätter aufgebaut.

Dottersacktumoren zeigen mikrozystische Areale mit drüsig-papillären Strukturen und typischen perivaskulär angeordneten Zellwucherungen. Choriokarzinome weisen solid-papilläre Wucherungen von zytotrophoblastären Zellen auf, die von synzytiotrophoblastären Riesenzellen bedeckt sind.

Kombinierte Keimzelltumoren weisen seminomatöse und nichtseminomatöse Anteile auf und sind mit etwa 15% aller Keimzelltumoren relativ häufig. Für die Prognose entscheidend ist der malignere, nichtseminomatöse Anteil.

Tab. 1: Modifizierte WHO-Klassifikation und prozentuale Verteilung der Hodentumoren [37]

Keimzelltumoren	(85-90%)
Seminome	(45-50%)
<ul style="list-style-type: none"> • Klassisches Seminom • Seminom mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen • Spermatozytisches Seminom 	(1-25%)
Nichtseminomatöse Keimzelltumoren (NSKT) einheitlicher Bauart	(15-18%)
<ul style="list-style-type: none"> • Embryonales Karzinom • Dottersacktumor • Polyembryom • Teratom • Choriokarzinom 	
Kombinierte Keimzelltumoren (Mischformen)	(10-15%)
Tumoren des Gonadenstromas	(3-5%)
Maligne Lymphome und paratestikuläre Tumoren	(6-8%)

Neben der WHO-Klassifikation mit ihrer eingegrenzten Definition des Teratoms existiert eine Britische Klassifikation, die zunehmend in den Hintergrund tritt. Bei der Britischen Klassifikation werden mit Ausnahme der Dottersacktumoren alle nicht-seminomatösen Keimzelltumoren als Teratome eingeordnet. Sie untergliedern sich nach ihrem Reifegrad in differenzierte, intermediäre und undifferenzierte Teratome [7]. Der Begriff des Teratoms wird in dieser Arbeit nach der Definition der WHO, nicht nach derjenigen der Britischen Klassifikation verwandt.

1.2 Virusassoziierte Malignome

Weltweit werden etwa 10-15% aller malignen Tumoren durch chronische Infektionen hervorgerufen. Zu den wichtigsten Erregern zählen Viren, wie das Hepatitis-B und -C-Virus (Leberzellkarzinom) und das Humane-Papillom-Virus (Zervixkarzinom).

Insbesondere im jungen Alter wird das Epstein-Barr-Virus mit Hodgkin-Lymphomen, malignen B-Zell-Lymphomen, in Asien mit Nasopharynxkarzinomen und in Afrika mit dem Burkitt-Lymphom assoziiert. Tabelle 2 zeigt die Virusassoziation der einzelnen Tumoren und deren regionale Häufung [4].

Tab. 2: Virusassoziierte Tumoren im jungen Erwachsenenalter und deren regionale Häufung [4]

Burkitt-Lymphom	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Äquatorialafrika
Nasopharynxkarzinom	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Südchina; Alaska
Hodgkin-Lymphom (insbes. Mischtyp)	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Europa, USA
Periphere T-Zell-Lymphome	Epstein-Barr-Virus (EBV)	
B-Zell-Lymphome bei Immundefizienz	Epstein-Barr-Virus (EBV)	
Anogenitalkarzinom	Humane Papillom-Viren (HPV 16, 18, 31, 33)	
Kehlkopf-Karzinom	Humane Papillom-Viren (HPV 16, 18, 31, 33)	
Karzinome in der Mundhöhle + im Plattenepithel der Haut	Humane Papillom-Viren (HPV 16, 18, 31, 33)	
Kaposi-Sarkom	Humanes Herpes Virus(HHV 8)	
Invasives Zervix-Karzinom	Humane Papillom-Viren (HPV 16, 18, 31, 33)	
Hepatozelluläres Karzinom	Hepatitis-B-Virus (HBV) Hepatitis-C-Virus (HCV)	Griechenland, Taiwan, Afrika, Asien Bei i.v. Drogenabhängigen: Europa, USA
T-Zell-Leukämie (ATL)	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus I [oder2] (HTLV-I [2])	Japan, Neuguinea, Afrika und Westindien
Haarzell-Leukämie	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus II (HTLV-II)	Bei i.v. Drogenabhängigen: USA

Auch bei Keimzelltumoren wurden das Cytomegalievirus (CMV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) als potentiell onkogene Viren diskutiert. Bei Patienten mit testikulären Keimzelltumoren fand man erhöhte Antikörpertiter gegen das Cytomegalievirus (CMV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) im Serum. CMV und EBV ließen sich jedoch nicht in den Tumorzellen nachweisen. Bei einem Nachweis von EBV-DNA in Tumorextrakten befand sich das Virus in Lymphozyten des Begleitinfiltrats, nicht jedoch in den Tumorzellen selbst. Das CMV und das EBV kommen daher als Onkogen nicht in Betracht [12,32]. Auch das Mumpsvirus, ein RNA-Virus der Paramyxo-Gruppe, wurde als Onkogen diskutiert ohne eine Kausalität letztlich beweisen zu können.

Demgegenüber zeigen aktuelle Untersuchungen einen regelmäßigen Virusnachweis des HERV-K (**h**uman **e**ndogenous **r**etrovirus-**K**) mit Expression von *gag*, *pol* und *env* Sequenzen in malignen testikulären, ovariellen und extragonadalen Keimzelltumoren jeglicher Differenzierung. Diese Veränderung findet sich auch in ihren Vorläuferzellen, der testikulären intraepithelialen Neoplasie wie in Abb.1 angedeutet. Auch in Gonadoblastomen und in Schwangerschafts-assoziierten uterinen Chorionkarzinomen gelang der Nachweis einer HERV-K-Expression.

Eine Ausnahme bilden die reifen und unreifen Teratome und das spermatozytische Seminom [13,14].

1.2.1 Endogene Retroviren der Gruppe HERV-K

Retroviren sind infektiöse virale Partikel, deren Genom aus Einzelstrang RNA besteht. Sie können als Proviren, d.h. als DNA-Kopie des in die Zelle eingedrungenen RNA-Virus, ins Genom eingebaut und mit ihm an Nachkommen vererbt werden.

Sie besitzen die für die Integration ins Wirtszellgenom erforderlichen LTRs (**L**ong **t**erminal **r**epeats), sowie drei proteinkodierende Genbereiche, die für die Vermehrung des Virus erforderlich sind. Diese enthalten Information

- Für Proteine, die mit der Nukleinsäure des Virus assoziieren und diese verpacken (*gag*, „group-specific-antigens“)
- Für eine **RNA-abhängige DNA-Polymerase**, auch **reverse Transkriptase** genannt (*pol*, „polymerase“), und
- Für die **Hüllproteine** (*env*, „envelope“), die in der Zellmembran für die äußere Verpackung des Virus sorgen.

Retroviren zählen ebenso wie Retrotransposons zu den Retroelementen. Retroelemente sind durch das Enzym reverse Transkriptase aus RNA in DNA umgeschriebene und dann in das Genom integrierte genetische Elemente. Retrotransposons sind als unvollständige Proviren fähig, reverse Transkriptase (*pol*) und gruppenspezifisches Antigen (*gag*) zu kodieren. Im Gegensatz dazu können Retroviren zusätzlich noch weitere Proteine kodieren, die zur Bildung extrazellulärer infektiöser Partikel erforderlich sind.

Das menschliche Genom besteht zu 8% aus Sequenzen retroviralen Ursprungs, von denen allerdings die meisten aufgrund zahlreicher Mutationen defekt sind: humane endogene Retroviren (HERV) und andere Repeat Familien mit HERV Ursprung, wie das SINE-R (short interspersed nuclear elements-R). Nur HERV-K (HML-2) kodiert alle essentiellen retroviralen Proteine [2].

Das fast intakte HERV-K Provirus zeigt den für einen Retrovirus typischen Aufbau zweier identischer langer terminaler Repeats (LTRs), die den proteinkodierenden Bereich – bestehend aus *gag*, *pol* und *env* Genen- am 3'- und 5' Ende flankieren. (vgl. Abb. 2)

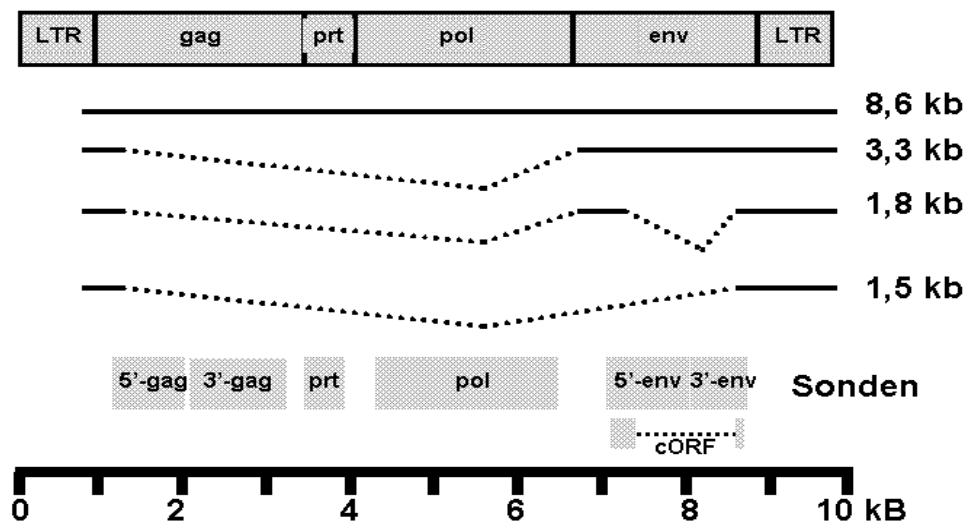


Abb. 2: HERV-K Transkripte

Die Untersuchungen von HERV-K im Zusammenhang mit Keimzelltumoren gehen zurück auf den elektronenmikroskopischen Nachweis retroviraler Partikel, den sog. „Human teratocarcinoma-derived Retrovirus“ (HTDV), in Zelllinien von Teratokarzinomen im Jahr 1979 [6]. Jahrzehnte hatte man keine Möglichkeit, diese Befunde direkt von Zelllinien auf Hodentumorgewebe zu übertragen.

Erst 1986 verfügte man durch die Klonierung eines Provirus eines prototypischen HERV-K über geeignete Gensonden, mit denen HERV-K als das früher aus Teratokarzinom-Zelllinien isolierte HTDV erkannt und eine enge Beziehung zwischen HERV-K und den Keimzelltumoren nachgewiesen werden konnte [24].

Es gelang die Expression von HERV-K Polypeptiden. Dies ermöglichte schließlich die Herstellung tierischer Antiseren und den Nachweis HERV-K spezifischer Antikörper in Patientenserum. Hohe Titer von Serumantikörpern gegen die HERV-K-Polypeptide *gag* und *env* ließen sich regelmäßig bei Patienten mit Keimzelltumoren (v.a. bei Seminomen) nachweisen. Demgegenüber zeigten Patienten anderer maligner Erkrankungen oder Entzündungen keine, bzw. kaum Antikörper gegen diese HERV-K Polypeptide [27,28].

Außerdem wird bei Keimzelltumoren das *rec*-Transkript (früher: cORF) exprimiert, das durch komplexe Spleißvorgänge in erster Linie aus *env* Sequenzen entsteht.

Das dazugehörige Protein $p15^{rec}$ (von 15 kDa Molekulargewicht) ist den nicht-strukturellen regulatorischen Proteinen *Rev* und *Rex* des HIV-I (Humanes Immundefizienz-Virus-I), bzw. dem HTLV-I (Humanes T-lymphotropes Virus-I) –zweier exogener Retroviren- sehr ähnlich. Diese regulieren die Expression der Virus-mRNS und den Transport nicht gespleißter mRNS. Wie mehrere Experimente ergaben, bindet das Protein $p15^{rec}$ an das Promyelozyten-Leukämie-Zinkfinger-(PLZF-) Protein [5]. Neben einer regulatorischen Funktion in der Myelopoese spielt das PLZF-Protein bei der Hodenentstehung eine entscheidende Rolle, wie Untersuchungen mit PLZF-gendefizienten Mäusen ergaben. Diese zeigten neben einer Phokomelie auch testikuläre Dysfunktionen. Die Bindung des *rec*-Proteins an das PLZF-Protein scheint demnach einen Differenzierungsarrest fetaler Keimzellen zu bewirken. Auf welche Weise dies geschieht, sei es durch Inhibierung oder eine andere Art der Funktionsmodulation ist bis heute noch nicht geklärt.

Die Überexpression von HERV-K in invasiven Keimzelltumoren, ihren Vorläuferzellen und in neoplastischen Keimzellen des Gonadoblastoms lässt vermuten, dass HERV-K, sein $p15^{rec}$ und auch das PLZF-Protein in einem engen Zusammenhang mit der frühen Entwicklung nichtteratomatöser Keimzelltumoren stehen.

Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen HERV-K und der Entwicklung testikulärer Keimzelltumoren liefert ein Experiment mit transgenen Mäusen, die das HERV-K Transkript *rec* exprimieren. Wird die Bildung des HERV-K *rec* Proteins induziert, so bilden sich bei den Mäusen bilateral nicht-invasive, fokale intratubuläre Keimzell-Neoplasien ähnlich dem testikulären Carcinoma-in-situ (CIS), den Vorläuferläsionen humaner klassischer Seminome [11]. Synonyme für diese Vorläuferläsionen sind TIN, testikuläre intraepitheliale Neoplasie, und der WHO-Begriff ITGCN, intratubuläre Keimzellneoplasie.

Das vom HERV-K (HML-2) Typ 2 transkribierte *Rec*-Protein (ähnlich dem HIV-*Rev*-Protein), konnte inzwischen im menschlichen Genom nachgewiesen und lokalisiert werden. HERV-K Typ 2 findet sich auf den Chromosomen 1p, 3, 5p, 6, 7p, 10, 11q, 12q, 19 und 22q [21].

1.3 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Komparative Genomische Hybridisierung (engl.: **comparative genomic hybridization**, CGH) ist eine zytogenetische Methode, die mit einem Versuchsansatz relative Gewinne und Verluste innerhalb des Genoms identifiziert, die durch Amplifikation, Deletion, Duplikation oder unbalancierte Translokation verursacht wurden [9,15,34]. Dabei wird die zu testende DNA, die aus Tumormaterial isoliert worden ist, mit der Kontrol-DNA eines gesunden Probanden auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der digitalen Bildanalyse ausgewertet. Der Nachweis von Amplifikationen liegt bei ca. 2 Mbp, der von Deletionen bei ca. 3-10 Mbp [8,16].

Der wesentliche Vorteil der CGH gegenüber anderen zytogenetischen Methoden besteht in der Möglichkeit, nicht nur frisches Gewebe am Gefrierschnitt, sondern auch formalinfixiertes Archiv-Material zu analysieren. Bei dieser Methode ist man nicht auf die Kultivierung von Zellen angewiesen und es kommt nicht zu einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse durch Selektionsdruck oder niedriger Raten auswertbarer Metaphasen.

Die CGH ermöglicht eine Identifizierung sämtlicher zugewonnener oder verlorener DNA-Sequenzen eines Genoms in einem einzigen Versuchsansatz. Als Screeningmethode ist sie nicht auf das Wissen um einen bestimmten zu untersuchenden chromosomalen Genlokus angewiesen ist, wie es in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) der Fall ist.

Aberrationen, die nicht zu dem Ergebnis eines chromosomalen Gewinns oder Verlusts führen (wie z.B. balancierte Translokationen), bleiben unentdeckt. Auch der Nachweis der absoluten Anzahl der Chromosomen bei Polyploidie ist nicht möglich, da hierbei das DNA Verhältnis innerhalb des Zellkernes gleich bleibt.

1.4 Fragestellung:

In der vorliegenden Arbeit wurden 49 maligne Keimzelltumoren mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf unbalancierte chromosomale Aberrationen untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

- a) Welche chromosomalen Aberrationen liegen bei malignen Keimzelltumoren vor?
- b) Gibt es für Seminome und Nichtseminome und spermatozytische Seminome typische chromosomale Aberrationen?
- c) Lassen sich diese Aberrationen auch bei gemischten Keimzelltumoren in den einzelnen Tumorkompartimenten (z.B. Seminom, Embryonales Karzinom) nachweisen?
- d) Lassen sich die chromosomalen Aberrationen von Keimzelltumoren zu den aus der Literatur vom menschlichen Genom bekannten Lokalisationen von HERV-K zuordnen? Ergeben sich Hinweise, ob strukturelle Veränderungen des Genoms testikulärer Keimzelltumoren durch eine Überexpression von HERV-K Proviren zustande kommen können ?

Die gewonnenen Ergebnisse sollen einen Beitrag zum Verständnis der frühen Entwicklung von testikulärer Keimzelltumoren liefern, aus dem vielleicht Ansätze zur Prävention und zur Therapie erwachsen könnten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 23 Seminomen, neun Embryonalen Karzinomen, vier Dottersacktumoren, sechs spermatozytischen Seminomen, einem uterinen Choriokarzinom und sechs gemischten Tumoren mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. W. Böcker bzw. Prof. Dr. U. Helmchen aus den Archiven des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie der Universität Münster (Einsendegut der Klinik und Poliklinik für Urologie; 1996-2001), des Institutes für Pathologie der Universität Hamburg (1994) und des Institutes für Pathologie des Vivantes Klinikums Am Urban Berlin (2004) untersucht.

Die gemischten Tumoren bestanden aus unterschiedlichen Kombinationen von mesenchymalen Teratomen mit Embryonalen Karzinomen, Dottersacktumoren, Seminomen und Choriokarzinomen. vgl. Tab.3. Die initiale Diagnose wurde anhand der Morphologie der mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten histologischen Schnitte gestellt.

Immunhistochemische Färbungen wurden zusätzlich durchgeführt, um die verschiedenen Keimzelltumoren besser zu charakterisieren. Es wurden folgende Antigene dargestellt:

Gonozytäre Alkalische Phosphatase mit einem gegen plazentare AP (PLAP) gerichteten Antikörper, Alpha-Fetoprotein (AFP), humanes Choriogonadotropin, β -Kette (β -HCG), CD30-Antigen, CD117-Antigen (c-kit-Protein), das Intermediärfilament Zytokeratin und Inhibin (X-Hormon).

Anzahl	Tumorentität		
23	Seminome		
9	Embryonale Karzinome		
4	Dottersacktumoren		
1	Uterines Choriokarzinom		
6	Gemischte Tumoren:		
2	Mesenchymales Teratom	Embryonales Karzinom	
1	Mesenchymales Teratom	Embryonales Karzinom	Epitheliales Teratom
1	Seminom	Dottersacktumor	
1	Seminom	Mesenchymales Teratom	
1	Epitheliales Teratom	Choriokarzinom	

Tab.3: Untersuchte Tumorentitäten

2.2 Mikrodissektion

Aus den gewünschten Zellarealen wurde mit Hilfe der Mikrodissektion möglichst reine Tumor-DNA, d.h. ohne Verunreinigung durch Normal-DNA, in ausreichender Menge (mindestens 50%) gewonnen.

10-20 sequentielle ursprünglich paraffineingebettete Gewebeschnitten à 10 µm wurden auf Objektträger aufgezogen und bei 37 °C 24h getrocknet. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung in Xylol (zweimal je 15 min), anschließend die Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 80%, 70%) bis zum Aqua dest.. Die Objektträger wurden luftgetrocknet.

Im Rahmen der Mikrodissektion wurde das gewünschte Areal mit einer feinen Injektionsnadel umrandet. Dieses Zellareal wurde mit einer geringen Menge DNA-Isolationspuffer benetzt, wodurch es mit einer Nadel abgelöst und in einem Reaktionsgefäß aufgenommen werden konnte. (Vgl. Abb. 3)

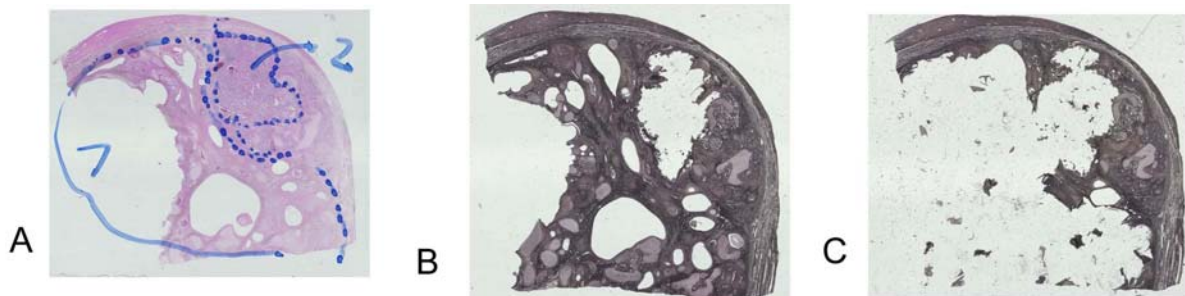


Abb.3: Mikrodissektion eines Gemischten Keimzelltumors (HE-Färbung)

A vor der Dissektion , B nach Dissektion des Embryonalen Karzinom-Anteils und C nach Dissektion des epithelialen Teratom-Anteils.

