

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Prospektive Isolation und Evaluation der
Kulturbedingungen zur Untersuchung des Wachstums
von Seminomzellen**

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

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

**vorgelegt von
Strittmatter, Rebekka Franziska, geb. Buck**

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 19.12.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Hodentumore	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	4
1.1.3 Klassifizierung	7
1.1.4 Diagnostik und Therapie	11
1.1.5 Prognose	12
1.1.6 Stammzeleigenschaften	12
1.2 Seminommarker	13
1.2.1 c-Kit	13
1.2.2 PLAP	14
1.3 Kultivierung von Seminomen	14
1.3.1 TCam-2 als einzige bestehende Linie	14
1.3.2 Überlegungen zur Seminomkultur	15
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Gewebesponder	19
2.2 Dissoziation und Primärkultur	20
2.2.1 Kulturmedien	21
2.3 Mediumwechsel	24
2.4 Lyse	24
2.5 Auftauen	25
2.6 Einfrieren	25
2.7 Magnetic Cell Sorting (MACS)	26

2.8	RNA-Isolation	27
2.9	cDNA-Umschrieb	28
2.10	RT-qPCR	29
2.10.1	TaqMan-PCR	30
2.10.2	SYBR-Green-PCR	33
2.11	Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Kultur	35
3.1.1	Tumor 301	36
3.1.2	TuDiak	39
3.1.3	Adhärenz	42
3.1.4	Überlebensdauer	43
3.2	RT-qPCR	44
3.2.1	MACS versus ohne MACS	44
3.2.2	Y27632 versus ohne Y27632	51
3.2.3	StemPro versus RPMI	57
4	Diskussion	65
4.1	Gewebe	65
4.2	Kultur	66
4.3	Die Methode MACS	67
4.4	PCR und statistische Auswertung	68
4.4.1	Lymphozytenmarker	69
4.4.2	Seminommarker	69
4.5	MACS versus ohne MACS: Auswirkung auf Seminomkultur (quali- tativ)	70
4.5.1	Tumor 301	70
4.5.2	Tumor Diak	73
4.6	Erfolg der Methode (quantitativ)	75
4.7	Zugabe von ROCK-Inhibitor Y-27632	78
4.7.1	Tumor 301	79
4.7.2	Tumor Diak	79
4.8	Kulturmedien im Vergleich	80
4.9	Auswirkungen der Kulturmedien auf die Zellkultur	82
4.9.1	Tumor 301	82
4.9.2	Tumor Diak	82
4.10	Schlussfolgerung aus der Arbeit	83

5	Zusammenfassung	85
6	Ausblick	87
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	105
8	Danksagung	107

Abbildungsverzeichnis

1.1	Abhängigkeit der Inzidenz vom Human Development Index (HDI) (Ferlay J et al., 2012)	2
1.2	Inzidenz Hodenkrebs weltweit (Ferlay J et al., 2012)	3
1.3	Mortalität Hodenkrebs weltweit (Ferlay J et al., 2012)	3
1.4	Stufenweise Entstehung von Testicular Germ Cell Tumor (TGCT) leicht verändert nach Boublikova et al. (Boublikova et al., 2014)	5
1.5	World Health Organization (WHO)-Klassifikation der Hodentumore (2016) (Moch et al., 2016)	8
2.1	Aufbau des MiniMACS-Separators mit MS Columns	26
2.2	PCR-Programm, Quelle: eigenes Bild	32
3.1	MACS: vorher (a) und hinterher (b) in Kulturmedium RPMI, potentielle Seminomzellen wurden mit Pfeilen markiert.	35
3.2	MACS: vorher (a) und hinterher (b) in Kulturmedium StemPro, potentielle Seminomzellen wurden mit Pfeilen markiert.	36
3.3	Tumor 301 StemPro + Y27632, 400x. Eine adhärent wachsende Zelle ist beispielhaft in Abbildung (b) markiert.	36
3.4	Tumor 301 StemPro - Y27632, 400x. Die Pfeile zeigen mehrere adhärente Zellen in Abbildung (d).	37
3.5	Tumor 301 RPMI + Y27632, 400x. Die Pfeilmarkierung zeigt adhärente Zellen.	38
3.6	Tumor 301 RPMI - Y27632, 400x. Die Pfeile markieren Zellen mit Ausläufern.	39
3.7	Tumor Diak StemPro + Y27632. In (a) ist eine Zelle abgebildet, die sich im Moment der Aufnahme absetzt und adhärent wird.	40
3.8	Tumor Diak StemPro - Y27632	41
3.9	Tumor Diak RPMI + Y27632	41
3.10	Tumor Diak RPMI - Y27632	42
3.11	Tumor 301: adhärente Zellen im Vergleich mit TCam-2	43

3.12 Tumor 301 PCR CD45- MACS versus ohne MACS	45
3.13 Tumor Diak PCR CD45- MACS versus ohne MACS	46
3.14 Tumor 301 PCR c-Kit- MACS versus ohne MACS	47
3.15 Tumor Diak PCR c-Kit- MACS versus ohne MACS	48
3.16 Tumor 301 PCR PLAP- MACS versus ohne MACS	49
3.17 Tumor Diak PCR PLAP- MACS versus ohne MACS	50
3.18 Tumor 301 PCR CD45 - Y27632 versus ohne Y27632	51
3.19 Tumor Diak PCR CD45 - Y27632 versus ohne Y27632	53
3.20 Tumor 301 PCR c-Kit - Y27632 versus ohne Y27632	54
3.21 Tumor Diak PCR c-Kit - Y27632 versus ohne Y27632	55
3.22 Tumor 301 PCR PLAP - Y27632 versus ohne Y27632	56
3.23 Tumor Diak PCR PLAP - Y27632 versus ohne Y27632	57
3.24 Tumor 301 PCR CD45 - StemPro versus RPMI	58
3.25 Tumor Diak PCR CD45 - StemPro versus RPMI	59
3.26 Tumor 301 PCR c-Kit - StemPro versus RPMI	60
3.27 Tumor Diak PCR c-Kit - StemPro versus RPMI	61
3.28 Tumor 301 PCR PLAP - StemPro versus RPMI	62
3.29 Tumor Diak PCR PLAP - StemPro versus RPMI	63

Tabellenverzeichnis

1.1	Alternative Klassifikation der Keimzelltumore nach WHO (2004) (Eble, 2004), angelehnt an Oosterhuis und Looijenga, 2005.	9
2.1	Gewebesponder	20
2.2	Materialien zur Zellkultur	22
2.3	Materialien für MACS	26
2.4	Materialien RNA-Isolation, cDNA Umschrieb	27
2.5	Materialien PCR	31
2.6	TaqMan Mastermix	31
2.7	SYBR-Green Mastermix	33
4.1	Übersicht über Vorkommen von Seminomzellen bei Tumor 301, ✓ steht für vorhanden, x für nicht vorhanden	71
4.2	Übersicht über Vorkommen von Seminomzellen bei Tumor Diak, ✓ steht für vorhanden, x für nicht vorhanden	73

Abkürzungsverzeichnis

AFP	α -Fetoprotein
ASR	Age-Standardised Rate
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
β-HCG	β - humanes Choriongonadotropin
CIS	Carcinoma in situ
EAU	European Association of Urologists
EGF	Epidermal Growth Factor
ESC	Embryonic Stem Cells
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
°C	Grad Celsius
GCNIS	Germ cell neoplasia in situ
GCT	Germ Cell Tumor
GDNF	Glial Cell Line-derived Neurotropic Factor
HDI	Human Development Index
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
ITGCNU	Intratubular Germ Cell Neoplasia, Unclassified
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MACS	Magnetic Cell Sorting
NEAA	Nonessential Amino Acids
RT	Raumtemperatur
TDS	Testikuläres Dysgenesiesyndrom
TGCT	Testicular Germ Cell Tumor
TILs	Tumour Infiltrating Lymphocytes
TIN	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Hodentumore

1.1.1 Epidemiologie

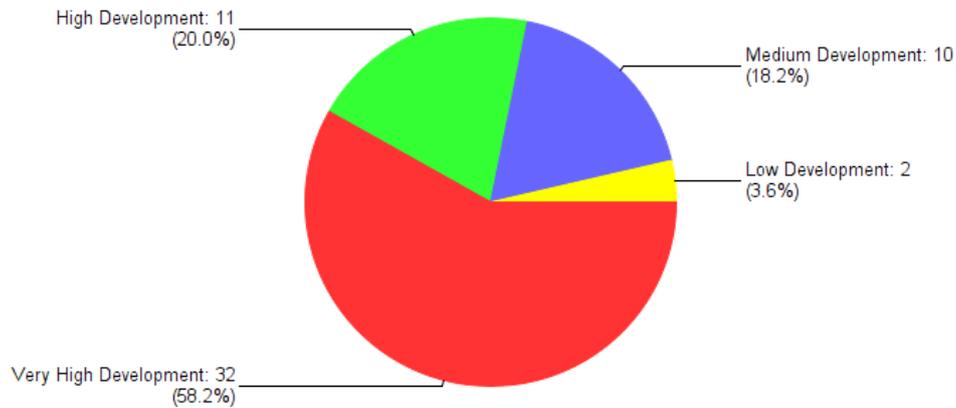
Obwohl Hodentumore nur circa 2% aller malignen Tumore ausmachen, sind sie mit ca. 4000 Neuerkrankungen im Jahr 2014 in Deutschland die häufigste bösartige Tumorentität bei Männern im Alter von 25-45 Jahren (Wolf et al., 2011). Trotz der überaus guten Therapiemöglichkeiten von fortgeschrittenen Fällen mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von zuletzt 95% sterben laut Zentrum für Krebsregisterdaten immer noch allein in Deutschland 179 Patienten pro Jahr (Daten aus dem Jahr 2012) (Ferlay J et al., 2012).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 38 Jahren, wobei Männer im Alter von 20 Jahren das höchste Erkrankungsrisiko aufweisen (Kaatsch et al., 2012). Die Inzidenz in den Industrienationen steigt aus verschiedenen, teils unbekanntem Gründen. Sie hat sich in den letzten 40 Jahren sogar mehr als verdoppelt (Motzer et al., 2012). Als Ursachen für den Anstieg werden unter anderem Umwelteinflüsse, die das Testosteron-Östrogen-Gleichgewicht stören, diskutiert (Huyghe, 2008). Weltweit unterscheiden sich die länderspezifischen Inzidenzen; der globale Durchschnitt der altersstandardisierten Inzidenz pro 100.000 Personen männlicher Bevölkerung liegt bei 1,5%, was Deutschland mit 9.7% deutlich überschreitet.

Weltweite Verteilung

Es gilt allgemein eine Abhängigkeit vom Entwicklungsstand (HDI), was die Diskussion um den Zusammenhang mit westlicher Lebensweise entfachte. Dies ist in Abbildung 1.1 dargestellt: Weit über die Hälfte aller Krebsfälle betrifft sehr hoch entwickelte Länder.

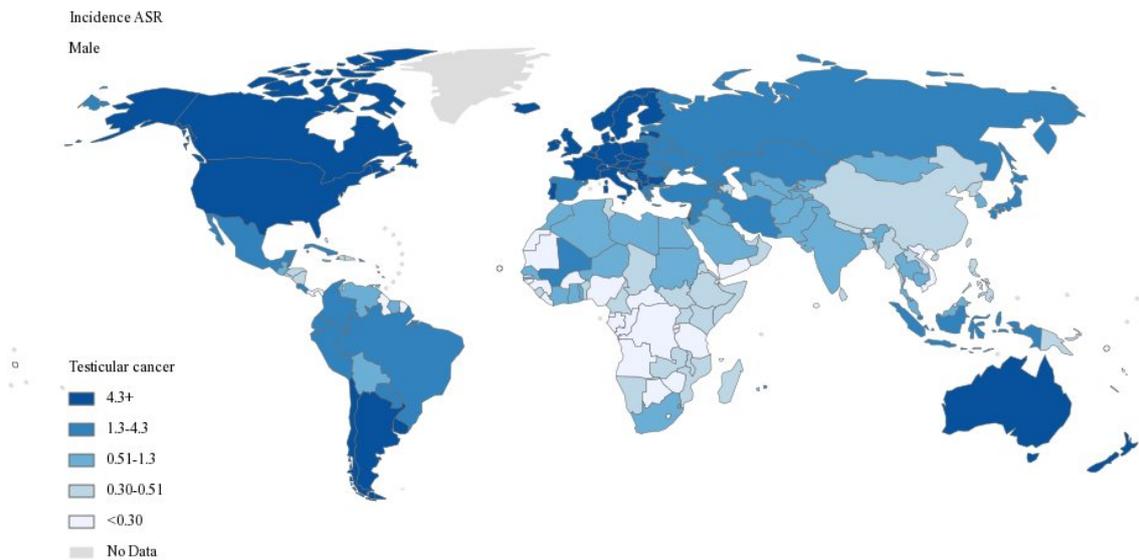
International Agency for Research on Cancer
Testis
Estimated number of cancer cases (x1000), all ages
Organization



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 19.8.2014

Abbildung 1.1: Abhängigkeit der Inzidenz vom HDI (Ferlay J et al., 2012)

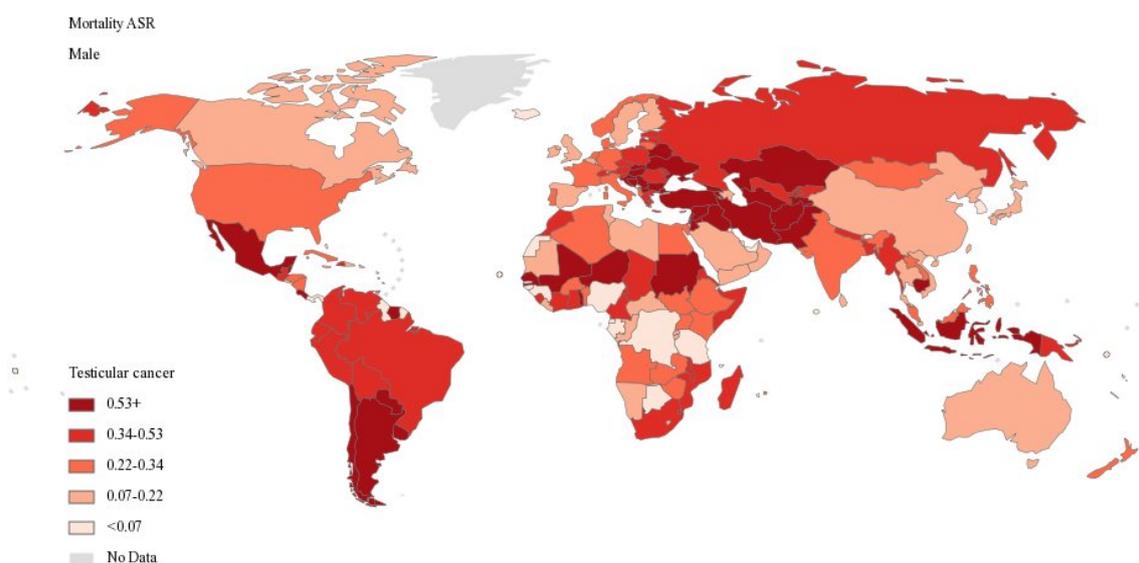
So treten Hodentumore sehr viel häufiger in den Vereinigten Staaten, Australien und Nordeuropa auf, bevorzugt in den skandinavischen Ländern. Laut Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC), die diese im Internet auf <http://globocan.iarc.fr> zur Verfügung stellt, gehört Deutschland mit einer anhand einer fiktiven Welt-Standard-Population altersstandardisierten Inzidenz (Age-Standardised Rate (ASR)) von 9,7 zu den Ländern mit dem größten Erkrankungsrisiko. Nur fünf Länder weisen mit 10,8-12,2 pro 100.000 eine noch höhere Inzidenz auf: Norwegen, die Schweiz, Dänemark, Ungarn sowie Slowenien. Die weltweite Verteilung der Inzidenz ist in Abbildung 1.2 veranschaulicht.



Source: GLOBOCAN 2012 (IARC)

Abbildung 1.2: Inzidenz Hodenkrebs weltweit (Ferlay J et al., 2012)

Mit der Mortalität verhält es sich anders: Länder mit hohem Einkommen haben sehr niedrige stabile oder sinkende Raten, während in Regionen mit mittlerem Einkommen in Lateinamerika und Asien kein Rückgang zu verzeichnen ist (Znaor et al., 2014). In Abbildung 1.3 sind diese generellen Trends mit einigen Ausnahmen dargestellt: China beispielsweise zeigt im Gegensatz zum restlichen Asien deutlich niedrigere Mortalitätsraten.



Source: GLOBOCAN 2012 (IARC)

Abbildung 1.3: Mortalität Hodenkrebs weltweit (Ferlay J et al., 2012)

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Pränatale/kongenitale Risikofaktoren

Es gibt wenige gesicherte Risikofaktoren für Hodentumore. Eine vierfache Erhöhung des Risikos in Zusammenhang mit Kryptorchismus für einen testikulären Keimzelltumor (TGCT) wurde gezeigt (Banks et al., 2012). Dies hat möglicherweise den gleichen Hintergrund wie die Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch einen Hodentumor in der eigenen sowie Familienanamnese (besonders erstgradige Verwandte) des Patienten: Bereits mehrere potenzielle Genloci wie zum Beispiel KIT-Ligand, SPRY4, BAK1, PDE11A-Mutationen und Y-Chromosom gr/gr-Deletion wurden identifiziert. Interessanterweise sind diese auch mit der Hodenentwicklung und dem Deszensus sowie Infertilität beim Mann assoziiert (Greene et al., 2010). Unter dem Begriff Testikuläres Dysgenesiesyndrom (TDS) können die genannten Symptome zusammengefasst werden: eingeschränkte Spermatogenese, genitale Malformationen wie z.B. Hypospadien, Maleszensus und TGCT (Skakkebaek et al., 2003). Die Genese des TDS ist mannigfaltig und reicht von Androgenmangel bis zu Umweltfaktoren wie Phtalatbelastung (Toppari et al., 2010).

Die Korrektur des Kryptorchismus durch eine Orchidopexie ist fertilitätstechnisch in jedem Fall anzuraten, ihre Auswirkungen auf das Hodenkrebsrisiko bleibt jedoch umstritten. Eine schwedische Studie belegt altersabhängig eine Halbierung des Risikos, wenn die Korrektur vor dem 13. Lebensjahr geschieht (Pettersson et al., 2007), was durch eine dänische Studie widerlegt wird (Myrup et al., 2007).

Als weitere Risikofaktoren gelten der kontralaterale Hodentumor (Wanderås et al., 1997), das Klinefelter-Syndrom (Motzer et al., 2012) und der persistierende Müller-Gang (Dueñas et al., 2001) sowie das Vorliegen der Vorstufe GCNIS, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Germ cell neoplasia in situ (GCNIS)

Die oben genannten Faktoren führen bereits in utero zu einer mehr oder weniger ausgeprägten gonadalen Dysgenese mit gestörter Funktion der fetalen Gonozyten, der somatischen Zellen (Sertoli, Leydig) und der "Nische", also des gesamten Zusammenspiels der Umgebungsfaktoren der Keimzellentwicklung (Boublikova et al., 2014).

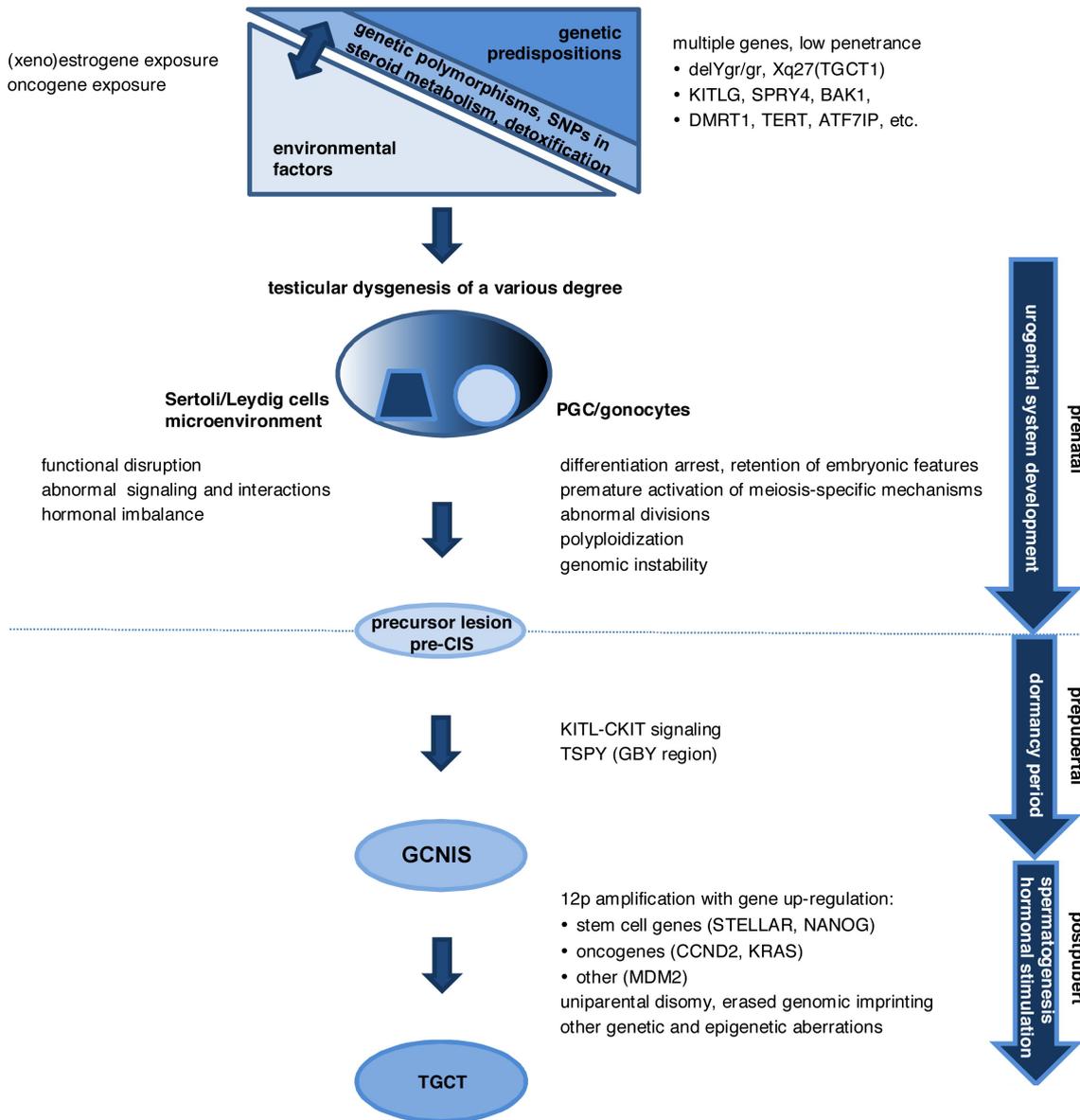


Abbildung 1.4: Stufenweise Entstehung von TGCT leicht verändert nach Boublikova et al. (Boublikova et al., 2014)

Zwei Entstehungsmechanismen der GCNIS werden vermutet: Die gängige Theorie geht davon aus, dass primordiale Gonozyten nach der Neonatalperiode, also prämeiotisch, weiter bestehen und nicht zu Spermatogonien ausreifen (Rajpert-De Meyts et al., 1998), (Looijenga et al., 2007). Dies zeigt sich durch die mikroskopische Ähnlichkeit (Gondos et al., 1983) und Übereinstimmungen im Expressionsprofil (z.B. OCT3/4, PLAP, AP-2 γ) (Honecker et al., 2004) von GCNIS und primordialen Keimzellen. Durch ihren Differenzierungsstopp ist die Voraussetzung für die Vorläuferläsion geschaffen. (Boublikova et al., 2014). Erworbene genetische

Veränderungen - wie unter anderem die Amplifikation des kurzen Arms von Chromosom 12- verschaffen diesen Zellen einen Überlebensvorteil (Reuter, 2005).

Auch die zweite Theorie basiert auf der gleichen genetischen Veränderung, nämlich der 12p-Amplifikation: Diese geht davon aus, dass sich die Mutation in der postmeiotischen Spermatozyte bei der Rekombination ereignet. Sie führt zu einer Überexpression von Cyklin D2, einem onkogenen Zellzyklus-regulierenden Protein. Dadurch wird der Zellzyklus reaktiviert (Chaganti and Houldsworth, 1998). Eine Übersicht über die pathogenetischen Vorgänge gibt Abbildung 1.4.

Als mögliche Vorläuferläsion eines malignen TGCT wurde das Carcinoma in situ (CIS) zum ersten Mal im Jahr 1978 von Skakkebaek beschrieben (Skakkebaek, 1972). Ursprünglich so benannt, verwendeten andere Autoren auch den Begriff Testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) oder Intratubular Germ Cell Neoplasia, Unclassified (ITGCNU). Nach der aktuellen WHO-Klassifikation, die 2016 erschienen ist, (Moch et al., 2016) soll diese histologische Entität als GCNIS bezeichnet werden.

Dabei wird der Tatsache Rechnung getragen, dass es sich bei diesen malignen Keimzellen nicht um epitheliales Gewebe handelt (was der Begriff Carcinoma/ intraepithelial suggeriert), sowie der für manche irreführende Zusatz "unclassified" abgeschafft. Die malignen Zellen entwickeln sich in der spermatogonalen Nische, also dort, wo sich auch normalerweise im frühen differenzierten Hoden Keimzellen befinden. Daher rührt die korrekte Bezeichnung "in situ".

GCNIS bleibt bis zur Pubertät unbemerkt und erst unter dem Einfluss der hormonellen Stimulation der Zellteilung zur Spermatogenese entartet sie weiter, wobei sie sich in eine Reihe unterschiedlicher Gewebe - den verschiedenen Hodentumoren - differenzieren kann (Boublikova et al., 2014).

In der Normalbevölkerung beträgt die Rate an GCNIS in Deutschland ca. 0.43% (Linke et al., 2005), was sich mit dem Lebenszeitrisiko für TGCT deckt.

Kontralateraler Befall

Bei einseitig vorliegendem TGCT zeigen 4.4% bis 5.4% der Männer eine kontralaterale GCNIS (Kier et al., 2015), (Dieckmann and Loy, 1996), (Berthelsen et al., 1982), (von der Maase et al., 1986), welche sich jeweils mit einer Hodenatrophie oder Maleszensus vergesellschaftet zeigten.

Eine Vorhersage, wie wahrscheinlich eine GCNIS im kontralateralen Hoden vorliegt, lässt sich anhand von verringerter Spermienkonzentration sowie vermindertem Volumen des kontralateralen Hodens sowie des Patientenalters treffen (Rud et al., 2013). Wie oft kontralaterale GCNIS tatsächlich zu einem syn- oder metachronen malignen TGCT führt, zeigt eine große Studie mit 29.515 US-amerikanischen Patienten. Hier besteht ein kumulatives Risiko von 1.9%, innerhalb von 15 Jahren ein metachrones Karzinom zu entwickeln, außerdem wurde bei Diagnosestellung bei 0.6% ein synchroner kontralateraler Tumor festgestellt. Die Autoren sprechen sich gegen eine routinemäßige Biopsie des kontralateralen Hodens aus (Fosså et al., 2005).

Die Hypothese, dass die Cisplatin-haltige Chemotherapie das Risiko eines metachronen TGCT senkt, belegt die Gruppe um Andreassen et al., die eine Halbierung des Risikos bei Patienten mit metastasiertem vs. lokalisiertem Auftreten des TGCT nach Beginn der Cisplatin-Ära 1980 feststellen (Andreassen et al., 2011). Schon früher wurde der Effekt auch von anderen Studien beobachtet (van Leeuwen et al., 1993), (von der Maase et al., 1986), die eine Risikoreduktion, jedoch keine vollständige Elimination desselben durch die Chemotherapie postulieren. Ob zwingend eine kontralaterale Biopsie durchgeführt werden soll, ist eine kontrovers diskutierte Frage. Momentan wird sie nur Männern mit erhöhtem TGCT-Risiko empfohlen: Bei einem Hodenvolumen < 12ml, Kryptorchismus in der Vorgeschichte oder wenn sie jünger als 30 Jahre sind (Heidenreich, 2009). Die Therapie der Wahl von GCNIS bei gesundem Gegenhoden oder bei GCNIS in einem atrophischen, funktionslosen Hoden ist eine Orchiektomie (Sharma et al., 2015). Eine Bestrahlung mit 20 Gy (in Einzeldosen von 2 Gy) kann bei einem solitären Hoden erwogen werden, kann jedoch zu einer Funktionsstörung der Leydig-Zellen führen, was eine Hormonsubstitution in bis zu 25% der Fälle erforderlich macht (Albers et al., 2005). Die Alternative ist eine regelmäßige Selbstuntersuchung sowie engmaschige Kontrolle des betroffenen Hodens. Die Forschung kann sich hier jedoch stets nur auf epidemiologische oder klinische Daten verlassen, da eine geeignete Zelllinie fehlt.

1.1.3 Klassifizierung

Im Prinzip können alle im Hoden vorhandenen Strukturen entarten und maligne Zellen hervorbringen.

WHO classification of tumours of the testis

Germ cell tumours derived from germ cell neoplasia in situ		
<i>Non-invasive germ cell neoplasia</i>		
Germ cell neoplasia in situ	9064/2	
Specific forms of intratubular germ cell neoplasia		
<i>Tumours of a single histological type (pure forms)</i>		
Seminoma	9061/3	
Seminoma with syncytiotrophoblast cells		
<i>Non-seminomatous germ cell tumours</i>		
Embryonal carcinoma	9070/3	
Yolk sac tumour, postpubertal-type	9071/3	
Trophoblastic tumours		
Choriocarcinoma	9100/3	
Non-choriocarcinomatous trophoblastic tumours		
Placental site trophoblastic tumour	9104/1	
Epithelioid trophoblastic tumour	9105/3	
Cystic trophoblastic tumour		
Teratoma, postpubertal-type	9080/3	
Teratoma with somatic-type malignancy	9084/3	
<i>Non-seminomatous germ cell tumours of more than one histological type</i>		
Mixed germ cell tumours	9085/3	
<i>Germ cell tumours of unknown type</i>		
Regressed germ cell tumours	9080/1	
Germ cell tumours unrelated to germ cell neoplasia in situ		
Spermatocytic tumour	9063/3	
Teratoma, prepubertal-type	9084/0	
Dermoid cyst		
Epidermoid cyst		
Well-differentiated neuroendocrine tumour (monodermal teratoma)		
	8240/3	
Mixed teratoma and yolk sac tumour, prepubertal-type		
	9085/3	
Yolk sac tumour, prepubertal-type	9071/3	
Sex cord–stromal tumours		
<i>Pure tumours</i>		
Leydig cell tumour	8650/1	
Malignant Leydig cell tumour	8650/3	
Sertoli cell tumour	8640/1	
Malignant Sertoli cell tumour	8640/3	
Large cell calcifying Sertoli cell tumour	8642/1	
Intratubular large cell hyalinizing Sertoli cell neoplasia	8643/1*	
Granulosa cell tumour		
Adult granulosa cell tumour		
	8620/1	
Juvenile granulosa cell tumour		
	8622/1*	
Tumours in the fibroma–thecoma group		
	8600/0	
<i>Mixed and unclassified sex cord–stromal tumours</i>		
Mixed sex cord–stromal tumour	8592/1	
Unclassified sex cord–stromal tumour	8591/1	
Tumour containing both germ cell and sex cord–stromal elements		
Gonadoblastoma	9073/1	
Miscellaneous tumours of the testis		
Ovarian epithelial–type tumours		
Serous cystadenoma		
	8441/0	
Serous tumour of borderline malignancy		
	8442/1	
Serous cystadenocarcinoma		
	8441/3	
Mucinous cystadenoma		
	8470/0	
Mucinous borderline tumour		
	8472/1	
Mucinous cystadenocarcinoma		
	8470/3	
Endometrioid adenocarcinoma		
	8380/3	
Clear cell adenocarcinoma		
	8310/3	
Brenner tumour		
	9000/0	
Juvenile xanthogranuloma		
	9120/0	
Haemangioma		
	9120/0	
Haematolymphoid tumours		
Diffuse large B-cell lymphoma		
	9680/3	
Follicular lymphoma, NOS		
	9690/3	
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal-type		
	9719/3	
Plasmacytoma		
	9734/3	
Myeloid sarcoma		
	9930/3	
Rosai–Dorfman disease		
Tumours of collecting duct and rete testis		
Adenoma		
	8140/0	
Adenocarcinoma		
	8140/3	

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions. *New code approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O.