2.3 DNA Extraktion aus Gewebe

- 1) Die mikrodissezierten Areale oder etwa 10 Gewebeschnitte à 10 µm in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (besser Schraubröhrchen) geben. Bei guter Zelldichte ist eine DNA-Konzentration von 500-1000 ng/µl zu erwarten.

Je Röhrchen 1 ml Xylol hinzugeben (Abzug); anschließend die Röhrchen im Styroporschwimmer bei 45 °C im Wasserbad für 15 min inkubieren. Ab und zu vortexen.

- 2) 5min bei 13000 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen und Schritte 1) und 2) noch zweimal wiederholen.
- 3) Den Überstand verwerfen und 1ml EtOH (100%) zugeben und vortexen. Danach 5 Min bei 13000 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen.
Schritt 3) wiederholen.
- 4) Das Gewebe trocknen; z.B. in einer „Speed-Vac“-Zentrifuge. Alternativ gut abpipettieren und in einen Thermoblock o.ä. stellen.
Danach das Gewebe resuspendieren in 1 ml (1M) NaSCN und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- 5) Die Lösung 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Überstand (schleimig, klar) vorsichtig so weit wie möglich abpipettieren, die Röhrchen mit DNA-Isolationspuffer auffüllen und erneut zentrifugieren; dann erneut den Überstand vorsichtig entfernen und mit DNA-Isolationspuffer auffüllen.
- 6) Schritt 5) noch ca. 1-2 mal wiederholen. Je mehr NaSCN entfernt wurde, desto besser lässt sich das Gewebe abzentrifugieren. Wenn keine schleimige Konsistenz mehr nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass das NaSCN komplett entfernt ist.
- 7) In das Röhrchen 400 µl DNA-Isolationspuffer geben und 20 µl Proteinase-K zugeben (bei Stammlösung 20 ng/ml). Die Lösung bei 50-60 °C (optimal: 56°C) über Nacht geschüttelt inkubieren, z.B. in einem waagrecht auf den Schüttler gestellten Heizblock. Dazu sollte man die Röhrchen allerdings gut verschließen, bzw. Schraubröhrchen nehmen und die Gefäße gut befestigen. Bei vollständiger Verdauung durch die Proteinase ist die Lösung klar. Je nach Gewebe kann sie gelb- bis grünlich gefärbt sein. Bei noch trüber Lösung kann erneut 20 µl Proteinase-K zugegeben und

weiterinkubiert werden. Die DNA-Ausbeute wird stark erhöht durch einen weiteren Verdau des Paraffinmaterials für 2 Tage (z.B. über das Wochenende).

- 8) Proben kurz anzentrifugieren, danach mit Phenol waschen (450 µl Phenol zugeben und 3 min manuell mischen). Dann 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Während der Zentrifugation neue Röhrrchen (normale 1,5 ml) beschriften und mit jeweils 450 µl Chloroform/ Phenol 1:1 befüllen. („Chloroform“ ist hierbei und im folgenden immer mit 4% Isoamylalkohol versetzt und sollte in einer Vorratsflasche angelegt sein!)
Nach der Zentrifugation erkennt man drei Phasen; die obere enthält die DNA, die Interphase Zelltrümmer und Paraffinreste (weiß-schaumig) und die untere das Phenol und organische Zellreste.
- 9) Waschen mit Phenol/Chloroform: hierzu wird die obere Phase in die neuen Röhrrchen mit Phenol/Chloroform überführt, dabei sollte die Interphase nicht mitpipettiert werden. (Phenolabfälle gehören in Sammelbehälter. Röhrrchen in Extramüll.)
Anschließend ca. 3 min manuell durchmischen, dann 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Während der Zentrifugation neue Röhrrchen beschriften und wieder mit jeweils 450 µl Chloroform/Phenol 1:1 befüllen.
- 10) 2. Waschung mit Phenol/Chloroform: wiederum die obere Phase in die neuen Röhrrchen mit Phenol/Chloroform überführen, dabei keine Interphase mehr mitnehmen und ca. 3 min manuell durchmischen. Wieder 5 min bei 13000rpm zentrifugieren. Während der Zentrifugation neue Röhrrchen für die dritte Waschung beschriften und mit jeweils 450 µl Chloroform befüllen (ohne Phenol).
- 11) 3. Waschung mit Chloroform: Erneut Überführen der oberen Phase in die neuen Röhrrchen mit Chloroform, ca. 3 min durchmischen und wieder 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren. Während der Zentrifugation neue Röhrrchen beschriften und mit jeweils 2 Teilen eiskaltem, unvergälltem 100% EtOH (Vorratflasche im -20°C Gefrierschrank), entsprechend 900 µl, befüllen. (Chloroform in Sammelbehälter. Röhrrchen in den Extramüll.)
- 12) DNA-Präzipitation: dazu die obere Phase in die neuen Röhrrchen mit eiskaltem 100% EtOH füllen. Eine Interphase sollte jetzt nicht mehr vorhanden sein.

- 13) Fällung: Röhrchen für 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kühlen, oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 14) 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, dabei möglichst die Röhrchen gleich ausrichten, damit man weiß, wo sich das Pellet nach der Zentrifugation befindet. Es kann bei sehr sauberer Extraktion unsichtbar sein.
- 15) Überstand vorsichtig abpipettieren und das Pellet mit ca. $100\text{ }\mu\text{l}$ 70% EtOH waschen; dann gleich wieder abpipettieren oder aber sicherheitshalber nochmals 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren und dann abpipettieren.
- 16) Zum Pellet je $50\text{ }\mu\text{l}$ (steriles) H₂O oder TE-Puffer (DNA länger haltbar, kann aber u.U. wegen des EDTA hemmend auf weitere enzymatische Reaktionen wirken) geben und im $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad lösen, dieses kann bis zu 3 Tagen dauern, dabei ist es sinnvoll, zwischendurch kurz anzuzentrifugieren.
- 17) Kontrolle: Ist DNA vorhanden, ist zuviel RNA vorhanden? Aliquot (1/10 der Gesamtmenge, d.h. $5\text{ }\mu\text{l}$) in ein neues Röhrchen geben und $1\mu\text{l}$ Gelloading-dye zugeben.
- 18) Das $6\text{ }\mu\text{l}$ - Aliquot zusammen mit $6\text{ }\mu\text{l}$ eines Größenmarkers (Hind III) auf ein 1,2 % Agarosegel auftragen und ca. 1h bei 100 V laufen lassen. (Elektrophorese beenden, wenn der zweite Strich der Färbelösung des Loadingdye ca. 2,5 cm vom Ende des Gels entfernt ist; sonst läuft evtl. die vorhandene RNA aus dem Gel.)
- 19) Gel unter UV-Licht fotografieren.
- 20) Sollte RNA in größerer Konzentration vorhanden sein (stärkeres Färbesignal etwa auf Höhe der 100bp-Linie), sollte je extrahierter DNA $1\mu\text{l}$ RNase zugegeben werden (DNase-frei! Stamm-Lsg 20 mg/ml), damit die nachfolgende Hybridisierungsreaktion nicht gestört wird.
- 21) Das Gemisch 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren und danach die Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholen.

22) DNA-Konzentration im Photometer bei 260/280 nm bestimmen.

Entscheidend für die DNA-Ausbeute war eine vollständige Proteinase-Verdauung des Gewebes, weshalb die Proteinase-Verdauung für mindestens 3 Tage bei täglich neuer Proteinase-K-Zugabe durchgeführt wurde.

Das Lösen von fixierungsbedingten Protein-DNA Vernetzungen wurde durch Inkubation der DNA-haltigen Lösung mit Natriumthiocyanat (NaSCN) erreicht, bevor die eigentliche Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt wurde. Dies ermöglichte eine Verbesserung der Hybridisierungseigenschaften der DNA.

Manuelles, vorsichtiges Mischen (kein maschinelles Vortexen) ließ einen möglichst schonenden Extraktionsprozeß zu. Auf diese Weise erhielt man eine möglichst hohe Ausbeute an hochmolekularer DNA und vermied eine unnötige Scherung der DNA.

2.4 Gewinnung von Referenz-DNA

Die Komparative Genomische Hybridisierung erfordert eine zytogenetisch normale Referenz-DNA. Die wurde aus Vollblut einer gesunden Versuchsperson extrahiert.

DNA-Extraktion aus Blut

- 1) 10 ml Vollblut (EDTA-, Heparin-, oder Citrat-Blut) mit 30 ml Blut-Lysis-Puffer vorsichtig mischen und 15-30 min auf Eis inkubieren, danach 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugieren, den Überstand abgießen (Blutabfall!)
- 2) 10 ml Lysispuffer zugeben und das Pellet lösen. Ist die Lösung trübe, so war die Hämolyse nicht vollständig, dann nochmals 15 min auf Eis inkubieren)
- 3) 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugieren, den Überstand abgießen (Blutabfall!) und erneut 10 ml Lysispuffer zugeben, um darin das Pellet zu lösen.

- 4) 10 min bei 1200 rpm bei 4 °C zentrifugieren und den Überstand wieder abgießen (Blutabfall!)
- 5) Das Sediment kann bei –80 °C gelagert werden oder es kann direkt mit der DNA-Extraktion (s. Laborvorschrift DNA-Extraktion aus Gewebe) fortgeföhren werden.

2.5 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH-Analyse umfasst die folgenden Präparationschritte:

2.5.1 Extraktion der genomischen DNA aus der Tumorgewebeprobe (Tumor-DNA) (s. 2.3) und aus Normal-DNA (Referenz-DNA) (s. 2.4)

2.5.2 Präparation der **Zielchromosomen** aus Lymphozytenkultur

2.5.3 Markierung der extrahierten DNA mittels **Nick-Translation**

2.5.4 Hybridisierung des Gemisches aus markierter Tumor- und Referenz-DNA auf die Targetchromosomen

2.5.5 Stringente Waschungen und Detektion der Tumor-DNA mit grün fluoreszierendem Avidin-FITC und der Referenz-DNA mit rot fluoreszierendem Rhodamin

2.5.6 Mikroskopie und digitale Bildanalyse

2.5.7 Auswertung und Schwellenwerte

2.5.1 Extraktion der genomischen DNA aus der Tumorgewebeprobe (Tumor-DNA) und aus Normal-DNA (Referenz-DNA)

siehe 2.3 und 2.4

2.5.2 Präparation der Zielchromosomen aus kultivierten Lymphozyten

Hybridisierungsmatrizen für die CGH sind normale Metaphasenchromosomen (46,XY) auf Glasobjektträgern. Entscheidend für die Qualität der CGH-Analyse sind die Charakteristika dieser Chromosomenpräparation. Deshalb werden die Metaphase-Präparate am besten in großer Zahl angefertigt und in stichprobenartigen Testhybridisierungen (normale Referenz-DNA und DNA einer Zelllinie (ET2A, Ewing-Tumor) mit bekannten Aberrationen) auf Tauglichkeit geprüft.

Sollte der Hybridisierungserfolg unzureichend sein, muß die gesamte Charge verworfen werden. Voraussetzung für die Metaphasenpräparate sind folgende Qualitätsanforderungen:

- Vorhandensein von genügend Metaphasen auf dem Objektträger (>100)
- Möglichst optimale Spreitung der Chromosomen mit wenig berührenden oder überlappenden Chromosomen
- Optimale Chromosomenlänge: 400-550 Banden
- Gleichmäßige Kondensation der Chromosomen
- Chromosomen mit gleichmäßigem, nicht granulärem Hybridisierungsmuster mit guter Fluoreszenzintensität nach der Testhybridisierung
- Geringe Hintergrundfluoreszenz des Objektträgers ist Voraussetzung für eine gute Signalerkennung
- Gute Erkennbarkeit des Chromosomen-Bandenmusters

Präparation der Zielchromosomen aus Lymphozytenkultur

- 1) Ansetzen einer Lymphozytenkultur in einer 250 ml Gewebekulturflasche

(T75): 40 ml RPMI 1640 mit Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin, 10 ml FCS (20%), 2 ml PHA und 5 ml Vollblut. Die Gewebeflasche darf nicht gasdicht verschlossen werden.

- 2) 70 h bei 37 °C stehend inkubieren, dann 2,5 ml Colcemid zugeben, gut mischen und für 2-2,5 h weiterinkubieren.
- 3) Aufteilen der Lymphozytenkultur auf zwei 50 ml Falconröhrchen und für 8 min bei 900 rpm zentrifugieren, den Überstand bis auf 1 ml absaugen; das Pellet wird resuspendiert mit 5 ml hypomolarem, vorgewärmten KCl (0,075 M/ 0,56%; 37°C= „sog. hypomolarer Schock“); dabei muß die Lösung bei vorsichtiger Schüttlung Tropfen für Tropfen zugegeben werden. Mit KCl auf 40 ml auffüllen oder, alternativ, auf 30 ml KCl + 10 ml H₂O.
- 4) Das Gemisch im Wasserbad bei 37 °C für 8 min inkubieren, dann 1 ml frisches Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) zugeben und mit der Pipette mischen.
- 5) Für 8 min bei 900 rpm zentrifugieren, dann den Überstand bis auf 1 ml absaugen und das Pellet vorsichtig resuspendieren.
- 6) 2 ml frisches Fixativ zugeben, mit einer 10 ml Pipette solange mischen, bis alle Klümpchen aufgelöst sind, danach auf 25 ml mit Fixativ auffüllen.
- 7) 20-30 min bei RT stehen lassen, danach für 8 min bei 900 rpm zentrifugieren und den Überstand bis auf 1 ml absaugen, das Pellet dann wieder resuspendieren.
- 8) 25 ml frisches Fixativ zugeben und mit der 10 ml Pipette erneut mischen.
- 9) Schritte 7) +8) noch dreimal wiederholen.
- 10) Die Chromosomensuspension in 15 ml Reaktionsgefäß füllen und mit frischem Fixativ auffüllen, um eine zum Auftropfen geeignete Suspension zu erhalten (1-4 ml). Wenn die Suspension zu dünn ist, muß noch einmal zentrifugiert werden und

anschließend wieder das Fixativ abgesaugt werden, um dann mit geringerer Fixativmenge zu resuspendieren.

- 11) Die so hergestellte Suspension kann auf die vorher geputzten Objektträger aufgetropft werden, danach muß der Erfolg der Chromosomenspreitung im inversen Mikroskop kontrolliert werden. Die guten Präparate können bei 4 °C in 70 % EtOH lagern.
- 12) Eventuell übriggebliebene Suspension kann bei –20 °C gelagert werden. Vor dem Auftropfen sollte sie 3x mit frischem Fixativ gewaschen werden.
- 13) Pepsinbehandlung der Metaphasepräparate für die CGH: Präparate werden direkt vor der Hybridisierung in einer Färbeküvette bei 37 °C für mind. 5 min in 10 % Pepsinlösung (50 µg/ml Pepsin in 0,01 n HCl (ph 2,3)) in einem Schüttelwasserbad inkubiert, danach noch 2x5 min bei RT mit 1x PBS, ebenfalls im Schüttelwasserbad, gewaschen, dann 5 min geschüttelt und bei RT mit 1x PBS/50 mM MgCl₂ gestellt.
- 14) Postfixation: Die Präparate werden in 1% Formaldehyd (2,7 ml 37%/100 ml, Merck 4003) in 1x PBS/50 mM MgCl₂ für 10 min bei RT im Wasserbad geschüttelt.
- 15) Danach müssen die Präparate dehydriert werden (70, 90 und 100 % EtOH je 3 min), anschließend können sie an der Luft trocknen.
- 16) Zur Denaturierung der Präparate wird eine Kunststoff-Küvette (50ml) mit: 1,5 ml 20x SSC (mit HCl auf ph 7,4 einzustellen) auf 15 ml mit H₂O (= 15 ml 2x SSC) + 35 ml Formamid (FA) auf 72 °C erhitzt (Mikrowelle); dabei sollte vorweg eine Küvette mit eiskaltem 70 % EtOH vorbereitet sein. Die Küvette mit heißem FA/SSC in ein 75 °C Wasserbad zum Warmhalten einstellen, Temperatur des FA/SSC kontrollieren.

- 17) Bei 71 °C werden die Objektträger mit den Chromosomenpräparaten in die Küvette für exakt 5 min eingestellt, danach die Objektträger für 3 min in die Küvette mit dem eiskaltem EtOH überführen.
- 18) Danach müssen die Präparate erneut in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden, anschließend können die Objektträger lufttrocknen.

2.5.3 DNA-Markierung mittels Nick-Translation

Mittels Nick-Translation werden markierte Nukleotide gleichmäßig in den DNA-Doppelstrang eingebaut. Gleichzeitig wird die DNA auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt. Die Kontrolle dessen erfolgt durch Agarosegelelektrophorese.

Der Nick-Translations-Ansatz wird gemäß einem Standardprotokoll durchgeführt, das allerdings für die Verwendung von DNA aus formalinfixiertem Gewebe optimiert worden ist. Je nach Fixierungsdauer ist die extrahierte DNA aus formalinfixiertem Gewebe mehr oder weniger stark fragmentiert und zum Teil durch DNA-Protein-Vernetzungen geschädigt, so dass dieser Anteil für die nachfolgende Hybridisierung nicht zur Verfügung steht.

Deshalb wird zum Ausgleich dieser Verluste dreimal soviel Tumor-DNA, wie theoretisch zur Nick-Translation nötig, eingesetzt, um trotzdem optimale CGH-Ergebnisse aus formalinfixiertem Gewebe zu erzielen.

Dieser Mehreinsatz an DNA führt nicht zu einer signifikanten Veränderung des CGH-Profiles.

2.5.3.1 Berechnung der DNA-Menge zur Nick-Translation

Für einen 50 µl Ansatz sollen 1 µg DNA eingesetzt werden, die zunächst in 32 µl H₂O gelöst sein sollen.

Diese Formel kann für die Berechnung der benötigten Menge an Kontroll-DNA, die in der Regel aus Blut extrahiert wird und damit qualitativ hochwertig ist, eingesetzt werden. Für die Test-DNA ist der Einsatz größerer Mengen DNA in Abhängigkeit von der DNA-Qualität

ratsam. Für die DNA aus Paraffinmaterial sollte die 3-fache Menge des theoretischen Wertes eingesetzt werden.

Die berechnete DNA-Menge wird mit sterilem H₂O auf das Gesamtvolumen von 32 µl gebracht.

2.5.3.2 Ansetzen des Nick-Translations-Gemischs

- 1) In eine auf Eis gelagerte 1,5 ml Eppendorf- Röhre wird ein Mix pipettiert aus:
 - 5 µl 10x NT Puffer
 - 5 µl dNTP Mix (0,5mM)
 - 5 µl 0,1M β-Mercaptoethanol
 - 1 µl Biotin 16 dUTP
 - 1 µl DNase (1:1000)
 - 1 µ DNA Polymerase
- 2) Zu jeder Probe 18 µl Mix geben, dann mit 30 µl-Pipette auf- und abpipettieren, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten und auf Eis halten.
- 3) Alle Proben gleichzeitig in einen Styroporschwimmer einstellen und für 45-120 min in 15 °C H₂O inkubieren (in Kältekübel mit Eis justieren). Die Inkubationszeiten variieren je nach DNA Qualität und -Menge. Im Zweifelsfall eher kürzer inkubieren und Schnittlänge im Gel kontrollieren. Bei neuen DNA-Chargen die Inkubationszeiten an der Kontroll-DNA bestimmen.
- 4) In der Zwischenzeit ein 1,2% Agarosegel gießen und neue Röhren beschriften und mit 1 µl „gel running dye“ beladen. Die Sephadex Säulen anfertigen oder fertige Quiagen-(PCR-Purification-Kit)-Säulen bereitstellen.
- 5) Kontrollgel zum Nachweis der richtigen Schnittlänge der DNase: Nach der entsprechenden Zeit die Proben auf Eis legen und ein Aliquot (z.B. 3-5 µl) zusammen mit 1 µl „gel running dye“ auf das angefertigte Gel laden. In eine Tasche einen Größenmarker (Hind III) füllen. Ziel sollte es sein, dass nach der

Elektrophorese die meist sehr unscharf begrenzte DNA-Bande auf Höhe der 200-500 Linie liegt.

- 6) Sind die Fragmente noch zu lang, sollte erneut 1 µl DNase je Probe zugegeben und im 15°C Wasserbad weiterinkubiert werden. Sind die Fragmente zu kurz, muß erneut eine Nick-Translation angesetzt werden, dieses Mal mit kürzerer Inkubationszeit.
- 7) Hat die DNase richtig geschnitten, kann zum Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotide a) jeweils die gleiche Menge Stop-Mix hinzugegeben werden, wenn die Aufreinigung über Sephadex-Säulen erfolgt (d.h. wenn 5 µl für das Gel verbraucht wurden, entsprechend 45 µl Stop-Mix) oder b) die Aufreinigung über Quiagen-Säulen nach Anleitung erfolgen (die Proben könnten in jedem Fall jetzt auch bei -20°C eingefroren werden; für b) muß Puffer PB zugegeben werden.)

2.5.3.3 Chromatographische Aufreinigung der Nick-translatierten DNA über Sephadex-G50-Säulen oder Quiagen-Säulen

- 1) Den Stempel einer 1 ml Einwegspritze entfernen und die Spritze in ein Zentrifugenröhrchen einstellen. Die Spritze bis zur 0,1 ml Marke mit Glaswolle so stopfen, dass die Wolle eine ebene Oberfläche bekommt. Die Spritze mit Sephadex G50 luftblasenfrei auffüllen und die Säulen 3 min bei 3000 rpm abzentrifugieren.
- 2) Die Säulen 2x mit TE-Puffer waschen.
- 3) Von einem Eppendorf-Röhrchen den Deckel abschneiden, beschriften und in das Zentrifugenröhrchen einstellen, um die Probe aufzufangen: Die Säule in das Röhrchen stellen und die gesamte Probe in die Säule geben.
- 4) Die Säulen 3 min bei 3000 rpm abzentrifugieren. Es sollte anschließend nur eine dunkelblaue Bande im oberen Drittel der Säule erkennbar sein (nicht gebundene Nukleotide). Eine hellblaue Färbung im unteren Teil der Säule weist auf restliche Probe hin, dann noch mal nachzentrifugieren.

- 5) Probe (hellblau) in ein neues Röhrchen umfüllen. Sie kann jetzt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden.

2.5.3.4 Filtertest

Hier soll kontrolliert werden, ob die Markierung der Proben zur Zufriedenheit abgelaufen ist. Über die Verdünnungsschritte wird über einen Dot-Blot festgestellt, ob eine ausreichende Biotinylierung bzw. Digoxigenierung erfolgt ist.

Nach dem Filternachweis sollte zumindest der 1: 100 Verdünnungsschritt auf dem Filter sichtbar sein. Ist der Filter zu schwach, hat es keinen Sinn zu hybridisieren.

Herstellen einer Verdünnungsreihe:

- 1) Zunächst muß ein Nitrozellulosefilterstück zurecht geschnitten und mit Kugelschreiber beschriftet werden.
- 2) Auf einem Stück Parafilm (möglichst auf den Untergrund aufsprühen) werden dreimal je $9\text{ }\mu\text{l}$ H_2O Tropfen nebeneinander aufgetragen (4x3 Tropfen nebeneinander ausreichend, sonst zu schnelle Austrocknung). Jetzt wird in den ersten Tropfen $1\text{ }\mu\text{l}$ der abzentrifugierten, markierten DNA-Probe pipettiert, dieser muß gut durchgemischt werden.
- 3) Dann $1\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung als ersten Verdünnungsschritt auf den Filter geben (muß gut einziehen). Von diesem ersten Tropfen wird wiederum $1\text{ }\mu\text{l}$ abpipettiert und in den zweiten Tropfen überführt. Nachdem gut gemischt wurde, wird wieder $1\text{ }\mu\text{l}$ als zweiter Verdünnungsschritt abgenommen und in den darauffolgenden Tropfen auf den Filter pipettiert, so dass eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100, 1:1000 entsteht.
- 4) Das Nitrozellulosefilterstück wird auf einem Stück Papierfilter in der Mikrowelle ($> 600\text{ W}$) für 2 min gebacken (alternativ 30 min bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$). In der Zwischenzeit sollte der AP2 Puffer (3% BSA) angefertigt werden.

- 5) Der Filter wird nach dem Backen in einer lichtverschießbaren Petrischale kurz mit AP1 Puffer (ph 7,5) equilibriert, dann wird AP1 abgegossen und der Filter mit AP2 Puffer für 10 min bei RT geblockt.
- 6) **Für biotinmarkierte Proben:** Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat 1:10000 (1µl/10 ml) AP1 Puffer 10 min bei RT inkubieren. **Für digoxigeninmarkierte Proben:** Dig-AP-Konjugat 1:5000 in AP1 Puffer bei RT inkubieren.
- 7) Das Filterpapier wird 2x3 min in AP1 Puffer in Schüttelwasserbad bei RT gewaschen, danach 3x3 min in AP3 Puffer gewaschen.
- 8) Der Filter wird in NBT/BCIP-Färbelösung über mindestens 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert, dieses kann auch über Nacht geschehen. Das Filterpapier wird dann unter Leitungswasser gespült und kann an der Luft trocknen.

2.5.4 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde ein Gemisch aus 500 ng digoxigenmarkierter Referenz-DNA und 1500 ng biotinmarkierter Tumor-DNA, 40 ng humaner Cot1-DNA und Lachssperma-DNA bei 75 °C für 5 min denaturiert und auf die ebenfalls bei 75 °C für 5 min denaturierten Objektträger mit den Mataphasechromosomen gegeben.

Die Zugabe der humanen Cot1-DNA erfolgte zum Abblocken der repetitiven DNA-Sequenzen der Tumor- und der Referenz-DNA. Diese repetitiven DNA-Abschnitte sind von Mensch zu Mensch in unterschiedlicher Kopienzahl vorhanden und können starke Ausschläge des Ratioprofiles in den zentromerischen und heterochromatischen Regionen der Targetchromosomen verursachen, wenn sie nicht ausreichend blockiert werden. Die Lachssperma-DNA blockiert unspezifische Bindungsstellen auf dem Objektträger.

Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Theoretisch sollten ca. 500 ng Test- und 500 ng Kontroll-DNA co-hybridisiert werden („Lehre der equal amounts“). Erfahrungsgemäß sollte die Menge der DNA je nach Ausgangsmaterial (Paraffin/ Frisch) angepasst werden, wie bereits in der Nick-Translation geschehen. Trotzdem zeigt der Filtertest oft sehr unterschiedliche Markierungsintensitäten der einzelnen Proben an, wobei in der Regel Kontroll- und Frisch-DNA sehr gut bis gut, DNA aus Paraffinmaterial eher befriedigend bis mangelhaft markiert ist. Für die Kontroll-DNA hat sich der Einsatz von 40 µl (ca. 400 ng) pro Hybridisierung bewährt. Für DNA aus Frischmaterial sind in der Regel 80 µl (800 ng) notwendig. Für die Paraffin-DNA werden bei gutem Filter (wenn das Signal so gut ist wie bei der Kontrolle) 80 µl, bei mäßigem Signal (1:100 Verdünnung der Kontrolle) 100 µl eingesetzt.

Bei noch schwächerem Filter ist eine Hybridisierung nicht mehr sinnvoll; die Nick-Translation für Paraffinmaterial sollte dann mit höherem DNA-Einsatz wiederholt werden.

- 1) Die DNA über mind. 120 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitieren lassen und dann 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren, dann den Überstand der abzentrifugierten Probe abheben und verwerfen. Das Pellet bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelwasserbad inkubieren.
- 2) 5µl (auf 37°C vorgewärmten) Mastermix zur Suspension hinzugeben und vortexen, dann wird die DNA für mind. 5 min bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad denaturiert.
- 3) Es folgt das „Preannealen“ für 45 min in $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad, anschließend können die Proben vollständig auf Objektträger mit Chromosomenpräparaten aufgetropft werden, diese werden mit Deckgläschen versehen.
- 4) Die Hybridisierung erfolgt schwimmend in einer Stahlwanne bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Tage.

2.5.5 Waschung und Detektion

Im Anschluß an die fünf Tage dauernde Hybridisierung wurden die Objektträger einer Reihe stringenter Waschungen zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden unterworfen. Die Biotin-Reste der Tumor-DNA wurden dann mit grün fluoreszierendem Avidin-FITC und die Digoxigenin-Reste der Referenz-DNA mit rot fluoreszierendem Anti-Digoxigenin-Rhodamin

nachgewiesen. Die Metaphasenchromosomen wurden zusätzlich mit blau fluoreszierendem DAPI gegengefärbt.

Doppelhybridisierungsnachweis der CGH

- 1) Die Deckgläschen werden entfernt, indem die Objektträger 4x 5min in 50% FA/2x SSC bei 45°C im Wasserbad geschüttelt werden. Sind die Deckgläser entfernt, so schließt sich eine erneute Waschung bei 60°C über 3x5 min in 0,1x SSC an, danach wird kurz in 4x SSC/Tween 20 gespült.
- 2) Blocking: Je 125 µl einer Lösung aus 3% BSA in 4x SSC/Tween 20 werden auf ein umgekehrtes Deckgläschen getropft, die dann auf die Objektträger gelegt werden und dann über 30 min in eine feuchte Kammer bei 37 °C gestellt werden. Dann wird kurz mit 4x SSC/Tween 20 gespült.
- 3) Danach werden die Präparate mit 100 µl eines Antikörpermix (Schaf anti Digoxigenin-Rhodamin 1:33 und Avidin-FITC1:200 in 4x SSC/Tween 20+1% BSA + 12,5 % Humanserum) über 45 min bei 37 °C in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert.
- 4) Es folgt eine Waschung über 3x5 min in 4x SSC/Tween 20, anschließend wird die Gegenfärbung bei RT über 7-10 min mit DAPI durchgeführt. Anschließend wird noch einmal mit 2x SSC/0,05% Tween gewaschen (2x SSC/0,05% Tween= 25 ml 4x SSC/Tween + 25 ml Aqua bidest.)
- 5) Nach Auftragen von „Antifading-Solution“ können die Präparate eingedeckelt bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.5.6 Mikroskopie und digitale Bildanalyse

Die hybridisierten Metaphasepräparate werden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (LEICA DMRBE) mit dem Filtersatz Chroma #8300 ausgewertet. Dieses ist über eine Digitalkamera (COHU 6x-924) mit einem Computer verbunden, der mit spezieller Bildanalysesoftware (Cytovision 3.1; APPLIED IMAGING) ausgestattet ist. Die Auswertung umfasst folgende Schritte:

- **Bildaufnahme:** Nacheinander werden Bilder der DAPI-, FITC- und Rhodamin-Fluoreszenz von 10 Metaphasespreitungen je Fall gespeichert.
- **Karyotypisierung:** Mit Hilfe der Software werden die DAPI-Bilder der Metaphasechromosomen invertiert. Das resultierende Bandenmuster ähnelt der G-Bänderung und wird zur Karyotypisierung genutzt.
- **Achsen-/Zentromerpositionen:** Die von der Software ermittelten Zentromerpositionen und Achsenverläufe der Chromosomen werden überprüft und gegebenenfalls korrigiert.
- **Generierung des CGH-Verhältnis-Profiles:** Die Intensitäten der grünen (Tumor-DNA) und roten (Referenz-DNA) Fluoreszenz werden von der Software entlang der Chromosomenachsen vermessen, normalisiert und miteinander verglichen. Die Normalisierung beinhaltet zunächst die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz (außerhalb der Chromosomen) vom Fluoreszenzwert innerhalb der Chromosomen.

Systematische Intensitätsunterschiede zwischen Rot und Grün, die z.B. durch den Einsatz unterschiedlicher Mengen an Tumor- und Referenz-DNA oder ungleichmäßiges Ausbleichen der beiden Fluorchrome während der Analyse auftreten können, werden durch die Software kompensiert.

Aus dem Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenz wird das Fluoreszenz-Ratio-Profil erstellt, welches Zugewinne oder Verluste genetischen Materials an den schematisierten Chromosomen darstellt. Besteht eine Gleichverteilung der Fluoreszenzintensität (grün:rot=1:1), so zeigt dieses normale DNA-Verhältnisse an.

Diese bedeutet jedoch auch, dass die CGH keine Polyploidie, also absolute DNA-Zugewinne pro Zelle, erkennen kann. Der mehrfache Chromosomensatz einer Zelle entspricht rechnerisch einem erhöhten Einsatz an Tumor-DNA und wird vom Programm als systematischer „Fehler“ herausgerechnet (schwarze Mittellinie).

Im Falle eines Zugewinnes eines Chromosoms (Trisomie) oder eines chromosomalen Abschnittes im Tumor verschiebt sich die Fluoreszenzratio auf 1,5

(3 Tumorchromosomen : 2 Normal-Chromosomen= Ratio 3:2= **1,5** : 1).

Das Profil erreicht dann die grüne Linie (1,5). Meistens kann im Rahmen der Tumormaterialgewinnung keine reine, genetisch homogene Tumor-DNA gewonnen werden, weil das Tumorgewebe z.B. von Lymphozyten oder anderen, nicht Tumor-DNA tragenden Zellen durchsetzt wird, aber auch unterschiedliche Tumorzellklone können eine genetische Heterogenität erzeugen. Mit der CGH ist eine zuverlässige Detektion chromosomaler Aberrationen jedoch bis zu einer Verunreinigung mit 50% DNA aus normalen Zellen möglich.

Unter diesen Bedingungen ergeben DNA-Zugewinne eine Fluoreszenzratio von 1,25 (erste grüne Linie). Verluste innerhalb der Tumor-DNA bewirken einen Ausschlag des Profils nach links (rote Linien), weil die Fluoreszenz-Ratio Werte <1 erreicht (1 Tumorchromosom : 2 Referenzchromosomen = Verhältnis 1: 2 = **0,5** :1; bei bis zu 50%iger Verunreinigung steigt dieser Ratiowert auf 0,75).

Für das Fluoreszenz-Profil können der Mittelwert und die Standardabweichung

(95%iges Konfidenzintervall) beliebig vieler ausgewerteter Metaphasen berechnet werden.

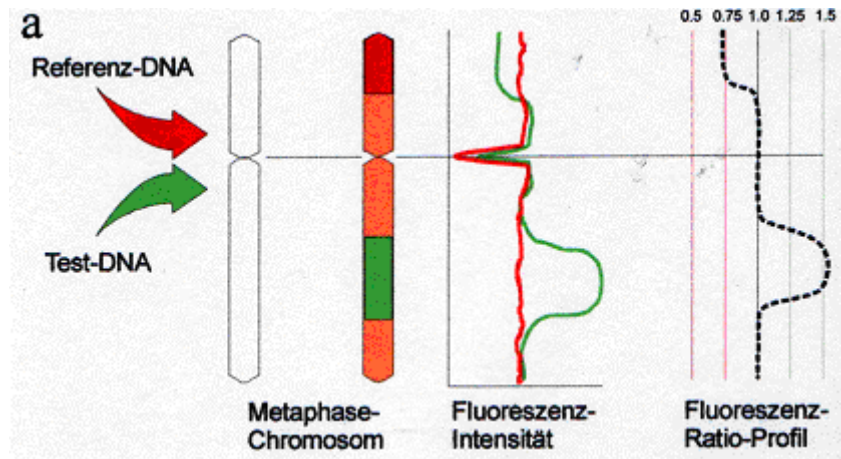


Abb.:4

- a) Schematischer Ablauf der CGH-Analyse. Unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Test-DNA (grün) und Referenz-DNA (rot) werden auf normale Metaphasechromosomen kohybridisiert. Chromosomale Abschnitte, die in der Tumor-DNA in erhöhter Kopiezahl vorliegen (z.B. auf Grund von Amplifikationen), verursachen eine erhöhte Hybridisierungsdichte (grüner Bereich), während deletierte Bereiche eine verminderte Hybridisierungsdichte auf dem komplementären Bereich des entsprechenden Metaphasechromosoms hervorrufen (roter Bereich). Je nach Hybridisierungsdichte der Tumor-DNA resultiert eine mehr oder weniger intensive Fluoreszenz des grünen Farbstoffs, während die Fluoreszenzintensität der roten Referenz-DNA auf allen Chromosomen gleichmäßig ist. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Referenz-DNA ergibt das Fluoreszenz-Ratio-Profil eines jeden Chromosoms. Gleiche Intensität (1:1) führt auf dem Ratioprofil zum Wert 1,0 und zeigt normale DNA-Verhältnisse an. Verschiebungen der Fluoreszenzratio über 1,25 werden als Zugewinne, unter 0,75 als Verluste chromosomalen Materials der Tumor-DNA am entsprechenden chromosomalen Locus gewertet.

2.5.7 Auswertung, Schwellenwerte und Kontrollen

Für die CGH-Analysen wurden pro Fall im Schnitt 8 Metaphasen analysiert, die mikroskopisch eine gleichmäßige und intensive Fluoreszenz zeigen. Die entsprechenden CGH-Verhältnis-Profile wurden nur dann verwertet, wenn die 95% Konfidenzintervalle den Wert $\pm 0,15$ nicht überschritten hatten, um Fehlinterpretationen aufgrund mangelhafter Hybridisierungen zu verhindern. Generell wurden die 50 % Schwellenwerte zur Definition von DNA-Zugewinnen und – Verlusten genutzt (Zugewinn: $\text{Ratio} \geq 1,25$; Verlust: $\text{Ratio} \leq 0,75$). Diese Schwellenwerte sind für diploide Tumoren festgelegt worden.

Für die Annahme rekurrenter Aberrationen hat sich in der Praxis der Schwellenwert von 25% bewährt, d.h., Aberrationen wurden nur dann als rekurrent bezeichnet, wenn sie bei 25% der Tumoren nachzuweisen waren.

Zur Sicherheit wurden zu jedem CGH-Experiment parallel zwei Kontroll-Hybridisierungen (Positiv-Kontrolle: Zelllinie ET2A; Negativ-Kontrolle: Normal-DNA) durchgeführt. Ausschläge des Ratio-Profiles, bei denen das 95% Konfidenzintervall die Mittellinie vollständig verlässt, wurden bei den Negativ-Kontrollen nicht beobachtet. Die chromosomalen Regionen 1p32-pter, 16 und 19 sind für fälschlicherweise erniedrigte Verhältnis-Werte bekannt, so dass Deletionen vorgetäuscht werden können, und wurden deshalb aus der Analyse ausgeschlossen.

2.6.8 Statistische Analysen

Statistische Vergleiche zwischen der Häufigkeit der Aberrationen und den verschiedenen Tumorentitäten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Typisierung der untersuchten Keimzelltumoren

Die 49 untersuchten Keimzelltumoren (vgl. Tab. 4) wurden primär an HE Schnitten diagnostiziert. Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 5 dargestellt.

Es wurden 23 reine Seminome untersucht. Zwanzig waren vom klassischen Typ. Sie zeigten uniforme, große, helle, glykogenreiche Zellen mit eingestreuten Lymphozyten und waren von zarten Bindegewebssepten umgeben.

Synzytiotrophoblastäre Riesenzellen fanden sich zusätzlich in drei der untersuchten Seminome.

Die sechs spermatozytischen Seminome waren aus großen, spermatozytenähnlichen, polymorphen Zellen und Tumoriesenzellen aufgebaut.

Von den dreizehn nichtseminomatösen Keimzelltumoren einheitlicher Bauart waren neun Embryonale Karzinome. Die Tumorzellen lagen in strukturlosen Haufen und zeigten teils drüsenähnliche, teils papilläre Strukturen. Die vier reinen Dottersacktumoren wiesen neben myxoiden und netzig-retikulären Strukturen auch papilläre und glanduläre Muster auf.

Die sechs gemischten Tumoren zeigten eine unterschiedliche Zusammensetzung mit Anteilen mesenchymaler (ausschließlich chondromatöser Strukturen) und epithelialer Teratome, Embryonaler Karzinome, Dottersacktumoren, Seminomen und Choriokarzinomen. Die Zusammensetzung der einzelnen gemischten Tumoren unter Berücksichtigung der Fallnummerierung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Zusätzlich wurde als Beispiel für ein reines Choriokarzinom ein uterines Choriokarzinom untersucht.