Abbildung 1.5: WHO-Klassifikation der Hodentumore (2016) (Moch et al., 2016)

Das führt zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Tumorarten, was in der aktuellen WHO-Klassifikation der Hodentumore (Abbildung 1.5) aufgezeigt ist. Im Allgemeinen werden sie unterteilt in Keimzelltumore, die etwa 90% aller bösartigen Neubildungen des Hodens ausmachen, und die restlichen, die sich aus Stroma- und Mischtumoren zusammensetzen. Keimzelltumore können in jedem Alter und sowohl bei Männern als auch Frauen auftreten. Ihre Hauptlokalisation sind die Gonaden, ein kleiner Teil tritt allerdings auch aufgrund von Migrationsaberrationen ektop in der Nähe der Mittellinie des Körpers, also extragonadal auf (Oosterhuis and Looijenga, 2005), (Mosbech et al., 2014).

Die Gonadentumore von Mann und Frau unterscheiden sich deutlich in ihrer Zusammensetzung: Die Tumoren des Ovar sind nur in etwa 20% der Fälle Keimzelltumoren, davon sind 90% reife zystische Teratome (Dermoidzysten). Nur 6-8% der Keimzelltumore bei Frauen sind maligne (Mostofi, 1998).

Keimzelltumore (Germ Cell Tumor (GCT))

Keimzelltumore treten generell in 3 verschiedenen Altersklassen auf: bei Säuglingen, im jungen Erwachsenenalter und bei älteren Männern, wobei die malignen Zellen jeweils aus einem spezifischen Stadium der Keimzellentwicklung hervorgehen (Rajpert-De Meyts et al., 2015).

Tabelle 1.1: Alternative Klassifikation der Keimzelltumore nach WHO (2004) (Eble, 2004), angelehnt an Oosterhuis und Looijenga, 2005.

Name	Erkrankungsalter	Tumormarker
Dottersacktumor Teratom (benigne)	0-5 Jahre	AFP -
Seminom	ca. 15-45 Jahre	10%: hCG, LDH, ⊖ AFP (Weissbach et al., 1997)
Nichtseminome:		
Embryonales Karzinom		-
Teratom (maligne)		-
Dottersacktumor		AFP
Chorionkarzinom		hCG
Spermatozytischer Tumor	>50 Jahre	

Von Oosterhuis und Looijenga wird eine Unterteilung der Keimzelltumore in fünf Gruppen anhand von Epidemiologie, Alterskategorie, anatomischer Lokalisation, Phänotyp und klinischer Präsentation des Tumors sowie den spezifischen chromosomalen Veränderungen vorgeschlagen (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Die drei ersten der fünf Gruppen sind in dieser Arbeit von Interesse, da sie die testikulär vorkommenden Keimzelltumore stellen (siehe Tabelle 1.1). Sogenannte **Gruppe I - GCT** umfassen vor allem reife Teratome oder Dottersacktumore und sind insgesamt sehr selten und benigner als ihre postpubertären Äquivalente (Ahmed et al., 2010), (Mosbech et al., 2014). Im Gegensatz zur zweiten und mit Abstand häufigsten Kategorie ist die Vorstufe hier nicht GCNIS, es wird vielmehr

davon ausgegangen, dass sich diese Tumore von Zellen im früheren Entwicklungsstadium ableiten, also direkt von primordialen Keimzellen. Sie kommen vor allem bei Neugeborenen und Kleinkindern vor mit einem Maximum in den ersten drei Lebensjahren (Mosbech et al., 2014).

Bei den **Gruppe II - GCTs** erfolgt eine Unterteilung in Seminome und Nichtseminome, also embryonale Karzinome, Teratome, Chorionkarzinome und Dottersacktumore von jungen Erwachsenen. Dies hängt mit dem unterschiedlichen therapeutischen Vorgehen zusammen. Sobald ein Hodentumor AFP exprimiert, wird er als Nicht-Seminom deklariert und wie ein solches behandelt. Seminome machen 62% (Kaatsch et al., 2012) der Keimzelltumore aus und haben durch Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie grundsätzlich eine bessere Prognose als Nicht-Seminome.

Außerdem fallen als Äquivalent für das Seminom hierunter auch das Dysgerminom des Ovar und das Germinom. Ihnen ist gemeinsam, dass sie alle aus einer Vorstufe, der GCNIS (s.o.) entstehen (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Gruppe III-GCT wird vom Spermatozytischen Seminom gebildet - nach neuer WHO-Klassifikation (Mosbech et al., 2014) als spermatozytischer Tumor zu bezeichnen. Mit einem mittleren Alter bei Diagnose von 50-55 Jahren tritt er ausschließlich im Hoden auf und geht auf weiter differenzierte Zellen als Gruppe I und II zurück, entwickelt sich also nicht aus GCNIS. Seine Pathogenese wird vielmehr in der klonalen Expansion aufgrund proliferationssteigernder Mutationen von postpubertären Spermato gonien gesehen (Rajpert-De Meyts et al., 2015). Mit dem klassischen Seminom hat es trotz des Namens nur wenige Gemeinsamkeiten.

Serum-Tumormarker

Tumormarker sind für Diagnose, Staging, Therapie- sowie Rezidivmonitoring und auch zur Vorhersage des Tumorverhaltens verwertbar (Klein, 1993).

Sie umfassen normalerweise die drei Standardmarker α -Fetoprotein (AFP), β -humanes Choriongonadotropin (β -HCG) und Laktatdehydrogenase (LDH). Nach aktuellen Leitlinien der European Association of Urologists (EAU) sollen sie vor Orchiektomie und danach bis zur Normalisierung in wöchentlichen Intervallen bestimmt werden. Dabei ist LDH für das Staging vor allem bei bereits metastasierten Formen heranzuziehen (Krege et al., 2008). Außerdem können sie zur Überwachung metastatischer Seminome benutzt werden, da ein Markeranstieg einen frühen Hinweis auf einen Rückfall gibt (Motzer et al., 2012).

Die mittlere Halbwertszeit im Serum für AFP liegt bei fünf bis sieben Tagen, für HCG bei zwei bis drei Tagen (Klein, 1993) Dabei sind AFP und β -HCG statistisch signifikant erhöht in Hodenkrebspatienten mit einer Spezifität von 97.1% bzw. 98.6%. LDH macht keinen Unterschied zwischen benignen Hodenläsionen und TGCT. Die Kombination der Marker ist statistisch am zuverlässigsten (Neumann et al., 2011).

90% der Hodentumore produzieren zumindest einen der beiden Marker, das heißt aber umgekehrt, dass negative Marker einen Hodentumor nicht ausschließen. Andere Marker – wie z. B. Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) – sind im klinischen Alltag von untergeordneter Bedeutung (z. B. bei HCG-negativen Seminomen), ihre Bestimmung ist daher optional (Albers et al., 2005). Die Serumentumormarker sind auch bei Chemotherapie prognostisch bedeutsam (Mazumdar et al., 2001).

Für diese Arbeit von Bedeutung ist, dass reine Seminome kein AFP produzieren (de Takats et al., 1996). Sollte es dennoch erhöht sein, muss nach nichtseminomatösen Anteilen gesucht werden (Motzer et al., 2012). Es wurden also nur Patienten mit negativem AFP eingeschlossen.

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Pathognomonisch für einen Hodentumor ist klinisch eine schmerzlose Hodenschwellung, oft imponiert der Hodentumor aber auch als Orchitis oder Epididymitis. Es sollte eine Ultraschalluntersuchung des Hodens sowie des Gegenhodens folgen, Laborabnahme inklusive oben genannter Tumormarker sowie ein Röntgen-Thorax (Motzer et al., 2012). Der wichtigste weitere Schritt ist nun die inguinale Orchiektomie evtl. mit Biopsie der Gegenseite (Indikation siehe oben). Wird nun ein TGCT festgestellt, wird eine Computertomographie des Abdomens und Beckens und - bei pathologischen Befunden - des Thorax angeschlossen (Beyer et al., 2013). Es kann so eine Einteilung anhand der TNM-Klassifikation nach Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (7. Auflage 2009) vorgenommen werden, die zum einen die **T**umorausdehnung, weiterhin den regionalen Lymphknotenstatus (**N**ode) sowie die Fern-**M**etastasen berücksichtigt.

Als Therapieregime stehen grundsätzlich mehrere Optionen zur Verfügung, die abhängig sind von der Histologie des Tumors und dem Stadium. Stadium 1 beschreibt eine auf den Hoden beschränkte Ausdehnung, bei Stadium 2 liegen eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen und bei Stadium 3 Fernmetastasen vor (mit einigen Ausnahmen).

Prinzipiell kann nach der sowohl diagnostisch als auch therapeutisch sinnvollen Orchiektomie auf eine Strahlen- oder Chemotherapie verzichtet werden. Diese kann vor allem bei metastasierter Erkrankung nach dem PEB-Schema (Carboplatin, Etoposid, Bleomycin) notwendig werden, wobei eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Analyse vorausgehen sollte. Besonders bei jungen Patienten sollte die Spermienkonservierung angeboten werden.

1.1.5 Prognose

Sowohl die histologische Art des Hodentumors als auch das Erkrankungsalter spielen bei der Prognose eine entscheidende Rolle: 2003 bis 2007 wird eine relative 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten unter 50 Jahren mit Seminom im Hoden mit 98% angegeben, die gleiche Altersgruppe hat beim Nichtseminom eine 3-6 %-Punkte niedrigere Lebenserwartung. Die Altersgruppe der über 50-Jährigen hat hingegen sowohl beim Seminom als auch beim Nicht-Seminom eine signifikant schlechtere Prognose (Verhoeven et al., 2012).

Mit der Einführung der Chemotherapie mit Cisplatin vor über 35 Jahren hat sich die Prognose der Hodentumore noch einmal deutlich verbessert. Das Gesamtüberleben stieg beispielsweise in den Vereinigten Staaten von 83% in den Jahren 1975–1979 auf 96% im Zeitraum von 1999–2005 (Siegel et al., 2012).

Die International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) hat einen Prognosescore veröffentlicht, der für Nichtseminome als unabhängige nachteilige Faktoren einen mediastinalen Primärtumor, die Erhöhung von AFP, β -HCG und LDH sowie nichtpulmonale viszerale Metastasen, z.B in Leber, Knochen und Gehirn nennt. Letztere sind auch für die Prognose des Seminom hauptausschlaggebend (Group, 1997).

1.1.6 Stammzeleigenschaften

Das Wort "multipotent" kommt aus der Forschung an Hodentumoren: Embryonale Karzinome wurden in Mäuse gespritzt und dabei festgestellt, dass sie noch die Potenz besitzen, alle drei Keimblätter zu bilden (Kleinsmith and Pierce, 1964).

In der Tat besitzen schon die Vorstufe GCNIS und seminomatöse Zellen selbst Übereinstimmungen mit embryonalen Stammzellen (Embryonic Stem Cells (ESC)). Dazu gehört zum einen das Expressionsmuster: OCT3/4 und NANOG werden mit

Pluripotenz bei ESC in Verbindung gebracht und werden auch im Seminom exprimiert (Looijenga et al., 2007), (Sperger et al., 2003), (Rosner et al., 1990), (Mitsui et al., 2003). Außerdem zeichnen sich sowohl ESC als auch Seminome durch eine niedrige Prävalenz an Mutationen aus (Bignell et al., 2006). In ESC ist die Rate an spontanen Mutationen im Vergleich zu somatischen Zellen ca. um das 100-fache erniedrigt (Hong and Stambrook, 2004). Auch die Strahlenempfindlichkeit bzw. die Eigenschaft, bei strahleninduzierten DNA-Schäden in die Apoptose, also den programmierten Zelltod, zu gehen, ist eine gemeinsame Eigenschaft der beiden Zellarten (Looijenga et al., 2007), (Hong and Stambrook, 2004). Dies kann auch als einer der Gründe angesehen werden, warum das Etablieren einer Seminomlinie so viele Schwierigkeiten bereitet.

1.2 Seminommarker

1.2.1 c-Kit

C-Kit ist eine Rezeptortyrosinkinase (auch CD117 oder KIT), welche das Genprodukt des Protoonkogens c-Kit darstellt. Sein Ligand ist der Stammzell-Faktor (SCF). Physiologischerweise wird es auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, was im Laufe der Differenzierung jedoch meist verloren geht, mit Ausnahme weniger differenzierter Zelltypen wie beispielsweise Mastzellen (Lennartsson et al., 2005). Bei B- und T-Zellen geht es in der Entwicklung von der Pro- zur Prä-B bzw. T-Zelle verloren. Im gesunden Hodengewebe wird c-Kit vor allem in Spermato gonien und Spermatozyten exprimiert. Hier stellt die c-Kit-Expression sowie die seines Liganden SCF (Stem Cell Factor) möglicherweise die regulatorische Funktion der spermatogenetischen Nische (Bokemeyer et al., 1996).

Der Nachweis der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit in Seminomen gelang 1991 Strohmeyer et al., die einen signifikanten Unterschied der Expression zwischen Seminomen (80%) und Nichtseminomen (7%) des Onkogens konstatierten (Strohmeyer et al., 1991).

Das Herunterregulieren von c-Kit wird als möglicher Schritt in der Progression vom Seminom zum Nicht-Seminom gewertet (Izquierdo et al., 1995). In der Vorläuferläsion GCNIS wird c-Kit ebenfalls nahezu immer nachgewiesen (Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994).

Gleichzeitig ist das Onkogen ein zuverlässiger Marker, um ein Seminom zu identifizieren (Bokemeyer et al., 1996), (Izquierdo et al., 1995), (Strohmeyer et al., 1991), (Rajpert-De Meyts and Skakkebaek, 1994).

1.2.2 PLAP

Placental alkaline phosphatase (PLAP) wird- wie der Name schon sagt- vor allem in der Plazenta von Primaten, jedoch auch als Isoenzym in TGCT exprimiert (Yamamoto et al., 1987). Sein Vorkommen wird in der Tumorstufe GCNIS beschrieben sowie zu einem kleinen Teil in embryonalen Karzinomen und vor allem in Seminomen (Burke and Mostofi, 1988), (Wahren et al., 1986), (Cheville et al., 2000). Es gehört mittlerweile zusammen mit c-Kit für Seminome zum diagnostischen Standard des Pathologen. Hier kann es sowohl im histologischen Präparat wie auch gelöst im Serum (Neumann et al., 2011) in sechs verschiedenen Isoformen nachgewiesen werden, wobei der Serumspiegel proportional zu einem fortgeschrittenen Tumorstadium steigt und bei erfolgreicher Therapie unter die Nachweisgrenze fällt (Wahren et al., 1986). Auch bei starken Rauchern kann der Serumspiegel erhöht sein (Koshida et al., 1990).

1.3 Kultivierung von Seminomen

1.3.1 TCam-2 als einzige bestehende Linie

Von einer Vielzahl der nicht-seminomatösen Tumore konnten jeweils Zelllinien etabliert und für die Forschung verwendet werden. TCam-2 ist bisher die einzige Zelllinie, die aus einem Seminom gewonnen wurde und dessen Eigenschaften zeigt (Mizuno et al., 1993). Trotz ihrer vielfältigen Anwendung gibt es immer wieder Zweifel über die Homogenität und Modellhaftigkeit der Linie. So vermuteten Eppelmann et al. in ihrer Studie 2013, dass TCam-2 mindestens 2 Subpopulationen aufweise (Eppelmann et al., 2013). De Jong et al. sehen im Nachweis einer Mutation des BRAF-Gens bei TCam-2, die sonst bei TGCT eher eine Seltenheit darstellt, eine Erklärung für die Aufrechterhaltung dieser Seminomlinie (de Jong et al., 2008). Der Ursprung der Linie bleibt jedoch weiterhin unklar. Bei einer weiteren als Seminom deklarierten Zelllinie namens JKT1 (Kinugawa et al., 1998)

wurde durch DNA-Array-Analyse sowie Western-Blotting die Keimzellnatur widerlegt. (Eckert et al., 2008). Eine weitere Keimzelllinie, SEM-1, ist vor kurzem aus einem extragonadalen Seminom gewonnen worden. Sie zeigt laut Autoren dabei sowohl Eigenschaften eines Seminoms als auch Nicht-Seminoms (Russell et al., 2013). Die Erfahrung vieler Arbeitsgruppen zeigt, dass es sich bei der Seminomkultur um eine komplexe Angelegenheit handelt (Biermann et al., 2008).

1.3.2 Überlegungen zur Seminomkultur

Verschiedene Ansätze zur Kultur der existierenden Linien werden beschrieben. Russell et al. kultivieren sowohl TCam-2 als auch Sem-1 erfolgreich in RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium-1640 mit 10% Fetalem Kälberserum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) bei 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) mit 5% CO_2 (Russell et al., 2013) (Goddard et al., 2007).

Bei der Kultivierung von Maushodenzellen neugeborener Mäuse haben Kanatsu-Shinohara et al. die Beobachtung gemacht, dass diese unter Anwesenheit von Glial Cell Line-derived Neurotropic Factor (GDNF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Stammzeleigenschaften zeigen (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). In der Tat konnte gezeigt werden, dass GDNF von Sertolizellen produziert wird und die Differenzierung von spermatogonalen Zellen reguliert (Meng et al., 2000).

Der Überlegung folgend, dass Seminomzellen aufgrund ihrer übereinstimmenden Eigenschaften mit Stammzellen auch höhere Anforderungen an die Kultur haben könnten, wurden die Kulturbedingungen teilweise aus der ESC-Kultur übernommen.

Schon früher wurden diese Zusätze bei der Kultivierung von primordialen Keimzellen (aus denen, wie oben aufgezeigt, Seminome entstehen), und deren Rückprogrammierung zu pluripotenten Stammzellen verwendet: Shamblo et al. verwendeten ein Medium unter anderem bestehend aus DMEM mit 15% Fetal Bovine Serum (FBS), 0.1 mM Nonessential Amino Acids (NEAA), 0.1 mM 2-Mercaptoethanol, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 1,000 Einheiten/ml human recomb. LIF, 1 ng/ml human recomb. bFGF (Shamblo et al., 1998).

Die Kultivierung dieser Zellen ohne Fibroblasten-Feeder gelang erstmals 2011, wobei von den Autoren unter anderem ein Faktor namens N2 dafür verantwortlich gemacht wurde (Zhao et al., 2011).

Einen weiteren Ansatz zum Verbessern des Überlebens bei Stammzellen bietet

(aktive ROCK-Inhibitor Y-27632: Es wird beschrieben, dass durch diesen insbesondere nach Zellsortierungsmethoden mit Oberflächenmarkern Stammzellen länger überleben (Emre et al., 2010). ROCK steht für p160-Rho-associated coiled-coil kinase, eine Serin/Threonin-Kinase, welche durch die GTP-gekoppelte Form von Rho aktiviert wird und eine bedeutende Rolle bei vielen Signalwegen der Zelle wie Migration, Zellproliferation und Lymphozytenaggregation spielt (bereitgestellt von RefSeq, August 2015).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Y-27632 außerdem das Überleben und die Wiederherstellung von gefrorenen menschlichen Embryos verbessert (Cortes et al., 2009) sowie das Wachstum undifferenzierter menschlicher ESC unterstützt (Gauthaman et al., 2010) und effektiv die Apoptose verhindert (Ichikawa et al., 2012). Der oben genannte Schutz durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 von pluripotenten Stammzellen vor Apoptose wurde auf eine Hemmung der Caspase 3 zurückgeführt (Wu et al., 2016). Bei Mäusen wurde ein protektiver Effekt des ROCK-Inhibitors bei Administration vor einer herbeigeführten Torsion auf den Hoden und seine Funktion beobachtet, da Y-27632 die Infiltration mit Leukozyten verhindern konnte (Çayan et al., 2014).

EBV-positive lymphozytoblastische B-Zellen

Eines der Probleme bei der Kultivierung könnte das Vorhandensein von EBV-positiven B-Lymphozyten darstellen, deren zahlreiches Vorhandensein Fend et al. in einer Studie zu Seminomen konstatierten (Fend et al., 1995). Die EBV-Infektion führt zu einer Immortalisierung der B-Zellen und Vermehrung derselben. Diese scheinen die Seminomzellen, die in Kultur genommen werden, nach Beobachtungen unserer eigenen Arbeitsgruppe regelrecht zu überwuchern und innerhalb einer gewissen Zeitspanne die Hauptpopulation zu bilden. Diese mikroskopischen Beobachtungen wurden durch die freundliche Unterstützung von Prof. Fend in Form einer immunhistochemischen CD45-Färbung verifiziert. Unsere Beobachtung wurde auch in der Literatur durch eine Studie belegt, die eine höhere Anzahl an CD20+ -Zellen in GCNIS in direkter Nachbarschaft eines Seminoms beobachtet (Hvarness et al., 2013).

CD45 und lymphozytäre Infiltrate

CD45, ein Rezeptor aus der Familie der Proteintyrosinphosphatasen, ist ein ubiquitärer Oberflächenmarker aller Zellen des hämatopoetischen Systems außer auf Thrombozyten und reifen Erythrozyten (Dahlke et al., 2004). Seine Funktion in B- und T-Lymphozyten, aber auch Leukozyten ist essentiell für die Signaltransduktion und die Lymphozytenentwicklung (Hermiston et al., 2003).

Es wurde gezeigt, dass regulär Lymphozyteninfiltrate in Hodengewebe mit TGCT vorkommen, in Seminomen mehr als in Nicht-Seminomen (Torres et al., 1997), was mit der besseren Prognose von Seminomen in Verbindung gebracht wird (Mostofi and Sesterhenn, 1978).

Der Hauptteil der Tumour Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Seminomen wurde charakterisiert als CD45R0 positiv - also aktivierte oder Gedächtnis-T-Lymphozyten (Hvarness et al., 2013). B-Lymphozyten kamen hingegen seltener und in allen Keimzelltumoren gleichermaßen (Torres et al., 1997) (Hvarness et al., 2013) und dann teilweise in Form eines Lymphfollikels vor (Nakanoma et al., 1992). In einer Studie von Yakirevich et al. wurde die Funktion der zytotoxischen T-Zell-Infiltrate beleuchtet: eine signifikant höhere Apoptoserate wurde festgestellt bei Seminom-Tumorzellen, die mit aktiven Lymphozyten in Kontakt standen (Yakirevich et al., 2002).

Diese Daten sind mit der Idee vereinbar, dass es eine aktive Immunantwort gegen den TGCT, insbesondere das Seminom gibt, welche das Tumorstadium und Metastasenbildung hemmt (Parker et al., 2002). Die Theorie wird unterstützt von den Ergebnissen einer Studie von Parker et al., in der ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben bei Seminom-Patienten mit zellreichem Lymphozyteninfiltrat im Tumor festgestellt wird (Parker et al., 2002).

Kritische Stimmen hingegen lassen bedenken, dass im Seminom weniger bis kein HLA exprimiert würde, welches essentiell für eine gerichtete Aktivität der T-Lymphozyten ist (Bell et al., 1987), (Klein et al., 1990). Die Ergebnisse zum Expressionsmuster auf der Oberfläche von Seminomzellen sind allerdings sehr unterschiedlich.

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Um die bestmöglichen Voraussetzungen für eine Kultivierung von Seminomzellen zu schaffen, ist es wie oben ausgeführt naheliegend, diese Lymphozyten-Zellpopulationen zu entfernen. Damit kann ein Störfaktor im Seminomwachstum entfernt und gleichzeitig Licht auf die Frage geworfen werden, ob diese Lymphozyten ursächlich am Absterben der Seminomzellen beteiligt sein könnten. Wie in den vorhergegangenen Kapiteln ausgeführt, ist die Entwicklung einer Seminomzelllinie aus unterschiedlichen Gründen von großem Interesse. Einerseits machen sie ihre Ähnlichkeiten zu Stammzellen sowie ihre Entstehung aus multipotenten Keimzellen zum interessanten Forschungsgegenstand, andererseits wäre dazu mehr als eine Zelllinie wünschenswert. Dies kann auch durch längeres Überleben der Nativzellen *in vitro* erreicht werden.

Kann also eine Depletion von CD45-positiven Zellen bei der Inkulturnahme eines Seminoms das Überleben der Seminomzellen verlängern?

2 Material und Methoden

2.1 Gewebespende

Es besteht ein durch die Ethikkommission unter dem Vorsitz von Prof. Dr. med. Luft genehmigter Forschungsantrag. Unter der Projektnummer 137/2010BO1 wurde der Antrag am 10. Mai 2010 bewilligt. Die Proben wurden intraoperativ nach den unten genannten Kriterien asserviert und in steriler Lösung zur weiteren Verarbeitung gekühlt direkt ins Zellkulturlabor überführt. Eingeschlossen wurden nur Proben,

- die keine TNM-relevanten Strukturen enthielten (d.h. keine Tunica albuginea und kein Rete testis)
- bei denen keine morphologisch auffällige Gewebestruktur vollständig entfernt wurde. Ein entsprechendes Korrelat musste im Präparat bis zur histologischen Aufarbeitung verbleiben.

Bei Keimzelltumorrezidiven und Metastasen musste anders verfahren werden: Hier entschied der Pathologe, welche Gewebeareale eventuell für die vollständige Diagnose entbehrlich waren.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren:

- kein TGCT, sondern anderer Hodentumor
- Malignomerkrankungen anderer Organsysteme in der Anamnese
- Behinderung der Diagnose durch die Probeentnahme
- Unmöglichkeit der intraoperativen Erfüllung der Kriterien ohne Einfluss auf TNM-relevante Strukturen

Die potentiellen Gewebespende wurden vor dem Eingriff nach Standardprotokoll, welches im Ethikantrag aufgeführt ist, aufgeklärt. Auf unsere Anfrage hin wurden wir freundlicherweise unterstützt von den umliegenden urologischen Kliniken, von

welchen wir bei für das Experiment infrage kommenden Patienten informiert wurden. In Tabelle 2.1 sind die Daten der jeweiligen Gewebsspender aufgeführt.

Tabelle 2.1: Gewebespende

Name Tumor	Entnahmedatum	Patientenalter bei Entnahme	Ort der Entnahme	Tumorart
Tu 300	26.09.2014	37 Jahre	Tübingen	Primärtumor
Tu 301	06.11.2014	44 Jahre	Tübingen	Primärtumor
Tu Diak	07.10.2014	52 Jahre	Suttgart	Primärtumor
Tu 14-035	28.01.2014	54 Jahre	Tübingen	Lymphknotenmetastase

2.2 Dissoziation und Primärkultur

Direkt intraoperativ wurde das Zellmaterial steril in ein gekühltes Transportmedium (Hank's BSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 1% Penicillin/Steptomycin versehen) verbracht und ebenfalls gekühlt zum Labor transportiert, wo es wie folgt weiter verarbeitet wurde: Die Zellen sollten zuerst aus ihrem Verband gelöst werden. Dazu wurden 7,5mg Collagenase IV (839U/mg, -20°C , Sigma Aldrich) und 26mg Dispase II (1U/ml= $250\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C , Roche) abgewogen und in 6ml Hank's BSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gelöst. Diese Elektrolyte aktivieren die Enzyme und sollen deshalb erst später hinzugegeben werden. Mit einem Spritzenfilter (Millex 0,22 μm Porengröße, Katalog-Nr. SLGPM33RS, MerckMillipore KGaA, Darmstadt, Germany) wurde das hergestellte Gemisch sterilfiltriert und in drei 15ml Falcons zu je 2ml verteilt. Das Gewebe wurde mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Einmalskalpell unter der CleanBench in einer Petrischale zerkleinert, bis es mit einer Pipette in drei mal 6ml Hank's BSS aufgenommen werden konnte. Dies wurde nun je zur Collagenase/Dispase in ein Falcon gegeben und bei 37°C im Wasserbad 30min inkubiert und währenddessen immer wieder leicht durchmischt. Um die Zellen vom Bindegewebe zu trennen, wurden sie zuerst durch ein grobes steriles Sieb und danach durch einen sterilen 100 μm cell strainer (BD FalconTM, Katalog-Nr.:352360) gegeben. Die filtrierte Lösung wurde 5min lang bei 216g zentrifugiert, ggf. wurde das Pellet nochmals gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert und in 6-Well- Kulturschalen zu gleichen Teilen verteilt.

2.2.1 Kulturmedien

Die Seminomzellen wurden zu gleichen Teilen zur vergleichenden Kultur auf zwei verschiedene Medien aufgeteilt: RPMI mit Supplements und StemPro. Die Zusammensetzung der Medien ist im Folgenden dargestellt, außerdem finden sich die Materialien dazu in Tabelle 2.2. Bei je der Hälfte der Zellen im jeweiligen Medium wurde zusätzlich ROCK-Inhibitor in der Konzentration $10\mu\text{M}$ täglich dazugegeben. Für die Kultur von TCam-2 verwendeten wir das in der Einleitung beschriebene RPMI-Medium, welches ebenfalls sterilfiltriert wurde. Um den Seminomzellen möglichst ihr Milieu zur Verfügung zu stellen, stellten wir noch ein zusätzlich supplementiertes und ebenfalls sterilfiltriertes RPMI-Medium her.

StemPro hGSC

Zusätze	Konzentration	Ansatz 500ml	
DMEM/F12 +GlutaMAX-I	-	442	ml
STEM PRO hESC Supplement	1:50	10	ml
N2 Supplement	1:100	5	ml
D+ Glucose	6mg/ml	5	ml
BSA	$5\mu\text{g/ml}$	25	μl
L-Glutamine	1%	5	ml
β -Mercaptoethanol	0,1%	1	ml
Pen/Strep	1%	5	ml
MEM Vitamine	1%	5	ml
NEAA (100x)	1:100	5	ml
Estradiol	30ng/ml	15	μl
Progesteron	60ng/ml	30	μl
EGF	20ng/ml	62,5	μl
bFGF	10ng/ml	62,5	μl
GDNF	8ng/ml	1	ml
ESC FBS	1%	5	ml
Ascorbic Acid	$100\mu\text{g/ml}$	2,5	ml
Pyruvic Acid	$30\mu\text{g/ml}$	11,8	μl
DL-Lactic Acid	$1\mu\text{l/ml}$	500	μl

Tabelle 2.2: Materialien zur Zellkultur

Name	Firma	Katalognummer
PureCell NU-5100 Under Counter Direct Heat CO2 Incubator	NuAire	-
Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fisher Scientific	-
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG	-
DMEM High Glucose 4,5g	PAA Laboratories GmbH	SH30022.01
Collagenase from Clostridium histolyticum Type IV, 440 units/mg solid	Sigma-Aldrich GmbH	C7657
Dispase II from Bacillus polymyxa (neutral protease Grad II)	Roche Diagnostics GmbH	04942078001
10% ESC FBS	Gibco/life technologies	16141-079
1% L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH	M11-004
1% Pen/Strep	PAA Laboratories GmbH	P11010
STEM PRO hESC Supplement	Invitrogen	A100701
N2 Supplement	PAA Laboratories GmbH	F005-004
D+ Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G8644
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	A8806
β -Mercaptoethanol 50mM	Gibco	31350-010.
MEM Vitamine 100x	PAA Laboratories GmbH	N11-002
NEAA	PAA Laboratories GmbH	M11-003
β Estradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	E22592
Progesteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P7556
EGF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	E9644
bFGF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F0291
GDNF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G1777
Ascorbic Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	A4403
Pyruvic Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P1656
DL-Lactic Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	69785
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	VWR	12001-558
ROCK-Inhibitor (Y-27632) dihydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Y0503
Hank's BSS without Ca^{2+} and Mg^{2+}	PAA Laboratories GmbH	H15-010

Die jeweiligen Firmensitze lauten wie folgt:

Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Gibco/life technologies	Carlsbad, California, USA
Invitrogen	Waltham, Massachusetts, USA
NuAire	Plymouth, Minnesota, USA
PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Roche Diagnostics GmbH	Rotkreuz, Schweiz
Sigma-Aldrich GmbH	St.Louis, Missouri, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
VWR	Radnor, Pennsylvania, USA

RPMI-Medium

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	500	ml
10% ESC FBS	50	ml
1% L-Glutamin	5	ml
1% Pen/Strep	5	ml

RPMI-Medium, supplementiert

Zusätze	Konzentration	Ansatz 500ml
RPMI 1640 ohne L-Glutamin		500 ml
10% ESC FBS		50 ml
1% L-Glutamin		5 ml
1% Pen/Strep		5 ml
Estradiol	30ng/ml	15 μ l
Progesteron	60ng/ml	30 μ l
EGF	20ng/ml	62,5 μ l
bFGF	10ng/ml	62,5 μ l
GDNF	8ng/ml	1 ml

Alle aufgeführten Zusätze wurden zusammengegeben und mit einem Flaschenaufsatzfilter (SteriTop-GP, 0,22 μ m, MerckMillipore, Katalog-Nr.: SCGPS05RE) in eine autoklavierte Flasche sterilfiltriert.