Tab.4: Histologische Typen der untersuchten Keimzelltumoren

Seminome	(n=23)
Klassisches Seminom	(n=20)
• Seminom mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen	(n= 3)
• Spermatozytisches Seminom	(n= 6)
Nichtseminomatöse Keimzelltumoren (NSKT) einheitlicher Bauart (n=13)	
• Embryonales Karzinom	(n= 9)
• Dottersacktumor	(n= 4)
Kombinierte Keimzelltumoren (Mischformen)	(n= 6)

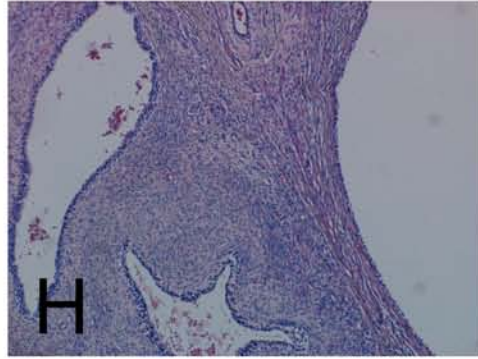
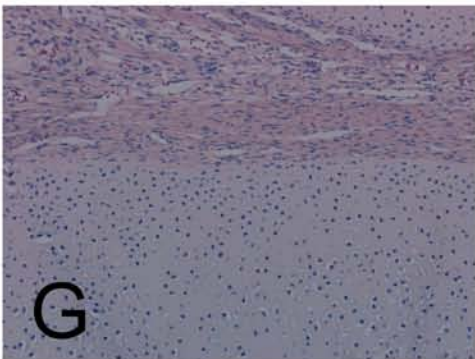
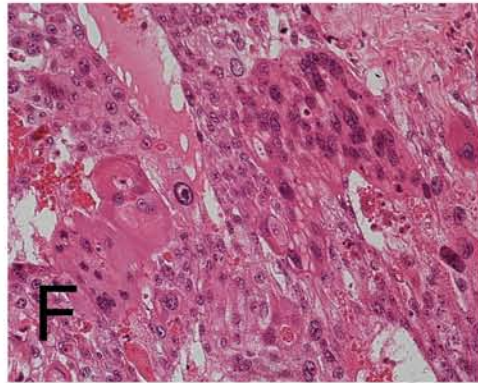
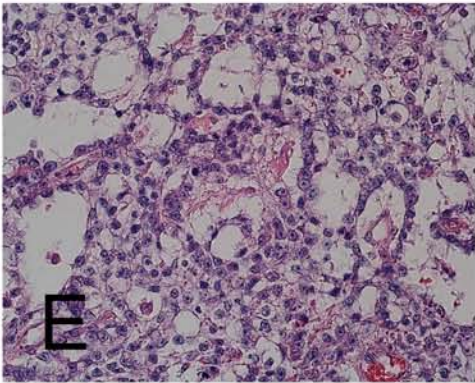
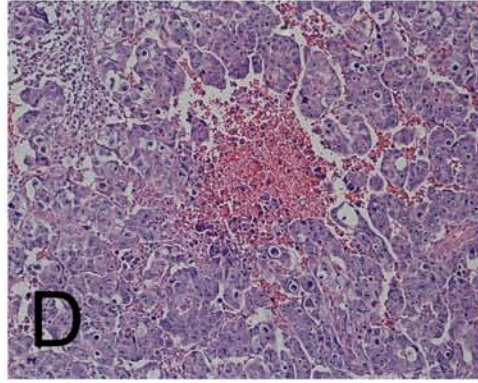
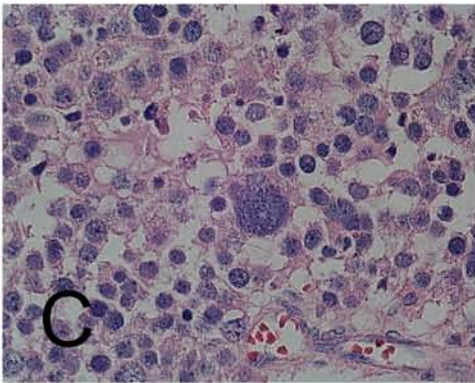
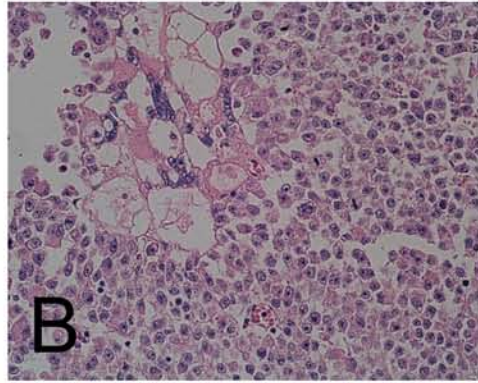
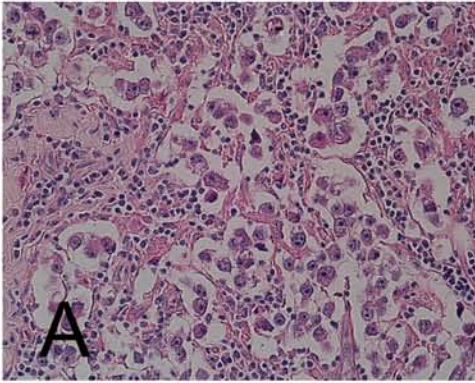
Tab. 5: Zusammensetzung der gemischten Keimzelltumoren

Fall			
37	Mesenchymales Teratom	Embryonales Karzinom	
38	Mesenchymales Teratom	Embryonales Karzinom	
39	Mesenchymales Teratom	Embryonales Karzinom	Epitheliales Teratom
40	Seminom	Dottersacktumor	
41	Seminom	Mesenchymales Teratom	
42	Epitheliales Teratom	Choriokarzinom	

Legenden zu Abbildung 5

Abbildung 5 (auf der folgenden Seite): Differenzierungen testikulärer Keimzelltumoren

- A) (Fall 8, HE, 20x) **Klassisches Seminom** mit den typischen hellen, glykogenreichen Tumorzellen und eingestreuten Lymphozyten
- B) (Fall 5, HE 20x) **Seminom mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen**
- C) (Fall 4, HE 40x) **Anaplastisches (mitosereiches) Seminom**
- D) (Fall 27, HE 10x) **Embryonales Karzinom** mit papillären Wachstumsmuster
- E) (Fall 35, HE 20x) **Dottersacktumor** mit myxoiden und netzig-retikulären Strukturen und typischem Schiller-Duval-Körper
- F) (Fall 42, HE 20x) **Choriokarzinom** mit Synzytialen Riesenzellen und Zytotrophoblastenanteilen
- G) (Fall 39, HE 10x) **Reifes Teratom** mit mesenchymalem Anteil
- H) (Fall 39, HE 5x) **Reifes Teratom** mit epithelialelem Anteil



3.2 Immunhistochemie

Ergänzend zu den HE Schnitten wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt, mit denen charakteristische Merkmale der verschiedenen Keimzelltumoren dargestellt werden konnten (vgl. Tab. 6). Die Seminome färbten sich typischerweise mit der alkalischen Phosphatase vom Plazentatyp (PLAP); die drei Seminome mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen zeigten zusätzlich eine Färbung mit β -HCG .

Für die Embryonalen Karzinome spezifisch fiel die CD 30 Färbung positiv aus.

Die Dottersacktumoren waren erwartungsgemäß alpha-Fetoprotein (AFP) positiv.

Bei den Choriokarzinomen ließ sich β -HCG in den synzytiotrophoblastären Riesenzellen nachweisen.

In spermatozytischen Seminomen waren nur einzelne schwach unspezifisch markierte Zellen nachzuweisen, die PLAP und Cytokeratin enthielten.

Tab. 6: Tumormarker bei verschiedenen Keimzelltumoren

	PLAP	AFP	β -hCG	CD 30	CD 117	Cytokeratin	Inhibin
Seminom	+++	-	*-	-	+	-	-
Embryonales Karzinom	+	-	*-	+	+	+	-
Dottersacktumor	-	++	*-	-	+	+	-
Choriokarzinom	+	-	+++	-	-	+	+
Spermatozytisches Seminom	-	-	-	-	-	-	-

PLAP: Alkalische Phosphatase vom Plazentatyp

AFP: a-Fetoprotein

β -hCG: b-humanes Choriogonadotropin

CD30: (= ki-1) cluster of differentiation 30

CD117: cluster of differentiation 117

Cytokeratin: Intermediärfilament

Inhibin: X-Hormon

* β -HCG in eingestreuten synzytiotrophoblastären Riesenzellen in einzelnen Fällen

3.3 Patientendaten

Das Alter der Patienten mit **Seminomen** lag zwischen dem 24. und 61. Lebensjahr, mit deutlichem Gipfel im vierten Lebensjahrzehnt, was den epidemiologischen Daten entspricht. Es handelte sich überwiegend um T1 Stadien nach der TNM-Klassifikation (vgl. Tab. 7).

Tab.7: Klinische Daten der Seminom-Fälle

Fall	Diagnose	Alter (J)	TNM
1	Seminom	39	pT1
2	Seminom	56	pT1
3	Seminom	36	pT2
4	Seminom	41	pT1
5	Seminom	30	pT2
6	Seminom	46	pT1
7	Seminom	30	PT1
8	Seminom	37	pT1
9	Seminom	61	pT1
10	Seminom	35	pT1
11	Seminom	46	pT1
12	Seminom	38	pT2
13	Seminom	34	pT1
14	Seminom	32	pT1
15	Seminom	43	pT1
16	Seminom	32	pT1
17	Seminom	31	pT1
18	Seminom	44	pT1
19	Seminom	61	pT1
20	Seminom	24	pT1
21	Seminom	30	pT1
22	Seminom	39	pT1
23	Seminom	61	pT1

Bei den spermatozytischen Seminomen lag der Altersgipfel bei 62 Jahren. Dies entspricht den epidemiologischen Daten. Die Tumorstadien konnten retrospektiv nicht mehr ermittelt werden (vgl. Tab. 8).

Tab. 8: Patientendaten der spermatozytischen Seminome

Fall	Diagnose	Alter (J)
43	spermatozytischesSeminom	68
44	spermatozytisches Seminom	66
45	spermatozytisches Seminom	48
46	Spermatozytisches Seminom	72
47	Spermatozytisches Seminom	45
48	Spermatozytisches Seminom	68

Die **Embryonalen Karzinome** traten bei Patienten zwischen dem 20. und 62. Lebensjahr auf. Der Medianwert lag bei 28 Jahren. Dies stimmt mit den epidemiologischen Daten überein. Die Tumoren wurden mit Ausnahme von zwei Fällen im Tumorstadium T1 entdeckt (vgl. Tab. 9).

Tab. 9: Patientendaten der embryonalen Karzinome

Fall	Diagnose	Alter (J)	TNM
24	Embryonales Karzinom	23	pT1
25	Embryonales Karzinom	32	pT2
26	Embryonales Karzinom	20	PT1
27	Embryonales Karzinom	26	pT1
28	Embryonales Karzinom	30	pT1
29	Embryonales Karzinom		
30	Embryonales Karzinom	38	pT1
31	Embryonales Karzinom	62	pT2
32	Embryonales Karzinom	55	pT1

Bei den vier **Dotterstaktumoren** lag das Erkrankungsalter zwischen dem 2. und 47. Lebensjahr. Der Median liegt bei 27,5 Jahren, was den Angaben in der Literatur entspricht. In zwei Fällen handelte es sich um T1-Stadien, in einem Fall um ein T2- Stadium, der älteste Patient war bereits metastasiert (M1) (vgl. Tab. 10).

Tab.10: Patientendaten der Dottersacktumoren

Fall	Diagnose	Alter (J)	TNM
33	Dottersacktumor	47	pTx NxM1
34	Dottersacktumor	32	pT1
35	Dottersacktumor	23	pT2,
36	Dottersacktumor	2	PT1

Bei den **gemischten Keimzelltumoren** lag das Alter zwischen dem 24. und 37. Lebensjahr, im Median entsprechend der Literatur bei 29,5 Jahren. In drei von fünf Fällen lag das Stadium T1 vor (vgl. Tab. 11).

Tab.11: Patientendaten der gemischten Keimzelltumoren

Fall	Diagnose	Alter (J)	TNM
37	Mesenchymales Teratom/Embryonales Karzinom		
38	Mesenchymales Teratom/ Embryonales Karzinom	37	pT1
39	Mesenchymales Teratom/Embryonales Karzinom/ Epitheliales Teratom	33	pT1
40	Seminom/Dottersacktumor		
41	Seminom/ Mesenchymales Teratom	26	pT1
42	Epitheliales Teratom/Choriokarzinom	24	pT2,pNx,M1b

Das Choriokarzinom im Uterus stammte von einer 29 jährigen Patientin im Tumorstadium pT1.

3.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die DNA-Proben der 49 Keimzelltumoren wurden mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf genetische Aberrationen untersucht. Die einzelnen CGH-Ergebnisse sind im Folgenden nach Tumorentitäten getrennt aufgeführt.

Entsprechend der Konvention wurden ganzchromosomale Veränderungen als eine Aberration gezählt, während bei mehreren Veränderungen auf einem Chromosom diese getrennt berechnet wurden.

3.4.1 Seminome

Die einundzwanzig auswertbaren Seminome wiesen unterschiedlich häufig Aberrationen auf. Sie lagen zwischen einer Aberration und 17 Aberrationen, im Durchschnitt bei 8,4 Aberrationen pro Fall. Bei den zwei nicht auswertbaren Fällen wurden keine Aberrationen gefunden, da die entsprechenden Präparate zu viele Lymphozyten aufwiesen.

Am häufigsten (85,7%) ist das Chromosom 12p betroffen. Hier finden sich in 18 von 21 Fällen Zugewinne, bei 4 Fällen handelt es sich um einen ganzchromosomalen Zugewinn.

Am zweithäufigsten ist ein Zugewinn des Chromosoms 21q in 13 von 21 Fällen (61,9%); am dritthäufigsten ist ein Zugewinn von Anteilen des Chromosoms 12q in 12 von 21 Fällen (57,1%), am vierthäufigsten ein Zugewinn von Anteilen der Chromosome 7p und 8q in 11 von 21 Fällen (52,4%). Zugewinne von Anteilen des Chromosoms 7q traten in 10 von 21 Fällen (47,6%), der Chromosome 15q und Xq in 8 von 21 Fällen (38,1%) und des Chromosoms 1q in 7 von 21 Fällen (33,3%) auf.

Chromosomenverluste traten in 11 von 21 Fällen (52,4%) an Anteilen von dem Chromosom 11q sowie in 10 von 21 Fällen (47,6%) an Anteilen von dem Chromosom 13q, in 9 von 21 Fällen (42,9%) an Anteilen von dem Chromosom 18q, in 8 von 21 Fällen (38,1%) an Anteilen von dem Chromosom 4q und in 7 von 21 Fällen (33,3%) an Anteilen von den Chromosomen 5q und 18p auf.

Bei den untersuchten Fällen gab es kein Chromosom, das von einem Zugewinn oder Verlust nicht betroffen war.

Die drei Seminome (Fall 5, 10, 22) mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen und das anaplastische Seminom verhielten sich in Bezug auf Gewinn und Verlust wie die anderen Seminome.

Die chromosomalen Aberrationen der einzelnen Fälle zeigt die Tabelle 12.

Abbildung 6 stellt das Summenkaryogramm der Seminome dar.

Fall	CGH-Ergebnisse	Aberr.
1	1q+, 4q-, 5q-, 7p+, 7q+, 8p+, 8q+, 11q-, 12p+, 12q+, 15q+, 18q-, 21q+	10
2	7p+, 7q+, 8p+, 8q-, 12p+, 12q+, 15q+, 18q-, 22q+	6
3	1q+, 2q+, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 7p+, 7q+, 8q+, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 18q-	10
4	5p+, 5q+, 7p-, 7q-, 8p-, 8q-, 9p+, 9q+, 13q-, 15q-, 20p+, 20q+, 21q+, Xq+	9
5	3p-, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 7q+, 7q-, 8q+, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 18p-, 18q-, Xp+, Xq+	11
6	2p+, 2q+, 3p-, 3q-, 4p-, 4q-, 7p+, 7q+, 8q+, 12p+, 12q+, 13q-, 21q+	8
7	1q+, 4q-, 7p+, 7q+, 11p-, 11q-, 12p+, 13q-, 18p-, 18q-, 21q+, Yp+, Yq+	9
8		0
9	12p+, Xq+	2
10	12p+, Xp+, Xq+	2
11	1q+, 5p-, 5q-, 6p+, 7p+, 8q+, 9q-, 10q-, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 14q+, 15q+, 17q+, 18p-, 18q-, Xq+	15
12	4p-, 4q-, 6q-, 7p+, 7q+, 12q+, 13q-, 14q+, 15q+, 17p+, 17q+, 18q-, 21q+, 22q+	11
13	1q+, 2q+, 5p-, 5q-, 7p+, 7q+, 8p+, 8q+, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 18p-, 18q-, 21q+, Xq+	10
14	3q-, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 8p-, 13q-, 20p+, 20q+, 21q+	7
15	12p+	1
16	6q+, 7p+, 7q+, 8q+, 11q-, 12p+, 12q+, 14q+, 15q+, 18p-, 18q-, 20q-, 21q+, Xp+, Xq+	11
17	12p+, 17q+, 21q+	3
18	12p+	1
19	8q+, 11p-, 11q-, 12p+, 14q+, 15q+, 21q+, Xp-, Xq-	7
20	1q+, 2p+, 2q+, 3p-, 3q-, 6q-, 6q+, 7p+, 8p+, 8q+, 9p-, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 15q+, 17p-, 17q-, 18p-, 18q-, 20p-, 21q+, Xp+, Xq+, Yp-, Yq-	17
21	8p-, 8q+, 9q-, 11q-, 12p+, 12q+, 13p-, 13q-, 14q+, 15q-, 20p-, 21q+, 22q-, Xp+, Xq+	12
22	1q+, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 7p+, 7q+, 8p+, 8q+, 9p+, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 14q-, 15q+, 17p-, 18p-, 18q-, 21q+	14
23		0

Tab.12: Chromosomale Aberrationen der Seminome

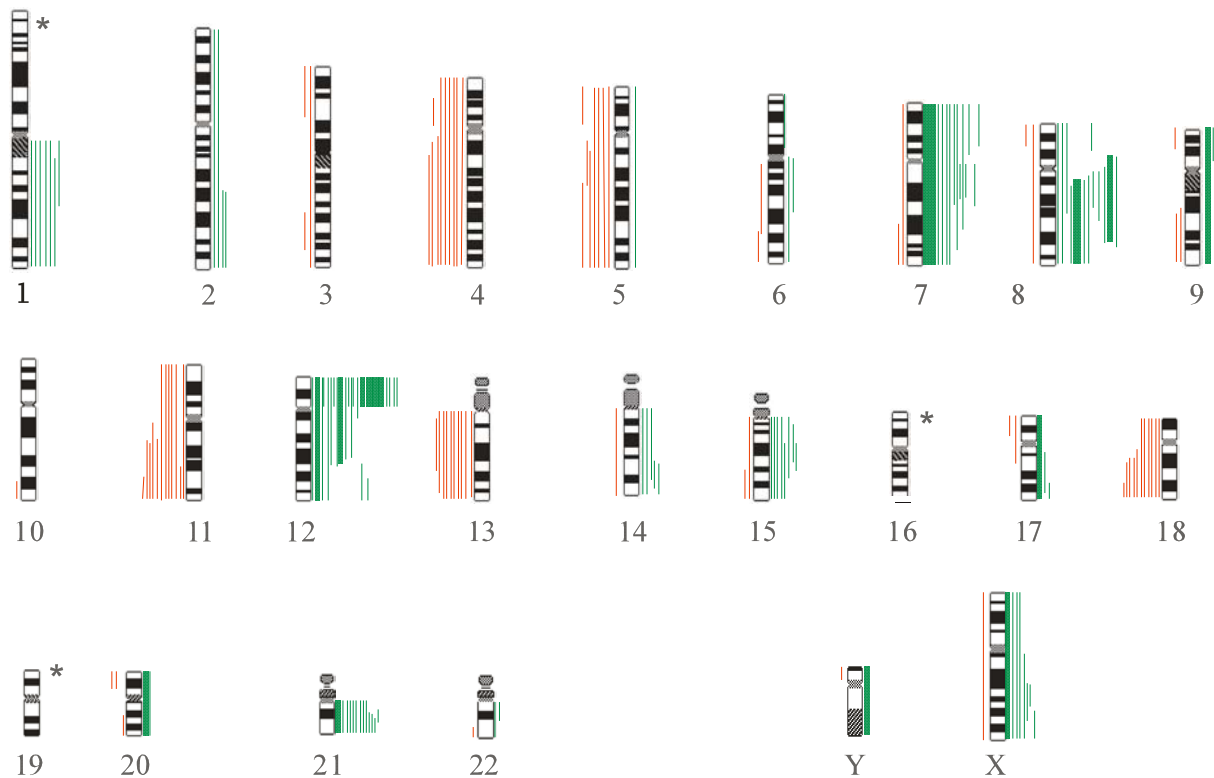


Abb. 6: Summenkaryogramm Seminome

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio > 1,5.)

3.4.2 Spermatozytische Seminome

Die sechs spermatozytischen Seminome zeigten zwischen zwei und 12 Aberrationen, im Schnitt 5,7 pro Fall. In fünf von sechs Fällen wurde ein Zugewinn auf den Chromosomen 6 und 9q beobachtet. In vier von sechs Fällen traten Zugewinne auf dem Chromosom 9q, in drei von sechs Fällen auf den Chromosomen 1q und 20 auf, in zwei von sechs Fällen auf den Chromosomen 5p und 18. Verluste traten auf den Chromosomen 13 und 22 in zwei von sechs Fällen auf. Die Chromosomen 10, 11, 12 und Y waren in keinem der sechs Fälle von Aberrationen betroffen.

Die chromosomalen Aberrationen der einzelnen Fälle sind in Tabelle 13 dargestellt. Abbildung 7 stellt das Summenkaryogramm der spermatozytischen Seminome dar.