2.3 Mediumwechsel

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten in einem Brutschrank bei 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurden die unterschiedlichen Zellen je in ein 5ml Falcon aufgenommen und 5min bei 216g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Je 1ml dieser Zelllösung wurde in ein Well der 6-Well-Platte gegeben, in dem schon 1ml Medium vorgelegt war.

Während der Kultur in den jeweiligen Medien wurde täglich mikroskopiert (Nikon Eclipse TS100) und alle 2 Tage fotografiert (Kamera: PixeLink PL-A662). Dazu wurden immer die gleichen Voreinstellungen vorgenommen, um die Fotografien vergleichbar zu machen.

2.4 Lyse

Damit das Expressionsmuster der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt analysiert werden konnte, wurden sie alle zwei Tage zum Zeitpunkt der Fotografie in Lysispuffer aufgenommen. Dieser zerstört die Zelle, um die RNA für die weiteren Untersuchungen zu isolieren. Dazu mussten unter dem Abzug 70 μ l β -Mercaptoethanol zu 7ml RLT-Puffer aus dem RNA-Easy Extraction Kit von Qiagen gegeben werden. Davon wurden dann je 125 μ l zu den Zellen gegeben und danach so viel zugefügt, bis sich keine Schlieren mehr bildeten.

Lysispuffer

RLT-Puffer	7	ml
β -Mercaptoethanol	70	μ l

Dieser wurde im Kühlschrank bei 4 °C für max. 1 Monat aufbewahrt.

2.5 Auftauen

Um eingefrorene Zellen aufzutauen, was bei der Linie TCam-2 der Fall war, wurden 10ml des entsprechenden Kulturmediums in ein Falcon vorgelegt. Die entsprechende Zelllinie wurde aus dem -80 °C-Gefrierschrank auf der Hand im 37°C Wasserbad 3-5min aufgetaut, allerdings nicht zu lange, um die Zellen möglichst kurz im Einfriermedium zu belassen. Nach dem Überführen in das Falcon mit Kulturmedium wurden sie daraufhin 5min bei 216g zentrifugiert, währenddessen wurden die Kulturschalen vorbereitet. Aus dem Falcon wurde nun der Überstand abgesaugt, das Pellet in vorgewärmtem Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Kulturplatten verteilt.

2.6 Einfrieren

Um die Zellen wie beispielsweise TCam-2 nach dem Einfrieren ohne größere Schäden wieder auftauen und in Kultur nehmen zu können, wurde ein Einfriermedium hergestellt. Dieses bestand aus 8ml FBS, welches vorgewärmt wurde, und 2ml DMSO. Die beiden Flüssigkeiten wurden in einem Spritzenfilter von Millipore (Millex 0,22µm Porengröße, Katalog-Nr. SLGPM33RS, MerckMillipore KGaA, Darmstadt, Germany) sterilfiltriert. Davon wurde 1ml zum entsprechenden Zellpellet gegeben, wozu noch 1ml DMEM/Ham's F12 hinzugefügt wurde. Vorher wurde mit den Zellen wie beim Mediumwechsel vorgegangen, nur ohne die Resuspension im Medium durchzuführen. Dieses Gemisch wurde nun schonend zuerst auf -20°C und darauffolgend schließlich auf -80°C abgekühlt.

2.7 Magnetic Cell Sorting (MACS)

Tabelle 2.3: Materialien für MACS

Name	Firma	Bestellnummer
MiniMACS Separator	Miltenyi	130-042-102
MACS MultiStand	Miltenyi	130-042-303
MS Columns plus tubes	Miltenyi	130-041-301
CD45 microbeads, human	Miltenyi	130-045-801
PBS 1x	PAA Laboratories GmbH	H15-002
2mM EDTA	Biochrom	L2113

Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

Herstellung MACS-Puffer

Es wurden 1,25g BSA in 20-30ml PBS mithilfe eines Rührfisches im Messbecher gelöst. Diese Lösung wurde mithilfe eines grünen Millex-Spritzenfilters (Filtergröße $0,22\mu\text{m}$, MerckMillipore, Katalog-Nr.:SLGPM33RS) zu 5ml einer 100mM EDTA-Lösung steril in eine 250ml Flasche filtriert und mit 1x PBS auf 250ml aufgefüllt.

Durchführung MACS

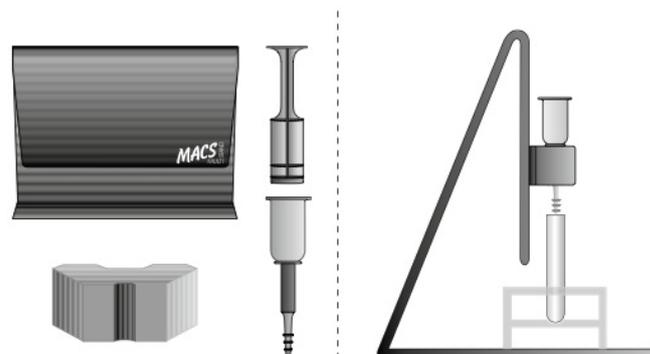


Abbildung 2.1: Aufbau des MiniMACS-Separators mit MS Columns

Das Aussortieren der CD 45-positiven Zellen fand jeweils direkt am Tag nach der Inkulturnahme statt. Dafür wurde unter der Clean Bench der Aufbau entsprechend Abbildung 2.1 vorbereitet: Die Säule wurde im Magnet platziert, ein Collection Tube zum Auffangen des Durchflusses musste darunter platziert werden. Dazu wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Materialien verwendet. Die Zellzahl der entsprechenden Zellen wurde bestimmt und diese Zellen dann bei 106g 5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zum Waschen in 4ml MACS-Puffer suspendiert und dies dann erneut bei 106g 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und nun das Pellet in 80 μ l Puffer pro 10⁷ Zellen aufgelöst. Von den auf Eis gehaltenen CD45⁺ MicroBeads wurden je 20 μ l pro 10⁷ Zellen hinzugefügt und gut vermischt sowie 25min auf Eis inkubiert (hier geschieht das bead-binding). Durch Hinzufügen von 1-2ml MACS-Puffer pro 10⁷ wurden die Zellen gewaschen und daraufhin bei 200g für 10min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurden bis zu 10⁸ Zellen in je 500 μ l Puffer resuspendiert. Um die Säule einmal mit MACS-Puffer zu sättigen, wurde diese mit 500 μ l MACS-Puffer einmal durchgespült. Jetzt konnte die Zellsuspension auf die Säule gegeben werden. Im Durchfluss befanden sich die unmarkierten, also gesuchten Zellen. Die Säule wurde durch dreimaliges Hinzufügen von je 500 μ l MACS-Puffer ausgewaschen. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 216 5min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und verworfen und das Pellet im entsprechenden Kulturmedium gelöst.

2.8 RNA-Isolation

Tabelle 2.4: Materialien RNA-Isolation, cDNA Umschrieb

Name	Firma	Katalognummer
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
RNase free DNase Set	Qiagen	79254
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	04897030001

Roche

Indianapolis, USA

Qiagen

Venlo, Niederlande

Zur Extraktion von RNA wurden die für die Untersuchung schon zu früheren Zeitpunkten in Lysispuffer abgestoppt und eingefrorenen Zellen aufgetaut. Mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen wurde wie folgt vorgegangen:

Zuerst wurde zu den Zellen das gleiche Volumen an 70% Ethanol dazugegeben, also 125 μ l. Mit einer Spritze wurden die Zellen homogenisiert, auf die Säule überführt und bei 9500g 15sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. 350 μ l RW1-Puffer wurden auf die Säule gegeben und bei 9500g 15sec zentrifugiert, der Durchfluss wiederum verworfen. Für einen DNase Verdau wurden 80 μ l DNase im entsprechenden Reaktionspuffer auf die Säule gegeben und 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das DNase-Gemisch setzte sich zusammen aus DNase-Pulver plus 550 μ l H₂O. Davon wurden 10 μ l-Aliquots mit 70 μ l Puffer RDD pro Probe verwendet. Im Anschluss wurden 350 μ l RW1-Puffer zu der DNase dazupipettiert und bei 9500g 15sec zentrifugiert, der entstandene Durchfluss wurde mitsamt Collection tube verworfen. Die Säule musste nun in ein neues Collection tube gestellt werden und es wurden 500 μ l RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Erneut wurde bei 9500g 15sec zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und 500 μ l RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Anschließend wurde 2min bei 9500g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diesmal sollte die Säule trocken nochmals für 15sec bei 9500g zentrifugiert werden. Nun wurde zum RNA-Gewinn aus der Säule diese in ein neues Tube mit Deckel gestellt, direkt auf die Säule 40 μ l RNase freies Wasser gegeben, 1min inkubiert und anschließend 1min bei 9500g zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt RNA, welche bei -80°C bis zur Umschreibung in cDNA aufbewahrt werden konnte.

2.9 cDNA-Umschrieb

Da RNA sehr instabil ist und sich nicht so einfach vervielfältigen lässt wie DNA, muss sie rückübersetzt werden in die sogenannte cDNA, also "copy"-DNA. Dies geschieht mittels eines Enzyms, der reversen Transkriptase, welches in der Natur von Viren benutzt wird, um ihr Genom, welches als RNA vorliegt, für die Wirt-DNA kompatibel zu machen. Die cDNA unterscheidet sich von der genomischen DNA durch das Fehlen der Exons, also der nicht kodierenden Bereiche, da diese bei der zellulären Transkription herausgeschnitten wurden. Die RNA enthält also nur die Information der Introns, der für Proteine codierenden DNA. Außerdem werden Primer, also "Anfangsstücke" benötigt, an welche diese Reverse Transkriptase binden kann und dort die Reaktion starten, in diesem Fall wurden Random

Hexamer-Primer verwendet. Wie der Name schon sagt, bestehen sie aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden. Diese können dann wiederum an viele verschiedene RNA-Stellen binden.

Zur Umschreibung wurde das Roche Transcriptor First Strand cDNA-Synthesis-Kit verwendet und daraus ein Mastermix wie folgt hergestellt:

Reverse Transkriptase	0.25	μ l
5-fach Puffer	2	μ l
Randomprimer	1	μ l
dNTPs	1	μ l
RNAse Inhibitor	0.25	μ l
H2O	0.5	μ l
	5	μ l Ansatz

Dazu wurden je 5 μ l der RNA gegeben, welche man davor kurz vortexen und wieder abzentrifugieren sollte. Außerdem wurde mit einer im Kit vorhandenen Kontroll-RNA eine Positivkontrolle durchgeführt. Dieses Gemisch wurde nun in einem Thermocycler (StepOnePlusTM, Applied Biosystems, California, USA, Katalog-Nr.: 4376599) auf die für den jeweiligen Reaktionsschritt optimalen Temperaturen erwärmt:

- 1. Step: 25°C für 10min. Das Annealing der Primer findet statt.
- 2. Step: 50°C für 60min. Bei dieser Temperatur hat die Reverse Transkriptase ihr Optimum. Da eine Länge von über 4 Kilobasenpaaren erwartet wurde, wurde diese Reaktionslänge wie im Protokoll beschrieben angepasst.
- 3. Step: 85°C für 5min. Hierbei wird das Enzym deaktiviert und damit die Reaktion gestoppt.

2.10 RT-qPCR

Um bewerten zu können, welche Gene in den Zellen mehr oder weniger exprimiert werden, müssen die Genprodukte in Form der in cDNA umgeschriebenen RNA vervielfältigt und so sichtbar gemacht werden. Diese Vervielfältigung geschieht im PCR-Reaktionsansatz durch eine DNA-Polymerase, die eine einzelsträngige DNA

als Matrize komplementär abschreiben und so wieder doppelsträngige DNA herstellen kann. Auch die dafür benötigten Primer, also die Anfangsstücke, die die Polymerase zur Initiation benötigt, sowie die Nukleotide, die komplementär zum Matrizenstrang nach dem Prinzip der Basenpaarung im neu synthetisierten Strang eingebaut werden, sind enthalten. Die hier verwendete real-time quantitative PCR benutzt gleichzeitig noch eine Sonde oder einen Farbstoff dazu, die Menge der gebildeten Amplifikate während der Vervielfältigung zu messen. Dies hat den Vorteil gegenüber der konventionellen PCR, dass die Anfangskonzentration der Nukleinsäure bestimmt werden kann. Dabei generiert das Instrument in der exponentiellen Phase der Reaktion verschiedene Ergebnisse: zum einen den "Threshold", also Schwellenwert, welcher genau dem Detektionsausmaß entspricht, bei dem die Fluoreszenz die Hintergrundaktivität übersteigt und somit messbar wird. Zum anderen wird der c_t -Wert berechnet, also der PCR-Zyklus, bei dem der "Threshold" erreicht wird. Außerdem wird ein sogenanntes "Housekeeping-Gen", nämlich die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet, um die einzelnen Reaktionsansätze zu normalisieren. Dieses Enzym kommt ubiquitär in allen Zellen vor, da es einen Schritt der Glycolyse katalysiert und kann deshalb als Standardexpressions-Level gewertet werden.

2.10.1 TaqMan-PCR

Methode

Diese Methode hat den Vorteil, dass nur die spezifischen Amplifikationsprodukte gemessen werden. Die benutzte Sonde ist so konstruiert, dass sie am 5'-Ende einen Farbstoff, den "reporter", und am 3'-Ende den "quencher", also Signalunterdrücker, gebunden hat. Letztgenannter sorgt dafür, dass im intakten Zustand das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs unterdrückt wird. Ist nun die Zielsequenz verfügbar, lagert sich die Sonde in die Primerposition ein. Folglich wird die 5' Nuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase ausgenutzt, um den quencher abzuspalten. Dadurch wird nun das Signal des Farbstoffs sichtbar und außerdem löst sich die Sonde von ihrer Position und ermöglicht den Elongationsprozess durch die Polymerase. Der beschriebene Prozess geschieht bei jedem Amplifikationszyklus und deshalb erhöht sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur generierten Produktmenge.

Material

Tabelle 2.5: Materialien PCR

Name	Firma	Katalog-Nr.
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	AB	4346906
MicroAmp Optical adhesive cover	AB	4360954
TaqMan Gene Expression Master Mix	AB	4369016
GAPDH Probe dye FAM-GB	AB	4352934
cKit	AB	Hs00174029_m1
PLAP	AB	Hs03046558_s1
H ₂ O ultra pure	Biochrom AG	L0015

AB = Applied Biosystems, Foster City, California, USA

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Der Zusatz _m1 bedeutet hier, dass das entstehende Amplifikat sich über mehrere Exons erstreckt. _s1 heißt, dass sowohl die Primer als auch das Amplifikat sich innerhalb eines einzelnen Exons befinden.

Durchführung

Zuerst wurden die 10 μ l cDNA mit 20 μ l ultrapurem Wasser verdünnt, also im Verhältnis 1:3. Außerdem sollte eine relative Standardkurve erstellt werden, die aus einem Gemisch aller cDNA hergestellt wurde und dann jeweils 1:5 verdünnt, so dass eine Verdünnungsreihe mit 1:1, 1:5, 1:25 und 1:125-Verhältnissen erstellt wurde. Für jeden verwendeten Primer wurde ein Mastermix-Gemisch hergestellt, welches sich pro Ansatz wie folgt zusammensetzte und entsprechend hochgerechnet wurde (Materialien siehe Tabelle2.5).

Tabelle 2.6: TaqMan Mastermix

TaqMan Mastermix 2x	5 μ l
Primer	0,5 μ l
H ₂ O	2,5 μ l

Diese 8 μ l pro Ansatz wurden anschließend auf die 96-Well PCR-Platten verteilt. Je 2 μ l der entsprechenden cDNA wurden hinzugegeben. Außerdem wurden pro

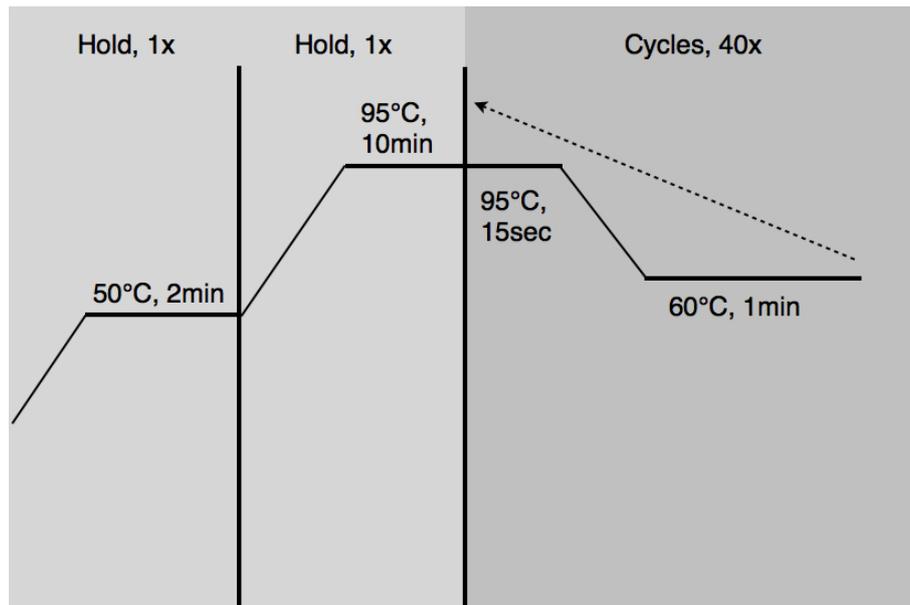


Abbildung 2.2: PCR-Programm, Quelle: eigenes Bild

Primer noch No-Template-Kontrollen durchgeführt, also ohne cDNA, stattdessen mit hochreinem Wasser. Diese stellen eine Negativkontrolle dar, Positivkontrollen wurden erzielt mit der Kontroll-cDNA, die wiederum die Positivkontrolle beim RNA-Umschrieb war. Um eine Verunreinigung der RNA mit cDNA auszuschließen, wurde außerdem mit dieser und GAPDH eine Kontrolle durchgeführt. Außerdem wurden zur Qualitätssicherung immer Duplikate von jedem Ansatz erzeugt. Befanden sich nun alle zu pipettierenden Reaktionsansätze auf der Platte, wurde diese gründlich mit dem durchsichtigen Optical Adhesive Cover (siehe Tabelle 2.5) verschlossen und anschließend in der dafür geeigneten Zentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 1 min bei 180g zentrifugiert. Die 96-Well Platte wurde nun vorsichtig in das PCR-Gerät gestellt (StepOnePlusTM, Applied Biosystems, California, USA, Katalog-Nr.: 4376599) und das Programm gestartet. Für das Experiment wurde eine Hot-Start-DNA-Polymerase verwendet, die bei Raumtemperatur nicht aktiviert wird. Sie stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq), welches in Geysiren vorkommt und deshalb hitzestabil ist. Der verwendete Mastermix (siehe Tabelle 2.5) enthielt außerdem Uracil-DNA Glycosylase (UDG).

Zu Beginn der Reaktion erfolgte, wie in Abbildung 2.2 aufgezeigt, ein einmaliges Erhitzen über 2min auf 50°C, um eine optimale Enzymaktivität der UDG zu erreichen. Danach erfolgte die Enzym-Aktivierung der Polymerase, was durch weiteres Erhitzen auf 95°C über 10min geschah. Dies stellt den sogenannten Hot Start der Taq-Polymerase dar. Direkt danach konnten die "cycles", also die PCR-Zyklen

beginnen: Dabei werden folgende Schritte, wie in Abbildung 2.2 dargestellt, 40x wiederholt: Zuerst das Denaturieren der Doppelstränge für 15sec bei 95°C und daraufhin Annealing und Elongation über 1min bei 60°C. Für die PCRs des Zeitpunktes "Tag 2" wurden 40 Zyklen durchgeführt, die Zeitpunkte "Tag 4" und "Tag 6" 45 Zyklen, da hier von einer geringen cDNA-Menge aufgrund niedriger Zellzahl in den entsprechenden Kulturen ausgegangen wurde.

2.10.2 SYBR-Green-PCR

Im Gegensatz zu TaqMan-PCR ist hier die Einlagerung des Farbstoffes unspezifisch in doppelsträngige DNA. Dies geschieht sofort beim Zugeben von SYBR-Green zu der Probe. Beim Denaturieren der Doppelstränge löst sich der Farbstoff von der DNA, um sich bei der Amplifikation wieder in die neu entstandenen DNA-Doppelstränge einzulagern. Dies geschieht proportional zur Menge an Doppelsträngen, das heißt das Fluoreszenzsignal kann direkt mit der Zunahme der Amplifikationsprodukte korreliert werden.

Auch hier wird ein Mastermix für die jeweiligen Primer angefertigt, wie in Tabelle 2.7 aufgezeigt. Dafür wurde das QuantiFast SYBR Green PCR Kit von Qiagen, Katalog-Nr. 204054 verwendet.

Tabelle 2.7: SYBR-Green Mastermix

SYBR-Green 2x	5 μ l
Primer forward	0,5 μ l
Primer reverse	0,5 μ l
H ₂ O	2 μ l

Es wurden selbst konstruierte Primer von Metabion (Planegg, Deutschland) verwendet mit den folgenden Sequenzen:

GAPDH forward	5' GTT CGA CAG TCA GCC GCA TC 3'
GAPDH reverse	5' GAA CAT GTA AAC CAT GTA GTT 3'
CD45 forward	5' GCA TTT GGC TTT GCC TTT CTG GACA 3'
CD45 reverse	5' CAG TGG GGG AAG GTG TTG GGC TTT 3'

Es wurde dieselbe Vorgehensweise wie für die TaqMan-PCRs gewählt, die Temperaturen beim PCR-Programm (siehe Abbildung 2.2) unterschieden sich nur im Anfangsschritt von 50°C, dieser entfiel hier.

2.11 Auswertung

Zur Auswertung der PCR-Daten wurde die Δc_t -Methode verwendet, bei der GAPDH als Housekeeping-Gen den Standard darstellte und von den c_t -Werten der jeweils getesteten Gene, also CD45, cKIT und PLAP, abgezogen wurde. Dann wurden die zu vergleichenden Daten in Schaubildern gegenübergestellt, wozu GraphPad Prism Version 7.0a für Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) verwendet wurde. Als statistischer Test wurde ein einfacher ANOVA ebenfalls mithilfe der Prism-Software durchgeführt, als signifikant wurden p-Werte < 0,05 gewertet.

3 Ergebnisse

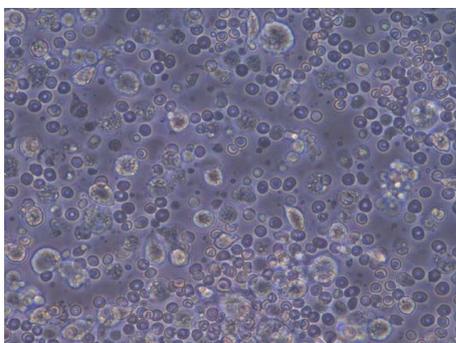
3.1 Kultur

Zur Auswertung gelangten die Zellen von Tumor 301 und Tumor Diak.

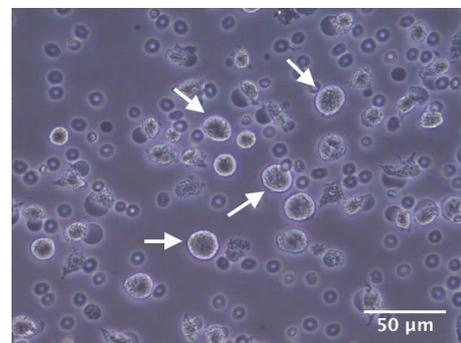
Die Zellen wurden in Kultur beobachtet. Sie wurden fotografiert nach der Inkulturnahme, vor und nach dem Magnetic Cell Sorting und an Tag 2, 4 und 6 nach MACS. An diesen Tagen wurde auch je ein Well in Lysispuffer zur späteren Auswertung mit Real-Time quantitativer PCR weggefroren. So konnten die einzelnen Bilder direkt mit der PCR korreliert werden. Dabei wurden immer mehrere Fotos gemacht, von denen beispielhaft je eines in den Abbildungen 3.3 bis 3.10 herausgegriffen ist.

Der Erfolg des MACS konnte mikroskopisch direkt überprüft werden. Der direkte Vergleich ist am Beispiel von Tumor Diak in Abbildung 3.1 und 3.2 dargestellt.

Die Zellpopulation wurde nach dem MACS homogener und es kristallisierte sich heraus, wie das Aussehen der Seminomzellen in Kultur war, ohne dass sie adhären wie TCam-2 wuchsen. Die runden leuchtenden, etwas größeren Zellen wurden angereichert. Einige von ihnen sind in Abbildung 3.1 und 3.2 je (b) mit Pfeilen markiert.

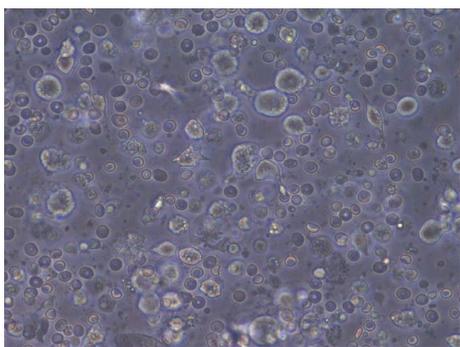


(a) Tu Diak in RPMI vor MACS

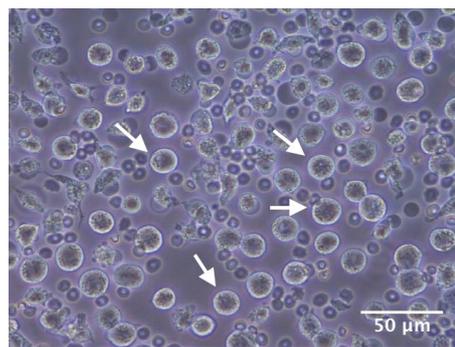


(b) Tu Diak in RPMI nach MACS

Abbildung 3.1: MACS: vorher (a) und hinterher (b) in Kulturmedium RPMI, potentielle Seminomzellen wurden mit Pfeilen markiert.



(a) Tu Diak in StemPro vor MACS

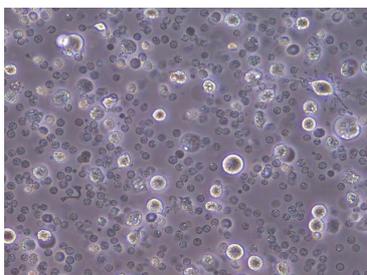


(b) Tu Diak in StemPro nach MACS

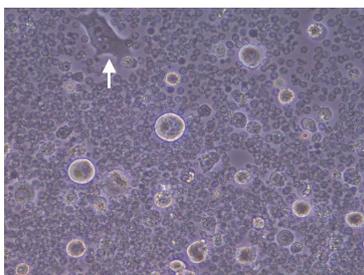
Abbildung 3.2: MACS: vorher (a) und hinterher (b) in Kulturmedium StemPro, potentielle Seminomzellen wurden mit Pfeilen markiert.

3.1.1 Tumor 301

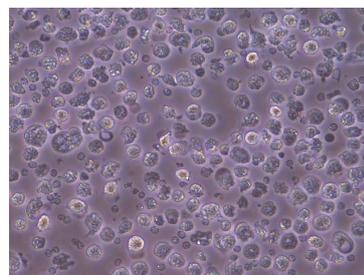
Alle folgenden Bilder der Zellkultur zeigen jeweils vergleichend Zellen in einem Medium über mehrere Tage je ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) CD45-positiven Zellen. Die Zellen der oberen Bildreihe wurden also mithilfe des MACS sortiert.



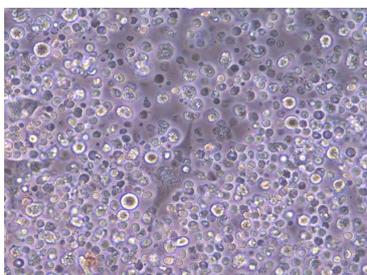
(a) Tag 2-CD45



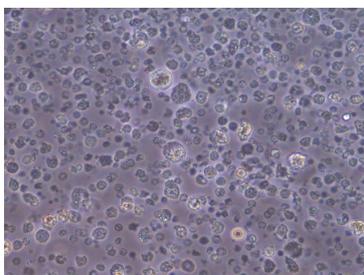
(b) Tag 4-CD45



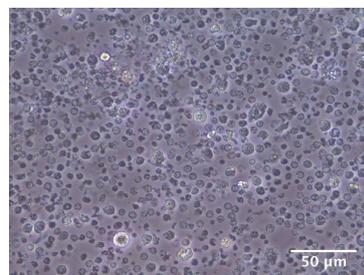
(c) Tag 6-CD45



(d) Tag 2+CD45



(e) Tag 4+CD45



(f) Tag 6+CD45

Abbildung 3.3: Tumor 301 StemPro + Y27632, 400x. Eine adhären wachsende Zelle ist beispielhaft in Abbildung (b) markiert.

Es wurde eine größere Zellzahl in den nicht mit MACS sortierten Zellen beobachtet. Über die Zeit kann man das Absterben beobachten, zuerst das der Erythrozyten. Die Zellen waren zum überwiegenden Teil nicht adhären wie die bestehende Seminomlinie TCam-2.

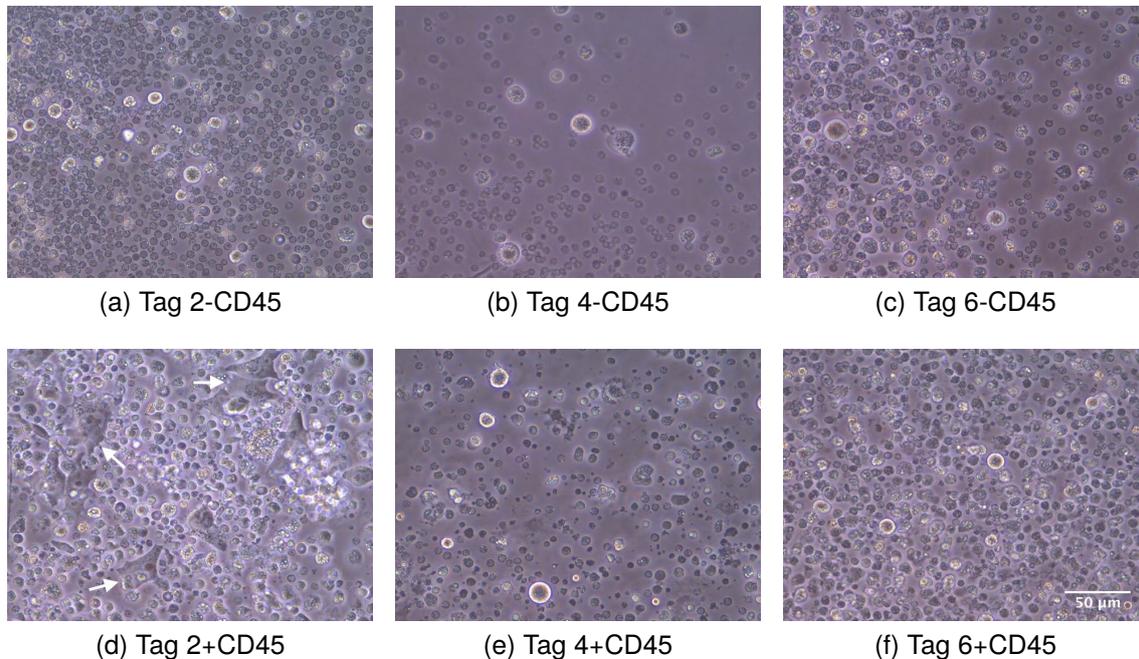


Abbildung 3.4: Tumor 301 StemPro - Y27632, 400x. Die Pfeile zeigen mehrere adhären Zellen in Abbildung (d).

Hier konnten verschiedene Zelltypen beobachtet werden: Zum einen erkennt man wieder die leuchtenden runden Zellen wie in Abbildung 3.3 beschrieben, und zwar deutlicher in (a) als in (d), die wir hier mit Seminomzellen gleichsetzen. Diese nahmen im zeitlichen Verlauf bis zu Tag 6 jedoch stark ab.

Außerdem sah man sehr viele Erythrozyten, die durch die Eindellung im Zentrum charakterisiert werden können und die -wohl durch das eher saure pH-Milieu des Mediums- Stechapfelformen bildeten und bei Tag 4 (je (b) und (e) in Abbildung 3.3 und 3.4) großteils abgestorben waren. Sie konnten auch durch die Zentrifugationsschritte bei der Inkulturnahme und beim Mediumwechsel nicht vollständig entfernt werden. Zudem konnte das Vorhandensein der größeren runden Zellen beobachtet werden, die ab Tag 4 abzunehmen schienen.

Auffällig ist außerdem, dass das überwiegende Wachstumsmuster der Zellen nicht adhären war, wie dies bei TCam-2 der Fall ist. Nichtsdestotrotz setzten sich teils adhären Zellen ab (siehe 3.3, (b) und 3.4, (d). Sie wurden je mit Pfeilen markiert.) Diese konnten sowohl in den MACS-sortierten als auch unsortierten Wells

beobachtet werden. Zudem fiel auf, dass der ROCK-Inhibitor je keinen offensichtlichen Überlebensvorteil brachte; zumindest, was in der Mikroskopie beobachtet werden konnte.

Um diese Frage definitiv zu klären, wurden PCRs mit den entsprechenden Markern durchgeführt (siehe unten).

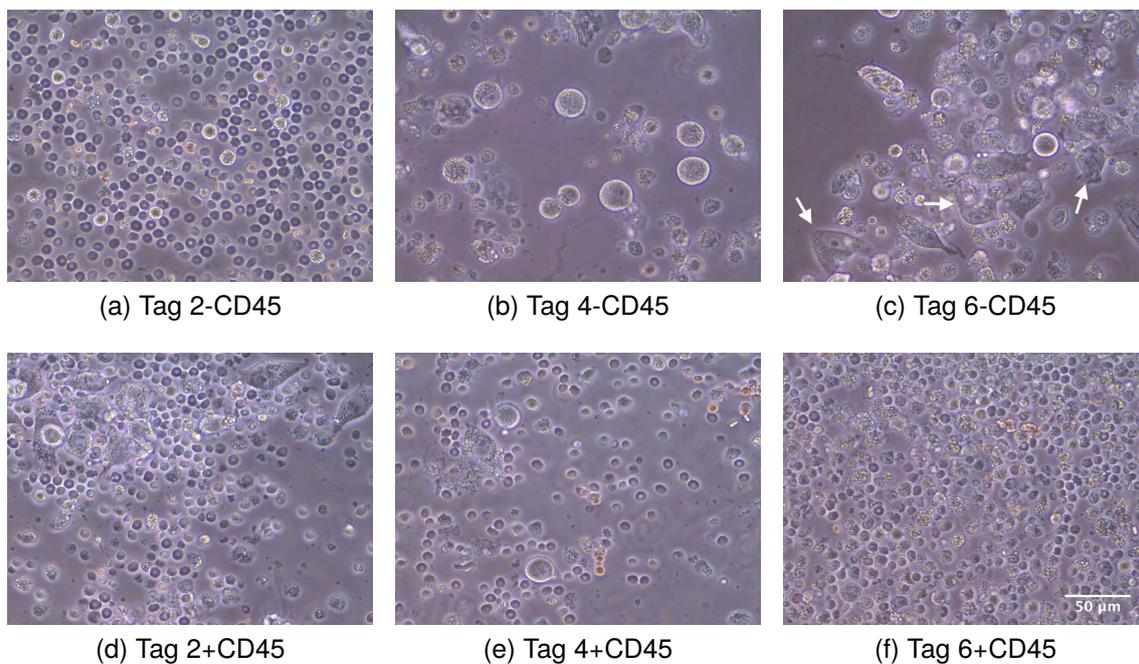


Abbildung 3.5: Tumor 301 RPMI + Y27632, 400x. Die Pfeilmarkierung zeigt adhärenente Zellen.

Die gleichen Zelltypen, wie weiter oben im StemPro beschrieben, konnten auch in RPMI-Medium beobachtet werden, wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist. Als Unterschied können hier mehr intakte Erythrozyten, teilweise in Stapelform vorliegend, beobachtet werden, diese haben also im RPMI das für sie bessere Milieu vorliegen. Es ist des Weiteren eine vermehrte Persistenz von Lymphozyten, vor allem an Tag 6 der nicht MACS-Zellen zu beobachten. Diese leben und sind intakt. Außerdem sammelt sich eine größer werdende Menge an granulärem Zellschrott am Boden der Wells. An Tag 6 fallen bei den mit MACS behandelten Kulturen (Abbildung 3.5 (c)) besonders viele adhärenente Zellen auf. Diese wurden mit einem Pfeil markiert.

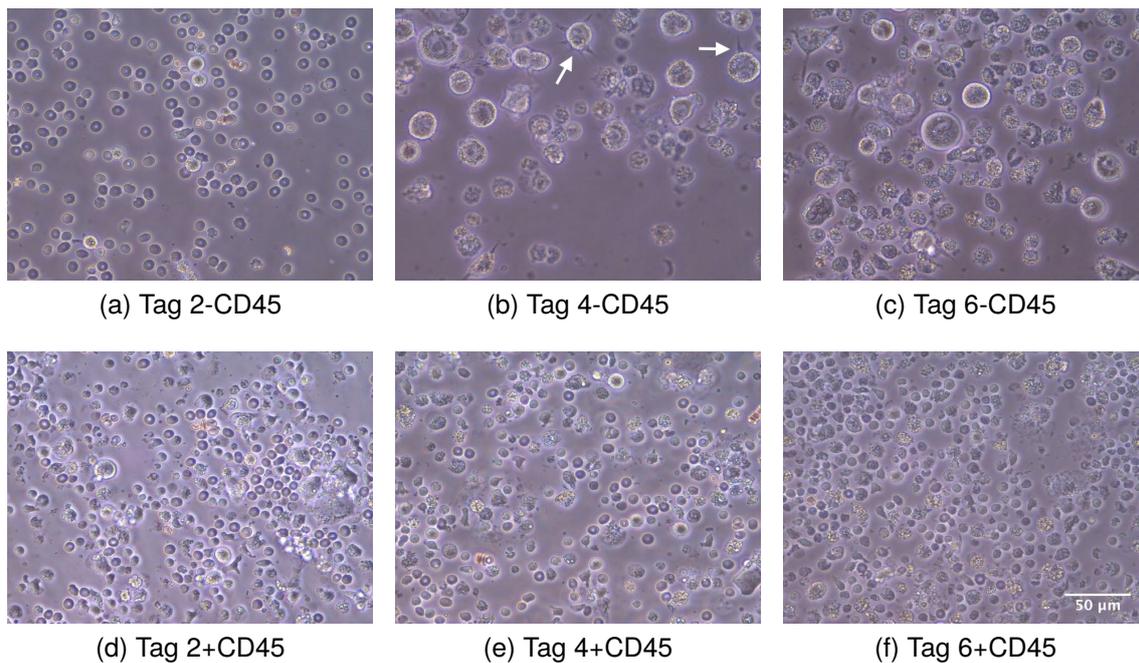


Abbildung 3.6: Tumor 301 RPMI - Y27632, 400x. Die Pfeile markieren Zellen mit Ausläufern.

Bei den Zellen von Tumor 301 in RPMI-Medium ohne Zusatz von Y27632 ist interessanterweise an den großen runden Zellen an Tag 4 (Abbildung 3.6 (b)) eine Ausbildung von Ausläufern zu beobachten (siehe Pfeil), die bei den anderen in dieser Form noch nicht zu sehen waren. Sie besitzen außerdem ein granuliertes Zytoplasma mit sichtbarem Zellkern. Auffällig ist auch, dass sie nur bei den MACS-sortierten Zellen vorkommen. Auch die unterschiedliche Anzahl an Lymphozyten zwischen der MACS-Population (Abbildung (a)-(c)) und der ohne MACS ist gut zu erkennen.

3.1.2 TuDiak

Verglichen mit Tu 301 war für den Tumor Diak besonders eine größere Anzahl an größeren leuchtenden runden Zellen, am ehesten Seminomzellen, auffällig. Diese hatten im Vergleich zu Tumor 301 länger Bestand, in allen Kulturbildern von Tag 6 (je (c) und (f) in Abbildung 3.7 und 3.8) sind sie zu sehen. Dafür konnte hier nur sehr vereinzelt die Ausbildung von adhärenenten Zellen beobachtet werden, wie beispielsweise in Abb. 3.7 (a). Außerdem haben wir hier in einer Momentaufnahme dargestellt, wie sich eine der großen Zellen vermutlich gerade am Boden abgesetzt und in adhärenentes Wachstum übergegangen ist (siehe Pfeil).

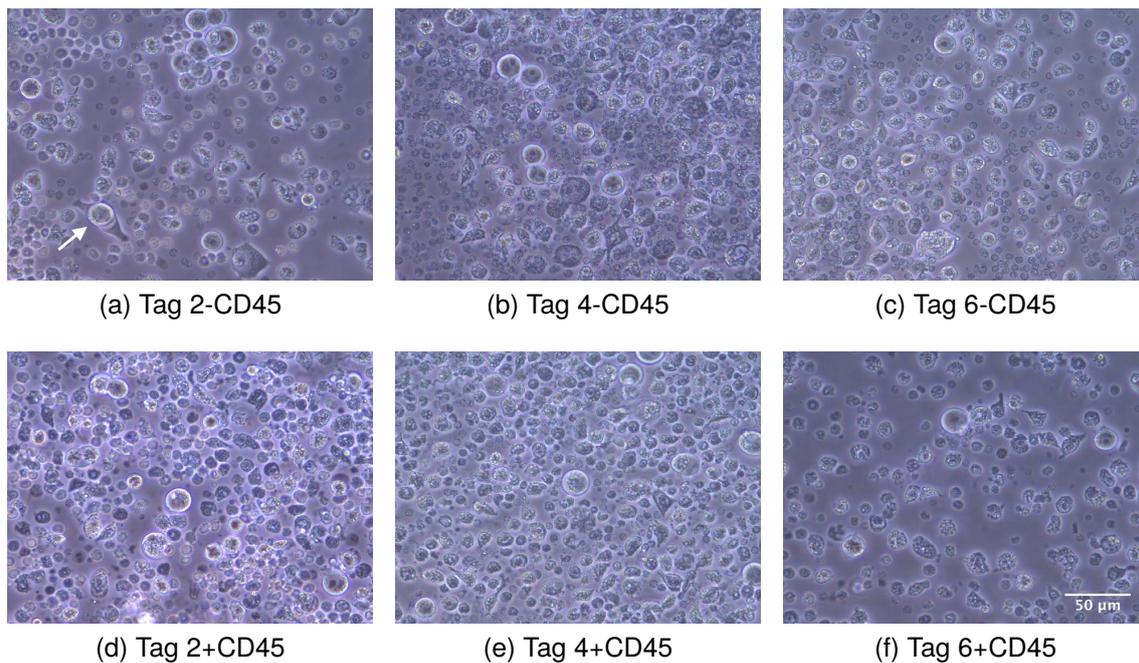


Abbildung 3.7: Tumor Diak StemPro + Y27632. In (a) ist eine Zelle abgebildet, die sich im Moment der Aufnahme absetzt und adhärenz wird.

Die mikroskopische Beobachtung von Tumor Diak in StemPro ohne ROCK-Inhibitor (siehe Abbildung 3.8) zeigt besonders an Tag 4 der MACS-sortierten Zellen (Abbildung (b)) besonders viele leuchtende runde, also am ehesten Seminomzellen, verglichen mit den entsprechenden unsortierten Zellen (e). Auch die Homogenität der Kultur ist hier erneut ersichtlich: verglichen mit Abbildung (e) sind in (b) weniger Lymphozyten zu sehen, was sich über die gesamte Zeit beobachten lässt. Außerdem zeigen die Zellen in Abbildung 3.8, die MACS unterzogen wurden, im Vergleich zu den unsortierten mehr Zellschrott an Tag 4 und 6. An Tag 4 sind in Abbildung (b) die einzigen Zellen, die noch intakt scheinen, die leuchtenden Seminomzellen.

Die Ausbildung von Adhärenz lässt sich spärlich beobachten, eine Zelle in Abbildung (a) wurde mit einem Pfeil markiert. Zu späteren Zeitpunkten sind hier wie auch in Abbildung 3.7 keine adhärenz Zellen zu sehen.

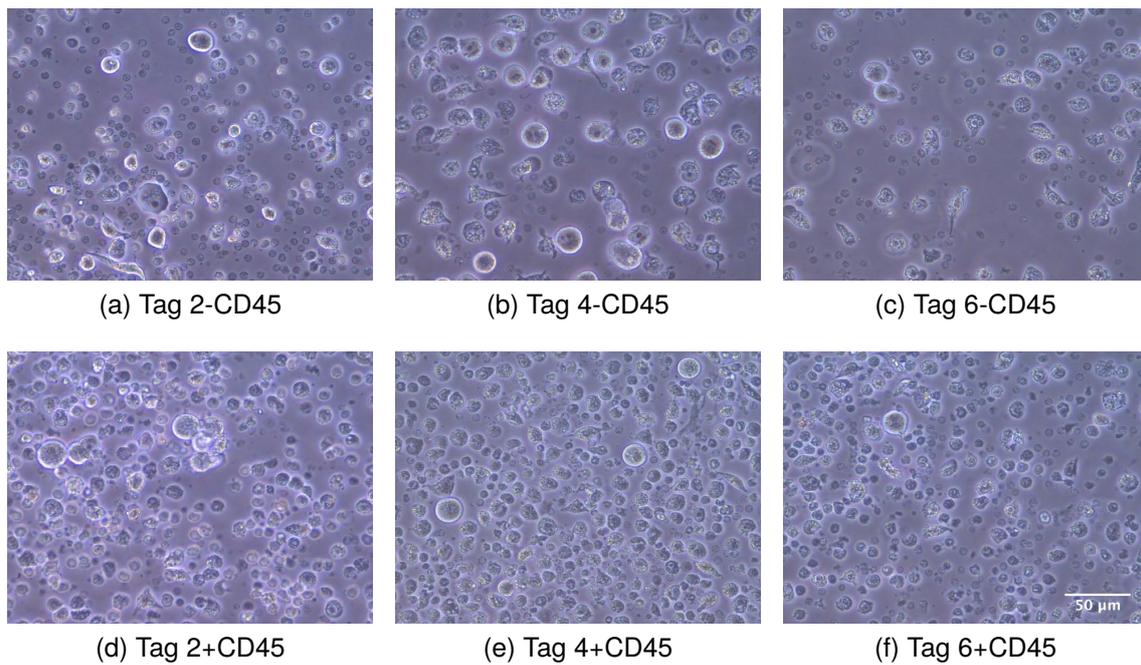


Abbildung 3.8: Tumor Diak StemPro - Y27632

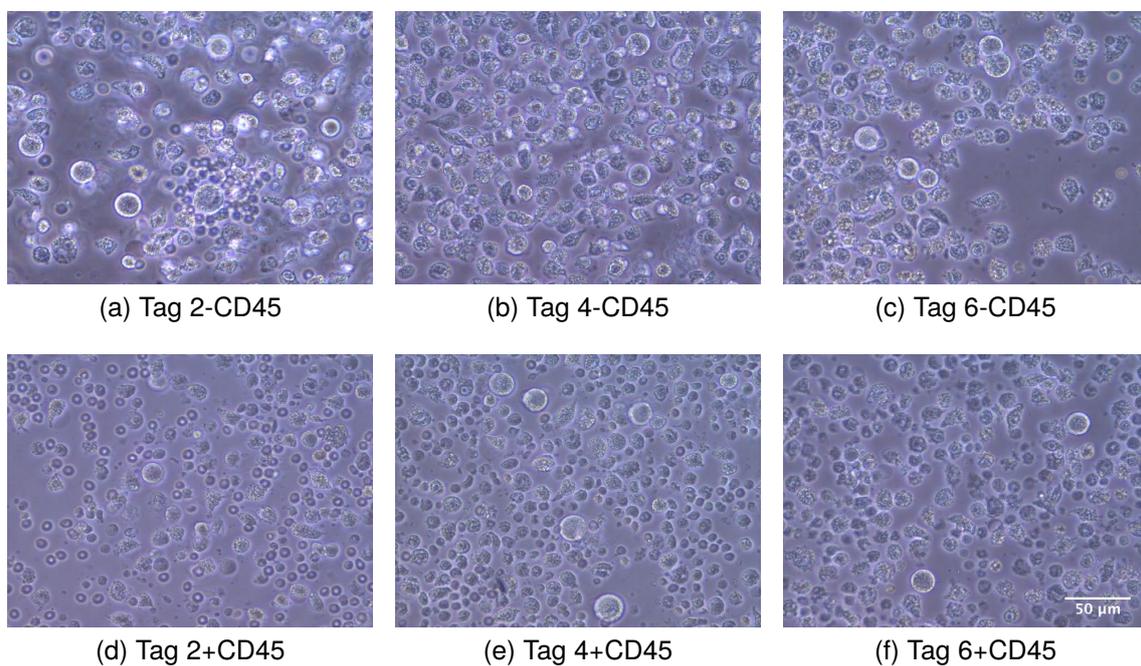


Abbildung 3.9: Tumor Diak RPMI + Y27632

In Abbildung 3.9 sind bei den unsortierten Zellen (also (d)-(f)) wieder mehr Lymphozyten zu sehen, aber auch Erythrozyten sind viele vorhanden. Die MACS-sortierte Zellpopulation scheint im RPMI inhomogener als im StemPro. In allen Bil-

dem sind leuchtende runde Zellen zu erkennen, allerdings in der MACS-sortierten Fraktion an Tag 6 (Abbildung (c)) noch mehr als bei den unsortierten Zellen am entsprechenden Tag.

Im Vergleich zu den Y27632-supplementierten Zellen (Abbildung 3.9) scheinen in Abbildung 3.10 allgemein weniger Seminomzellen an Tag 4 und Tag 6 vorhanden zu sein. Abbildung (c) zeigt viel Zellschrott, wohingegen bei den unsortierten Zellen am selben Tag (Abbildung (f)) noch deutlich mehr Lymphozyten überlebt haben. Adhärente Zellen konnten hier genau wie in Abbildung 3.9 nicht beobachtet werden.

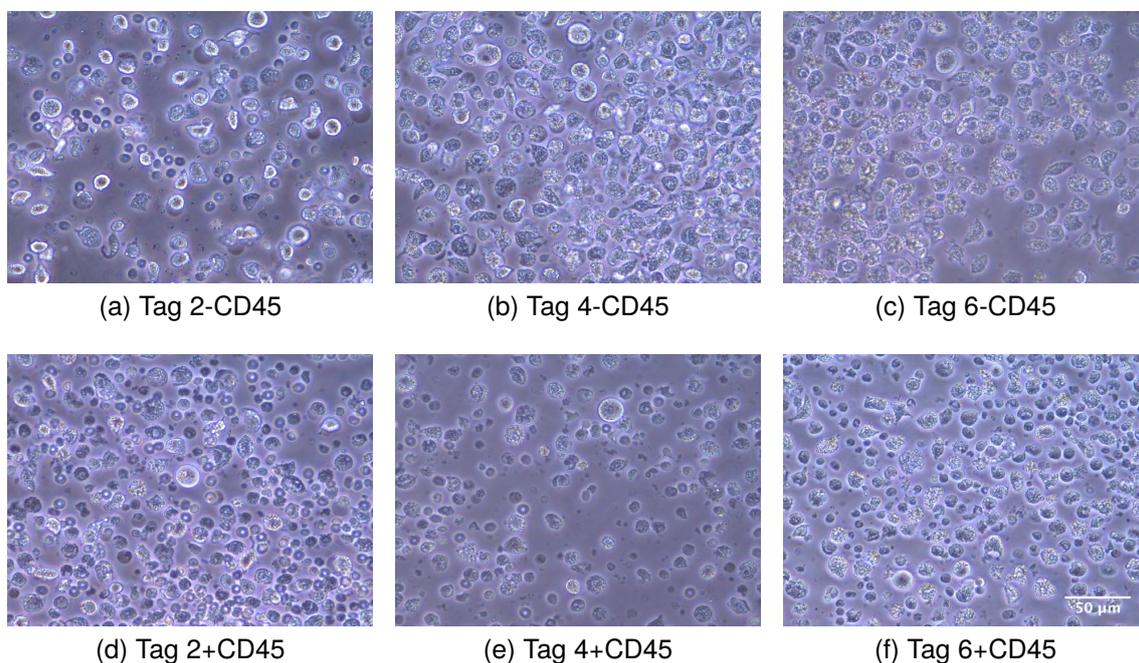
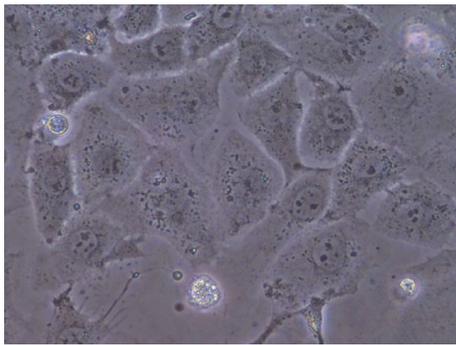


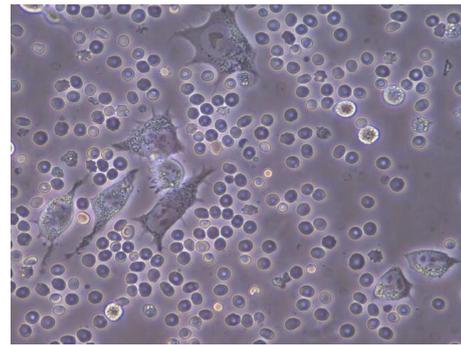
Abbildung 3.10: Tumor Diak RPMI - Y27632

3.1.3 Adhärenz

Im RPMI-Medium wurde teilweise die Entwicklung von adhärennten Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3.5, (c) und (d)), die TCam-2 im Wachstumsmuster stark ähnelten. Sie waren je nach Tumor unterschiedlich oft vorhanden. Zum Vergleich wurde hier ein Bild aus der TCam-2-Kultur mit einem Seminom-Bild gegenübergestellt (siehe Abbildung 3.11).



(a) TCam-2



(b) Tumor 301 - CD45

Abbildung 3.11: Tumor 301: adhärenente Zellen im Vergleich mit TCam-2

Beobachtete man die adhärenente Zellen, entwickelten manche Ausläufer wie Fibroblasten, allerdings ähnelten sie in ihrem Aussehen stark der Seminomlinie TCam-2. Die adhärenente Zellen überlebten im Schnitt gleich lang wie die restliche Kultur, da sie von einigen sich absetzenden Fibroblasten überwuchert wurden.

3.1.4 Überlebensdauer

Die Überlebensdauer der Seminomzellen war generell unterschiedlich lang. Durchschnittlich betrug die Überlebensdauer sowohl in StemPro als auch RPMI 11,5 Tage, wobei diese auch in Abhängigkeit vom Tumor stark variierte. So überlebten die Seminomzellen von Tumor 301 durchschnittlich 7,5 Tage, bei Tumor Diak hingegen 15,5 Tage.

Vergleicht man die Zellzahl der an Tag 2 (je (a) und (d) in den jeweiligen Abbildungen) mit der direkt nach MACS (siehe Abbildung 3.1 und 3.2, je (b)), so wird deutlich, dass schon an Tag 2 die Zahl der von uns postulierten Seminomzellen deutlich abgenommen hat. Teilweise sind sie in der mit MACS sortierten Population noch häufiger vorhanden. Bei der gemeinsamen Auswertung beider Tumore beobachteten wir eine geringere Anzahl von Erythrozyten in TuDiak. Vergleicht man je die Bilder der mit MACS sortierten mit denen der unsortierten Zellen, ist hier eindeutig ein Unterschied zu erkennen: In den Wells ohne CD45-positive Zellen waren viel weniger Lymphozyten vorhanden. Mikroskopisch konnte also der Erfolg des MACS belegt werden.

Um genau dies auch noch durch eine zweite Methode zu belegen sowie um zu beweisen, dass es sich bei den beschriebenen Zellen um Seminomzellen handelt, führten wir eine RT-qPCR mit Proben der jeweiligen Zeitpunkte durch.

3.2 RT-qPCR

Aus den in der PCR gewonnenen c_t -Werten, also dem Grenzwert, bei dem ein exponentieller Anstieg der Amplifikate beginnt, wurde die Differenz aus dem jeweiligen Gen und dem Housekeeping-Gen gebildet. Dieser sogenannte Δc_t -Wert wurde im Folgenden in Diagrammen aufgetragen. Dabei ist auf der x-Achse der Verlauf über die Zeit dargestellt. Die Fehlerbalken wurden berechnet aus den jeweiligen Einzelbestimmungen der c_t -Werte, um die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert zu veranschaulichen. Zur Signifikanzberechnung wurde ein Two-way ANOVA mithilfe von GraphPad Prism (siehe oben) durchgeführt. Dabei wurden die jeweils einander zugeordneten Durchschnitte der c_t -Wertepaare auf signifikante Unterschiede mit Konfidenzintervall von 95% untersucht, also einem p-Wert von $<0,05$.

3.2.1 MACS versus ohne MACS

Um die Effektivität des MACS zu messen und ob die Sortierung der Zellen über die Zeit in Kultur stabil blieb, wurde eine PCR mit CD45 durchgeführt.

CD45 in Tumor 301

Hier fallen zunächst die negativen Δc_t -Werte ins Auge, die in allen vier Schaubildern in Abbildung 3.12 an Tag 2 und 4 bei den Zellen ohne MACS vorkommen. Dies muss so gedeutet werden, dass CD45 Genprodukte hier häufiger vorkommen als die der GAPDH. Die Zellen mit MACS hingegen haben deutlich größere Δc_t -Werte, was sich von Tag 2 bis in Tag 6 fortsetzt. Am deutlichsten ist dies in RPMI-Medium zu sehen, wo die Δc_t -Werte der Zellen ohne MACS auf dem gleichen niedrigen Niveau stabil blieben, die Anzahl der Lymphozyten scheint hier also konstant.

Die MACS-Zellen weisen im Gegensatz dazu deutlich weniger und im zeitlichen Verlauf sinkende Level an CD45 auf. Unter Auslassen des nicht definierten Wertes (undetermined in (a)), kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne MACS sowohl in StemPro ($p=0,0016$) als auch RPMI ($p=0,0001$) errechnet werden. Dort, wo "undetermined" im Schaubild anstelle eines Balkens aufgetragen ist, wurde in der PCR in beiden Ansätzen kein Wert gemessen, CD45 ist also unterhalb der Nachweisgrenze.

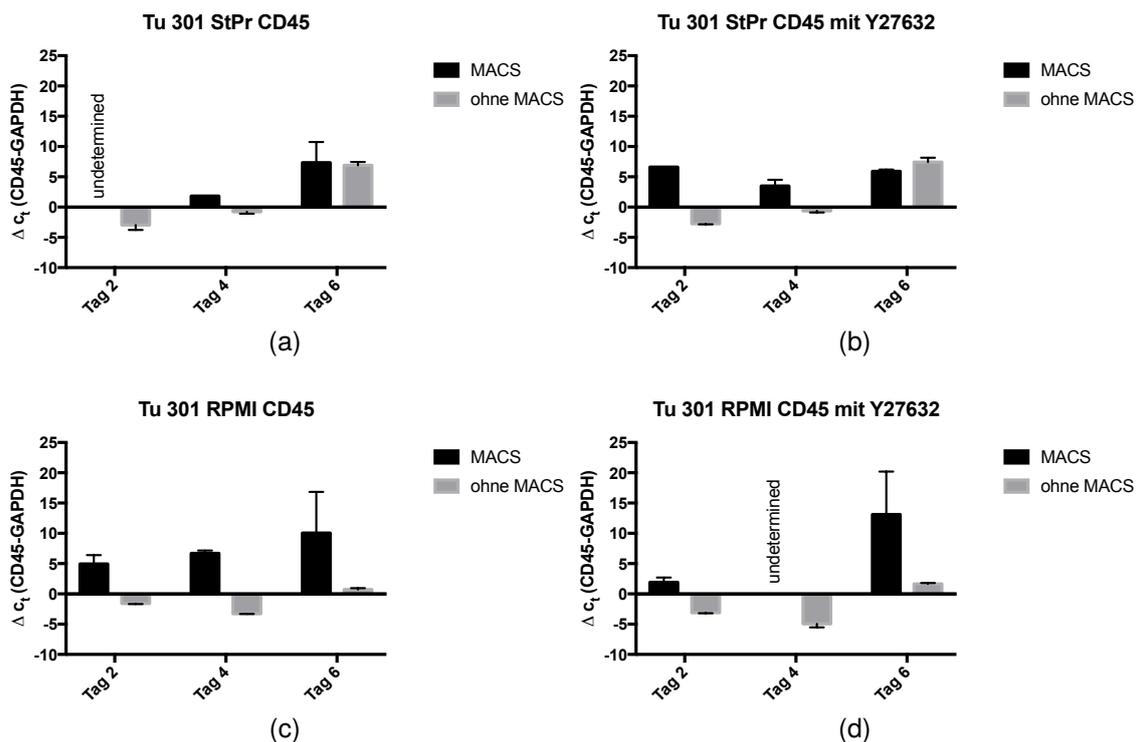


Abbildung 3.12: Tumor 301 PCR CD45- MACS versus ohne MACS

Um herauszufinden, ob dieser Effekt über die Zeit anhält, wurde separat von Tag 6 eine statistische Auswertung durchgeführt, auch hier ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0280$). Das Sortieren der Zellen zeigt also einen Effekt auch über längere Zeit hinweg.