Tab.13: Chromosomale Aberrationen der spermatozytischen Seminome

Fall	CGH-Ergebnis	Aberr.
43	1p+, 1q+, 9p+, 9q+, 17q+, 18p+, 18q+, 20p+, 20q+	5
44	6p+, 6q+, 9p+, 9q+	2
45	1q-, 4p-, 4q-, 5p+, 5q+, 6p+, 6q+, 7p-, 7q-, 9p+, 9q+, 13p-, 13q-, 14p+, 14q+, 15p-, 15q-, 18p+, 18q+, 22p-, 22q-, Xp+	12
46	1q+, 2q-, 5p+, 6p+, 6q+, 8p-, 8q-, 9p+, 13p-, 13q-, 21p+, 21q+	8
47	6p+, 6q+, 20p+, 20q+	2
48	6p+, 6q+, 9p+, 9q+, 20p+, 20q+, 21p-, 21q-, 22p-, 22q-	5

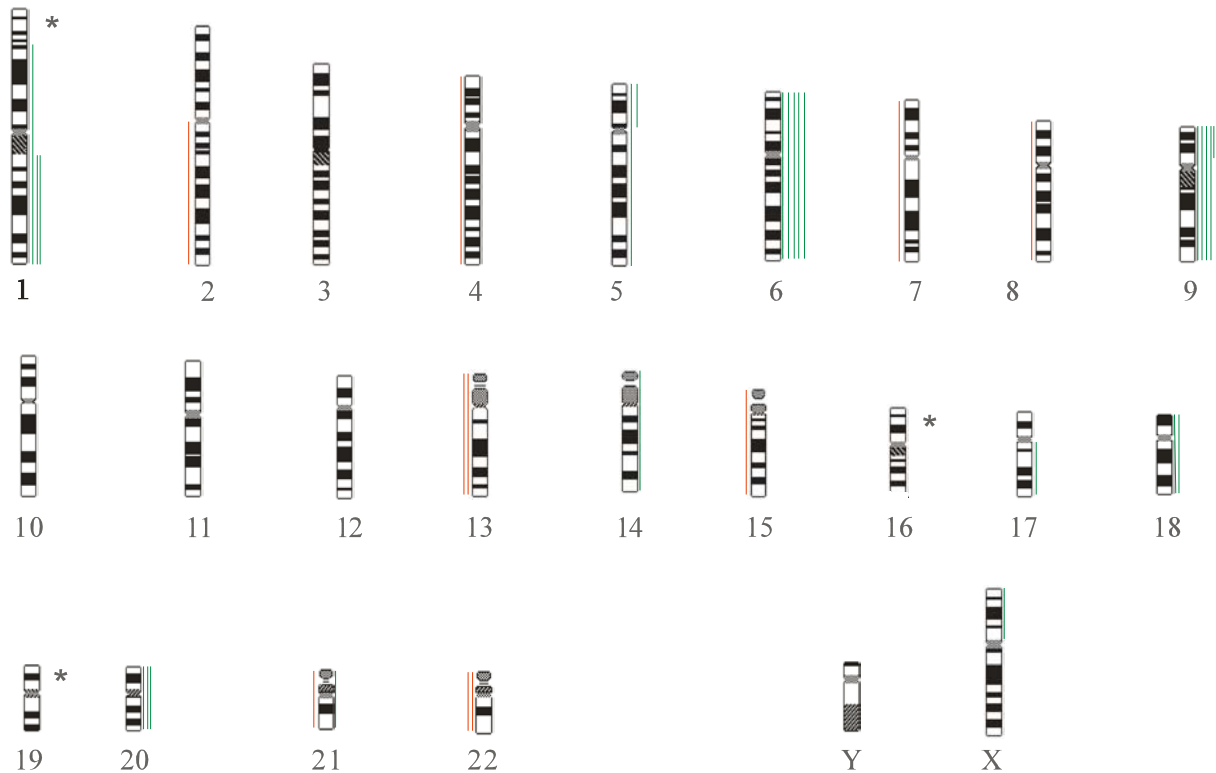


Abb. 7: Summenkaryogramm der spermatozytischen Seminome

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio>1,5.)

3.4.3 Embryonale Karzinome

Von den neun Embryonalen Karzinomen waren acht auswertbar , in einem Fall reichte die Tumorzellmenge nicht für eine valide Analyse aus.

Die ausgewerteten Proben wiesen zwischen drei und 19 Aberrationen pro Fall auf, durchschnittlich 10 Aberrationen.

Bei allen acht Embryonalen Karzinomen fand sich ein Zugewinn der Chromosome 12p und X. In sechs von acht Fällen lag ein Zugewinn von Anteilen der Chromosome 7p , in fünf von acht Fällen ein Zugewinn von Anteilen der Chromosome 7q und 8q sowie in vier von acht Fällen ein Zugewinn von Anteilen des Chromosoms 8p vor.

Verluste von Anteilen der Chromosomen 4q und 18q traten in sechs von acht Embryonalen Karzinomen auf. Anteile des Chromosoms 10q wiesen in 5 von 8 Fällen und Anteile der Chromosomen 11 und 13q in 4 von 8 Fällen Verluste auf.

Die Chromosomen 20 und 22 zeigten in keinem der Embryonalen Karzinome Aberrationen.

Die chromosomalen Aberrationen der einzelnen Fälle zeigt die Tabelle 14, die Abbildung 8 stellt das Summenkaryogramm der Embryonalen Karzinome dar.

Tab.14: Chromosomale Aberrationen der Embryonalen Karzinome

Fall	CGH-Ergebnisse	Aberr.
24	3q+, 4q-, 7p+, 7q+, 12p+, Xp+, Xq+	5
25	1q+, 4q-, 5p-, 5q-, 7p+, 7q-, 8p+, 8q+, 9q-, 10p-, 10q-, 11p-, 11q-, 12p+, 13q-, 14q-, 18q-, Xp+, Xq+	15
26	4q+, 4q-, 5p-, 5q-, 6p+, 6q-, 8p+, 8q+, 9q-, 10q-, 11p-, 11q-, 12p+, 13q-, 14q+, 15q+, 18p-, 18q-, Xp+, Xq+, Yq-	16
27	4p-, 4q-, 6q-, 7p+, 7q+, 8p+, 8q+, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 18p-, 18q-, Xp+, Xq+, Yq+	9
28	2q-, 3p+, 3q+, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 7p+, 7q+, 8p+, 8q+, 9p+, 10q-, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 14q+, 15q+, 17p+, 17q+, 18p-, 18q-, 21q+, Xp+, Xq+, Yq+	19
29	4p-, 4q-, 10p-, 10q-, 12p+, 13q-, 17p+, 17q+, 18q-, Xp+, Xq+	7
30	7p+, 7q+, 12p+, 12q+, Xp+, Xq+	3
31	7p+, 7q+, 8q+, 10p-, 10q-, 12p+, 12q+, 18q-, Xp+, Xq+	6
32		0

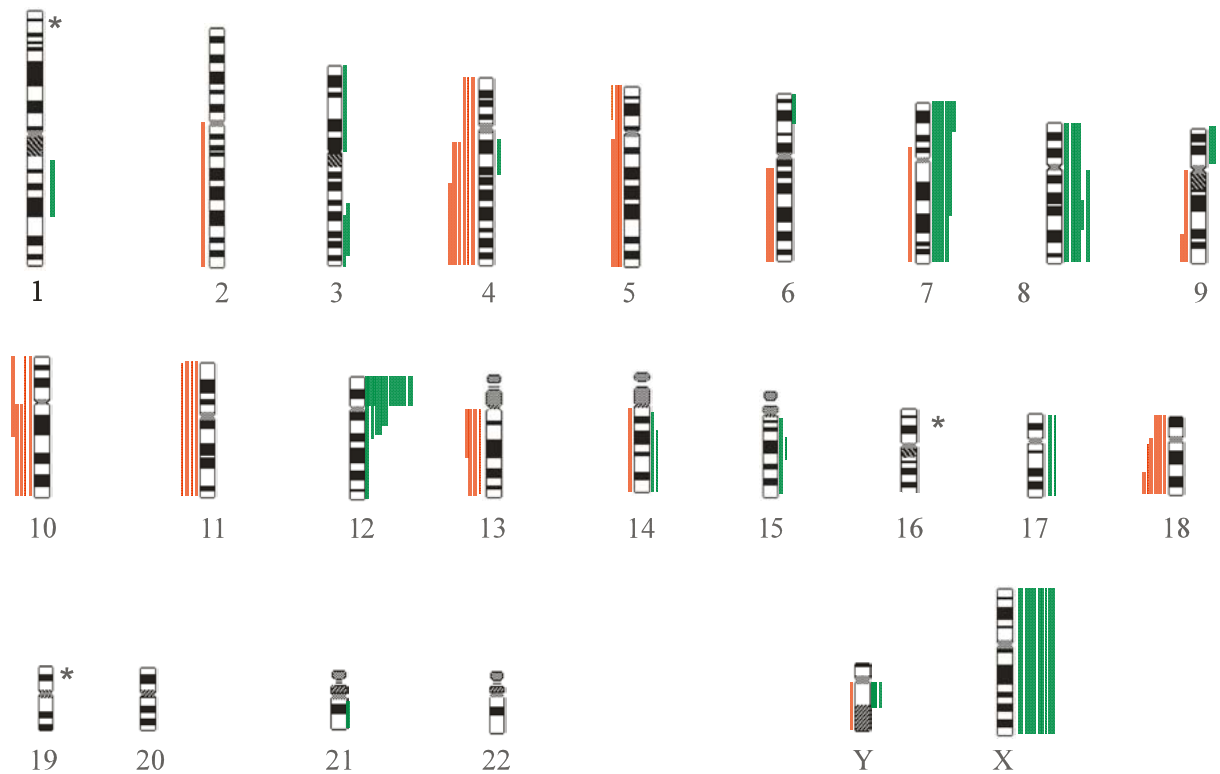


Abb. 8: Summenkaryogramm Embryonale Karzinome

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio>1,5.)

3.4.4 Dottersacktumoren

Von vier Dottersacktumoren waren drei auswertbar, ein Fall war aufgrund der zu geringen Tumorzellmenge nicht verwertbar.

Die analysierten Fälle zeigten zwischen acht und 18 Aberrationen, im Durchschnitt 11,3 Aberrationen pro Fall.

Alle drei Dottersacktumoren hatten einen Zugewinn auf den Chromosomen 2p und 12p. Zwei Fälle hatten einen Zugewinn von Anteilen des Chromosom 1q , des Chromosoms 14q und des Chromosoms X .

Ein Verlust von Anteilen des Chromosoms 6p wurde in zwei von drei Fällen beobachtet.

Die Chromosomen 9, 15, 18 und 21 waren unauffällig.

Die chromosomalen Aberrationen der einzelnen Fälle zeigt die Tabelle 15, die Abbildung 9 stellt das Summenkaryogramm der Dottersacktumoren dar.

Tab.15: Chromosomale Aberrationen der Dottersacktumoren

Fall	CGH-Ergebnisse	Aberr.
33	2p+, 6p-, 7p+, 8p+, 8q+, 12p+, 13q+, 17p+, 17q+, Xp+	8
34	1p+, 1q+, 2p+, 2q-, 3p+, 3q+, 4p-, 4q-, 5p-, 5q-, 6p-, 6q-, 8p-, 8q-, 10p-, 11q-, 12p+, 12q+, 13q-, 14q+, 20q+, 22q-, Xp+, Xq+, Yp+, Yq+	18
35	1p-, 1q+, 2p+, 11p+, 12p+, 14q+, Xq+, Yp-, Yq-	8
36		0

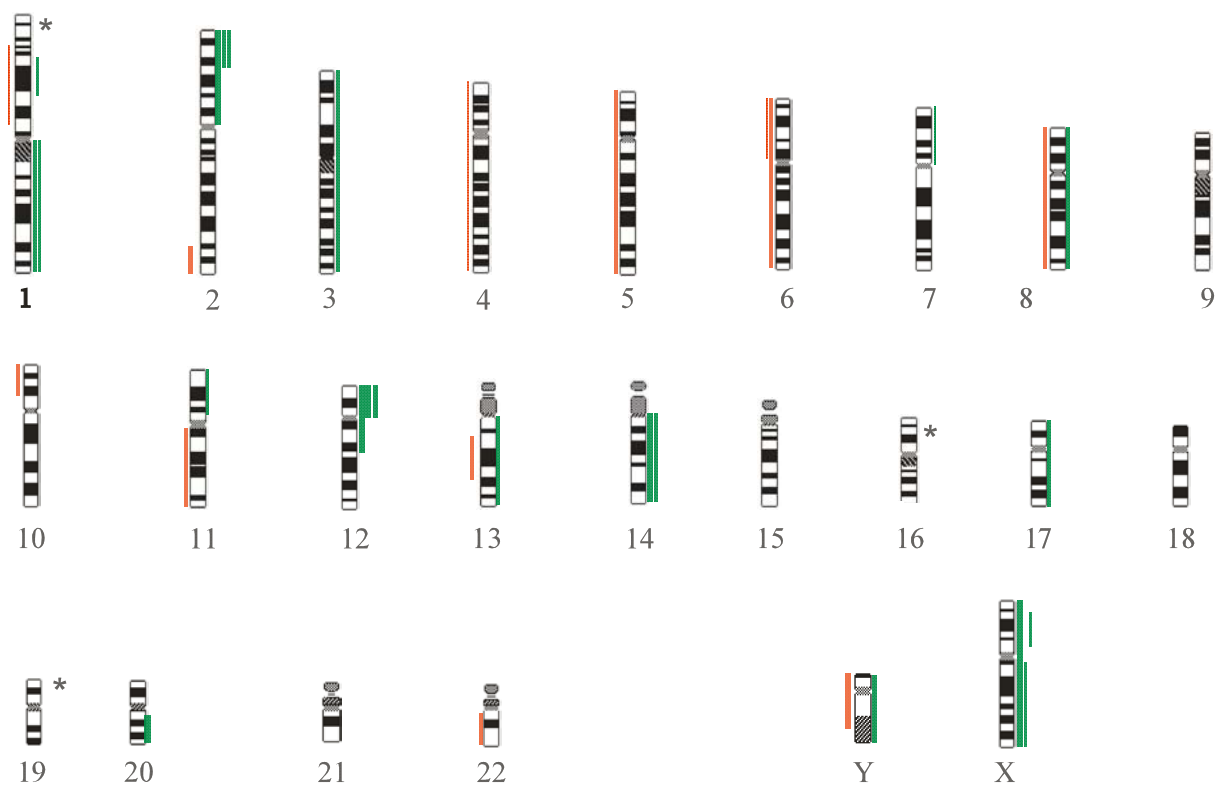


Abb.9: Summenkaryogramm der Dottersacktumoren

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio>1,5.)

3.4.5 Gemischte testikuläre Keimzelltumoren

Die gemischten Keimzelltumoren weisen in unterschiedlicher Anzahl und Menge Anteile von mesenchymalen Teratomen (ausschließlich chondromatöse Anteile), epithelialen Teratomen, Embryonalen Karzinomen, Seminomen, Dottersacktumoren und Choriokarzinomen auf. Diese Anteile fanden sich in sechs der Gemischten Keimzelltumoren in jeweils zwei bis maximal drei Ausprägungen (vgl. Tab. 5).

Die chromosomalen Aberrationen der gemischten Keimzelltumoren werden im Folgenden auf zwei Arten analysiert:

- a) Alle Aberrationen pro Fall wie bei den Seminomen und Nichtseminomen
- b) Analyse der einzelnen histologischen Komponenten, um die Aberrationen mit denen der „reinen“ Formen vergleichen zu können.

3.4.5.1 Analyse der Aberrationen pro Fall

Die sechs gemischten Keimzelltumoren zeigten zwischen zwei und 12 Aberrationen, im Schnitt 8 Aberrationen pro Fall. Allen gemeinsam ist ein Zugewinn der Chromosome 12p und X. Ein Zugewinn von Anteilen des Chromosoms 12q trat in vier von sechs Fällen, der Chromosome 1q und 8 in drei von sechs Fällen und der Chromosomen 7, 21q und Yq in zwei von sechs Fällen auf.

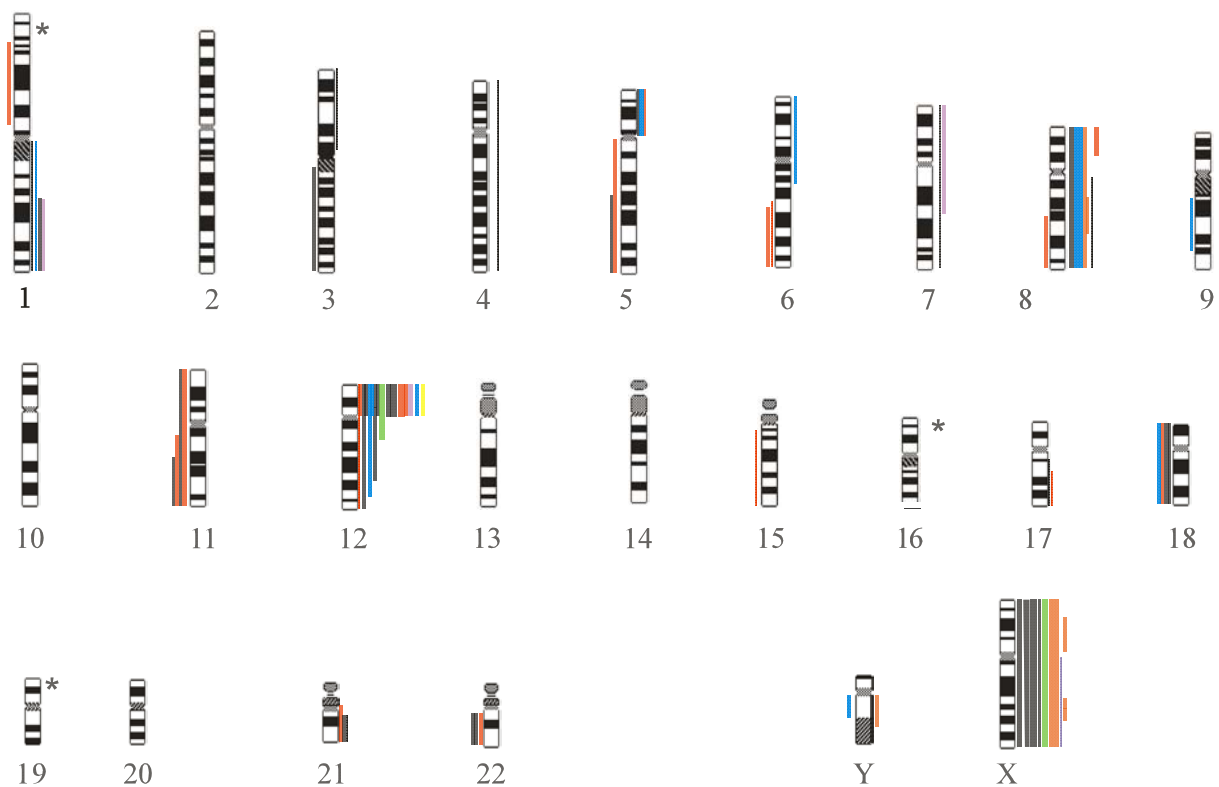
Verluste waren auf Chromosom 11q in vier von sechs Fällen und auf den Chromosomen 5q, 6q, 11p, 18 und 22q in zwei von sechs Fällen nachzuweisen.

Die Chromosomen 2, 10, 13, 14 und 20 wiesen keinerlei Aberrationen auf.

Die chromosomalen Aberrationen der einzelnen Fälle zeigt Tabelle 16; die Abbildung 10 stellt das Summenkaryogramm der gemischten Keimzelltumoren dar.

Tab.16: Chromosomale Aberrationen der gemischten Tumoren

Fall	D	CGH-Ergebnisse	Aberr.
37	Tmes	1q+, 12p+, 21q+, 22q-, Xp+, Xq+	5
	EC	1p-, 5q-, 6q-, 8p+, 8q-, 11p-, 11q-, 12p+, 15q-, 21q+, 22q-, Xp+, Xq+	11
38	Tmes	11q-, 12p+, 12q+, Xp+, Xq+	3
	EC	12p+ Xp+, Xq+, Yq+	3
39	Tmes	1q+, 5p+, 8p+, 8q+, 12p+, 17q+, 18q-, 18p- Xp+, Xq+, Yq+	8
	EC	5p+, 6q-, 8p+, 8q+, 11q-, 12p+, 12 q+, 17q+, 18p-, 18q-, Xp+, Xq+	9
	Tepi	1q+, 5p+, 6p+, 6q+, 8p+, 8q+, 9q-, 12p+, 18p-, 18q-	7
40	S		0
	YST	12p+, 12q+, Xp+, Xq+	2
41	S	12p+	1
	Tmes	3p+, 3q-, 4p+, 4q+, 5q-, 7p+, 7q+, 8q+, 11p-, 11q-, 12p+, 12q+, 18p-, 18q-, 21q+, 22q-, Xp+, Xq+	12
42	Tepi	8p+, 8q+, 12p+, 12q+, Xp+, Xq+, Yq-	4
	C	1q+, 7p+, 7q+, 12p+, Xp+, Xq+	4



Mesenchymales Teratom (Tmes): schwarz

Epitheliales Teratom (Tepi): blau

Embryonales Karzinom (EC): rot

Dottersacktumor (YST): grün

Seminom (S): gelb

Choriokarzinom (C): lila

Abb. 10: Summenkaryogramm der gemischte Keimzelltumoren

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio>1,5.)

3.4.5.2 Analyse der Aberrationen der einzelnen histologischen Komponenten

Die Aberrationen der einzelnen histologischen Komponenten können der Falldarstellung in der Tabelle 16 entnommen werden, in der die einzelnen histologischen Komponenten pro Fall verzeichnet sind. Das Summenkaryogramm ist in Abbildung 8 dargestellt .

a) Die vier **mesenchymalen (chondromatösen) Teratomanteile** wiesen drei bis 12 Aberrationen, im Schnitt 7 Aberrationen auf. In allen vier Fällen ließ sich ein Zugewinn des Chromosoms 12p und des Chromosoms X erkennen. Zwei der vier Fälle zeigten Zugewinne von Anteilen der Chromosomen 1q, 8q, 12q und 21q. Verluste von Anteilen der Chromosomen 11q, 18, 22q traten in zwei der vier Fälle auf. Bei den Chromosomen 2, 6, 9, 10, 13, 14, 15 und 20 fanden sich keine Aberrationen.

b) Die zwei **epithelialen Teratomanteile** wiesen vier, bzw. sieben Aberrationen auf. Beide zeigten einen Zugewinn des Chromosoms 8 und 12p. Zugewinne auf Anteilen von den Chromosomen 1q, 5p, 6, 12q und X traten in jeweils einem Fall auf. Verluste wurden in jeweils einem Fall auf Anteilen von den Chromosomen 9q , 18 und Yq nachgewiesen. Die Chromosomen 2, 3, 4, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 20, 21 und 22 zeigten keine Aberrationen.

c) Die drei **Embryonalen Karzinome** zeigten drei, neun und 11 Aberrationen. In allen Fällen war ein Zugewinn der Chromosome 12p und X zu erkennen. In zwei Fällen gab es einen Zugewinn von Anteilen des Chromosoms 8p. Ein Verlust auf den Chromosomen 6q und 11q wurde in zwei der drei Fälle beobachtet. Die Chromosome 2, 3, 4, 7, 9, 10, 13, 14 und 20 zeigten keine Aberrationen.

d) Von den zwei **Seminomanteilen** war wegen unzureichender Zellzahl nur ein Fall auswertbar. Dieser zeigte ein Zugewinn des Chromosoms 12p. Ein Verlust konnte nicht nachgewiesen werden, womit sich die übrigen 23 Chromosomen als unauffällig erwiesen.

e) Der eine analysierte **Dottersackanteil** wies zwei Aberrationen auf, einen Zugewinn der Chromosomen 12 und X. Ein Verlust wurde nicht beobachtet, so dass die übrigen 22 Chromosomen als normal erschienen.

f) Der eine Anteil eines **Choriokarzinoms** wies vier Aberrationen auf. Es handelte sich um Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7, 12p und X. Einen Verlust wurde nicht beobachtet, die übrigen 20 Chromosomen waren frei von Aberrationen.

3.4.6 Uterines Choriokarzinom

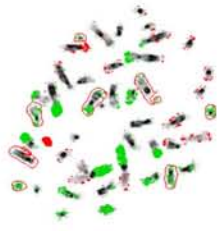
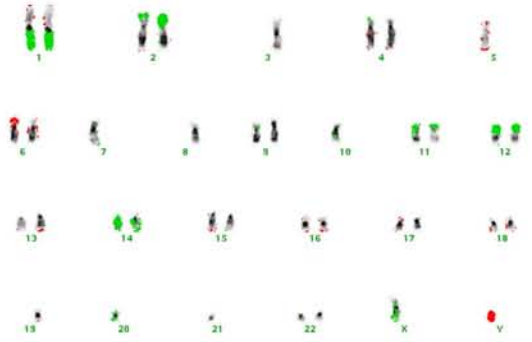
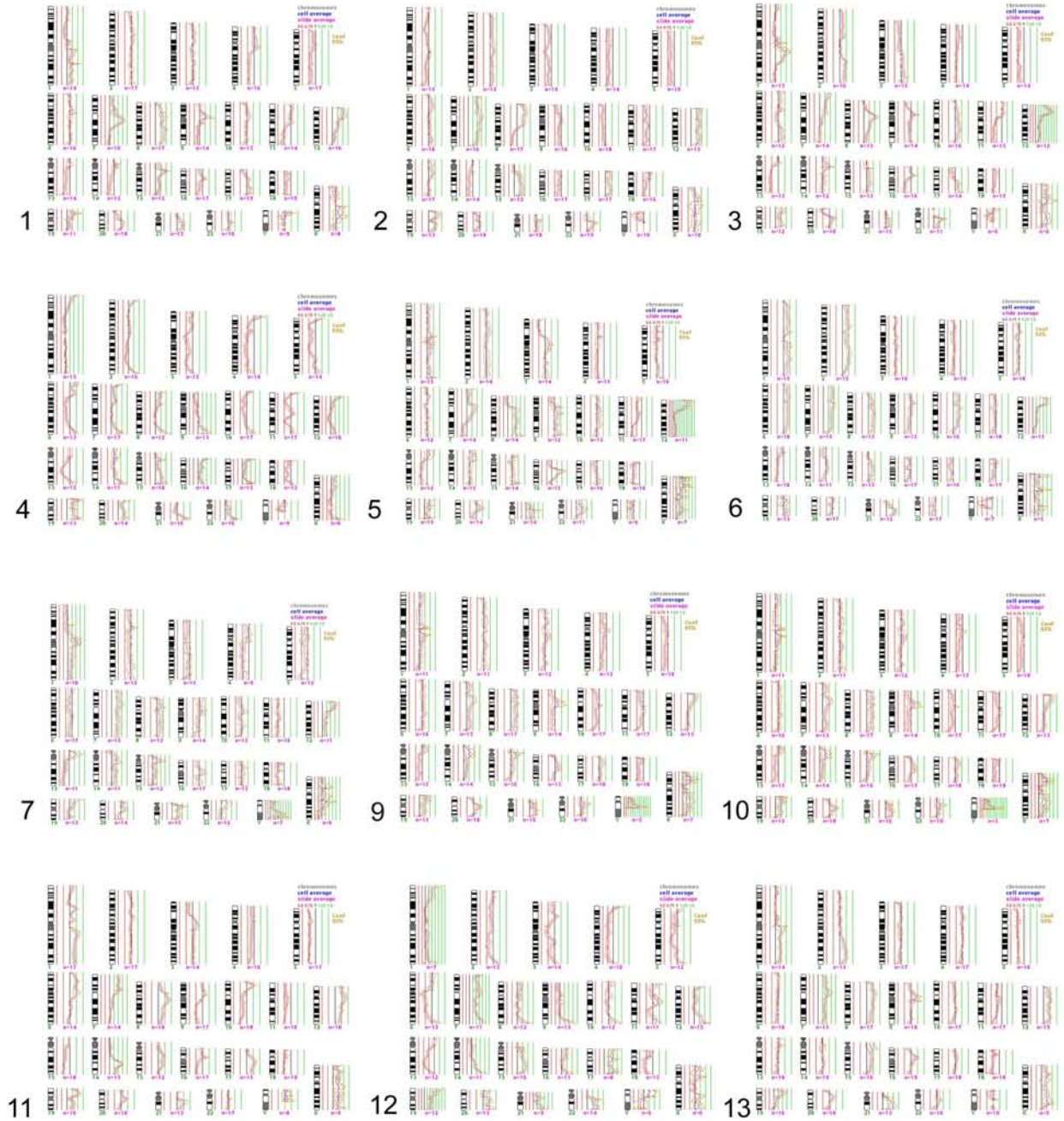
Das Choriokarzinom im Uterus zeigte drei Aberrationen, einen Zugewinn des Chromosoms 3 und einen Zugewinn auf dem Chromosom 2. Ein Verlust wurde auf Chromosom 18 festgestellt. Die übrigen 21 Chromosomen wiesen keine Aberrationen auf. (vgl. Tab.

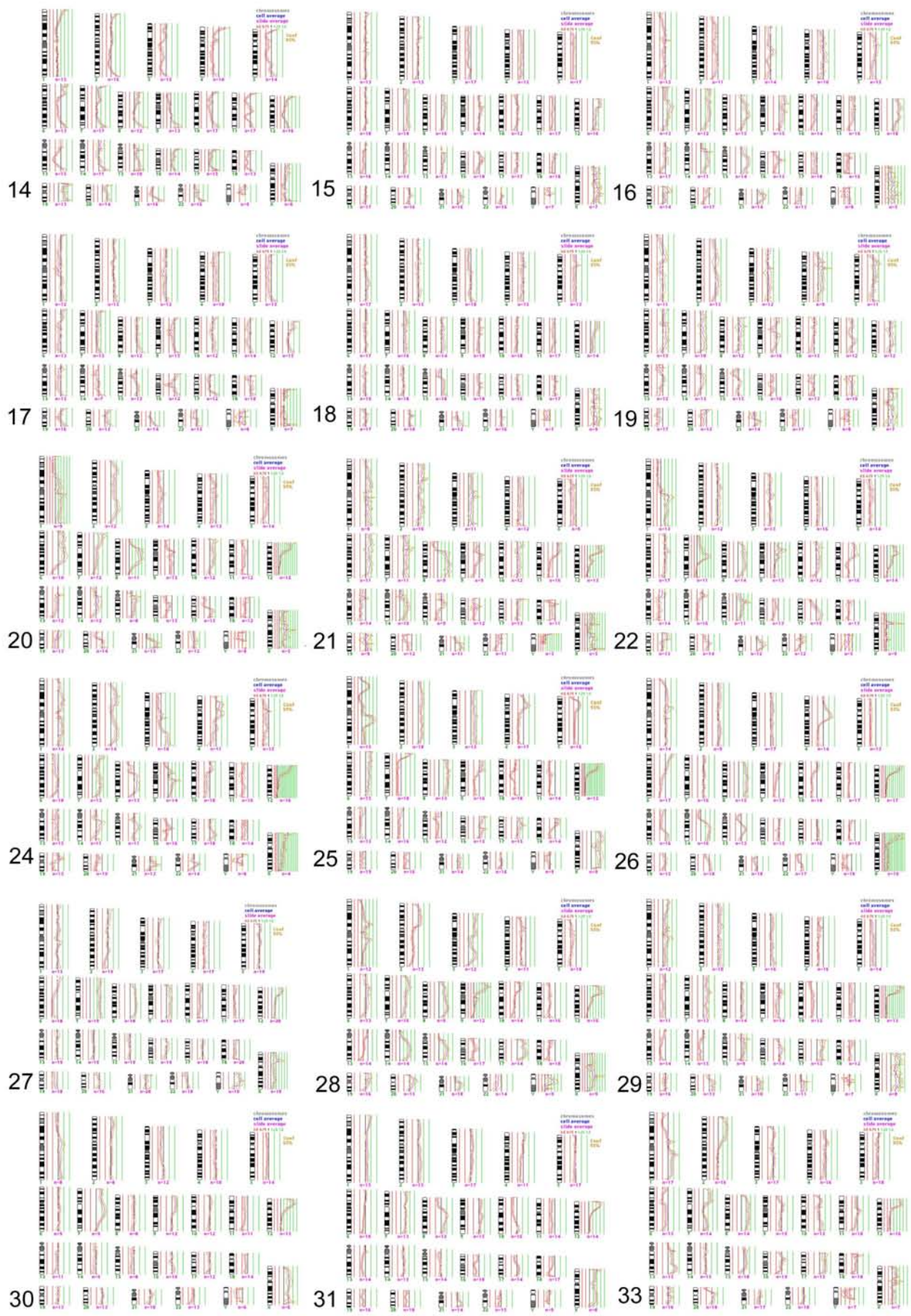
Tab.17: Chromosomale Aberrationen des uterinen Choriokarzinoms

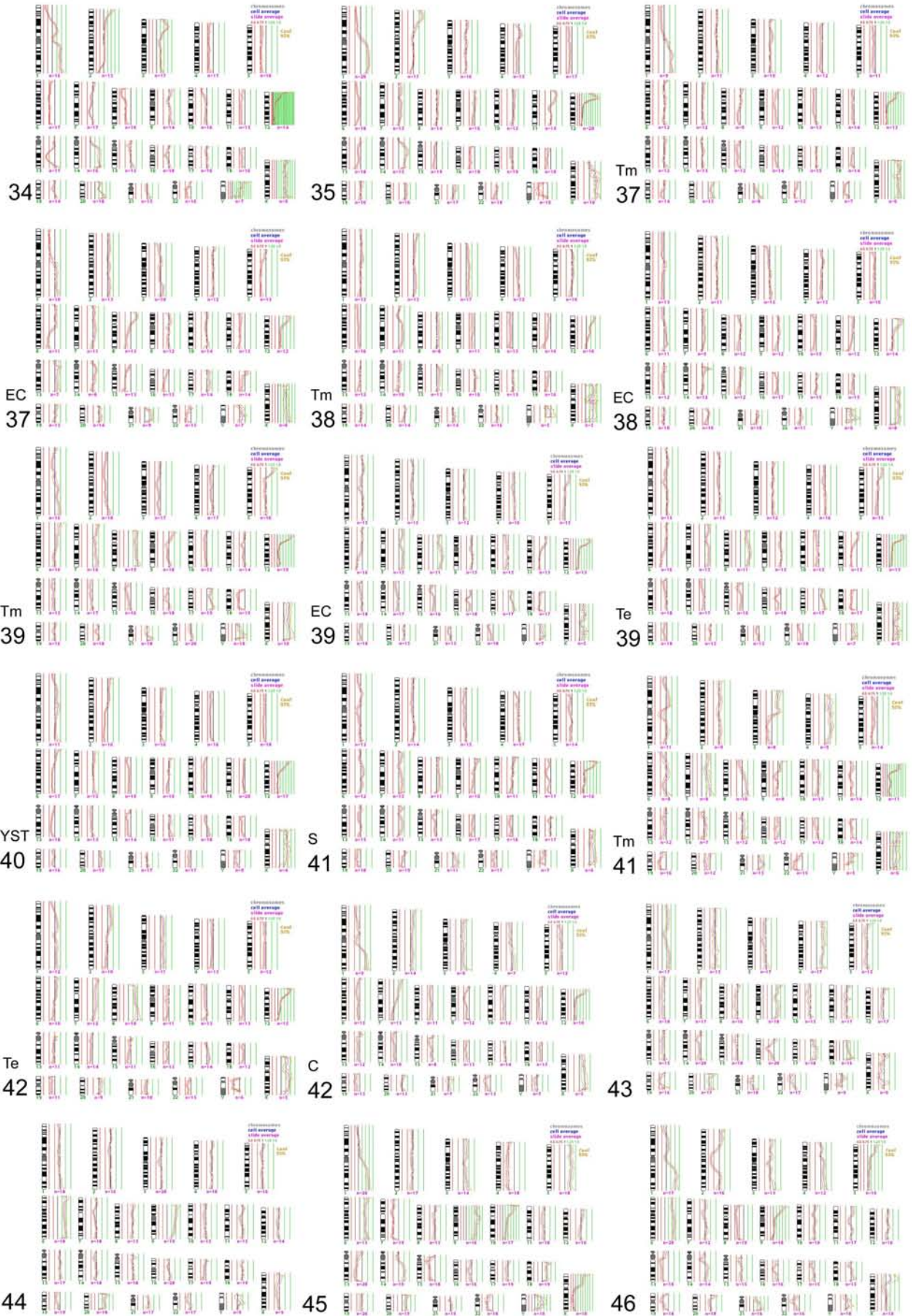
Fall	CGH-Ergebnis	Aberr.
49	2p+, 3p+, 3q+, 18q-	3

Anhang zu 3.4 Darstellung der ausgewerteten Idiogramme

- A) Ungeordnete Chromosomen eines Dottersacktumors (Fall 35) nach komparativer genomischer Hybridisierung
- B) Anordnung der Chromosomen eines Dottersacktumors (Fall 35) in ein Karyogramm
- C) Idiogramme der auswertbaren Keimzelltumoren

A**B****C**





3.5 Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit von der Tumorentität

Die Dottersacktumoren wiesen mit durchschnittlich 11,3 und die Embryonalen Karzinome mit durchschnittlich 10 die häufigsten Aberrationen auf.

Die Seminome zeigten mit durchschnittlich 8,4 und die Gemischten Keimzelltumoren mit 8 deutlich weniger Aberrationen.

Die spermatozytischen Seminome zeigten im Schnitt 5,7 Aberrationen pro Tumor.

Die Anzahl der Aberrationen der einzelnen Entitäten der Gemischten Tumoren lag zwischen sieben und eins (vgl. Tab. 19)

Tab.18: Durchschnittliche Häufigkeit chromosomaler Aberrationen der Keimzelltumoren

Tumorentität	Aberrationen/Tumor
Dottersacktumor	11,3 (8-18)
Embryonales Karzinom	10,0 (3-19)
Seminom	8,4 (1-17)
Gemischte Tumoren	8,0 (2-13)
Spermatozytisches Seminom	5,7 (2-12)
Gemischte Tumoren:	
Embryonaler Karzinom Anteil	7,7
Mesenchymaler Teratom Anteil	7
Epithelialer Teratom Anteil	5,5
Choriokarzinom Anteil	4
Seminom Anteil	1
Uterines Choriokarzinom	3

3.6 Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Seminomen (SE), Nichtseminomen (NS) und Spermatozytischen Seminomen (SpSE)

Im Gegensatz zu den spermatozytischen Seminomen waren bei den Seminomen und Nichtseminomen alle Chromosomen von Aberrationen betroffen.

Sowohl bei Seminomen als auch bei Nichtseminomen waren Zugewinne von Anteilen der Chromosomen 1q, 7 und 8 häufig. Im Vergleich zu den Nichtseminomen hatten die Seminome einen häufigeren Zugewinn an den Chromosomen 15q und 21q. Die Nichtseminome hatten im Vergleich zu den Seminomen einen häufigeren Zugewinn an den Chromosomen 3, 12p und X. Die Spermatozytischen Seminome wiesen dagegen einen häufigen Zugewinn von Anteilen der Chromosomen 6 und 9 auf.

Bei Seminomen und Nichtseminomen fiel ein gehäuftes Vorkommen von Verlusten an den Chromosomen 4, 5, 11 und 18 auf. Die Seminome hatten am Chromosom 13q häufiger Verluste als die Nichtseminome, die Nichtseminome hatten an den Chromosomen 6 und 10 häufiger Verluste als die Seminome. Die Spermatozytischen Seminome zeigten z.T. ganzchromosomale Verluste der Chromosome 13 und 22.

Bei Seminomen und Nichtseminomen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Lokalisation und Häufigkeit der Aberrationen feststellen. Seminome und Nichtseminome ließen im Vergleich zu den spermatozytischen Seminomen einen signifikanten Zugewinn auf den Chromosomen 7 (SE: $p < 0,025$; NS: $p < 0,05$), 8 ($p < 0,01$), 12p (SE: $p < 0,001$; NS: $p < 0,0001$) und X (NS: $p < 0,001$) erkennen.

Die spermatozytischen Seminome zeigten im Unterschied zu den Seminomen und Nichtseminomen einen signifikanten Zugewinn auf den Chromosomen 6 ($p < 0,1$) und 9 ($p < 0,001$). Seminome und Nichtseminome wiesen im Vergleich zu den spermatozytischen Seminomen einen signifikanten Verlust der Chromosomen 5 ($p < 0,1$), 6 (NS: $p < 0,1$), 10 (NS: $p < 0,1$), 11 (SE: $p < 0,025$; NS: $p < 0,05$) und 18 (SE: $p < 0,025$; NS: $p < 0,05$) auf (vgl. Tab. 20).