CD45 in Tumor Diak

In allen 4 Diagrammen von Abbildung 3.13 ist ein klarer Unterschied zwischen "MACS" und "ohne MACS" an Tag 2 zu erkennen. Die Δc_t -Werte unterscheiden sich dabei signifikant mit einem p-Wert von $p < 0.0001$. Dieser Unterschied hält in RPMI tendenziell länger an als in StemPro, dort haben sich die Werte an Tag 4 schon wieder fast angeglichen. Von Tag 2 auf Tag 4 sinkt der Δc_t -Wert in allen Diagrammen außer (d), was einem größeren Vorhandensein von CD45 entspricht. Im RPMI-Medium ist an Tag 6 wieder ein klarer Unterschied zu erkennen: die Zellen ohne MACS haben einen kleineren Δc_t -Wert, also mehr CD45 als die MACS-sortierten. Außerdem ist von Tag 4 auf Tag 6 allgemein eher ein Anstieg (vor allem (a) und (b)) der Δc_t -Werte zu beobachten, was insgesamt weniger CD45 entspricht.

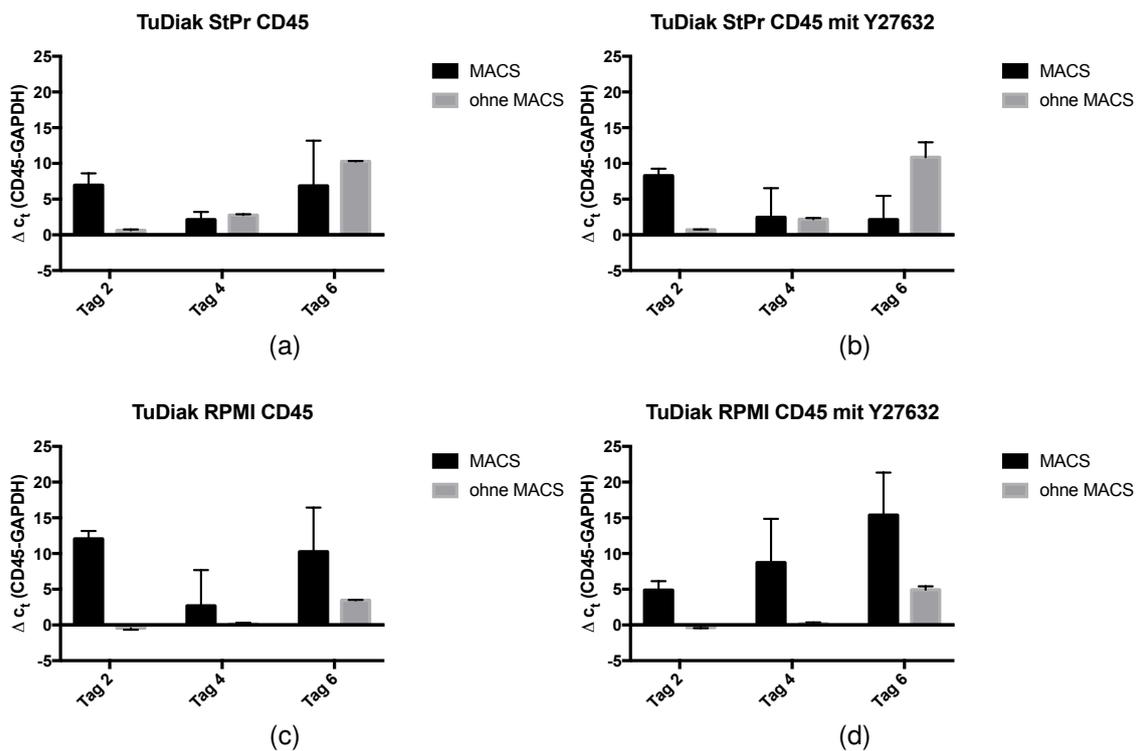


Abbildung 3.13: Tumor Diak PCR CD45- MACS versus ohne MACS

Bei der gemeinsamen Auswertung beider Tumore konnten zwei Erkenntnisse gewonnen werden: Zum einen ist allgemein gesprochen MACS erfolgreich, was die Depletion der CD45-positiven Zellen angeht ($p < 0.0001$), zum anderen besteht dieser Effekt auch über die Zeit, denn an Tag 6 kann immer noch ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0366$) zwischen den beiden Populationen errechnet werden.

c-Kit in Tumor 301

Umgekehrt kann unter anderem mit einer PCR von c-Kit überprüft werden, ob hier nun Seminomzellen vorliegen.

Erstaunlicherweise ist in Abbildung 3.14 (a) in der MACS-Zellfraktion zu allen Zeitpunkten kein c-Kit nachweisbar. Wie in Abbildungen (b)-(d) dargestellt, ist c-Kit in RPMI sowie StemPro mit Y27632 in beiden Zellfraktionen nachzuweisen. Auffällig ist hier vor allem im RPMI-Medium ein jeweiliges Maximum der Δc_t -Werte an Tag 4, was ein Minimum an c-Kit bedeutet. Danach steigt es wieder an, was entweder mit einem Wachstum der Seminomzellen gleichgesetzt werden kann oder ein Absterben aller anderen vorhandenen Zellen bedeutet. In StemPro war dies nicht der Fall. Die Zellpopulation, die MACS unterzogen wurde, zeigt hier im RPMI-Medium

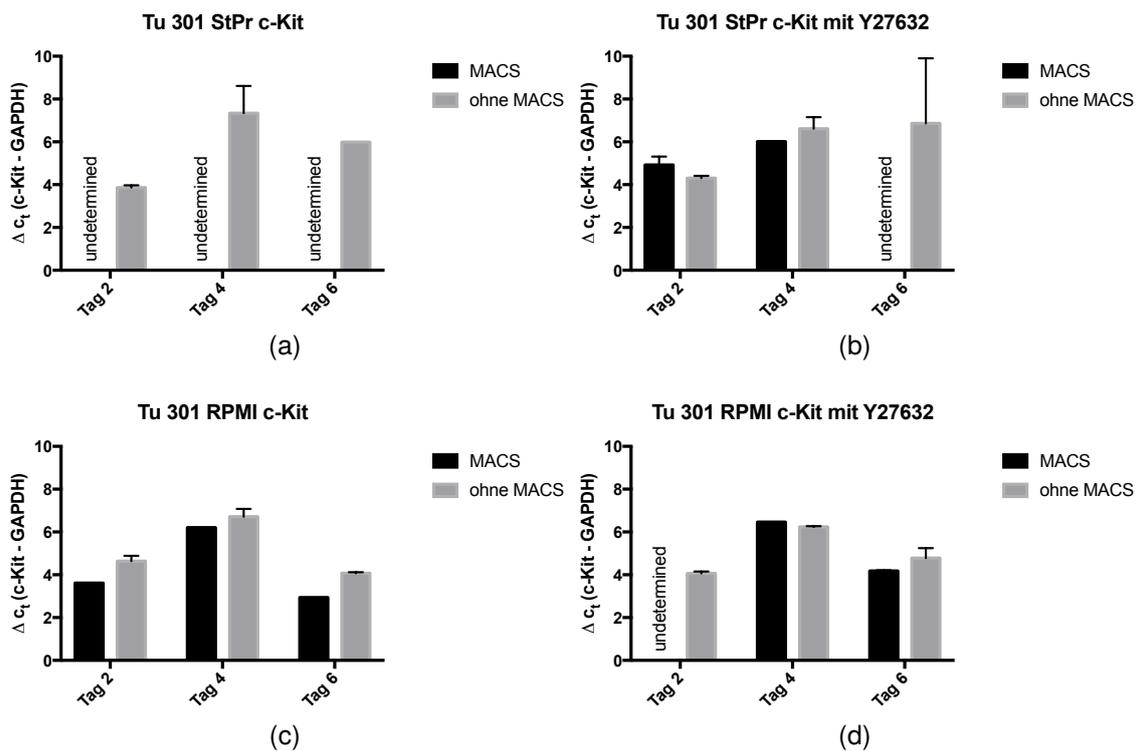


Abbildung 3.14: Tumor 301 PCR c-Kit- MACS versus ohne MACS

einen signifikanten Unterschied ($p=0,0048$) zu der ohne MACS-Sortierung: Der Δc_t -Wert ist kleiner, es ist also mehr c-Kit vorhanden, und zwar bis zum Tag 6. Tatsächlich lässt sich auch bei einer ausschließlichen Auswertung der Werte von Tag 6 ein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,0272$).

Hier darf geschlossen werden, dass im RPMI-Medium das MACS erfolgreich angewendet wurde und sich dies auch über die Zeit erhalten ließ. Eine gemeinsame statistische Auswertung aller Werte in Abbildung 3.14 ergibt, dass MACS signifikant erfolgreich ($p=0,0121$) ist. Es wurde überwiegend mehr c-Kit bei den behandelten Zellen von Tu 301 in beiden Medien nachgewiesen.

c-Kit in Tumor Diak

Hier war im Gegensatz zu Tumor 301 wie in Abbildung 3.15 ersichtlich in der Tat überall c-Kit nachweisbar, und zwar gleichermaßen in beiden Gruppen (MACS und ohne MACS). Die überwiegend kleinen Δc_t -Werte sprechen hierbei für eine große Menge an c-Kit.

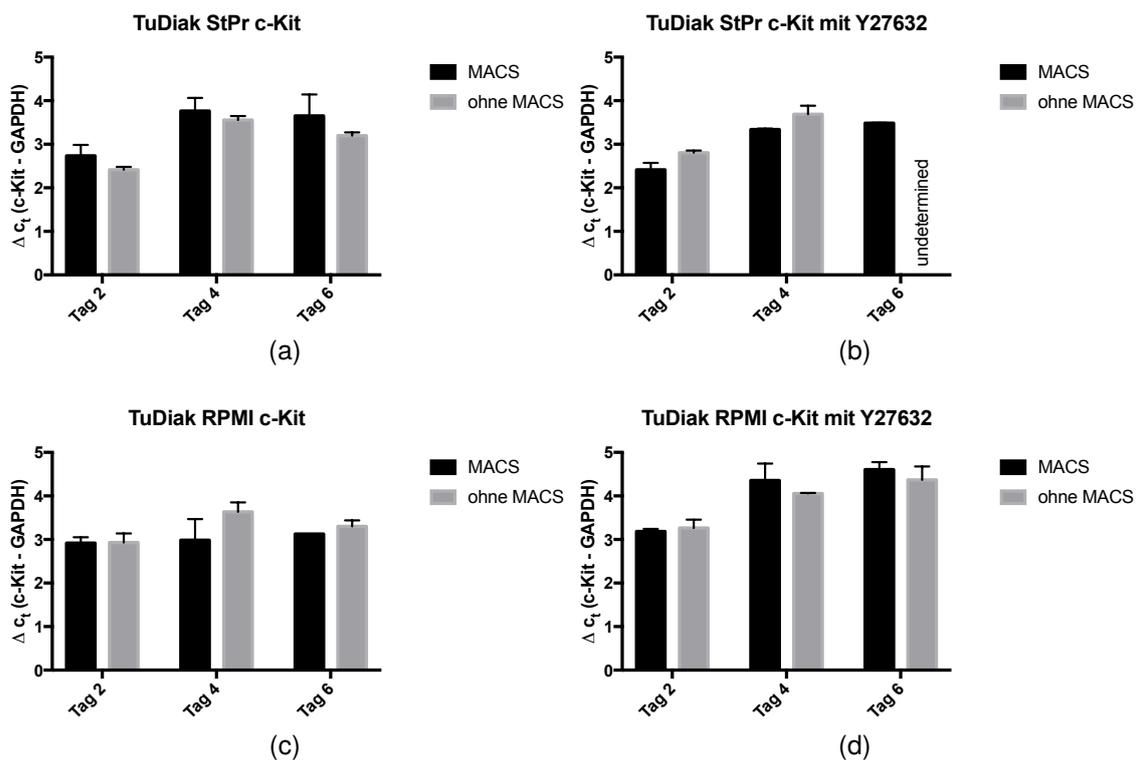


Abbildung 3.15: Tumor Diak PCR c-Kit- MACS versus ohne MACS

An Tag 2 zeigt sich kein Unterschied in der Menge an c-Kit zwischen der MACS-sortierten und der unsortierten Zellfraktion. Eine signifikant unterschiedliche Menge an c-Kit als Marker für Seminomzellen an Tag 4 und Tag 6 in der Kultur mit MACS-sortierten Zellen im Gegensatz zu solchen ohne MACS ist nicht zu beobachten. Die Δc_t -Werte bleiben dafür überraschend konstant, was in der Mikroskopie nicht so beobachtet werden konnte. Außerdem wurden die Daten beider Tumore zusammengefügt und ausgewertet, wobei für c-Kit ein statistisch signifikanter Unterschied der MACS-Zellen zu denen ohne MACS zu konstatieren ist: Mit einem p-Wert von $p=0,0011$ ist in Kulturen, die MACS unterzogen wurden, mehr c-Kit vorhanden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde noch eine weitere PCR mit dem Seminommarker PLAP durchgeführt.

PLAP in Tumor 301

Auch der Seminommarker PLAP kann äquivalent zum Ergebnis der c-Kit-PCR bei den MACS-Zellen in StemPro ohne Y27632 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.16 (a)) Genauso konsistent ist der undeterminierte Wert in 3.16 (b), Tag 6 sowie 3.16 (d), Tag 2. Dies spricht dafür, dass hier entweder keine Seminomzellen

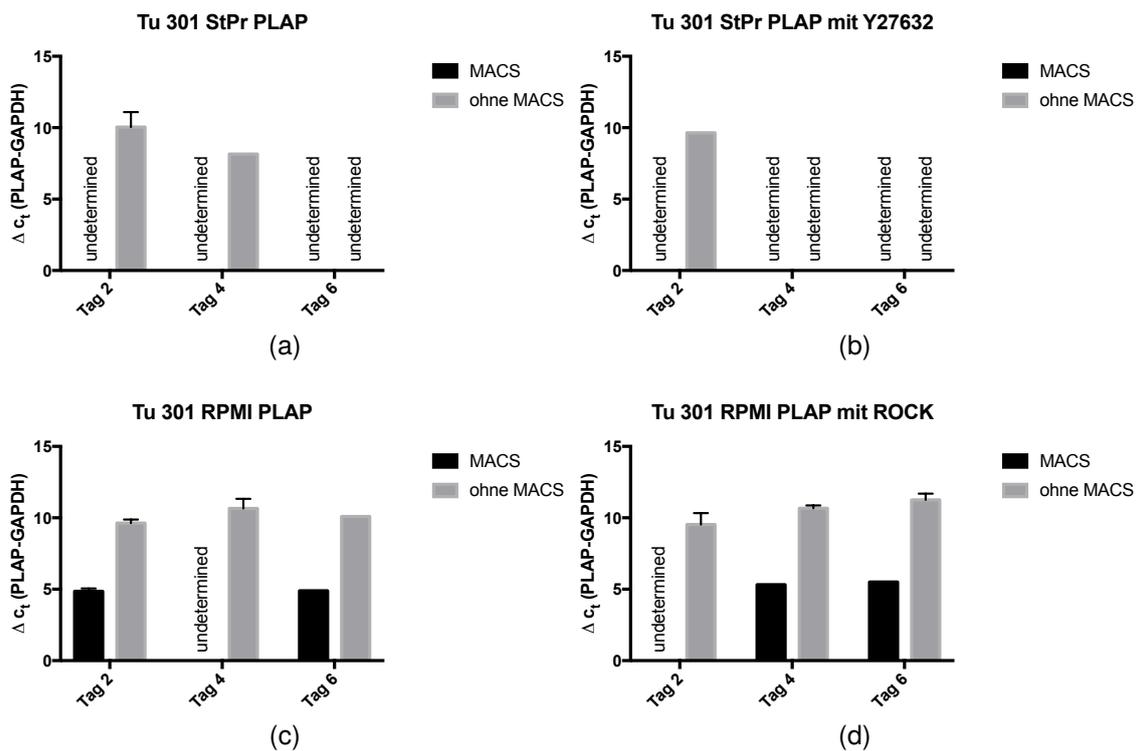


Abbildung 3.16: Tumor 301 PCR PLAP- MACS versus ohne MACS

vorlagen, wovon in Abbildung 3.16 (a) ausgegangen werden kann. In Grafik 3.16 (d) muss hingegen davon ausgegangen werden, dass auch ohne Nachweis von PLAP an Tag 2 einige Seminomzellen vorliegen, da an Tag 4 und 6 Seminommarker nachgewiesen werden können. In RPMI zeigt sich eine klare Tendenz, dass in den MACS-behandelten Zellen mehr PLAP vorhanden ist, was für ein besseres Wachstum und Überleben der Seminomzellen in RPMI spricht. Dieser ist statistisch signifikant mit einem p-Wert von $p < 0.0001$. Dieser Unterschied ist im RPMI-Medium bis Tag 6 nachweisbar ($p = 0,0479$).

PLAP in Tumor Diak

Genau wie c-Kit kann PLAP auch hier an Tag 2 in allen Kulturen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.17). Die Menge an PLAP der MACS-sortierten Zellen unterscheidet sich hier allerdings im Gegensatz zu c-Kit statistisch signifikant von den unsortierten Zellen ($p = 0,0016$). In diesem Fall kann also angenommen werden, dass sich an Tag 2 anteilmäßig mehr Seminomzellen in den mit MACS-sortierten Kulturen befinden, was sich in StemPro mit Y27632 (Abbildung 3.17 (b)) bis Tag 4 verfolgen lässt, wo in den nicht MACS-sortierten Zellen gar kein PLAP,

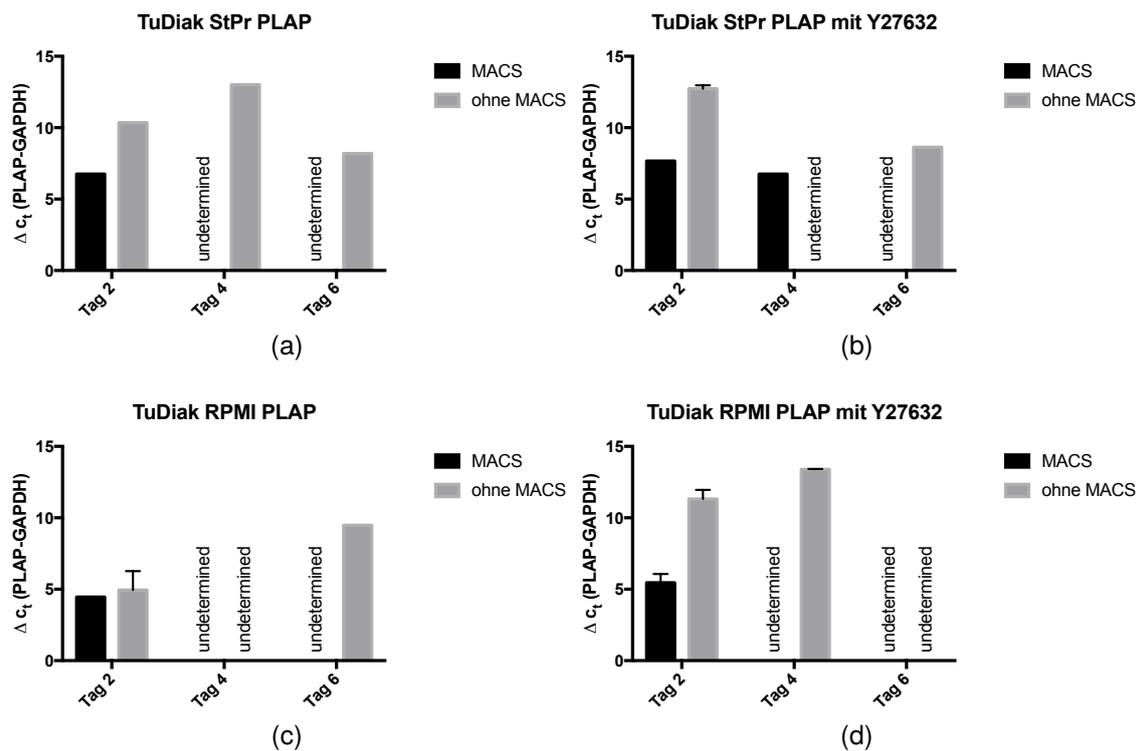


Abbildung 3.17: Tumor Diak PCR PLAP- MACS versus ohne MACS

dafür in den MACS-Zellen gleich viel wie an Tag 2 vorliegt. An Tag 4 ist das Vorkommen von PLAP sehr heterogen, in den MACS-sortierten Kulturen ist PLAP in 3 von 4 Fällen gar nicht mehr nachzuweisen, an Tag 6 in keiner einzigen Kultur mehr, was sich nicht mit den Beobachtungen aus der Zellkultur deckt. Interessanterweise ist es in den nicht MACS-Kulturen noch länger oder teilweise nach zwischenzeitlichem Verschwinden wieder nachweisbar (siehe (b) und (c)). Vergleicht man Abbildung (b) mit Abbildung 3.13 (b), so fällt ein komplementäres Verhalten von CD45 auf: Während die ohne MACS-Zellen an Tag 2 und 4 noch sehr viel CD45 aufweisen, ist dafür wenig bis gar kein PLAP vorhanden, was bei den MACS-Zellen hier eindeutig in größerer Menge vorhanden ist. Der Unterschied der MACS-sortierten versus nicht MACS-sortierten Zellen in StemPro ist, unter Auslassen der undeterminierten Werte, schwach signifikant ($p=0,0332$). Auch in RPMI kann signifikant mehr PLAP nachgewiesen werden ($p=0,0221$). Diese Werte müssen allerdings in Zusammenschau mit anderen ausgewertet werden, da hier je nur zwei Wertepaare für die Gewinnung der p-Wertes herangezogen werden konnten. Kombiniert man die beiden Medien in einer gemeinsamen Auswertung, kann bei TuDiak ein signifikant höheres PLAP bei den MACS-sortierten Zellen mit einem p-Wert von 0,0016 bestätigt werden.

Betrachtet man nun erneut beide Tumore in der Zusammenschau, kann ein zuverlässigeres Ergebnis erzielt werden: Die sortierten Zellen weisen deutlich mehr PLAP auf also die unsortierten ($p=0,0064$).

3.2.2 Y27632 versus ohne Y27632

Bei den gewonnenen Daten kann nicht nur die Population von Zellen mit MACS-Sortierung den unsortierten gegenübergestellt werden, sondern auch die Auswirkung der Anwendung des ROCK-Inhibitors Y27632 kann überprüft werden. Dafür wurden jeweils neue Graphen erstellt, bei welchen die Δc_t -Werte der entsprechenden Zellreihen mit und ohne Y27632-Zugabe gegeneinander aufgetragen sind.

CD45 in Tumor 301

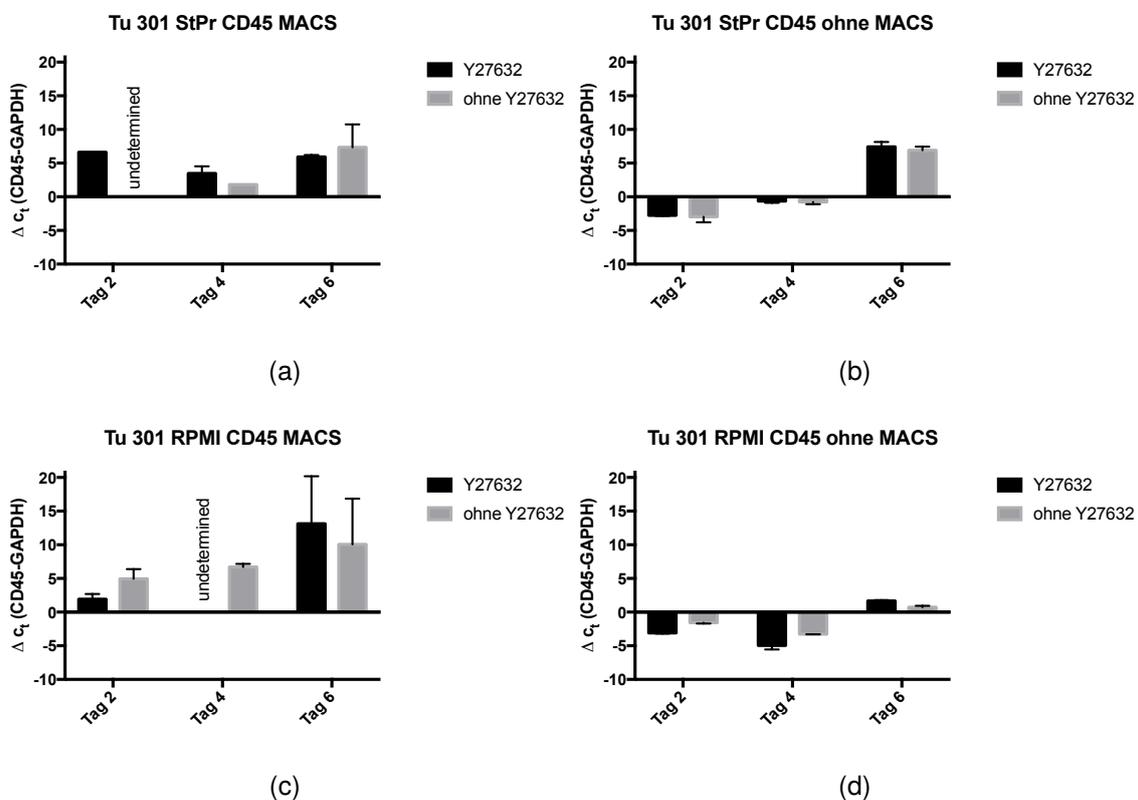


Abbildung 3.18: Tumor 301 PCR CD45 - Y27632 versus ohne Y27632

Zuerst stellt sich die Frage, wie sich der ROCK-Inhibitor auf die CD45-positive-Zellpopulation, also vor allem die Lymphozyten, auswirkt. Diese sollen im Idealfall nicht in ihrem Wachstum gestärkt werden.

In Abbildung 3.18 (a) und (b) zeigt sich, dass Y27632 keine Auswirkung auf CD45-positive Zellen in StemPro zu haben scheint: Die Menge an CD45 unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Populationen, zu denen Y27632 supplementiert wurde, von denen ohne Y27632-Zusatz. Auch wenn man die MACS-sortierten Zellen ohne Sortierung gegenüberstellt, ist in Hinblick auf Y27632 kein Trend zu erkennen. Bei den Zellen in RPMI verhält es sich anders: Die unsortierten Zellen (siehe Abbildung 3.18 (d)) zeigen ein signifikant höheres Vorkommen an CD45 in den mit Y27632 behandelten Zellen ($p=0,0031$), wobei dies nur für Tag 2 und 4 gilt. Bei den MACS-sortierten ist dies nicht der Fall.

CD45 in Tumor Diak

Bei Tumor Diak kann dieselbe Beobachtung gemacht werden: die Menge an CD45 unterscheidet sich nur geringfügig oder kaum, wenn man Y27632 versus ohne Y27632 vergleicht. Abbildung 3.19 zeigt auf, dass sowohl in StemPro als auch RPMI keine signifikanten Unterschiede der Δc_t -Werte festgestellt werden können. Dies bedeutet, dass Y27632 sich nicht auf das Wachstum oder Fortbestehen von Lymphozyten auswirkt, weder am Anfang der Kultur noch zu späteren Zeitpunkten. Am eindrucklichsten ist die Übereinstimmung der Wertepaare ohne und mit ROCK-Inhibitor in Abbildung 3.19 (b) und (d), also in den Kulturen ohne MACS-Sortierung, zu sehen. Auch die Tendenzen in den Abbildungen 3.18 und 3.19 je (c) gleichen sich: An Tag 2 ist der Δc_t -Wert von CD45 bei den mit ROCK-Inhibitor behandelten Zellen je niedriger als ohne Behandlung, es ist also mehr CD45 vorhanden. Dieses Verhältnis kehrt sich an Tag 4 um, wo weniger CD45 bei den mit Y27632 supplementierten Kulturen vorliegt.

Auch wenn man beide Tumore gemeinsam betrachtet, ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, zu denen Y27632 hinzugefügt wurde und denen ohne Supplementierung. Jetzt soll noch herausgefunden werden, ob Y27632 sich positiv auf das Überleben oder Wachstum von Seminomzellen auswirkt.

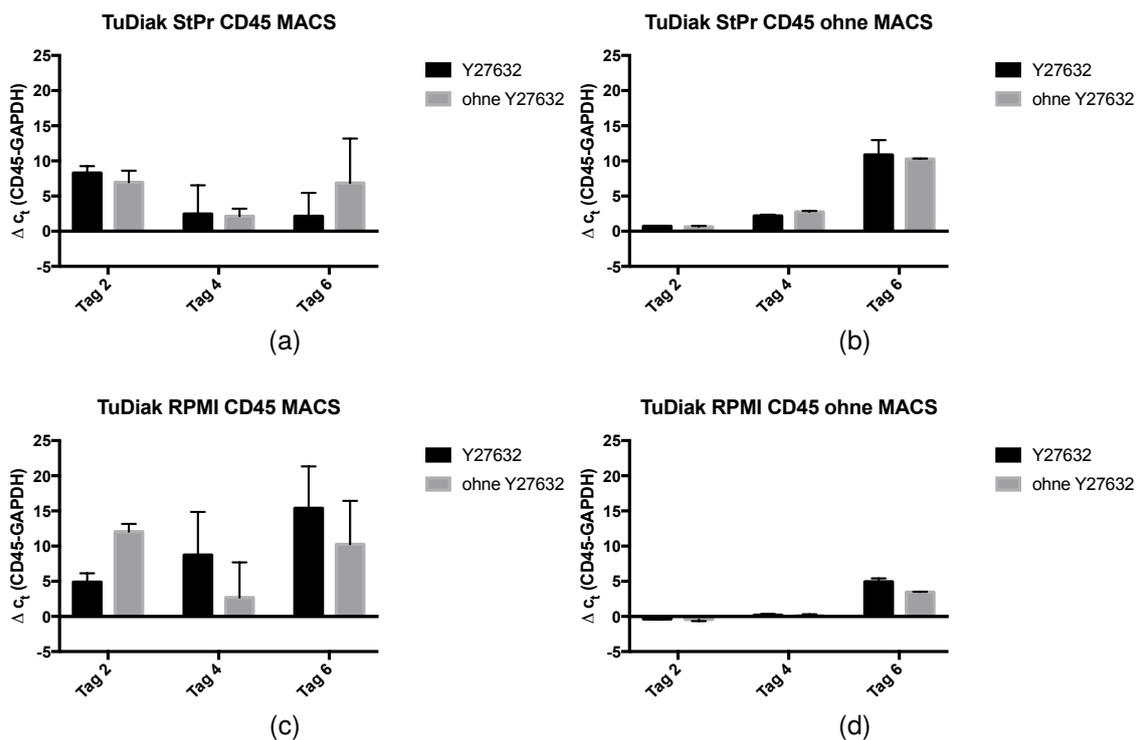


Abbildung 3.19: Tumor Diak PCR CD45 - Y27632 versus ohne Y27632

c-Kit in Tumor 301

Wie in Abbildung 3.20 dargestellt, sind die Unterschiede zwischen den Zellen, denen ROCK-Inhibitor hinzugefügt wurde und solchen ohne Y27632 nur marginal. Wenn man davon ausgeht, dass undetermined bedeutet, dass sehr wenig oder gar kein c-Kit vorliegt, zeichnet sich in Abbildung (a) die deutlichste Tendenz ab: Zweimal ist dort noch c-Kit vorhanden, wo Y27632 zugegeben wurde, jedoch in den Kulturen ohne Hinzufügen von Y27632 nicht nachweisbar. Diese Beobachtung lässt sich allerdings in den anderen Graphen nicht bestätigen, hier sind die Δc_t -Werte sehr ähnlich zwischen behandelten und Kontrollzellen. Allerdings ist diese eine Tendenz auch weiter unten in Abbildung 3.21 (a) bei Tumor Diak nachzuweisen: hier ist ebenfalls in Abbildung (a) mehr c-Kit in den mit ROCK-Inhibitor behandelten Zellen nachgewiesen.