Tab. 19: Aberrationen der einzelnen Chromosomen (%) bei Seminomen, Nichtseminomen und spermatozytischen Seminomen

VERLUSTE [%]				GEWINNE [%]			
Chromosom	Seminome (n=21)	Nichtseminome (n=17)	Sperm. SE (n=6)	Chromosom	Seminome (n=21)	Nichtseminome (n=17)	Sperm. SE (n=6)
1p		11,8		1p		5,9	16,7
1q				1q	33,3	35,3	50,0
2p				2p	9,5	17,6	
2q		11,8	16,7	2q	19,0		
3p	14,3			3p		17,6	
3q	14,3	5,9		3q		17,6	
4p	28,6	23,5	16,7	4p		5,9	
4q	38,1	41,2	16,7	4q		11,8	
5p	28,6	23,5		5p	4,8	5,9	33,3
5q	33,3	35,3		5q	4,8		16,7
6p		11,8		6p	4,8	11,8	83,3
6q	9,5	29,4		6q	9,5	5,9	83,3
7p	9,5		16,7	7p	52,4	52,9	
7q	4,8	5,9	16,7	7q	47,6	41,2	
8p	4,8	5,9	16,7	8p	28,6	47,1	
8q	4,8	11,8	16,7	8q	52,4	52,9	
9p	4,8	5,9		9p	9,5		83,3
9q	4,8	17,6		9q	9,5		66,6
10p		23,5		10p			
10q	4,8	29,4		10q			
11p	28,6	35,3		11p		5,9	
11q	52,4	52,9		11q			
12p				12p	85,7	100	
12q				12q	57,1	52,9	
13p			33,3	13p			
13q	47,6	29,4	33,3	13q	4,8	5,9	
14p				14p			16,7
14q	4,8	5,9		14q	23,8	23,5	16,7
15p			16,7	15p			
15q	9,5	5,9	16,7	15q	38,1	11,8	
17p	9,5			17p	4,8	17,6	
17q	4,8			17q	14,3	23,5	16,7
18p	33,3	29,4		18p			33,3
18q	42,9	47,1		18q			33,3
20p	9,5			20p	9,5		50,0
20q	4,8			20q	9,5	5,9	50,0
21p			16,7	21p			16,7
21q			16,7	21q	61,9	17,6	16,7
22p			33,3	22p			
22q	4,8	17,6	33,3	22q	9,5		
Xp	4,8			Xp	3,8	94,1	16,7
Xq	4,8			Xq	38,1	94,1	
Yp		5,9		Yp	9,5	5,9	
Yq		17,6		Yq	4,8	23,5	

3.7 Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Embryonalen Karzinomen (EC) und Dottersacktumoren (YST)

Bei den Embryonalen Karzinomen wiesen die Chromosomen 20 und 22 und bei den Dottersacktumoren die Chromosomen 9, 15, 18 und 20 keine Aberrationen auf.

Die Embryonalen Karzinome zeigten häufig Zugewinne auf den Chromosomen 7, 8, 12 und X und die Dottersacktumoren auf den Chromosomen 1q, 2q, 12p, 14q und X.

Häufige Verluste waren bei den Embryonalen Karzinomen auf den Chromosomen 4q, 10q, 11, 13q und 18q und bei den Dottersacktumoren auf dem Chromosom 6p zu finden.

Die Embryonalen Karzinome hatten im Vergleich zu den Dottersacktumoren signifikant häufiger einen Zugewinn auf dem Chromosom 7q ($p < 0,01$).

Die Dottersacktumoren hatten einen signifikanten Zugewinn auf Chromosom 2p ($p < 0,01$).

Die Embryonalen Karzinome zeigten im Unterschied zu den Dottersacktumoren signifikant häufiger Verluste des Chromosoms 18q ($p < 0,05$). (vgl. Tab. 21)

Tab. 20: Aberrationen der einzelnen Chromosomen (%) bei Embryonalen Karzinomen (EC) und Dottersacktumoren (YST)

VERLUSTE [%]			GEWINNE [%]		
Chromosom	EC (n=8)	YST (n=3)	Chromosom	EC (n=8)	YST (n=3)
1p		33,3	1p		33,3
1q			1q	12,5	66,6
2p			2p		100,0
2q	12,5	33,3	2q		
3p			3p	12,5	33,3
3q			3q	25,0	33,3
4p	37,5	33,3	4p		
4q	75,0	33,3	4q	12,5	
5p	37,5	33,3	5p		
5q	37,5	33,3	5q		
6p		66,6	6p	12,5	
6q	25,0	33,3	6q		
7p			7p	75,0	33,3
7q	12,5		7q	62,5	
8p		33,3	8p	50,0	33,3
8q		33,3	8q	62,5	33,3
9p	12,5		9p		
9q	25,0		9q		
10p	37,5	33,3	10p		
10q	62,5		10q		
11p	50,0		11p		33,3
11q	50,0	33,3	11q		
12p			12p	100,0	100,0
12q			12q	50,0	33,3
13p			13p		
13q	50,0	33,3	13q		33,3
14p			14p		
14q	12,5		14q	25,0	66,6
15p			15p		
15q			15q	25,0	
17p			17p	25,0	33,3
17q			17q	25,0	33,3
18p	37,5		18p		
18q	75,0		18q		
20p			20p		
20q			20q		3,3
21p			21p		
21q			21q	12,5	
22p			22p		
22q		33,3	22q		
Xp			Xp	100,0	66,6
Xq			Xq	100,0	66,6
Yp		33,3	Yp		33,3
Yq	12,5	33,3	Yq	12,5	33,3

3.8 Spezifische Lokalisation von Aberrationen „reiner“ Keimzelltumoren und ihrer Anteile in Gemischten Keimzelltumoren

3.8.1 Seminome und seminomatöse Anteile Gemischter Keimzelltumoren

Unterschiede zwischen den „reinen“ Seminomen und dem seminomatösen Anteil eines gemischten Keimzelltumors waren nicht zu erkennen. Der eine auswertbare seminomatöse Anteil eines gemischten Keimzelltumors wies wie die „reinen“ Seminome einen Zugewinn auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 auf.

3.8.2 Embryonale Karzinome und embryonal-karzinomatöse Anteile Gemischter Keimzelltumoren

Signifikante Unterschiede zwischen Embryonalen Karzinomen und dem embryonal-karzinomatösen Anteil Gemischter Keimzelltumoren traten nicht auf. Gemeinsamkeiten waren Zugewinne von Anteilen der Chromosomen 8, 12, 17q und X und Verluste von Anteilen der Chromosomen 5q, 11, 18.

3.8.3 Dottersacktumore und dottersacktumoröse Anteile Gemischter Keimzelltumoren

Unterschiede zwischen den „reinen“ Dottersacktumoren und dem dottersacktumorösen Anteil eines gemischten Keimzelltumors waren nicht zu erkennen. Der eine dottersacktumoröse Anteil eines gemischten Keimzelltumors wies wie die „reinen“ Dottersacktumoren einen Zugewinn auf von Chromosom 12p und X auf.

3.9 Lokalisation chromosomaler Aberrationen und HERV-K Lokalisation bei testikulären Keimzelltumoren

Das humane endogene Retrovirus HERV-K, seine Transkripte und Genprodukte werden in Keimzelltumoren und deren Zelllinien (mit Ausnahme der Teratome und der spermatozytischen Seminome) regelmäßig nachgewiesen. Im Human Genome Browser vom April 2003 wird das Genom von HERV-K (HML-2) Typ 2 auf die Chromosomen 1p, 3, 5p, 6, 7p, 10, 11q, 12q, 19 und 22q lokalisiert. [13]

In der Tabelle 22 werden die Chromosomen, die in der vorliegenden Arbeit bei testikulären Keimzelltumoren Aberrationen gezeigt haben zu den HERV-K assoziierten Chromosomen in Beziehung gesetzt.

Es zeigt sich, dass von den zehn mit HERV-K assoziierten Chromosomen lediglich drei (7p, 11q, 12q) mehr als 50% Aberrationen aufweisen. Von 14 in der Literatur nicht mit HERV-K assoziierten Chromosomen zeigen sechs (7q, 8, 12p, 18, 21, X) in mehr als 50% chromosomale Aberrationen. Während alle Chromosomen testikulärer Keimzelltumoren in unterschiedlicher Häufigkeit Aberrationen aufweisen, lässt sich eine HERV-K Lokalisation auch nicht in annähernd gleicher Häufigkeit zeigen. Dies legt die Vermutung nahe, dass für die Karzinogenese testikulärer Keimzelltumoren neben endogenen Retroviren weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Tab. 21: HERV-K Lokalisation und chromosomale Aberrationen bei testikulären Keimzelltumoren

Chromosom	HERV-K Lokalisation	Chromosomale Aberrationen (%)	Chromosomale Aberrationen (%)
		SE (n=21)	NS (n=17)
1p	+	0	17,6
1q		33,3	35,3
2		19,0	23,5
3p	+	14,3	17,6
3q	+	14,3	23,5
4		38,1	47,1
5p	+	33,3	29,4
5q		38,1	35,3
6p	+	4,8	23,5
6q	+	19,0	35,3
7p	+	62,0	52,9
7q		52,4	47,1
8		67,0	71,0
9		23,8	23,5
10p	+	0	23,5
10q	+	4,8	29,4
11p		28,6	41,2
11q	+	52,4	52,9
12p		85,7	100,0
12q	+	57,1	52,9
13		47,6	35,3
14		28,6	29,4
15		47,6	17,6
17		23,8	23,5
18		57,1	47,1
20		23,8	5,9
21		61,9	17,6
22p		0	0
22q	+	14,3	17,6
X		47,6	94,1
Y		9,5	47,1

4. Diskussion

4.1 Untersuchte testikuläre Keimzelltumoren

Das Einsendematerial der testikulären Keimzelltumoren entsprach mit 48% Seminomen, 27% Nichtseminomen und 13% Gemischten Tumoren der in der Literatur angegebenen Verteilung mit 50%, 15-18% und 1-15%. Der im Vergleich zur Literatur höhere Anteil der Nichtseminome ist bei dem gepoolten Einsendematerial aus drei verschiedenen Instituten eher als zufällig anzusehen.

Die spermatozytischen Seminome entsprachen mit 13% in etwa ihrer üblichen Verteilung (1-25%) [4].

Die Diagnose wurde anhand von HE Schnitten gemäß den üblichen histologischen Kriterien gestellt und durch charakteristische immunhistochemische Färbungen bestätigt. Seminome zeigten typischerweise PLAP positive und Embryonale Karzinome CD 30 positive Zellen. Bei den Dottersacktumoren ließen sich AFP positive Zellen nachweisen und bei den Choriokarzinomen β -HCG positive Zellen.

Die Altersverteilung der Patienten entsprach dem zu erwartenden Muster. Das Alter der Patienten mit Seminomen lag im Schnitt bei 40 Jahren und das Alter der Patienten mit Nichtseminomen zwischen 20 und 30 Jahren. Die spermatozytischen Seminome traten mit einem Altersgipfel von 62 Jahren erwartungsgemäß in einem höheren Lebensalter auf.

Die Tumorstadien waren mehrheitlich T1. Eine Aussage über stadienabhängige Unterschiede der einzelnen Gewebeproben lässt sich deshalb nicht treffen. Angaben über den klinischen Verlauf der einzelnen Patienten lagen nicht vor, so dass zur prognostischen Bedeutung der ermittelten Daten nicht Stellung genommen werden kann.

4.2 Anzahl der chromosomalen Aberrationen

Mit Hilfe der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) konnte in der vorliegenden Untersuchung an Seminomen, Nichtseminomen und spermatozytischen Seminomen gezeigt werden, dass die Anzahl der chromosomalen Aberrationen bei den Nichtseminomen mit durchschnittlich 9,5 höher lag als bei den Seminomen mit 8,4 und den spermatozytischen Seminomen mit 5,7.

Die ermittelten Aberrationsraten sind mit denen von Summersgill et al. vergleichbar, die mit Hilfe der CGH-Analyse von 8 Seminomen und 12 Nichtseminomen bei den Nichtseminomen 11,5 Aberrationen/Tumor und bei den Seminomen 9,0 Aberrationen /Tumor fanden [31]. Die etwas höheren Werte in der Arbeit von Summersgill et al. sind möglicherweise durch die unterschiedlichen Schwellenwertdefinitionen (Zugewinn: Fluoreszenz-Ratio > 1,2; Verlust: Fluoreszenz-Ratio < 0,8; vgl. 2.5.6) erklärbar.

Rosenberg et al. sahen bei ihrer CGH-Analyse von drei spermatocytyischen Seminomen mit 5,75 ebenfalls eine deutlich geringere Häufung von chromosomalen Aberrationen [26]. Nichtseminome haben unter den Keimzelltumoren eine deutlich ungünstigere Prognose als Seminome und spermatocytyische Seminome. Letztere werden klinisch in einem deutlich höheren Alter (65 Jahre vs. 30-40 Jahre bei Seminomen) manifest und metastasieren nie.

Diese Beobachtung stützt die These, dass die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen als Malignitätskriterium gelten kann.

4.3 Lokalisation chromosomaler Aberrationen

4.3.1 Seminome

In mehr als 30% wiesen die Chromosomen 4, 5, 11, 13q und 18 einen Verlust, die Chromosomen 1q, 7, 8, 12, 15q, 21q und X einen Zugewinn auf. Diese Chromosomen waren gleichermaßen bei klassischen Seminomen, anaplastischen Seminomen und Seminomen mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen betroffen. Der annähernd gleiche klinische Verlauf und die Prognose dieser Tumorentitäten scheinen trotz unterschiedlicher Morphologie auf gemeinsame Veränderungen des Genoms zurückzuführen zu sein.

Ein Verlust der Chromosomen 4, 5, 11, 13q und 18q und einen Zugewinn der Chromosomen 1q, 7, 8, 12, 14q, 15q, 21 und 22q wurde an einem kleineren Kollektiv mit 16 Fällen von Ottesen et al. bereits 1997 beschrieben [25]. In der vorliegenden Arbeit konnten an einem größeren Kollektiv die für Seminome typischen chromosomalen Veränderungen bestätigt werden. Dies zeigt, dass es sich dabei nicht um zufällig auftretende chromosomale Aberrationen handelt.

4.3.2 Spermatozytische Seminome

Bisher wurden nur sehr wenige spermatozytische Seminome zytogenetisch untersucht. Die spermatozytischen Seminome wiesen signifikante Zugewinne auf den Chromosomen 6 und 9 auf. Interessanterweise zeigten diese beiden Chromosomen bei testikulären Seminomen und Nichtseminomen eher Verluste. Verluste bei spermatozytischen Seminomen traten sporadisch auf.

Es hat sich gezeigt, dass die Chromosomen mit einem Zugewinn in keinem Fall Verluste aufwiesen und umgekehrt ließ sich bei Chromosomen mit Verlusten in keinem Fall ein Zugewinn nachweisen. Dies spricht dafür, dass Verluste und Gewinne der Chromosomen spermatozytischer Seminome in einem bestimmten Muster auftreten.

Die Chromosomen 10, 11, 12 und Y, die bei Seminomen und Nichtseminomen häufig betroffen sind, zeigten bei spermatozytischen Seminomen keine strukturellen Veränderungen. Diese Ergebnisse bestätigen erste Untersuchungen von Rosenberg et al., die bei einer CGH-Analyse von drei spermatozytischen Seminomen einen signifikanten Zugewinn auf dem Chromosom 9 in allen Fällen und einen Zugewinn auf dem Chromosom 6 in einem der drei Fälle zeigten. Verluste traten sporadisch auf. Die Chromosomen 10, 11, 12 und Y wurden auch von diesen Autoren als unauffällig beschrieben [26].

Die Konstanz der Ergebnisse und das von Seminomen und Nichtseminomen unterschiedliche Muster chromosomaler Aberrationen unterstreichen die biologische Besonderheit dieser Tumoren als eine eigene Entität innerhalb der Keimzelltumoren.

4.3.2 Embryonale Karzinome

Die acht auswertbaren Embryonalen Karzinome als nichtseminomatöse Keimzelltumoren einheitlicher Bauart wiesen am häufigsten Verluste auf den Chromosomen 4, 5, 10, 11, 13q und 18 und Zugewinne auf den Chromosomen 7, 8, 12 und X auf. In der Literatur werden Embryonale Karzinome in der Gruppe der nichtseminomatösen Keimzelltumoren oft nicht gesondert ausgewiesen. Die Auswertung erfolgt pauschal mit anderen Ausprägungen nichtseminomatöser Keimzelltumoren. Dies erlaubt nur in Grenzen einen Vergleich. Allerdings konnten Korn et al. bei zwei reinen Embryonalen Karzinomen ein ähnliches Verteilungsmuster chromosomaler Aberrationen zeigen [18].

4.3.3 Dottersacktumoren

Die drei Dottersacktumoren als weiteren nichtseminomatösen Keimzelltumoren einheitlicher Bauart wiesen elf Chromosomen mit Verlusten auf, am häufigsten Chromosom 6p. Dreizehn Chromosomen hatten einen Zugewinn, sie waren am häufigsten auf den Chromosomen 1q, 12p 14q und X, auf.

Korn et al. beschrieben einen Fall eines reinen Dottersacktumors mit Hilfe der CGH [18]. Sie fanden Verluste an acht Chromosomen und Zugewinne an fünf Chromosomen. Die in der vorliegenden Arbeit am häufigsten auftretenden Verluste an Chromosom 6 und Zugewinne an den Chromosomen 1q, 12p 14q und X wurden auch in dieser Arbeit genannt. Trotz der geringen Fallzahl lässt sich erkennen, dass die vorliegenden Chromosomenaberrationen keine Zufallsbefunde sind.

4.3.4 Gemischte Keimzelltumoren

Die sechs Gemischten Keimzelltumoren wiesen am häufigsten Verluste auf den Chromosomen 5q, 6q, 11, 18 und 22q sowie Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7, 8, 12, 21q, X und Yq auf.

Loojienga et al. beschrieben einen Fall eines Gemischten Keimzelltumors, der an je vierzehn Chromosomen Verluste und Zugewinne aufwies. Die in der vorliegenden Arbeit am häufigsten auftretenden Verluste an den Chromosomen 5q, 6q, 11, 18 und 22q sowie Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7, 8, 12, 21q, X und Yq werden auch von Loojienga et al. genannt [20].

Korn et al. fanden in der CGH-Analyse zweier gemischter Keimzelltumoren ähnliche chromosomale Aberrationen in Form eines Verlustes der Chromosomen 5q, 6q und Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7, 8, 12, 21q und X. Einen Verlust an den Chromosomen 11, 18 und 22q, bzw. ein Zugewinn auf dem Chromosom Y wurden von dieser Autorengruppe nicht nachgewiesen [18].

Die Unterschiede der chromosomalen Aberrationen lassen sich mit der geringen Fallzahl oder der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gemischten Tumoren erklären. Loojienga et al. untersuchten einen Gemischten Tumor mit vier verschiedenen Anteilen: Embryonales Karzinom, Dottersacktumor und Teratome mit epithelialen und mesenchymalen Komponenten. Bei Korn et al. setzte sich der eine Fall aus Anteilen eines Seminoms und

Embryonalen Karzinoms, der andere aus Anteilen eines unreifen Teratoms und Embryonalen Karzinoms zusammen.

Die **Analyse der Aberrationen der einzelnen histologischen Komponenten** innerhalb der Gemischten Keimzelltumoren ergab bei seminomatösen Anteilen und „reinen“ Seminomen, bei embryonal-karzinomatösen Anteilen und „reinen“ Embryonalen Karzinomen und bei Dottersacktumörösen Anteilen und „reinen“ Dottersacktumoren jeweils eine identische Verteilung der betroffenen Chromosomen.

Analysiert man in der Arbeit von Korn et al. die chromosomalen Aberrationen der beiden Gemischten Tumoren, der fünf reinen Seminome und der zwei reinen Embryonalen Karzinome, so entspricht auch hier das Muster der Aberrationen der seminomatösen Anteile der Gemischten Tumoren dem der reinen Seminome und das der embryonal-karzinomatösen Anteile dem der reinen Embryonalen Karzinome [18]. Dies belegt, dass der identischen Morphologie identische chromosomale Aberrationen zugrunde liegen.

Die vier **mesenchymalen Teratomanteile** Gemischter Tumoren, die ausschließlich **aus chondromatösem Gewebe** bestanden, zeigten einen Zugewinn der Chromosome 1q, 8q, 12, 21q und X. Verluste waren auf den Chromosomen 11q, 18 und 22q zu erkennen.

Diese chromosomalen Veränderungen sind vergleichbar mit denen, die die Arbeitsgruppe von Loojienga et al. in einem chondromatösen Anteil eines Gemischten Tumors gefunden haben mit einem Zugewinn der Chromosome 1, 8p, 12, 21q und X und einem Verlust auf den Chromosomen 11 und 18q[20].

Ein Vergleich der CGH-Ergebnisse der chondromatösen Teratomanteile mit denen einer Studie von 50 Chondrosarkomen zeigt durchschnittlich 4,8 (3-7) Aberrationen pro Tumor bei Chondrosarkomen und 7 (3-12) Aberrationen pro Tumor bei chondromatösen Anteilen in mesenchymalen Teratomen. Die Aberrationen bei Chondrosarkomen zeigen mit einem Zugewinn der Chromosomen 8q, 14q und 20q und mit Verlusten 6q, 18q und Xq deutliche Unterschiede [19]. Dies mag bei ähnlicher Morphologie das unterschiedliche biologische Verhalten der aggressiveren Chondrosarkome erklären.

Ein Gemischter Keimzelltumor hatte einen **choriokarzinomatösen Anteil**. Dieser zeigte Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 7, 12p und X. Verluste wurden nicht nachgewiesen.

Das **uterine Choriokarzinom** wies Zugewinne auf den Chromosomen 2p und 3 auf. Verluste waren auf dem Chromosom 18q zu beobachten.