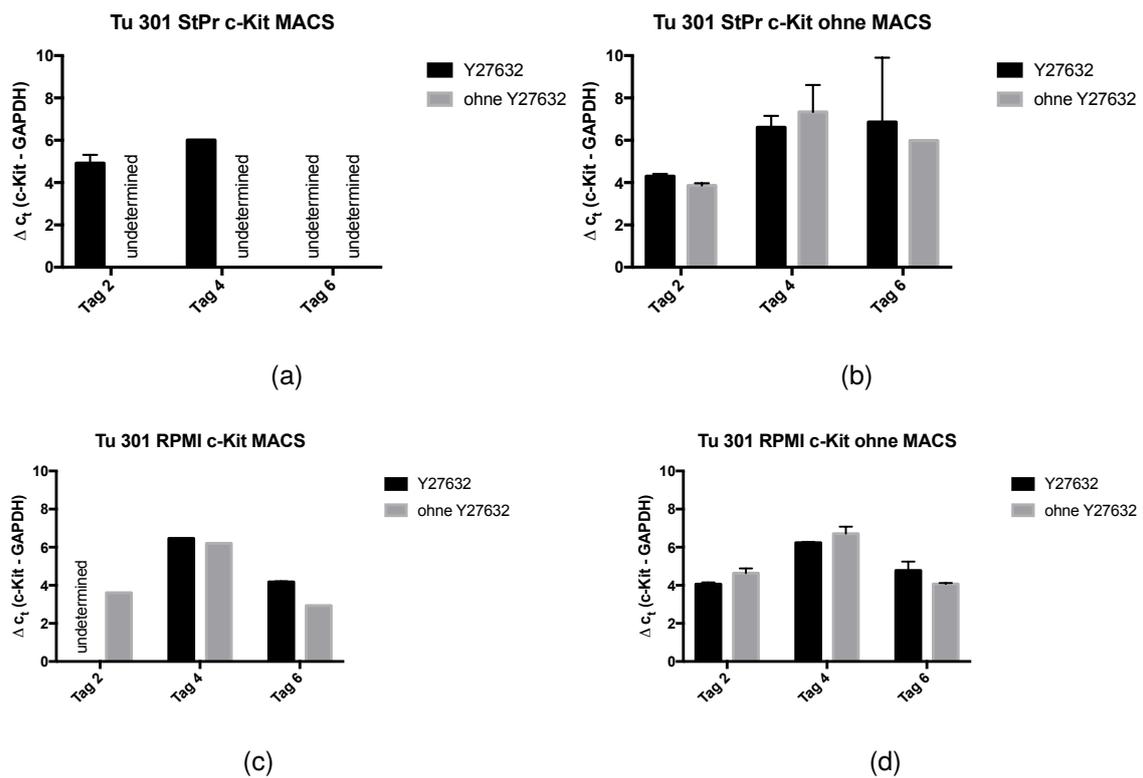


Abbildung 3.20: Tumor 301 PCR c-Kit - Y27632 versus ohne Y27632

c-Kit in Tumor Diak

Für Tu Diak ergibt sich ein interessantes Ergebnis: In RPMI wirkt sich Y27632 negativ aus. Mit einem eindeutig signifikanten Unterschied zwischen "ROCK-Inhibitor" und "ohne ROCK-Inhibitor" bei einem gemeinsamen p-Wert von $p < 0.0001$ (auch einzeln bei den MACS-sortierten Zellen ($p = 0,0024$) und Zellen ohne Sortierung ($p = 0,0019$)) ist hier je ein größerer Δc_t -Wert, also weniger c-Kit, vorliegend. Dieser Unterschied vergrößert sich sogar von Tag 2 auf Tag 4 (c) bzw. Tag 6 (d) und wirkt sich somit negativ auf die Seminomzellen aus. Im StemPro-Medium ist dieser Effekt nicht zu beobachten, hier sind wie oben bereits erwähnt bei den MACS-sortierten Zellen im Schaubild 3.21 (a) sogar eher umgekehrte Tendenzen zu beobachten, die bedeuten würden, dass Y27632 hier dem Überleben der Seminomzellen eher zuträglich ist. Bei den Zellen ohne MACS hingegen sind StemPro und RPMI recht ähnlich, wenn man davon ausgeht, dass der undeterminierte Wert bedeutet, dass c-Kit hier unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

In Zusammenschau der beiden Tumore wirkt sich Y27632 also tendenziell positiv bei den Zellen in StemPro nach MACS aus (je Abb. (a)).

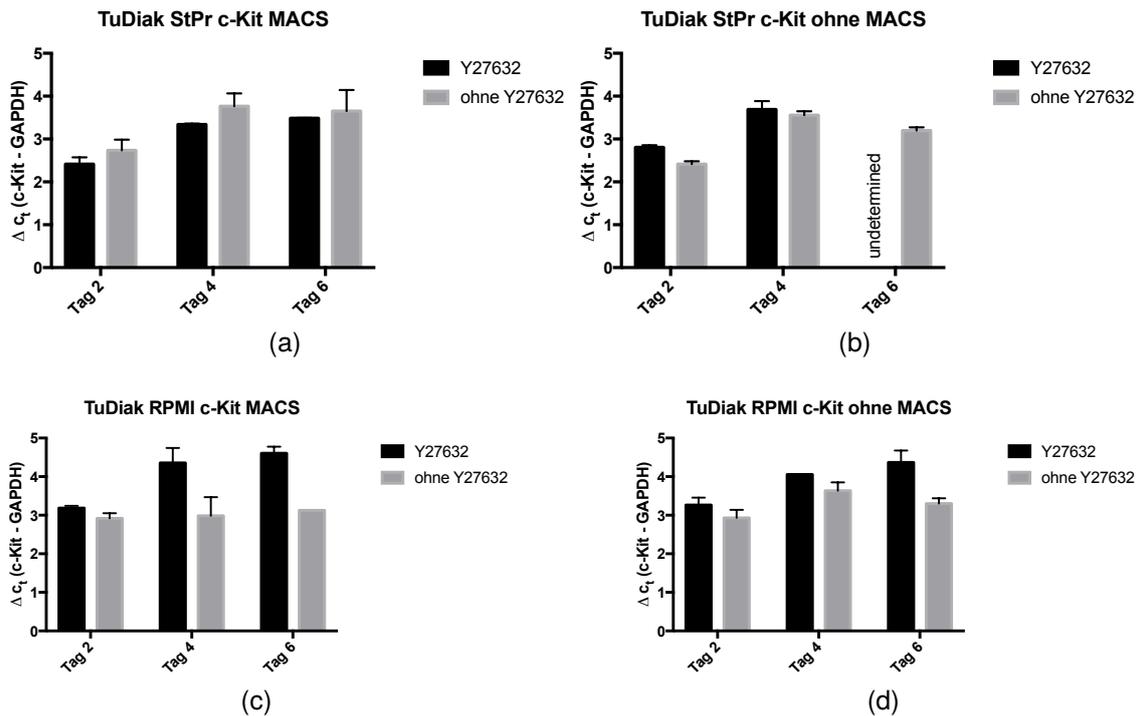


Abbildung 3.21: Tumor Diak PCR c-Kit - Y27632 versus ohne Y27632

PLAP in Tumor 301

Auch PLAP kann hinsichtlich der Kriterien Y27632 versus ohne Y27632 ausgewertet werden, um die Ergebnisse der c-Kit-PCR zu verifizieren.

Tumor 301 zeigt wie in Abbildung 3.22 ersichtlich größtenteils keine unterschiedlichen ΔC_t -Werte von PLAP zwischen den mit Y27632 behandelten und unbehandelten Zellen. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von c-Kit überein. Hier fällt Graph (a) auf, bei dem weder bei den mit Y27632 behandelten noch den unbehandelten Zellen PLAP nachgewiesen werden kann.

Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Fraktionen, weder in StemPro noch RPMI.

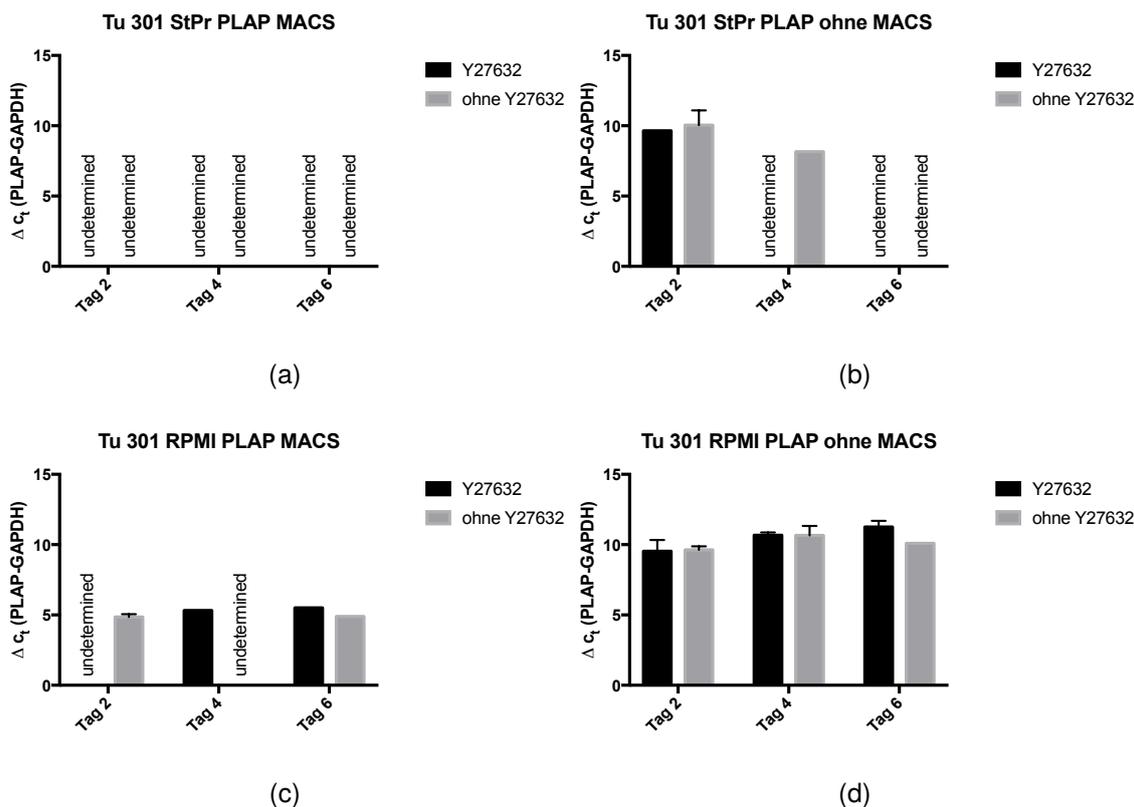


Abbildung 3.22: Tumor 301 PCR PLAP - Y27632 versus ohne Y27632

PLAP in Tumor Diak

Auch hier ist in den beiden Graphen 3.23 (c) und (d) eine klare Auswirkung von Y27632 zu erkennen: der Δc_t -Wert ist bei den in RPMI-Medium kultivierten Zellen signifikant ($p=0,0147$) höher, wenn ihnen Y27632 zugesetzt wurde. Dieses Ergebnis wurde auch schon bei c-Kit beobachtet, es beschreibt eine negative Auswirkung von Y27632 auf Seminomzellen. Dies ist jedoch erneut nur in RPMI-Medium nachzuweisen, in StemPro sind jedoch gleiche Tendenzen vorhanden, was im Gegensatz zu den PCR-Daten von c-Kit steht. Hier sind allerdings auch viele Werte undeterminiert, was die Vergleichbarkeit einschränkt.

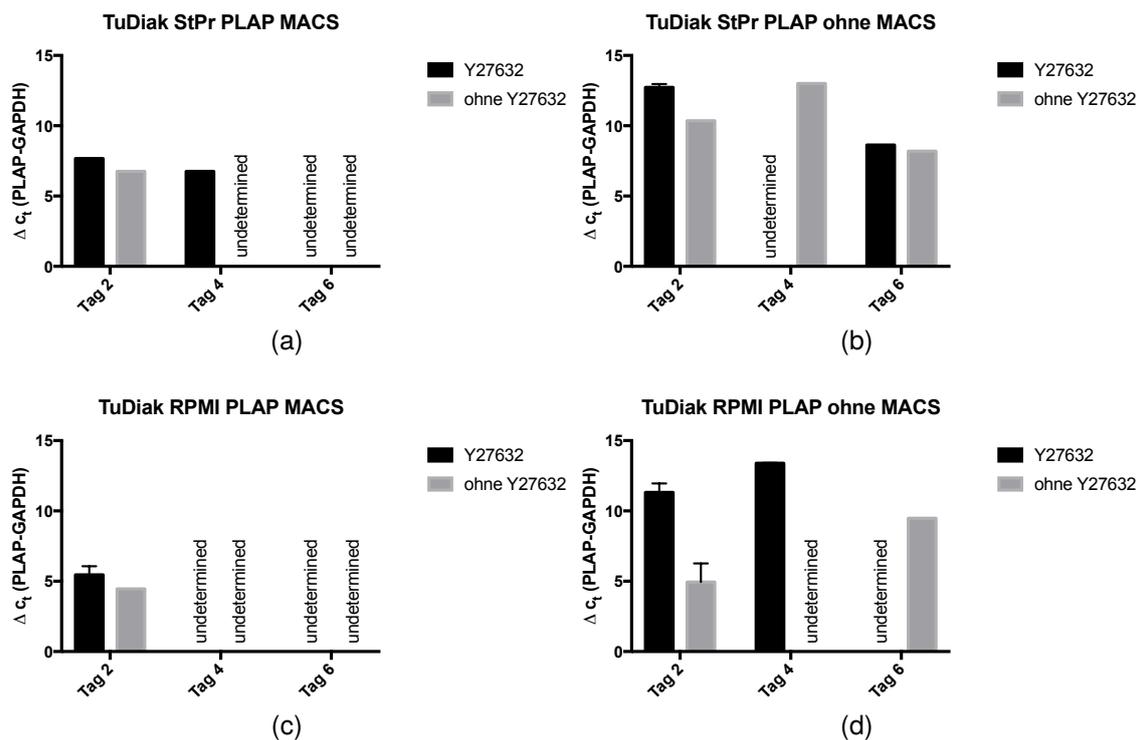


Abbildung 3.23: Tumor Diak PCR PLAP - Y27632 versus ohne Y27632

3.2.3 StemPro versus RPMI

Zur Evaluation der Kulturbedingungen muss als ein entscheidender Faktor auch das Kulturmedium herangezogen werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Medien verwendet, die hier ebenfalls miteinander verglichen werden sollen, um das optimale Medium für Seminomzellen zu finden. Die Daten wurden zur besseren Übersicht neu angeordnet, sodass nun jede Zellpopulation in StemPro gegen die entsprechende in RPMI abgewogen werden kann.

CD45 in Tumor 301

Auch hier wurden jeweils ANOVA-Tests der einzelnen Datengruppen durchgeführt werden, um signifikante Unterschiede zu detektieren. Die erste PCR beantwortet die Frage, wie die Zellen, die nicht gewollt sind, also Lymphozyten, im jeweiligen Medium wachsen.

Hier fällt vor allem die Zellpopulation, die keinem MACS unterzogen wurde, ins Auge (Abbildung 3.24 (c) und (d)). Sie weist -am eindrucklichsten an Tag 6- klare Unterschiede der beiden Medien auf: CD45 kann in StemPro viel weniger nachge-

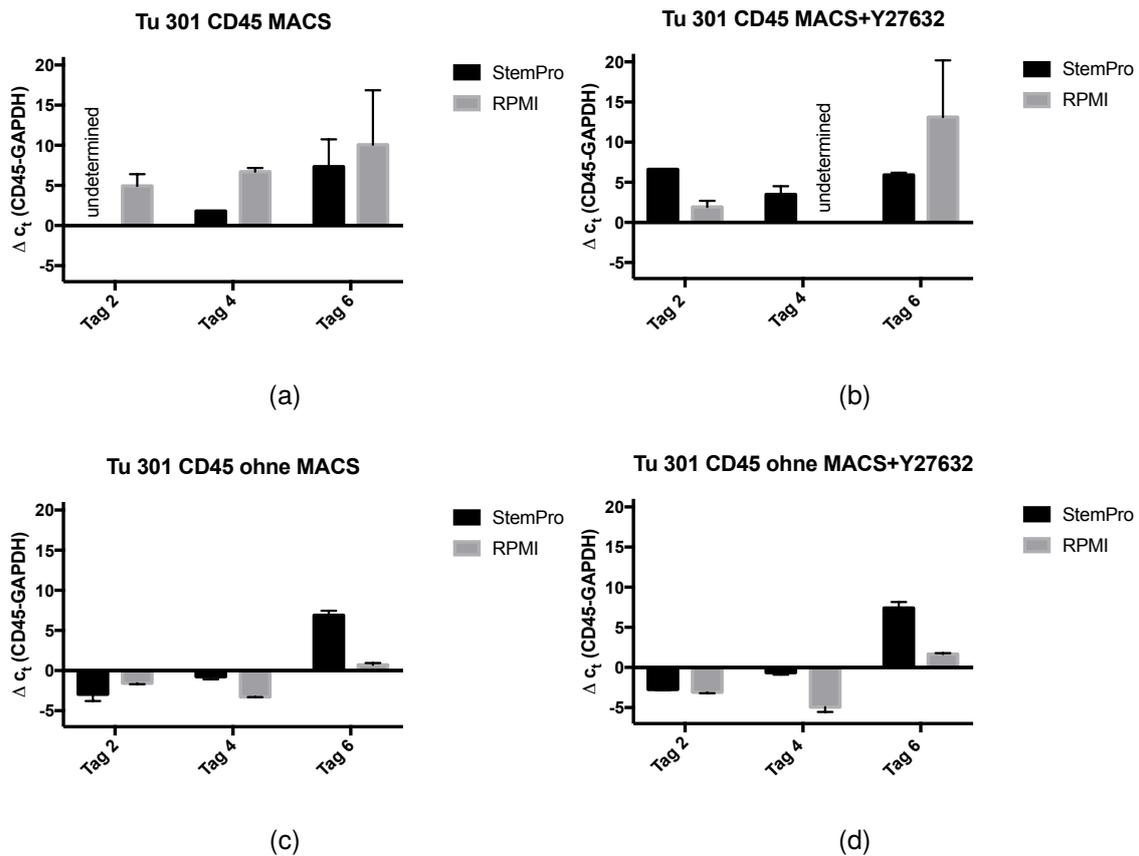


Abbildung 3.24: Tumor 301 PCR CD45 - StemPro versus RPMI

wiesen werden als in RPMI ($p < 0.0001$). RPMI kann als das bevorzugte Medium vom CD45-positiven Zellen bezeichnet werden. Sortiert man diese nun heraus, ist der CD45-Level nicht mehr so unterschiedlich zwischen beiden Medien, auch der Betrag der Δc_t -Werte steigt. Dies bedeutet, dass quantitativ weniger CD45 vorliegt, und zwar in beiden Medien.

CD45 in Tumor Diak

Die Analyse der Zellen ohne MACS ist auch hier interessant: sie zeigen wieder eine signifikante Differenz der Δc_t -Werte der beiden Medien ($p < 0.0001$). Im StemPro ist auch hier, wieder vor allem an Tag 6, das Überleben von CD45-positiven Zellen schlechter. Bei den Zellen, die MACS unterzogen wurden, sieht es dagegen anders aus: hier sind überwiegend Δc_t -Werte von in RPMI kultivierten Zellen größer, was sich auch statistisch belegen lässt ($p = 0,0305$). Hier überleben also CD45-positive Zellen schlechter in RPMI, im Gegensatz zu den Zellen ohne MACS-Sortierung. Die Beobachtung stimmt mit der Tendenz aus Tumor 301

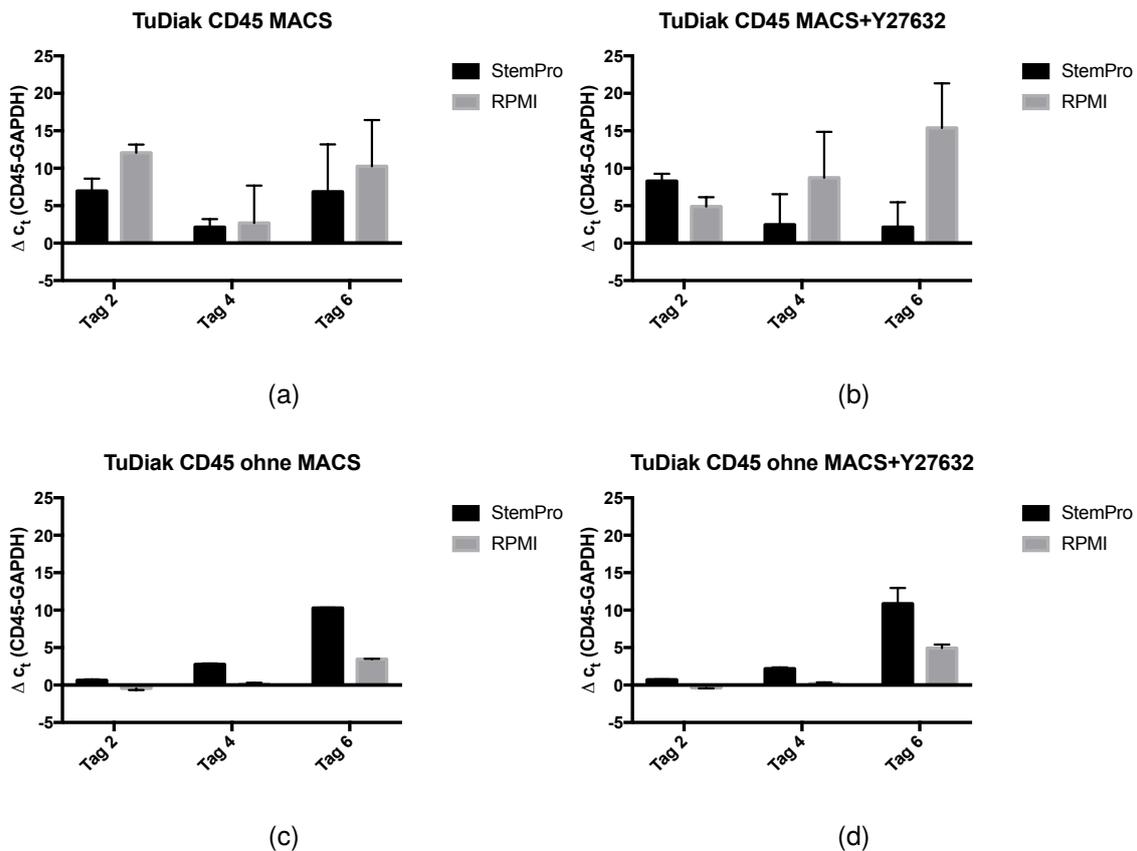


Abbildung 3.25: Tumor Diak PCR CD45 - StemPro versus RPMI

überein.

Zusammenfassend kann bei der gemeinsamen Auswertung der Zellen ein eindeutiges Resultat festgehalten werden: Die CD45-positiven Zellen, die keiner MACS-Sortierung unterzogen wurden, überleben in StemPro schlechter als in RPMI ($p < 0.0001$), was auch über die Zeit konstant so beobachtet werden kann. Wurden die CD45-positiven Zellen jedoch mit MACS herausgefiltert, kann in RPMI bei Tumor 301 und Diak signifikant ($p = 0,0212$) weniger CD45 nachgewiesen werden.

c-Kit in Tumor 301

Mit diesem Marker können nun Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, in welchem Medium die Seminomzellen besser überleben.

Die Zellfraktion, die MACS durchlaufen hat, ist hier aufgrund der vielen undeterminierten Werte schlecht zu beurteilen. Allerdings ist in Abbildung 3.26 (a) zu

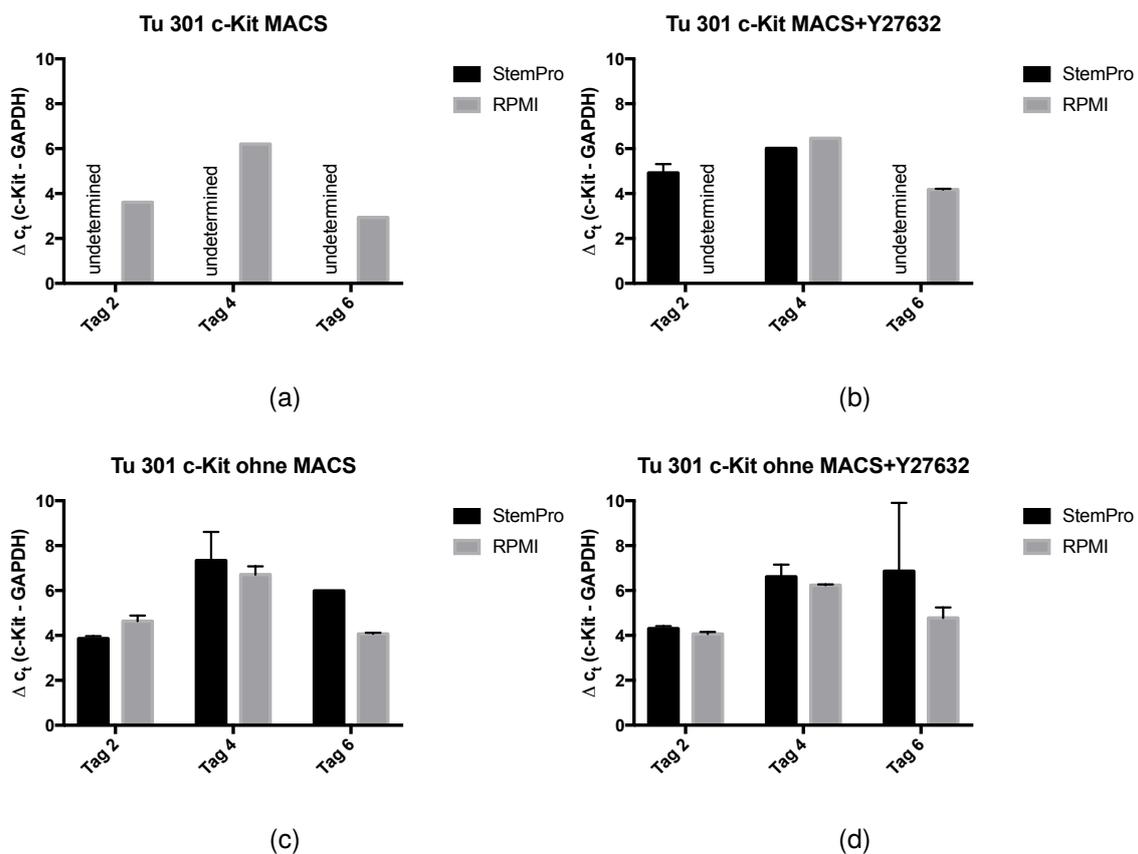


Abbildung 3.26: Tumor 301 PCR c-Kit - StemPro versus RPMI

beobachten, dass in RPMI noch c-Kit nachzuweisen ist, wohingegen es in StemPro fehlt. Die Zellen ohne MACS-Sortierung (Abbildung 3.26 (c) und (d)) zeigen hingegen eine Tendenz der Δc_t -Werte: Zu fast allen gemessenen Zeitpunkten ist mehr c-Kit im RPMI-Medium vorhanden.

c-Kit in Tumor Diak

Wertet man hier die beiden MACS-Zellkulturen (Abbildung 3.27 (a) und (b)) gemeinsam aus, kann die Aussage verifiziert werden, dass mehr c-Kit in StemPro nachgewiesen wurde ($p=0,0282$), was mit der angedeuteten Tendenz bei Tumor 301 (siehe Abbildung 3.26 (b)) übereinstimmt. Die Zellen, die bei Tu Diak ohne MACS belassen wurden, zeigen ein noch eindeutigeres Ergebnis: Hier sind die Δc_t -Werte in StemPro mit einem p-Wert von $p=0,0007$ signifikant niedriger als in RPMI, was ebenfalls auf ein besseres Überleben von Seminomzellen in StemPro schließen lässt.

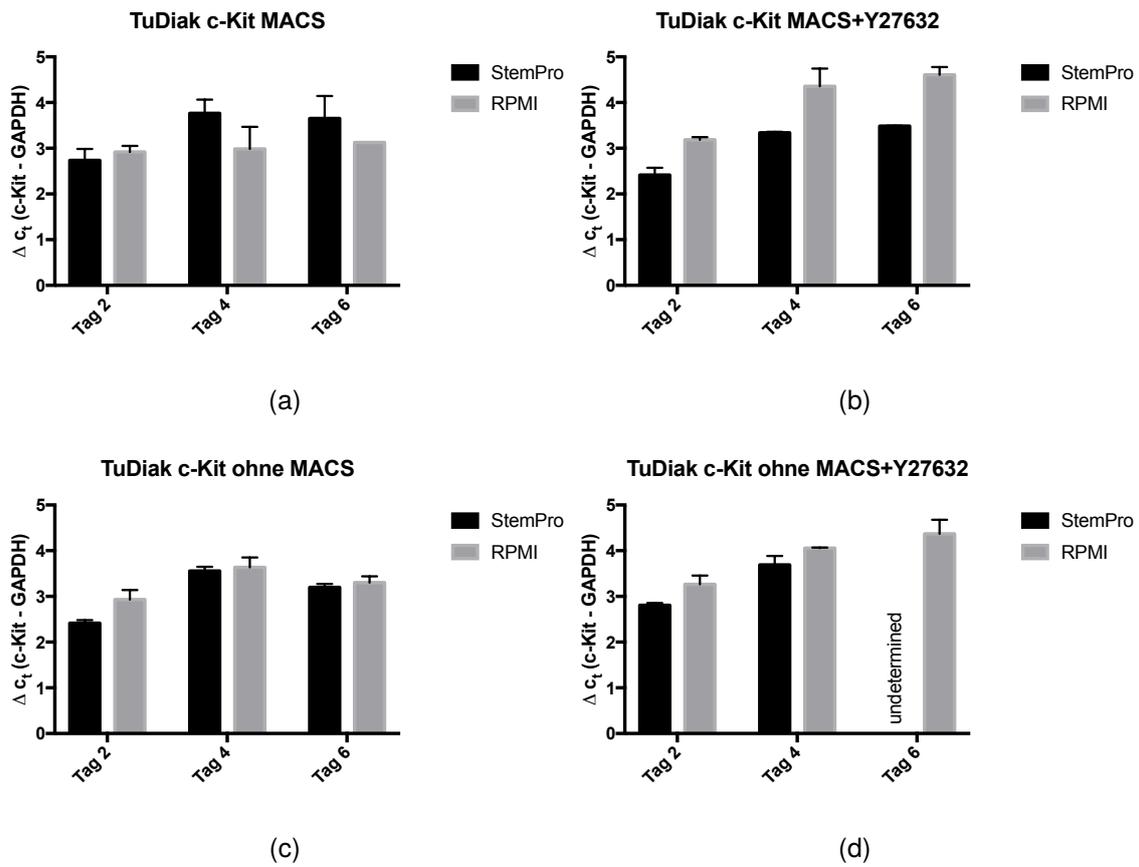


Abbildung 3.27: Tumor Diak PCR c-Kit - StemPro versus RPMI

PLAP in Tumor 301

Auch PLAP kann zur Beurteilung, in welchem Medium Seminomzellen besser überleben, herangezogen werden.

Die Ergebnisse der PLAP-PCR sind bei der MACS-Population, also 3.28 (a) und (b), nahezu identisch mit denen der c-Kit-PCR. Der überwiegende Teil der in StemPro gemessenen Werte ist undeterminiert, wobei dies am ehesten bedeutet, dass kaum PLAP vorhanden war. Im Unterschied zu c-Kit ist bei der Menge an PLAP hier bei den Zellen ohne MACS-Sortierung jedoch keine eindeutige Aussage zu treffen. Weder bei der gemeinsamen Auswertung noch, wenn man einzeln Abbildung (c) bzw. (d) betrachtet, kann von einer klaren Tendenz gesprochen werden.

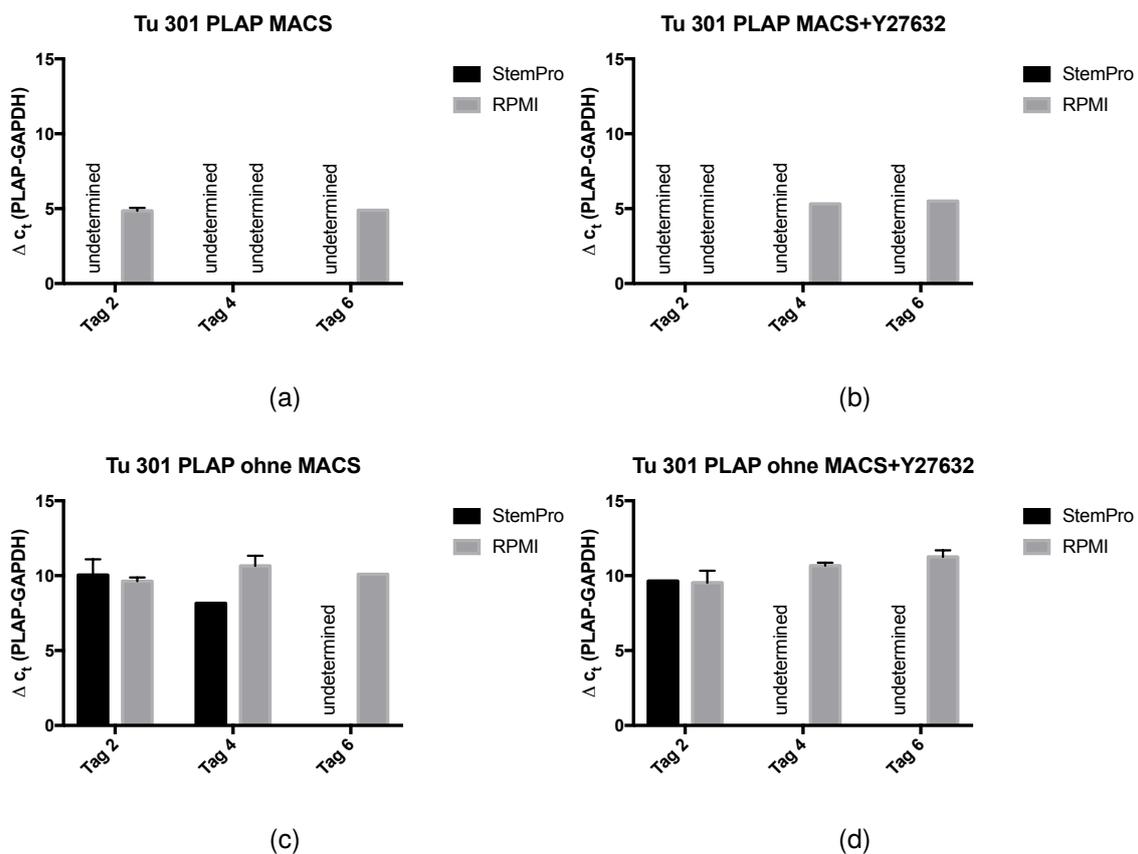


Abbildung 3.28: Tumor 301 PCR PLAP - StemPro versus RPMI

PLAP in Tumor Diak

TuDiak weist bei der PLAP-PCR viele undeterminierte Werte auf, was eine Aussage über Trends erschwert. Sowohl bei den MACS-sortierten Zellen als auch bei denjenigen ohne Heraussortieren der CD45-positiven sind die Δc_t -Werte unterschiedlich. Es fällt auf, dass bei allen Schaubildern von Abbildung 3.29 die Δc_t -Werte für PLAP eher in RPMI erniedrigt sind, was sich statistisch für die gesamte PLAP-PCR von TuDiak belegen lässt ($p=0,0115$). Dies bedeutet auch, dass für die MACS-sortierten und unsortierten Zellen ein gemeinsamer Trend vorliegt, der im Gegensatz zu den Ergebnissen der c-Kit-PCR steht.

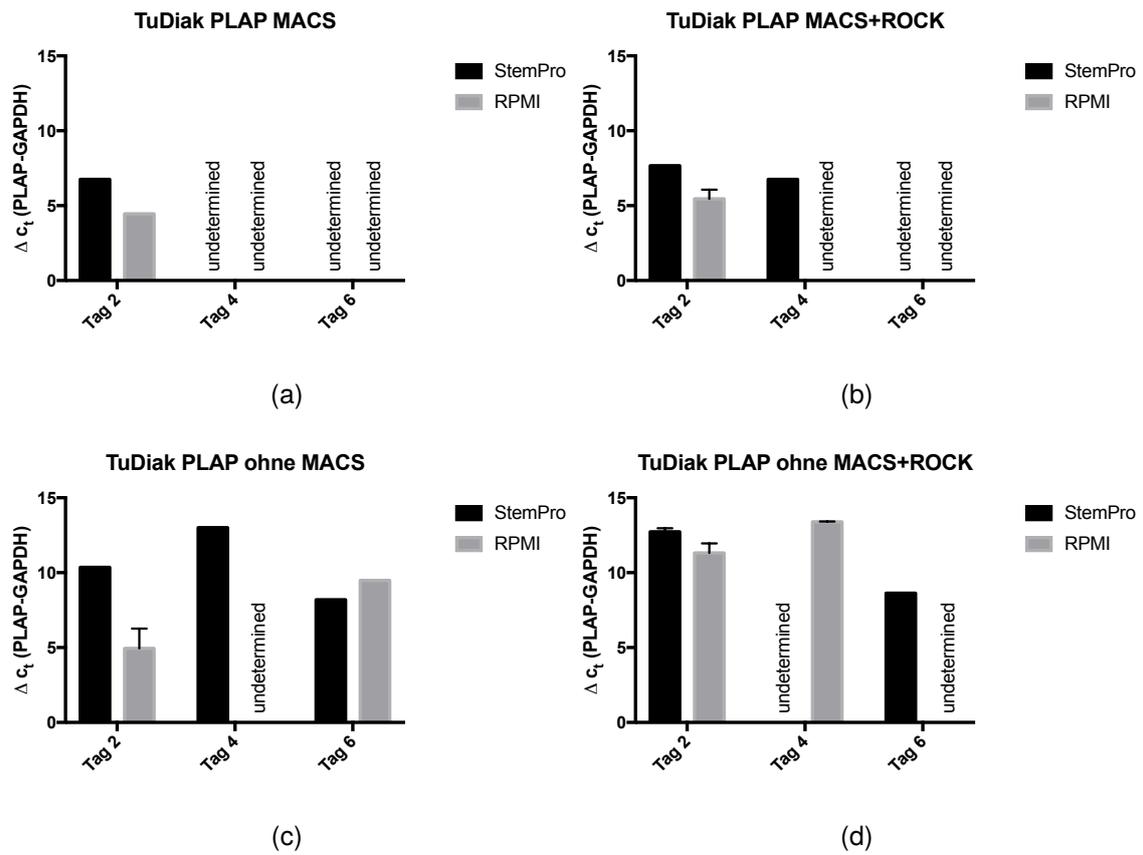


Abbildung 3.29: Tumor Diak PCR PLAP - StemPro versus RPMI

4 Diskussion

Seminomzellen sterben in herkömmlicher Kultur nach durchschnittlich drei Tagen (Berends et al., 1991). Schon von mehreren Arbeitsgruppen wurde versucht, eine Zelllinie, wie beispielsweise TCam-2, JKT-1 oder SEM-1 zu entwickeln. Diese stellten sich teilweise im Nachhinein als in besonderer Weise mutiert (TCam-2, (de Jong et al., 2008)), durch ein embryonales Karzinom kontaminiert und damit aus zwei Subpopulationen bestehend (TCam-2, (Eppelmann et al., 2013)) oder etwas anderes als Seminomzellen heraus (JKT-1, (Eckert et al., 2008)). SEM-1 wurde aus einem mediastinalen Seminom entwickelt (Russell et al., 2013) und kann deshalb ebenfalls nicht als beispielhaft für ein gonadales Seminom gesehen werden. Für die Forschung essentiell wäre also eine weitere, repräsentative Seminomlinie. Ein großer Schritt in diese Richtung kann durch das Verlängern der Kulturzeit von Seminomen geschehen. Diese wurde unter anderem schon von Berends et al. durch das Kultivieren auf Sertoli-Feederzellen erfolgreich auf durchschnittlich 3-11 Tage verlängert. Gleichzeitig wurde von Fend et al. sowie unserer Arbeitsgruppe die Beobachtung gemacht, dass lymphoblastische B-Zelllinien in Seminomkulturen entstehen und diese überwuchern (Fend et al., 1995). Diese Arbeit verfolgt die Idee, dass Seminomzellen zum einen durch Heraussortierung dieser Lymphozyten möglicherweise länger in Kultur gehalten werden können und dadurch Experimenten zugänglich gemacht werden können. Zum anderen werden verschiedene Einflussfaktoren wie die Zugabe bestimmter Faktoren oder die Kultur in spezialisierten Medien getestet.

4.1 Gewebe

Der Einschluss von Patienten erfolgte nach genauen Kriterien: Nur ein histologisch gesichertes Seminom mit negativem AFP-Serumlevel des Patienten wurde für die Experimente verwendet. Die Entnahme erfolgte ebenfalls nach vorgegebenen Kriterien steril und in ein gekühltes Transportmedium. Trotzdem können hier

natürlich abhängig vom jeweiligen Operateur, der Operationsdauer und den räumlichen Gegebenheiten unterschiedlich lange Zeitspannen von der Entnahme bis zur Inkulturnahme der Zellen entstehen, welche jedoch nicht länger als 8 Stunden betrug. Außerdem sind noch patientenabhängige Einflussfaktoren auf das Zellwachstum wie der Lebensstil, das Patientenalter und die Tumorprogredienz denkbar. Als Beispiel kann hier der erhöhte PLAP-Serumlevel auch bei Rauchern angeführt werden (Koshida et al., 1990). Einige patientenabhängige Faktoren sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Dies sowie die von Patient zu Patient verschiedenen Tumoreigenschaften können zu Unterschieden führen, die nur schwer zu berechnen oder statistisch zu beschreiben sind. Die Probengröße war ebenfalls von Fall zu Fall unterschiedlich, da einmal die Tumorgöße differierte, zum anderen das für die vorrangige pathologische Untersuchung benötigte Gewebe einen unterschiedlichen Anteil ausmachte. Durch die gleichmäßige Aufteilung auf 6-Well-Platten wurde dem entgegengewirkt. Trotzdem mussten auch einige Tumore aufgrund von für alle Experimente zu wenig vorhandenem Gewebe ausgeschlossen werden.

4.2 Kultur

Die Kultur konnte im Gesamtdurchschnitt bei den aufgeführten Zellen 11,5 Tage aufrechterhalten werden. Dies stellt eine Verbesserung im Vergleich zu den beschriebenen 3 Tagen (ohne Feeder) dar. Die Medien machen anscheinend keinen Unterschied, jedoch die jeweiligen Tumore untereinander, wobei der Durchschnitt bei Tumor Diak bei 15,5 Tagen und bei Tumor 301 bei 7,5 Tagen liegt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sie unterschiedliche "Voraussetzungen" zur Kultivierung wie unterschiedliche Mutationsmuster mitbringen.

Außerdem scheint die Anzahl der Erythrozyten in Kultur eine Einflussgröße auf das Überleben zu sein: In Tumor 301 beobachteten wir eine sehr hohe Anzahl der roten Blutkörperchen und dieser zeigte ein kürzeres Überleben als Tumor Diak. Mit der Annahme, dass die sterbenden Erythrozyten den pH-Wert und die Zusammensetzung des Mediums negativ beeinflussen, könnte dies erklärt werden. Nichtsdestotrotz hätte dies an einer Farbänderung des Mediums auffällig werden sollen, was nicht der Fall war. Eventuell korreliert die größere Menge der Erythrozyten aber auch mit der Vaskularisation und dadurch indirekt mit der erhöhten Immunantwort auf den Tumor, welcher folglich ein schlechteres Wachstum zeigt.

Die runden größeren Zellen könnten als Korrelat von Seminomzellen gewertet

werden, da sie nach der MACS-Sortierung ein maximales Vorkommen in der Kultur zeigten. Nach Tag 4 war ihre Anzahl stetig fallend (siehe Abbildungen 3.3 bis 3.10).

4.3 Die Methode MACS

Die magnetische Zellsortierung ist eine Methode, bei der relativ einfach unterschiedliche Zellpopulationen getrennt werden können, die danach weiterhin der Kultur zur Verfügung stehen. Dabei werden Zellen mit 50nm großen superparamagnetischen MicroBeads markiert und mittels eines Magneten von den nicht markierten getrennt. Dabei werden die Zellen laut Herstellerangaben (Miltenyi) um das 50 bis 1000fache angereichert, je nachdem, wie spezifisch und stark die magnetische Markierung ist und wie stark das Oberflächenantigen exprimiert wird. Diese Prozedur aktiviert die entsprechenden Rezeptoren zwar nicht, ist für die Zellen aber potenziell schädlich, weshalb hier die Zellen markiert wurden, die aussortiert werden sollten. Dadurch wurde versucht, möglichst wenig Einfluss auf die ohnehin sehr empfindlichen Seminomzellen auszuüben. Trotzdem wurden sie hier einer zusätzlichen Behandlung und der weitgehend unbekanntem Auswirkung eines Magneten ausgesetzt, was eine negative Einflussgröße auf das Zellwachstum gewesen sein könnte. Gleichzeitig bedeutet dies allerdings auch, dass die Seminomzellen nur indirekt durch Entfernung von Leukozyten angereichert wurden. Dabei ist es unumgänglich, dass immer noch einige davon in der Seminomkultur verbleiben. Die Auswahl des Markers CD45 erfolgte bewusst, da dieser zum einen das bekannte lymphozytäre Infiltrat, welches überwiegend aus T-Zellen besteht (Torres et al., 1997), (Hvarness et al., 2013), eliminiert. Zudem können dadurch gleichzeitig die die Sminome überwuchernden lymphoblastischen B-Zellen herausortiert werden. Auch alle anderen Zellen der hämatopoetischen Linie bis auf Thrombozyten und Erythrozyten wurden erfasst (Dahlke et al., 2004). Da letztere jedoch offensichtlich Einfluss auf die Kultur genommen haben, bleibt eine Überlegung für nachfolgende Arbeiten, ob diese nicht ebenfalls mithilfe eines weiteren Beads herausortiert oder durch einen Zentrifugationsgradienten entfernt werden sollten, um die möglichen negativen Einflussfaktoren auf die Seminomzellen so gering wie möglich zu gestalten. Da die Effizienz des MACS nicht bei 100% liegt, also immer einige Lymphozyten in Kultur verbleiben, wäre ein weiterer Versuch die Positivselektion mit PLAP, also einem Seminommarker, der ubiquitär für den immunhistochemischen Nachweis von Seminomen verwendet wird. Damit wür-

den zwar nicht alle Seminomzellen erfasst, jedoch höchstwahrscheinlich ein noch geringerer Anteil von Lymphozyten mit in die Kultur überführt. Es bleibt zu erforschen, ob die ohnehin schon geringe Zahl an lebendigen Seminomzellen bei Inkulturnahme (25% laut Berends et al. (Berends et al., 1991)) dadurch nicht zu stark eingeschränkt würde.

4.4 PCR und statistische Auswertung

Um das Vorhandensein von Lymphozyten und Seminomzellen zu quantifizieren, wurden PCRs mit unterschiedlichen Markern durchgeführt. Dabei wurden von jeder Messung Duplikate angefertigt. Noch korrekter wäre allerdings die Messung in Triplikaten, was allerdings in unserem Fall aufgrund der geringen Zellzahl und deshalb sehr kleinen Mengen an RNA nicht möglich war.

Zur Normalisierung wurde die GAPDH verwendet, ein sogenanntes Housekeeping-Gen, welches an der Glycolyse und Gluconeogenese beteiligt ist. GAPDH ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Dexamethason, Glucose, Insulin, Apoptose, der Tumorpheriferation und weiteren (Suzuki et al., 2000). Dies könnte eine Interpretation aufgrund der vielen unbekanntten patientenabhängigen Einflussfaktoren erschweren. Es gibt außerdem Hinweise in der Literatur, dass GAPDH in Seminomen aufgrund des Tumormetabolismus hochreguliert ist und deshalb zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann (Neuvians et al., 2005). Dabei werden hochregulierte Daten eher unterschätzt und herunterregulierte überschätzt. Das bedeutet, dass die hier vorliegenden Δc_t -Werte eher zu groß sind, in Wirklichkeit also eine größere Menge der jeweiligen Marker angenommen werden kann, was eine realistische Einschätzung der Ergebnisse trotzdem zulässt. Die Autoren schlagen vor, die Standardisierung nicht mit der PCR, sondern bereits davor beim Studiendesign durchzuführen, wie beispielsweise bei der Materialgewinnung, dem Transport und der RNA-Extraktion einer Gruppe im selben Reaktionszyklus. Dies wurde, soweit technisch möglich, in dieser Studie umgesetzt, indem ein genaues Protokoll zur Entnahme und Aufbereitung der Zellen sowie zur Durchführung der PCR befolgt wurde. Trotzdem mussten beispielsweise die PCR-Reaktionen aus Platzgründen auf mehrere Platten verteilt und als mehrere aufeinanderfolgende Experimente durchgeführt werden. Dass dennoch einige Δc_t -Werte negativ sind (beispielsweise in Abbildung 3.12), also die Expression des Zielgens höher als die von GAPDH ist, könnte die oben genannte tumorbedingte Hochregulation der GAPDH widerlegen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem sogenannten normalen two-way ANOVA. Die Voraussetzung dafür ist, dass keine wiederholten Messungen vorliegen: Es wurden von Anfang an Zellen den unterschiedlichen Gruppen zugeordnet und diese dann unterschiedlich behandelt. Der eine untersuchte Faktor ist die Zeit, der andere die jeweilige Behandlung. Dabei mussten undeterminierte Werte ausgelassen werden, obwohl in ihnen ebenfalls eine Aussage steckt: Höchstwahrscheinlich ist so wenig von der jeweiligen mRNA vorhanden, dass sie unter die Nachweisgrenze fällt. Das würde gleichzeitig bedeuten, dass dort, wo noch ein Wert gemessen werden konnte, mehr vom jeweiligen Marker vorliegt als in den Fällen, in denen dieser undeterminiert ist. Diese Information konnte bei der statistischen Auswertung nicht mit einbezogen werden.

4.4.1 Lymphozytenmarker

Als Lymphozytenmarker wurde CD45 ausgewählt. Dies hat den Vorteil, dass die MACS-Methode mit exakt diesem Marker durchgeführt wurde und so direkt die Effizienz dieser Methode getestet werden konnte. Es wird berichtet, dass es bis zu 10% aller Oberflächenantigene von T-Lymphozyten ausmacht (Williams and Barclay, 1986). Das wäre eine mögliche Erklärung für die negativen Δc_t -Werte in der CD45-PCR der nicht MACS-sortierten Zellen: CD45 ist ein so häufig vorkommender Marker, dass er quantitativ mehr ausmacht als GAPDH. Die Spezifität ist gegeben: Es gibt keine Hinweise in der Literatur, dass Seminome etwa CD45 exprimierten. Da des Weiteren bereits mehrfach in unserer eigenen Arbeitsgruppe immunhistochemische Färbungen mit CD45 von Seminomen durchgeführt wurden (Tamara Brenauer, unveröffentlichte Ergebnisse), kann davon ausgegangen werden, dass diese CD45 negativ sind.

4.4.2 Seminommarker

Sowohl c-Kit als auch PLAP werden zur Identifikation von Seminomen verwendet (Strohmeyer et al., 1991), (Biermann et al., 2006). Die PLAP-Expression ist dabei nicht auf Seminome beschränkt, sie ist auch teilweise positiv in anderen Keimzelltumoren, vor allem embryonalen Karzinomen (Burke and Mostofi, 1988). C-Kit ist relativ spezifisch für Seminome bezogen auf alle TGCT, kann aber zu einem geringen Prozentsatz auch in gewöhnlichen Keimzellen und Spermatogonien nachgewiesen werden (Bokemeyer et al., 1996), (Sandlow et al., 1997). Da

es diese nicht neoplastischen Keimzellen im Gegensatz zu PLAP unspezifisch färbt, ist es laut Biermann et al. nicht zur alleinigen Diagnose eines Seminoms oder dessen Vorstufe GCNIS geeignet (Biermann et al., 2012).

In Seminomen ist c-Kit in 90% (Gallegos et al., 2011) bis 100% (Izquierdo et al., 1995) der Fälle positiv. PLAP-Positivität wird auf über 95% der Fälle angegeben (Burke and Mostofi, 1988). Die Kombination mehrerer Marker wird als hilfreich angesehen (Raspollini, 2014), (Ulbright, 2005), weshalb auch hier auf die zwei gängigen zurückgegriffen wurde.

4.5 MACS versus ohne MACS: Auswirkung auf Seminomkultur (qualitativ)

Wie oben gezeigt, konnte die Methode ihre Aufgabe, CD45-positive Zellen herauszufiltern, erfüllen. Die eigentlich interessante Frage ist nun aber, ob dies sich auch auf die Kultur der Seminomzellen ausgewirkt hat. Das kann zum einen durch die Kulturmikroskopie und zum anderen mithilfe der Marker c-Kit und PLAP geklärt werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 4.1 und 4.2.

4.5.1 Tumor 301

Bei den Zellen von **Tumor 301 ohne Y27632 im StemPro-Medium** sind an Tag 2, 4 und 6 mikroskopisch Seminomzellen zu erkennen. Hingegen gelingt der Nachweis von Seminommarkern hier nur jeweils in der nicht MACS-sortierten Fraktion. Zu allen 3 Zeitpunkten kann weder c-Kit noch PLAP in der PCR nachgewiesen werden. Dies ist insofern erstaunlich, als dass in der Kultur immer Seminomzellen sichtbar waren und lässt deshalb nur den Schluss eines systematischen Fehlers bei der PCR zu. Eine weitere denkbare Alternative wäre, dass die Zellen, die in Kultur gesehen wurden, nicht für den PCR-Nachweis ausreichen oder dies gar keine Seminomzellen waren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Zellen mit denen anderer Kulturen verglichen wurden.

Tabelle 4.1: Übersicht über Vorkommen von Seminomzellen bei Tumor 301, ✓ steht für vorhanden, x für nicht vorhanden

	Kultur		PCR c-Kit		PCR PLAP	
	MACS	+CD45	MACS	+CD45	MACS	+CD45
StemPro-Y27632 Tag 2	✓	✓	x	✓	x	✓
Tag 4	✓	✓	x	✓	x	✓
Tag 6	✓	✓	x	✓	x	x
StemPro+Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	x	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	x	x
Tag 6	x	x	x	✓	x	x
RPMI - Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	x	✓
Tag 6	✓	x	✓	✓	✓	✓
RPMI + Y27632 Tag 2	✓	✓	x	✓	x	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 6	✓	x	✓	✓	✓	✓

Bei **Tumor 301 + Y27632 im StemPro-Medium** konnten Seminomzellen an Tag 2 und 4 in Kultur gesehen werden und auch der Nachweis von c-Kit erfolgt sowohl bei den mit MACS sortierten als auch den unsortierten Zellen. PLAP kann in der MACS-Fraktion an keinem der 3 Zeitpunkte nachgewiesen werden, was eventuell auf einen Messfehler hindeutet (Pipettierfehler, Gerätefehler). Zum Nachweis eines Seminoms sollten eigentlich beide Marker positiv sein, was hier nicht der Fall ist. Es ist also ebenfalls denkbar, dass hier schon an Tag 2 keine Seminomzellen mehr vorliegen, da sie eventuell durch die MACS-Prozedur zu stark geschädigt wurden und abstarben oder ein Fehler bei der Sortierung selbst passiert ist. Dies würde allerdings den Ergebnissen der Kultur widersprechen, da dort Seminomzellen zu sehen waren. An Tag 6 sind keine Seminomzellen in Kultur mehr sichtbar, c-Kit wurde aber in der nicht MACS sortierten Fraktion nachgewiesen. Da die PCR-Ergebnisse von c-Kit und PLAP sich nicht decken, muss hier vermutet werden, dass c-Kit eventuell etwas anderes außer Seminomzellen nachweist, wie beispielsweise Spermatozoen. Eine Diskussion weiterer Gründe findet sich bei Tumor Diak.

In der Kultur im StemPro-Medium haben also die Tumor 301-Seminomzellen wohl besser überlebt, wo die CD45-positiven Zellen noch vorhanden waren. Bei einem

c_t -Wert der GAPDH von zum Beispiel ca. 35,36 bei der MACS-sortierten Linie ist allerdings die Nachweismöglichkeit von einem seltener als GAPDH vorkommenden Marker bei 45 PCR-Zyklen sehr beschränkt. Andere Überlegungen sind hier, ob zum Überleben der Seminomzellen eine gewisse Zelldichte für das richtige Milieu oder Microenvironment notwendig sein könnten. Eventuell sind durch die MACS-Prozedur doch mehr Seminomzellen abgestorben als bei den nicht MACS-sortierten, die hier nun fehlen. Dies müsste sich allerdings auch in einer Differenz der Δc_t -Werte von c-Kit und PLAP zwischen den sortierten und den unsortierten Zellen niederschlagen, was hier nicht der Fall war.

Bei **Tumor 301 ohne Y27632 im RPMI-Medium** wurden hier an Tag 6 in Kultur bei den unsortierten Zellen keine Seminomzellen mehr gesehen, wohingegen in der PCR sowohl c-Kit als auch PLAP positive Ergebnisse lieferten. Also müssen sich wohl doch noch Seminomzellen in Kultur befunden haben, die eventuell übersehen wurden. Auch denkbar wäre ein Persistieren von c-Kit und PLAP bei schon abgestorbenen Zellen, wobei die Halbwertszeit von c-Kit-mRNA in hämatopoetischen Stammzellen durchschnittlich 2-4 Stunden betrug (Dubois et al., 1994), für PLAP sind keine Daten in der Literatur vorhanden. Allerdings gilt diese Überlebenszeit nur für intrazelluläre mRNA und kann daher erheblich von den extrazellulären Konzentrationen abweichen. Ansonsten wurde an Tag 2 und 4 jeweils übereinstimmend ein Seminom sowohl in der Kultur als auch in der c-Kit und PLAP-PCR nachgewiesen bis auf das negative PLAP-Ergebnis an Tag 4 der MACS-sortierten Zellen, was bei PLAP-Nachweis an Tag 6 am ehesten als Messfehler zu werten ist. Es wäre auch ein Abfallen des Seminommarkers unter die Nachweisgrenze durch eine zu geringe Anzahl an Zellen denkbar, die bis Tag 6 wieder zunehmen, was jedoch in der Kultur so nicht beobachtet wurde.

In **Tumor 301 + Y27632 im RPMI Medium** kann einmal die gleiche Beobachtung gemacht werden wie im StemPro: die PLAP-PCR in der MACS-Linie bleibt an Tag 2 negativ, hier ist sogar c-Kit ebenfalls negativ. Ein Grund dafür könnte sein, dass die PCR an Tag 1 über 40 Zyklen durchgeführt wurde und an den darauffolgenden Tagen über 45 Zyklen. Dagegen spricht jedoch, dass die c_t -Werte bei den späteren Zeitpunkten (also Tag 4 und Tag 6) ebenfalls nie über 40 lagen, an Tag 2 also theoretisch mehr vorhanden sein müsste und damit die eventuell positiven Ergebnisse mit 40 Zyklen erfasst werden müssten. Außerdem wurden hier an Tag 6 ebenfalls wie bei den Zellen ohne ROCK-Inhibitor in RPMI in der Kultur keine Seminomzellen mehr gesehen, was oben diskutiert wurde. Alles in allem ist in RPMI zum einen die Übereinstimmung zwischen Kultur und PCR recht groß, zum anderen ist häufig ein Nachweis in allen drei Kategorien noch an Tag 6 zu

erbringen, was mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit ein Seminom nachweist.

4.5.2 Tumor Diak

Tabelle 4.2: Übersicht über Vorkommen von Seminomzellen bei Tumor Diak, ✓ steht für vorhanden, x für nicht vorhanden

	Kultur		PCR c-Kit		PCR PLAP	
	MACS	+CD45	MACS	+CD45	MACS	+CD45
StemPro-Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	x	✓
Tag 6	✓	✓	✓	✓	x	✓
StemPro+Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	✓	x
Tag 6	✓	✓	✓	x	x	✓
RPMI - Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	x	x
Tag 6	✓	✓	✓	✓	x	✓
RPMI + Y27632 Tag 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tag 4	✓	✓	✓	✓	x	✓
Tag 6	✓	✓	✓	✓	x	x

Tumor Diak - Y27632 im StemPro-Medium zeigt gleiche Tendenzen wie Tumor 301: PLAP ist an Tag 4 und 6 bei den Zellen, die MACS-sortiert wurden, nicht nachweisbar, ansonsten passen alle Ergebnisse sehr gut zueinander, sowohl in Kultur als auch bei der c-Kit PCR. In den MACS-sortierten Zellen ist also nur an Tag 2 sicher ein Seminom vorhanden, bei den Zellen ohne Sortierung bis Tag 6.

Auch für **Tumor Diak + Y27632 im StemPro-Medium** zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Kultur und PCR. An Tag 2 und Tag 4 sind eindeutig überall Seminomzellen vorhanden, nur an Tag 4 konnte bei der nicht MACS-Fraktion der Zellen kein PLAP nachgewiesen werden. Dies ist erstaunlich, da an Tag 6 der Nachweis wieder gelingt, was am ehesten auf einen Messfehler oder ein mögliches Versagen des Primers zurückzuführen sein könnte. An Tag 6 sind Hinweise auf Seminomzellen immer noch vorhanden, c-Kit kann bei der Zellfraktion, die CD45-positive Zellen enthält, nicht nachgewiesen werden. Das könnte

einen Vorteil für die Zellen, die MACS-sortiert wurden, bedeuten, da der Marker hier positiv ist. Da dies jedoch der einzige Fall ist, kann nicht von einer generellen Tendenz gesprochen werden. PLAP hingegen fehlt in der MACS-Fraktion, wobei c-Kit dort noch vorhanden war. Bei Tu Diak wurde gehäuft beobachtet, dass dort, wo c-Kit noch nachweisbar war, PLAP bereits unter die Nachweisgrenze gefallen war. Hier können unterschiedliche Gründe diskutiert werden. Denkbar wäre, dass der Primer von PLAP schlichtweg nicht so gut funktioniert wie der Primer von c-Kit. Dagegen spricht jedoch das trotzdem häufig übereinstimmende PCR-Ergebnis von c-Kit und PLAP. Eine weitere Erklärung wäre, dass PLAP bei Seminomzellen, wenn diese absterben, früher herunterreguliert wird als c-Kit. Dafür spricht, dass PLAP auch bei erfolgreicher Seminomtherapie im Serum abfällt (Wahren et al., 1986), konkrete Hinweise fehlen jedoch in der Literatur. Des Weiteren könnte das positive c-Kit hier auch auf andere mögliche Bestandteile eines Hodentumorsektats wie beispielsweise Spermatogonien zurückzuführen sein.