Ahmed et al. fanden mit Hilfe der CGH-Analyse bei zwölf Choriokarzinomen Zugewinne auf dem Chromosom 7q und Verluste auf dem Chromosom 8p [1]. Bei dem seltenen Befund eines choriokarzinomatösen Anteils eines rektalen Adenokarzinoms beschrieben Verbeek et al. Zugewinne auf den Chromosomen 5p und 20q und Verluste auf den Chromosomen 8p, 18q und Xp [33].

Diese Aberrationsmuster erscheinen so heterogen wie das Vorkommen choriokarzinomatöser Anteile in verschiedenen malignen Geweben beider Geschlechter.

Es ist hervorzuheben, dass sich der für testikuläre Keimzelltumoren typische Zugewinn auf Chromosom 12p ausschließlich in dem choriokarzinomatösen Anteil des Gemischten Keimzelltumors gefunden hat.

4.3.5 Spezifische Lokalisationen der Aberrationen von Seminomen (SE), Nichtseminomen (NS) und Spermatozytischen Seminomen (SpSE)

Seminome und Nichtseminome wiesen analoge Zugewinne der Chromosomen 1q, 7 und 8 auf. Bei den Nichtseminomen waren zusätzlich die Chromosomen 15q und 21q und bei den Seminomen die Chromosomen 3, 12p und X häufiger betroffen. Im Unterschied dazu beschränkten sich bei spermatozytischen Seminomen die Zugewinne im wesentlichen auf die Chromosomen 6 und 9.

Seminome und Nichtseminome hatten gehäufte Verluste an den Chromosomen 4, 5, 11 und 18. Seminome zusätzlich am Chromosom 13 und Nichtseminome an den Chromosomen 6 und 10. Spermatozytische Seminome wiesen im wesentlichen Verluste auf den Chromosomen 13 und 22 auf.

Aus den Daten lassen sich hinsichtlich der chromosomalen Aberrationen keine Unterschiede zwischen Seminomen und Nichtseminomen nachweisen. Das Muster chromosomaler Aberrationen spermatozytischer Seminome unterscheidet sich signifikant von dem der Seminome und Nichtseminome.

Mostert et al. gaben für Seminome und Nichtseminome einen Zugewinn der Chromosomen 7, 8, 12 und X und einen Verlust der Chromosomen 4, 18 und 13q an [23]. Die Autoren können ebenfalls keinen Unterschied zwischen beiden Tumorarten aufzeigen. Spermatozytische Seminome haben sie nicht analysiert. Rosenberg et al. beschrieben bei den drei von ihnen

untersuchten spermatozytischen Seminomen ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit einen Zugewinn auf Chromosom 9 als wesentliches Merkmal; ein Zugewinn auf Chromosom 6 wurde in einem von drei Fällen beobachtet. Verluste sahen sie auf den Chromosomen 13, 15 und 22 in zwei von drei Fällen [26].

Die bisher beobachteten Unterschiede chromosomaler Aberrationen zwischen Seminomen und Nichtseminomen einerseits und spermatozytischen Seminomen andererseits wurden von den genannten Arbeitsgruppen in der Vergangenheit separat erarbeitet. Dies lässt die Möglichkeit offen, dass Unterschiede in der Methode zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen mit einem methodischen Ansatz und einheitlichen Schwellenwerten die Differenzen der unterschiedlichen Entitäten herauszuarbeiten und zu bestätigen.

4.4 Lokalisation chromosomaler Aberrationen und HERV-K Lokalisation bei testikulären Keimzelltumoren

Die in dieser Arbeit untersuchten testikulären Keimzelltumoren zeigten Aberrationen an allen Chromosomen in unterschiedlicher Häufigkeit. Nach Angaben der Literatur ist HERV-K nur auf zehn Chromosomen in Form von Proviren vorhanden, die in unterschiedlichem Ausmaß zur Expression gelangen können [21] (Vgl. Abb. 11).

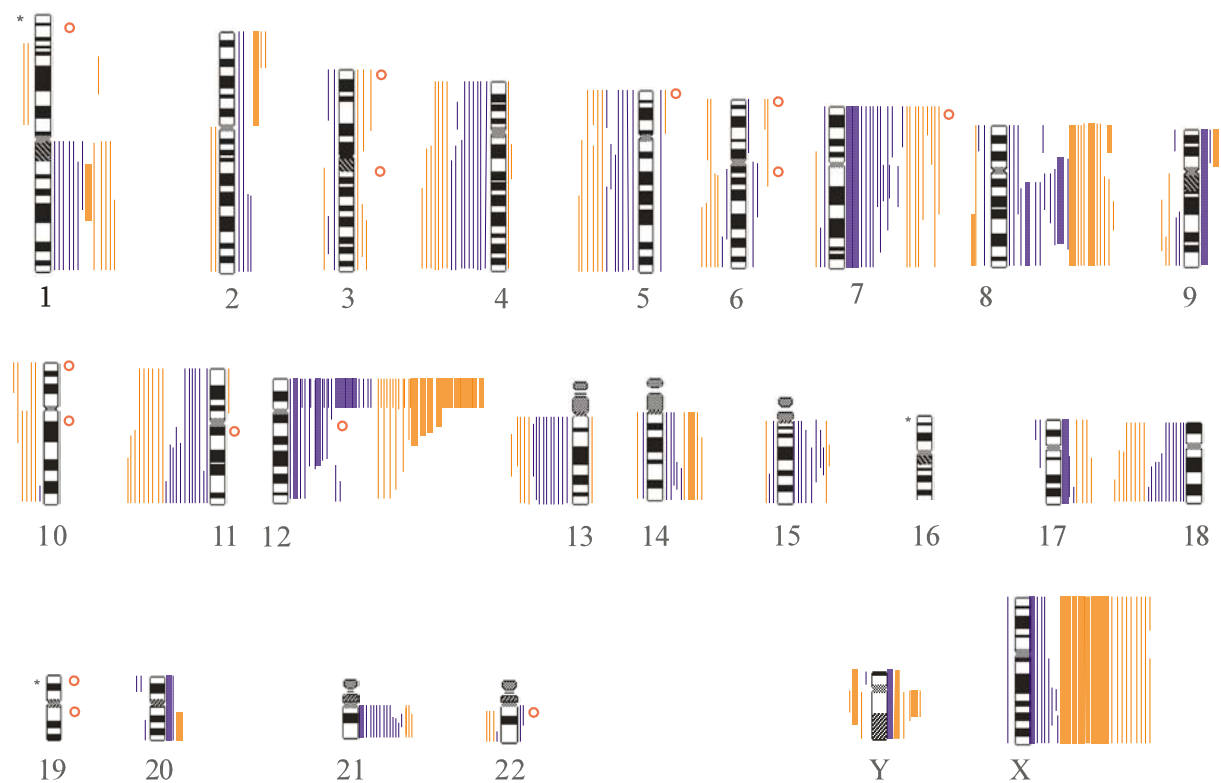


Abb. 11: Summenkaryogramm der Seminome und Nichtseminome und der HERV-K Lokalisation.

Die mit ^ogekennzeichneten Bereiche zeigen die HERV-K Lokalisation testikulärer Keimzelltumoren.

Zugewinne chromosomalen Materials sind als Strich rechts, Verluste links neben den Idiogrammen der Chromosomen dargestellt. Blaue Striche kennzeichnen Seminome, orangene Striche Nichtseminome.

(Die mit * gekennzeichneten Bereiche [1p32-pter und die Chromosomen 16 und 19] wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dicke Striche illustrieren eine Fluoreszenz-Ratio>1,5)

Bei einem Vergleich der Chromosomen mit häufigen Aberrationen und den HERV-K-assoziierten Chromosomen zeigt sich, dass das Genom testikulärer Keimzelltumoren lediglich bei drei (7p, 11q, 12q) der zehn mit HERV-K Proviren belegten Chromosomen in mehr als 50% aller Fälle Aberrationen aufweist. Von 14 in der Literatur nicht mit HERV-K assoziierten Chromosomen zeigten sechs (7q, 8, 12p, 18, 21, X) in mehr als 50% aller Fälle

chromosomale Aberrationen. Eine Korrelation zwischen HERV-K Proviren tragenden Chromosomen und einer bestimmten Art der Chromosomenveränderung, Verlust oder Zugewinn, konnte nicht nachgewiesen werden.

Von den HERV-K Proviren tragenden Chromosomen weisen einige zahlreiche, andere geringe strukturelle Veränderungen auf. Dies kann ein Hinweis sein, dass die HERV-K Proviren unterschiedliche transkriptionelle Aktivität aufweisen oder die Proviren verschiedener Chromosomen und ihre für das Tumorwachstum mutmaßlich relevanten Genprodukte zueinander komplementär sind. Weisen HERV-K-positive Chromosomen Verluste auf, so ist denkbar, dass die transkriptionsaktiven HERV-K Proviren verlorengegangen oder inaktiviert worden sind. Bei HERV-K negativen Chromosomen mit einem Zugewinn ist zu vermuten, dass hier von HERV-K unterschiedliche Gene von Bedeutung und für die Rekurrenz dieser Veränderungen verantwortlich sind. Die in testikulären Keimzelltumoren zu beobachtende Expression von HERV-K setzt auf jeden Fall nicht zwingend strukturelle Veränderungen, wie Amplifikationen oder Deletionen, voraus.

Dies steht im Gegensatz zu anderen Onkogenen, bei denen eine Genamplifikation obligat für die Überexpression verantwortlich ist. So findet sich bei Mamma- und Ovarialkarzinomen eine Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors *Her-2/neu* in Folge einer Genamplifikation. In Kenntnis dieser Zusammenhänge und mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen *Her-2/neu* konnte ein neues Prinzip in die Therapie des Mammakarzinoms eingeführt werden [29,30,34].

Bei testikulären Keimzelltumoren ist die Expression von HERV-K Proviren in Seminomen und Nichtseminomen evident. Die geringe Korrelation der HERV-K Expression mit chromosomalen Aberrationen legt nahe, dass neben strukturellen auch funktionelle, regulatorische Aspekte berücksichtigt werden müssen. Hinsichtlich der *rec* Sequenzen, die für die Karzinogenese wichtig sind, spielt möglicherweise ein Komplementationsmechanismus eine Rolle: Sollte das Provirus auf dem einen Chromosom fehlen, hat dies keine Konsequenz, da es noch auf anderen Chromosomen aktiv ist.

Auch andere, zukünftig noch zu gewinnende Sequenzen aus weiteren Abschnitten (*gag*, *env*, u.a.), die eine eindeutige Zuordnung zum Provirus erlauben, sollten mit den CGH-Daten verglichen werden.

Aus einem noch zu entwickelnden Verständnis der Regulation der HERV-K-Genexpression können therapeutische Ansätze zur Prävention und zur Therapie von Keimzelltumoren erwachsen.

5. Zusammenfassung

Testikuläre Keimzelltumoren (TKZT) sind die häufigste Krebserkrankung junger Männer. In dieser Altersgruppe sind maligne Erkrankungen oft mit onkogenen Viren assoziiert. Genprodukte endogener Retroviren der Familie HERV-K konnten in TKZT regelmäßig nachgewiesen werden. Ihr Bezug zu chromosomalen Aberrationen ist unklar.

Es wurden 21 Seminome, 19 Nichtseminome und 6 Spermatozytische Seminome mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert. Diese zytogenetische Methode erlaubt auch an Archivmaterial relative Gewinne und Verluste des Genoms zu identifizieren, die durch Amplifikation, Deletion oder unbalancierte Translokation verursacht werden.

Die durchschnittliche Anzahl der Aberrationen war vom histologischen Typ abhängig. So wiesen nichtseminomatöse Tumoren durchschnittlich 9,5, Seminome 8,4 und spermatozytische Seminome 5,7 Aberrationen pro Fall auf.

Seminome und nichtseminomatöse Tumoren zeigten ähnliche, charakteristische Aberrationen: Zugewinne auf den Chromosomen 7, 8, 12 und X sowie Verluste auf den Chromosomen 4, 5, 11, 13q und 18. Spermatozytische Seminome waren durch spezifische chromosomale Veränderungen in Form von Zugewinnen auf den Chromosomen 6 und 9 charakterisiert und unterstrichen damit ihre Abgrenzung zu den klassischen Seminomen als eigene Entität.

Die Analyse der Gemischten Keimzelltumoren zeigte identische chromosomale Aberrationen innerhalb der einzelnen histologischen Kompartimente.

Ein Vergleich der durch CGH analysierten chromosomalen Aberrationen mit den Chromosomen, auf denen HERV-K Proviren integriert sind, zeigte keine schlüssige Korrelation. Chromosomale Aberrationen von mehr als 50% wurden bei den HERV-K Proviren tragenden Chromosomen bzw. chromosomalen Armen 7p, 11q und 12q ebenso entdeckt wie bei den HERV-K negativen Chromosomen 7q, 8, 12p, 18, 21 und X. Dies kann als Hinweis darauf gelten, dass die in TKZT zu beobachtende Expression von HERV-K nicht zwingend strukturelle Veränderungen voraussetzen oder zur Folge hat und dass für die Karzinogenese testikulärer Keimzelltumoren neben endogenen Retroviren weitere Faktoren in Betracht kommen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed MN, Kim K, Haddad B, Berchuck A, Qumisyeh M B (2000): Comparative genomic hybridization studies in hydatidiform moles and choriocarcinoma: amplification of 7q21-q31 and loss of 8p12-p21 in choriocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **116** (1): 103-5
2. Armbruster V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, and Mueller-Lantzsch N (2002): A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clinical Cancer Research*, **Vol.8**: 1800-1807
3. Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, Zatonski W et al. (1996): Increase in testicular cancer incidence in 6 European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* **88**:727-733
4. Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2004): Pathologie Lehrbuch; 3. Auflage
5. Boese A, Sauter M, Galli U, Best B, Herbst H, Mayer J, Kremmer E, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2000): Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with promyelocytic leukaemia zinc finger protein. *Oncogene* **19**:4328-4336
6. Bronson DL, Fraley EE, Fogh J, Kalter SS (1979): Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera 1) cell cultures: an electron microscopic study. *J Natl. Cancer Inst* **63**: 337-339
7. Collins DH, Pugh RCB (1964): Pathology of testicular tumours. Livingstone, Edinburgh, London
8. du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR; Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19**:27-41
9. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Nicaud RM, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet.* **90**: 590-610
10. Gallagher RP, Huchcroft S, Phillips N, Hill GB, Coldman AJ, Coppin C, Lee T (1995): Physical activity, medical history and risk of testicular cancer (Alberta and British Columbia, Canada). *Cancer Cause Control* **6**:398-406
11. Galli UM, Sauter M, Lecher B., Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2005): Human endogenous retrovirus *rec* interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors

12. Heinzer H, Diekmann KP & Huland H(1993). Virus-related serology and in situ hybridization for the detection of virus DNA among patients with testicular cancer. *European Urology* **24**: 271-276
13. Herbst H, Sauter M, and Mueller-Lantzsch N (1996): Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol*, **149**(5):1727-1735
14. Herbst H, Kühler-Obbarius C, Lauke H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Harms D, Löning T (1999): Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours. *Virchows Arch* **434**:11-15
15. Herbst H, Sauter M, Boese A, Galli U, Best B, Mayer J, Kaevel J, Kremmer E, Roemer K, Mueller-Lantzsch N (2001): Molecular pathogenesis of germ cell tumors: the human endogenous retroviral protein p15cORF has transforming potential and binds to the promyelocytic leukaemia zinc finger protein. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **85**: 279-285
16. Kallioniemi AH, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldmann FM, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**:818-821
17. Kallioniemi OP, Kallioniemi AH, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* **10**:231-243
18. Korn WM, Olde Weghuis DEM, Suijkerbuijk RF, Schmidt U, Otto T, du Manoir S, van Kessel AG, Harstrick A, Seeber S, and Becher R(1996): Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **17**:78-87
19. Larramendy ML, Mandahl N, Mertens F, Blomqvist C, Kivioja AH, Karaharju E, Valle J, Bohling T, Tarkkanen M, Rydholm A, Akerman M, Bauer HC, Anttila J P, Elomaa I, Knuutila S(1999): Clinical significance of genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Hum Pathol* **130** (10):1247-53
20. Looijenga LHJ, Rosenberg C, Ruud JH, van Gurp LM, Geelen E, van Echten-Arends J, de Jong B, Mostert M and Oosterhuis JW(2000): Comparative genomic hybridization of microdissected samples from different stages in the development of a seminoma and a non-seminoma. *J Pathol* **191**:187-192

21. Mayer J, Ehlhardt S, Seifert M, Saute M, Muller-Lantzsch N, Mehraein Y, Zang K-D, Meese E (2004): Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity
22. Moller H (1993): Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology; *Eur Urol* **23** (1):8-13; discussion 14-15
23. Mostert MMC, van de Pol M, Olde Weghuis D, Suijkerbuijk RF, Geurts van Kessel A, van Echten J, Oosterhuis JW, and Looijenga LHJ (1996): Comparative genomic hybridization of germ cell tumors of the adult testis: confirmation of karyotypic findings and identification of a 12p-amplicon. *Cancer Genet Cytogenet* **89**:146-152
24. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H (1986): Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* **60**:589-598
25. Ottesen AM, Kirchhoff M, De-Meyts ER, Maahr J, Gerdes T, Rose H, Lundsteen C, Petersen PM, Philip J, and Skakkebaek NE (1997): Detection of chromosomal aberrations in seminomatous germ cell tumours using comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **20**:412-418
26. Rosenberg C, Mostert MC, Bakker Schut T, van de Pol M, van Echten J, de Jong B, Raap AK, Tanke H, Oosterhuis JW, and Loijenga LHJ(1998): Chromosomal constitution of human spermatocytic seminomas: comparative genomic hybridization supported by conventional and interphase cytogenetics. *Genes Chrom Cancer* **23**:286-291
27. Sauter M, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dölken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haefelin D, Mueller-Lantzsch N(1995): Human endogenous retrovirus HERV-K: expression of gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* **69**: 414-421
28. Sauter M, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantzsch N (1996): Specificity of antibodies directed against Env proteins of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res* **56**:4362-4365
29. Slamon DJ; Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244** (4905): 707-712
30. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton LA (2001): Use of

chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Engl J Med* **344**:783-792

31. Summersgill B, Goker H, Weber-Hall S, Huddart R, Horwich A, and Shipley J (1998): Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. *Br J Cancer* **77**(2):305-313
32. Trendell-Smith N-J, Agathangelou A, Herbst H, Collins MP, Rooney N, Niedobietek G (1995): Absence of Epstein–Barr-virus in testicular germ cell tumours: a study of 21 cases using in situ hybridisation. *J Clin Pathol Mol Pathol* **48**: M109-110
33. Verbeek W, Schulten HJ, Sperling M, Tiesmeier J, Stoop H, Dinjens W, Looijenga L, Wormann B, Fuzesi L, Donhuijsen K (2004): Restal adenocarcinoma with choriocarcinomatous differentiation: clinical and genetic aspects. *Hum Pathol* **35** (11):1427-1430
34. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M (2002): Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **20**:719-726
35. Weiss MM, Hermsen MAJA, Meijer GA, van Grieken NCT, Baak JPA, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol Mol Pathol* **52**:243-251
36. Westergard T, Olen JH, Frisch M, Kronman N, Neilsen JW, Melbye M (1996): Cancer risk in fathers and brothers of testicular cancer patients in Denmark: a population-based study. *Int J Cancer* **66**:627-631
37. World Health Organization (WHO) (1998): International Histological Classification of Tumours: Histological Typing of Testis Tumours. 2nd ed. Mostofi FK, Sesterhenn IA (eds); Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo

6. Danksagung

Den Herren Prof. Dr. W. Böcker, Prof. Dr. U. Helmchen und Prof. Dr. V. Loy möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Tumorgewebe aus den Archiven des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie der Universität Münster und des Institutes für Pathologie der Universität Hamburg und des Institutes für Pathologie des Vivantes Klinikums Am Urban Berlin bedanken.

Herrn Dr. H. Bürger sei gedankt für die vielseitige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung der CGH-Ergebnisse.

Frau Gabi Krull und Frau Ulrike Neubert sei Dank gesagt für die unermüdliche Hilfe im Labor und den Spaß bei der Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer, Prof. Dr. med. H. Herbst für die kompetente Unterstützung, Förderung und stete Gesprächsbereitschaft.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Anna Katharina Kleine
Geburtsdatum:	28.07.1979
Geburtsort:	Freiburg i.Brsg.
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Prof. Dr. med. Werner Kleine, Dr. rer. nat. Brigitte Weidner-Kleine

Schulbildung:

1985-1989	Grundschule Merzhausen
1989-1998	Friedrich-Gymnasium Freiburg
09/1995-12/1995	St. Austell College, Cornwall, GB
06/1998	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

10/1998-11/2004	Studium der Humanmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
08/2000	Physikum
08/2001	1. Staatsexamen
08/2003	2. Staatsexamen
11/2004	3. Staatsexamen

Münster, den 18.03.2005