Wie oben diskutiert kann bei den Zelllinien ohne Nachweis von PLAP nicht mit vollständiger Sicherheit von einem Seminomnachweis gesprochen werden. Dies würde in diesem Fall bedeuten, dass an Tag 4 und 6 kein Seminom mehr vorliegen könnte.

Auch bei **Tumor Diak - Y27632 im RPMI-Medium** ist diese Konstellation vorhanden: PLAP ist in der MACS-Zellfraktion an Tag 4 und 6 nicht nachweisbar, hier allerdings noch zusätzlich an Tag 4 bei der nicht MACS-sortierten Zellreihe negativ. In der Kultur sind zu allen gemessenen Zeitpunkten Seminomzellen vorhanden und auch c-Kit ist immer positiv. Betrachtet man **Tumor Diak + Y27632 im RPMI-Medium**, fällt erneut genau dieses Fehlen von PLAP in der MACS-Linie sowohl an Tag 4 als auch 6 auf. Dies würde erneut die oben genannte Theorie stützen. Auch in der nicht MACS-unterzogenen Reihe ist hier an Tag 6 kein PLAP mehr vorhanden. Fasst man nun die Ergebnisse von TuDiak zusammen, lag an Tag 2 mit großer Wahrscheinlichkeit ein Seminom bei allen Kulturmedien und Zusätzen vor, an Tag 4 und 6 kann dies jedoch aufgrund des häufigen Fehlens von PLAP bei den MACS-sortierten Zellen nicht immer mit letzter Sicherheit behauptet werden. Das stellt einen Unterschied zu Tumor 301 dar, bei dem PLAP häufiger bis Tag 6 nachgewiesen werden konnte, vor allem im RPMI-Medium. Multiple Unterschiede zwischen den Tumoren betreffend der proliferationsbegünstigenden Faktoren wie Mutationen oder patientenabhängige Einflüsse können hier eine Rolle gespielt haben. Auch die vermutlich längere Transportzeit von TuDiak kann sich negativ auf das Überleben der Zellen ausgewirkt haben.

Alle aufgeführten Ergebnisse wurden in Tabelle 4.2 zur besseren Übersicht zusammengefasst.

4.6 Erfolg der Methode (quantitativ)

Der Erfolg der Methode MACS kann anhand der Zusammenschau der PCR des Lymphozytenmarkers CD45 mit den Seminommarkern bestimmt werden: Hier lässt sich bei **Tumor 301** sowohl in StemPro als auch RPMI ein signifikanter Unterschied der CD45-Menge zwischen den MACS-sortierten und den unsortierten Zellen nachweisen. Es sind also anteilmäßig in den mit MACS sortierten Zellen weniger Lymphozyten vorhanden, was das erklärte Ziel dieser Methode war. Im RPMI-Medium bleibt die Lymphozytenzahl dabei bei den nicht MACS unterzogenen Zellen relativ konstant, bei den MACS-sortierten Zellen nehmen sie dafür sogar ab- das heißt im Umkehrschluss, dass hier dann anteilmäßig mehr Seminom- oder andere Zellen vorliegen müssten. Dies bestätigt sich auch tatsächlich, wenn man die beiden Seminommarker-PCR Ergebnisse im RPMI-Medium damit vergleicht. Hier kann statistisch signifikant mehr c-Kit stabil bis zu Tag 6 und sogar bei ausschließlicher Auswertung dieses Tages nachgewiesen werden. Auch für PLAP zeigt sich ein signifikant höheres Vorkommen bei den MACS-sortierten Zellen, ebenfalls bis zu Tag 6. Dies ist als Erfolg zu werten. Es sind also tatsächlich mehr Seminomzellen dort vorhanden, wo die CD45-positiven Zellen heraussortiert wurden. Dies unterstützt die eingangs formulierte Hypothese, dass die Lymphozyten die Seminomzellen eventuell überwuchern und so am Wachstum hindern. Dort, wo in der MACS-sortierten Zellfraktion im Medium RPMI über die Zeit abnehmende Lymphozytenzahlen nachgewiesen wurden, kommt genau äquivalent dazu mehr c-Kit und PLAP in den Kulturen vor (siehe Abbildung 3.14 und 3.16). Das simultane Vorkommen und Steigen beider Marker macht das Vorliegen und auch Wachsen eines Seminoms sehr wahrscheinlich. Alternativ erhöht sich die Zellzahl aller anderen Zellen in diesem Fall langsamer, das heißt die Seminomzellen werden langsamer überwachsen. Oder aber die Zellzahl der anderen Zellen verringert sich erheblich stärker als die der Seminome, wodurch deren Anzahl prozentual zunimmt.

Im StemPro-Medium zeigt sich derselbe Verlauf, hier ist an Tag 6 die Menge an CD45 jedoch zwischen den sortierten und unsortierten Zellen nicht so deutlich unterschiedlich wie bei RPMI. Dies kann daran liegen, dass Lymphozyten in StemPro nicht so gut überleben. Der undeterminierte Wert an Tag 2 in der Linie, wo kein

Y27632 hinzugegeben wurde, kann so interpretiert werden, dass die Sortierung sehr erfolgreich war und praktisch keine CD45-positiven Zellen mehr vorlagen. Denkbar ist auch, dass hier von Anfang gar keine Zellen dieser Sorte vorlagen, wogegen allerdings der hohe Wert von CD45 an Tag 4 und die Werte der anderen Linien sprechen. Bei diesen wurde stets CD45 nachgewiesen, und da die Tumorzellen immer bei Inkulturnahme zu gleichen Teilen den jeweiligen Experimenten zugeordnet wurden, ist es sehr unwahrscheinlich, dass zufällig in einem dieser Teile keine Lymphozyten vorhanden sein sollten. Die niedrigen Δc_t -Werte an Tag 4 zeugen von einem Wachstum der CD45-positiven Zellen oder einer prozentualen Zunahme, was einer Abnahme der anderen vorhandenen Zellpopulationen gleichkommt. Welche der beiden Hypothesen diesem Verlauf nun tatsächlich zugrunde liegt, lässt sich nicht vollständig klären, da ein Verlauf bei den Seminommarkern aufgrund mehrfach undeterminierter Werte nur schwer nachzuvollziehen ist. Auffällig ist jedoch, dass genau an diesem Tag 4 sowohl c-Kit als auch PLAP bei den mit Y27632 behandelten Zellen positiv ist, hier also mit großer Wahrscheinlichkeit Seminomzellen vorliegen.

Die gleiche statistische Auswertung im StemPro-Medium wie im RPMI ist aufgrund der vielen undeterminierten Werte nicht aussagekräftig. Fügt man sie mit den Werten von RPMI zusammen, ergibt sie allerdings die gleiche Tendenz: Es ist mehr c-Kit in der MACS-Fraktion vorhanden. Diese Aussage ist jedoch eher vage, da nur 2 Wertepaare als Grundlage dafür vorliegen. Außerdem muss hier zur Vervollständigung der Ergebnisse wieder die PLAP-PCR mit bewertet werden. Auch hier sind bis auf den einen oben genannten Wert an Tag 4 alle Ergebnisse der MACS-sortierten Zellen undeterminiert. Eine statistische Analyse ist hier also ebenfalls nicht möglich.

Die PCR zeigt, dass die Methode MACS auch bei **Tumor Diak** dazu geführt hat, dass weniger CD45-positive Zellen vorhanden waren. Dieser Effekt hielt in den einzelnen Medien unterschiedlich lang an, an Tag 2 war bei Tumor Diak sowohl in StemPro als auch in RPMI ein signifikanter Unterschied der Δc_t -Werte auszumachen. Auffällig sind die sich an Tag 2 im Gegensatz dazu nicht unterscheidenden Δc_t -Werte von c-Kit zwischen den MACS-sortierten und unsortierten Zellen: Eigentlich wäre zu erwarten, dass anteilmäßig an der Gesamtzellzahl bei den MACS-sortierten Zellen mehr Seminomzellen vorliegen, also mehr c-Kit als in der nicht-MACS-Zellpopulation nachzuweisen wäre. Eine Erklärung für die gleiche Menge an c-Kit in den MACS-sortierten und unsortierten Zellreihen wäre eine andere, c-Kit positive Zellpopulation wie beispielsweise Spermatogonien oder nicht neoplastische Keimzellen. Dies ist bei einem Gewebestück aus einem reinen

Seminom zwar wenig wahrscheinlich, aber möglich. Eine weitere denkbare Zellpopulation wären die ebenfalls im Seminom vorkommenden synzytiotrophoblastischen Riesenzellen (Hedinger et al., 1979). Laut einer immunhistochemischen Studie mit intrakraniellen Germinomen kommt c-Kit sowohl auf Seminomzellen als auch den genannten synzytiotrophoblastischen Zellen vor (Nakamura et al., 2005), wohingegen Takeshima et al. konstatierten, dass keine Antikörperfärbung dieser Zellen für c-Kit möglich sei. (Takeshima et al., 2004). In dieser Studie wird auch gezeigt, dass das lymphozytäre Infiltrat c-Kit-negativ ist.

Für PLAP verhält es sich hingegen anders: Hier sind die MACS-sortierten und unsortierten Zellen signifikant unterschiedlich: Es kommen also an Tag 2 anteilmäßig mehr Seminomzellen in den MACS-sortierten Kulturen vor. Dieser Fakt stützt die These, dass PLAP Semineome spezifisch nachweist. Im weiteren Verlauf unterscheiden sich die beiden Medien wieder: im RPMI-Medium zeigt sich einmal in den Zellen ohne MACS eine gleichbleibend hohe Anzahl an CD45 von Tag 2 auf Tag 4. Hier bleibt die Lymphozytenzahl wohl unverändert, was auch für die Seminomzellen zuzutreffen scheint, betrachtet man die konstanten Werte von Tag 2 und 4 bei c-Kit und PLAP, wobei letzteres einmal nicht nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 3.15).

Für die MACS-sortierten Zellen sieht es jedoch anders aus: hier verändert sich die Menge an CD45 von Tag 2 auf Tag 4, und zwar wird es mehr, dort wo kein Y27632 zugegeben wurde und weniger, wo ROCK-Inhibitor supplementiert wurde. Die Seminommarker verhalten sich hier allerdings nicht komplementär: c-Kit bleibt gleich, wo CD45 deutlich zunimmt (c), PLAP hingegen ist an Tag 4 der MACS unterzogenen Zellen in RPMI nicht nachweisbar und bleibt dies auch an Tag 6, wo CD45 wieder deutlich abfällt. Diese Ergebnisse können zu zwei Aussagen führen: zum einen wird erneut die These, dass durch c-Kit etwas anderes außer ein Seminom unspezifisch nachgewiesen wird, untermauert. Zum anderen kann hier wahrscheinlich beobachtet werden, wie durch den Anstieg von CD45-positiven Zellen Seminomzellen abnehmen, sie werden also höchstwahrscheinlich von diesen überwuchert. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit wäre, dass die Seminomzellen von selbst in die Apoptose gehen und deshalb an Tag 4 anteilmäßig mehr CD45 vorliegt. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass bei der Zellpopulation, bei der von Tag 2 auf Tag 4 CD45 abfällt, PLAP ebenfalls an Tag 4 nicht mehr nachweisbar ist. Hier sind die Seminomzellen also trotz einer sinkenden Anzahl an CD45-positiven Zellen unter der Nachweisgrenze, was gegen eine gerichtete Lymphozytenaktivität spricht. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass PLAP falsch negativ sein könnte. c-Kit verhält sich hier erneut

ungerichtet, es ist vorhanden, wenn auch in annähernd gleichbleibender Menge.

Im StemPro-Medium sind an Tag 4 die CD45-Level höher: sowohl bei den Zellen, wo Y27632 hinzugefügt wurde, als auch ohne Supplementierung, sowohl in den MACS-sortierten als auch den unsortierten Zellen. Erneut hält also im StemPro der Erfolg der MACS-Sortierung nicht so dauerhaft an wie in RPMI. c-Kit folgt diesem Trend nur andeutungsweise, von Tag 2 auf Tag 4 fällt es leicht, aber nicht signifikant ab. PLAP hingegen ist an Tag 4 bei den MACS-unterzogenen Zellen ohne ROCK-Inhibitor undeterminiert, was wieder als Fehlen von Seminomzellen gedeutet werden muss. Bedenkt man hier jedoch, dass bei den Doppelbestimmungen oft nur ein Wert bestimmbar war, ist auch ein falsch negatives Ergebnis aufgrund fehlender Funktionalität des Primers denkbar. Bei den Zellen, wo ROCK-Inhibitor dazugegeben wurde, ist es umgekehrt: Hier ist PLAP bei der MACS-Fraktion von Tag 2 auf Tag 4 beinahe unverändert nachweisbar, hingegen der Wert für PLAP an Tag 4 bei den Zellen ohne MACS-Sortierung nicht nachweisbar. Bei PLAP gibt es allgemein viel häufiger undeterminierte Werte. Dies kann unterschiedliche Gründe haben: Einmal materialtechnisch bedingt, wobei die c-Kit PCR jeweils auf der gleichen Platte durchgeführt wurde und deshalb als Unterschied nur der Primer in Betracht kommt. Da dieser des Öfteren bei den Duplikaten nur in einem Fall einen Δc_t -Wert geliefert hat, der dann aber teilweise nicht etwa kurz vor dem 40.-PCR Zyklus, sondern darunter lag, kann auch von einer gewissen fehlerhaften Funktionalität des Reaktionsansatzes ausgegangen werden.

4.7 Zugabe von ROCK-Inhibitor Y-27632

ROCK-Inhibitor ist ein potenter Apoptosehemmer bei ESC (Ichikawa et al., 2012), außerdem verbessert er das Überleben von ESC nach Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) (Emre et al., 2010). Er scheint außerdem protektiv auf Hodengewebe zu wirken (Çayan et al., 2014). Erst kürzlich wurde ein positiver Einfluss von ROCK-Inhibitor auf die von T-Lymphozyten vermittelte Toxizität berichtet (Nozaki et al., 2015). Inwiefern er diese Effekte in der Seminomkultur ausübt, wurde noch nicht untersucht. Es handelt sich beim Seminom um einen Tumor, der einige übereinstimmende Eigenschaften mit Stammzellen zeigt (Looijenga et al., 2007). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Zellsortierungsmethode angewandt, die auf der Markierung von Oberflächenantigenen beruht. Dies führt zur Überlegung, ob der ROCK-Inhibitor auch in diesem Fall protektiv wirkt.

4.7.1 Tumor 301

Die Frage, ob sich der ROCK-Inhibitor bei Tumor 301 auf das Wachstum von Lymphozyten auswirkt, kann für das Kulturmedium StemPro mit einem klaren Nein beantwortet werden. Die CD45 PCR-Ergebnisse zeigen weder bei den mit MACS sortierten noch unsortierten Zellen einen Unterschied zwischen den mit Y27632 supplementierten und un-supplementierten Zellen. Auch über den Zeitverlauf zeigt sich keine Tendenz, dass sich ROCK-Inhibitor-Zugabe in irgendeiner Weise auswirken würde. Die Seminommarker-PCR zeigt ebenfalls keinen Überlebensvorteil für die Zellen, denen ROCK-Inhibitor zugegeben wurde. Im RPMI-Medium bewirkt ROCK-Inhibitor bei den unsortierten Zellen ein höheres Vorkommen an CD45. Hier würde also das Wachstum der Lymphozyten gesteigert, was bei den MACS-sortierten Zellen nicht der Fall ist. Auch sind in den Seminommarker-PCRs keine entsprechend signifikanten niedrigeren Werte an cKit oder PLAP.- Lediglich in einigen Fällen kann dort, wo die Zellen ohne Supplementierung durch Y27632 einen undeterminierten Wert liefert, noch c-Kit (Abbildung 3.20 a) bzw. PLAP (Abb 3.22 c) nachgewiesen werden. Dies ist allerdings ein sehr schwaches Indiz aufgrund der fraglichen Aussage eines undeterminierten Wertes. Der ROCK-Inhibitor hat also weder im RPMI noch StemPro-Medium einen positiven Effekt auf das Überleben von Seminomzellen.

4.7.2 Tumor Diak

Bei Tumor Diak verhält es sich betreffend der Anzahl der Lymphozyten ebenso. Die CD45 PCR zeigt fast übereinstimmende Δc_t -Werte zwischen den supplementierten und unbehandelten Zellen, bei den MACS-sortierten Zellen sind die Werte unterschiedlicher. Dies könnte ein Hinweis auf einen eventuell doch vorhandenen Einfluss des ROCK-Inhibitors sein, der sich ohne Lymphozyten auswirkt. Konkrete Hinweise hierzu fehlen in der Literatur. Bezüglich c-Kit und PLAP wurde im RPMI-Medium eine signifikante Auswirkung des ROCK-Inhibitors nachgewiesen, und zwar entgegengesetzt der erwarteten Wirkung: es sind jeweils signifikant weniger c-Kit und PLAP vorhanden, also weniger Seminomzellen in den mit Y27632 behandelten Kulturen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der ROCK-Inhibitor positive Auswirkungen auf das Überleben von Lymphozyten hat, was wiederum den Seminomzellen schadet. Dies müsste sich jedoch in den Δc_t -Werten der CD45 PCR niederschlagen, was nicht der Fall ist. Es bleibt also noch die Möglichkeit, dass Y27632 einen negativen Einfluss auf Seminomzellen

hat, der näher nicht bekannt ist. Dies könnte auch in Zusammenhang mit dem Medium stehen, eventuell interagiert Y27632 mit einem Inhaltsstoff von supplementiertem RPMI in einer sich negativ auf Seminomzellen auswirkenden Weise. Dafür infrage käme die sich als einziges vom StemPro Medium unterscheidende hohe Konzentration an FBS. Tatsächlich wurde in der Literatur beschrieben, dass FBS die Zellproliferation von glatten Muskelzellen des Bronchialsystems steigert und diese Proliferation spezifisch durch Y27632 gehemmt wird. Genauer wird die Membranlokalisation von RhoA (aktivem Rho) deutlich durch FBS (10%) erhöht (Takeda et al., 2006). Ein solcher Vorgang ist auch bei Seminomen gut vorstellbar: Die hohe Konzentration an FBS im supplementierten RPMI-Medium (ebenfalls 10%) steigert die Proliferation der Seminomzellen über den Rho-Kinase-Weg und wird dann durch Y27632 direkt inhibiert. Diese bedeutsame Erkenntnis sollte auf jedem Fall durch weitere Experimente bestätigt werden und könnte schlussendlich ein neues Therapeutikum beinhalten.

In StemPro sind diese Auswirkungen des ROCK-Inhibitors nicht nachzuweisen, jedoch sind in PLAP Tendenzen in die gleiche Richtung zu erkennen. Erneut kann hier der gleiche Mechanismus vermutet werden, der in StemPro aufgrund der niedrigeren Konzentration an FBS (1% ESC-FBS im Gegensatz zu 10% in RPMI) jedoch nicht so stark ausgeprägt ist und deshalb nicht signifikant zum Tragen kommt. Außerdem ist der Effekt eventuell bei ESC-FBS anders geartet. Für diese Theorie sprechen die c-Kit-Werte der nicht MACS-sortierten Zellen in StemPro: Hier ist ebenfalls tendenziell weniger c-Kit in den Zelllinien mit Y27632-Zugabe enthalten. Ein widersprüchliches Ergebnis hingegen liefert die c-Kit-PCR bei den MACS-sortierten Zellen: hier ist eher tendenziell mehr c-Kit in den mit Y27632 behandelten Kulturen vorhanden.

Zur Wachstumsförderung ist die Zugabe von Y27632 zu Seminomkulturen also nicht geeignet.

4.8 Kulturmedien im Vergleich

Zur Kultur der Seminomzellen wurden zwei Medien ausgewählt. RPMI deshalb, weil es das Standardkulturmedium von TCam-2 ist und StemPro vor dem Hintergrund, dass Seminome gewisse Gemeinsamkeiten mit Stammzellen aufweisen (Looijenga et al., 2007) und um eine Alternative zum RPMI zu bieten, welches regelmäßig zur Kultivierung normaler und neoplastischer Leukozyten eingesetzt

wird (Moore et al., 1967). Dabei kommt es für periphere Blutlymphozyten in einer Zusammensetzung von 80% RPMI 1640 und 20% FBS zum Einsatz, für die Seminomkultur mit 10% FBS. Es kamen Supplements zum Einsatz, die sich vor allem positiv auf die Zellproliferation auswirken sollen: GDNF trägt erwiesenermaßen zum besseren Wachstum von Hodenzellen bei (Kanatsu-Shinohara et al., 2004) und wird von Sertolizellen gebildet und sorgt hier auf parakrinem Weg dafür, dass genügend undifferenzierte Spermatogonien vorhanden sind. Es wurde die Beobachtung gemacht, dass bei GDNF überexprimierenden Mäusen mit der Zeit TGCT entstehen (Meng et al., 2000). Wird die Selbsterhaltung von Spermatogonien gefördert, ist in Hinblick auf die Ergebnisse denkbar, dass genau diese durch die c-Kit-PCR nachgewiesen wurden (Bokemeyer et al., 1996), was die häufig unterschiedlichen Ergebnisse von c-Kit und PLAP erklären könnte.

Auch EGF und bFGF sollen zum Wachstum beitragen, wobei interessanterweise sogar T-Lymphozyten, die Tumore infiltrieren, eine Produktion dieser beiden Faktoren zeigten (Peoples et al., 1995) und so proliferationssteigernd wirken. In dieser Hinsicht macht es doppelt Sinn, diese Faktoren zu supplementieren, wenn durch die Methode MACS die Lymphozyten depletiert werden und dieser Aspekt einer möglichen positiven Auswirkung des lymphozytären Tumorinfiltrats wegfällt. Diese werden hier gleichermaßen mit den für die Überwucherung der Seminome durch Bildung einer lymphoblastischen B-Zelllinie verantwortlichen B-Lymphozyten herausortiert. Neuere Quellen hingegen gehen eher von einer proapoptotischen Wirkung der T-Lymphozyten auf Seminomzellen aus (Yakirevich et al., 2002). Nicht nur für das Überleben von Spermatogonien, sondern auch für das Wachstum und Erhaltung der Kultur von spermatogonalen Mäusestammzellen fanden Kubota et al. die beiden Faktoren GDNF und bFGF (Kubota et al., 2004) als essentiell. Progesteron und Estradiol wurden ebenfalls zur Wachstumsförderung hinzugegeben. Es ist bekannt, dass Estrogen alle Arten von Hodenzellen, wie auch die Keimzellen, in ihrem Wachstum beeinflusst (Schulster et al., 2016). Auf die in den entsprechenden Protokollen vorgesehene Zugabe von LIF wurde verzichtet unter dem Aspekt, dass der LIF-Rezeptor auch auf Leukozyten exprimiert wird (Janssens et al., 2015) und das Wachstum hämatopoetischer Zellen steigert (Yue et al., 2015). Yao et al. zeigten, dass humane ESC stabil ohne Feeder überleben, wenn man unter anderem den Zellkulturzusatz N2 zugibt (Yao et al., 2006), was von anderen Gruppen bestätigt wurde (Zhao et al., 2011) Eine weitere Versuchsreihe, die das Standard-RPMI mit einschließt, wäre wünschenswert, hier allerdings aufgrund der geringen Zellmenge pro Tumor nicht durchführbar.

4.9 Auswirkungen der Kulturmedien auf die Zellkultur

4.9.1 Tumor 301

Die CD45 PCR zeigt für Tumor 301 für die nicht MACS-sortierte Zellpopulation eindeutig, dass Lymphozyten in RPMI besser wachsen als in StemPro. Dies ist nicht überraschend, da RPMI eines der Standardkulturmedien für Lymphozyten ist. Gleichzeitig kann diese Vorliebe der Lymphozyten allerdings durch die MACS-Sortierung wettgemacht werden: Werden die CD45-positiven Zellen größtenteils entfernt, gibt es keine klare Tendenz mehr für ein Medium, es ist sogar tendenziell eher mehr CD45 in StemPro. Eventuell benötigen die Lymphozyten ein gewisses Microenvironment, also auto- und parakrine Wachstumsfaktoren, die nur ab einer bestimmten Zellzahl ausreichend wirken können oder produziert werden. Ist die Zellzahl zu gering, sind sie vermutlich auf Wachstumsfaktoren aus dem Stammzellmedium StemPro angewiesen. Bei der Auswertung der Seminommarker fällt auf, dass sowohl c-Kit als auch PLAP bei den MACS-sortierten Zellen je überwiegend (c-Kit) bzw. ausschließlich (PLAP) im RPMI-Medium noch nachzuweisen sind. Seminomzellen wachsen also unter Abwesenheit von Lymphozyten bevorzugt in RPMI-Medium. Dies gilt jedoch nicht für unsortierte Zellen: Diese zeigen keinen Unterschied zwischen den beiden Medien, was c-Kit betrifft und einzelne undefinierte Werte in StemPro für PLAP. Das bedeutet für zukünftige Experimente: wenn die MACS-Methode angewendet werden soll, ist eine Kultur in RPMI Medium erfolversprechender, wenn die Seminomzellen nicht MACS-sortiert werden, eher in StemPro, da hier die Lymphozyten signifikant schlechter wachsen.

4.9.2 Tumor Diak

Tumor Diak zeigt für CD45 dieselben Ergebnisse, die unsortierten Zellen weisen weniger CD45 in StemPro auf, die MACS-sortierten Zellen diesmal signifikant mehr CD45 in StemPro, was die oben genannte Vorgehensweise der Kulturmedienauswahl bestätigt. Die c-Kit PCR zeigt hier der PLAP PCR entgegengesetzte Ergebnisse, da c-Kit vorrangig in StemPro-Medium erhöht ist, PLAP hingegen in RPMI. Auffällig ist auch, dass c-Kit den eindeutigen Vorzug für StemPro nur mit Y27632 zeigt, ohne diesen Zusatz findet sich in zwei von drei Wertepaaren im RPMI mehr c-Kit. Dies lässt wieder den Rückschluss auf eine etwaige dritte c-Kit

positive Zellpopulation wie beispielsweise Spermatogonien zu, die in StemPro-Medium besser wächst, am besten in Kombination mit dem ROCK-Inhibitor. Die in der Literatur als erfolgreich beschriebene Kultivierung von Spermatogonien erfolgte mittels DMEM plus FBS, welches mit den Wachstumsfaktoren GDNF, LIF, bFGF und EGF) supplementiert wurde (Shirazi et al., 2014). In dieser Zusammensetzung gleicht es eher StemPro. Gleichzeitig betonen die Autoren jedoch, dass vor allem das zugegebene GDNF für das bessere Überleben verantwortlich sei. Vertraut man hier also wieder der diagnostischen Spezifität von PLAP, zeigt sich ein bevorzugtes Wachstum von Seminomzellen in RPMI-Medium.

4.10 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Bei der Auswertung aller Ergebnisse kann also der Schluss gezogen werden, dass die Methode MACS insgesamt erfolgreich war. Sie konnte, wie in den Kulturbildern und durch CD45-PCR aufgezeigt, die CD45-positiven Zellen signifikant verringern. Dies zeigt auch Auswirkungen auf die Seminomkultur. Hier konnten mehr Seminommarker bei Tumor 301 im RPMI-Medium im Vergleich zu den unsortierten Zellen gefunden werden. Das bessere Wachstum in RPMI stimmt überein mit der Tatsache, dass die einzige bekannte Seminomlinie TCam-2 ebenfalls in diesem Medium kultiviert wird. Das Überleben von Seminomzellen in Kultur kann also durch Heraussortieren von Lymphozyten und durch Kultivieren in RPMI-Medium verlängert werden, was das erklärte Ziel dieser Arbeit war. Dieser positive Effekt der MACS-Sortierung kann für Tumor Diak nicht bestätigt werden, da hier sehr viele Werte der PCR undeterminiert sind, widerspricht aber den Ergebnissen von Tumor 301 nicht. Entgegen der Erwartungen, dass ROCK-Inhibitor sich als Apoptosehemmer positiv auf das Überleben auswirken könnte, hat dieser den gegenteiligen Effekt. Im RPMI-Medium wird durch den Einfluss von Y27632 die Menge an Seminommarkern verringert. Seine Anwendung zur Verbesserung des Überlebens kann also nicht empfohlen werden.

5 Zusammenfassung

Keimzelltumoren sind die häufigste Todesursache für Männer zwischen 20 und 40 Jahren. Zur Erforschung eines dieser Keimzelltumore, dem Seminom, stehen bis heute nur begrenzte Möglichkeiten zur Verfügung. Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, durch unterschiedliche Herangehensweisen entweder das Überleben von Seminomzellen in Kultur zu verlängern oder eine Zelllinie zu generieren, was bis jetzt nur im Fall von TCam-2 erfolgreich war. Gleichzeitig wurde die Beobachtung gemacht, dass Seminome von B- und vor allem T-Lymphozyten infiltriert und dadurch von diesen geschädigt werden. In vivo ist dies von Vorteil und wird als einer der Gründe für die gute Prognose von Seminomen angesehen. In vitro jedoch könnten genau diese Lymphozyten Grund für das schlechte Überleben von Seminomzellen in Kultur sein. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit bei Inkulturnahme von Seminomen durch eine magnetische Zellsortierungsmethode (MACS), die CD45-positiven Zellen heraus-sortiert. Die Zellen wurden dann in zwei verschiedenen Medien, StemPro und RPMI, in Kultur genommen und je der ROCK-Inhibitor Y27632 zur Hälfte der Zellen gegeben. Die verschiedenen Zellreihen wurden regelmäßig fotografiert und an jedem zweiten Tag wurde ein gewisser Teil der Zellen lysiert und eingefroren. Dieser Anteil wurde in einem weiteren Arbeitsschritt für eine qPCR mit dem Lymphozytenmarker CD45 und den Seminommarkern c-Kit und PLAP verwendet. In der Kulturmikroskopie konnte beobachtet werden, dass Zellen von Tumor Diak länger überlebten als Zellen von Tumor 301 (15,5 vs 7,5 Tage). Des Weiteren wurden hier die Zellen identifiziert, die wir für Seminomzellen halten. Die PCR wurde hinsichtlich der MACS-Sortierung, der Zugabe von ROCK-Inhibitor Y27632 und der Zellkulturmedien ausgewertet. Dazu wurde mit den Daten ein sogenannter normaler two-way-ANOVA durchgeführt.

Die Methode MACS war hinsichtlich der Depletion CD45-positiver Zellen bei beiden Tumoren erfolgreich. Bei Tumor 301 konnte im RPMI-Medium des Weiteren bis Tag 6 nach MACS eine signifikant größere Menge der Seminommarker c-Kit und PLAP in den MACS-sortierten Zellreihen nachgewiesen werden. In StemPro

zeigten sich die gleichen, jedoch nicht signifikanten Tendenzen. Bei Tumor Diak zeigte sich, dass c-Kit noch eine andere Zellpopulation außer Seminomzellen und Lymphozyten nachgewiesen haben musste. Außerdem hielt der Erfolg der Methode MACS dort in StemPro nicht so lange an wie in RPMI. Das MACS-Sortieren hat sich also in beiden Fällen zur Depletion der Lymphozyten und in einem Fall auch zur längeren Kultivierung von Seminomzellen als günstig erwiesen.

Die Zugabe von Y27632 zeigte bei beiden Tumoren weder Auswirkungen auf Lymphozyten noch einen positiven Effekt auf die Seminomkultur.

Beim Vergleich beider Medien zeigten die Seminomzellen unter Abwesenheit von Lymphozyten ein besseres Wachstum in RPMI, wie dies auch bei TCam-2 beschrieben ist.

In Gesamtschau der Ergebnisse konnte also für die Seminomkultur ein besseres Überleben in RPMI Medium bei Aussortieren der CD45-positiven Zellen ohne Zusatz von Y27632 nachgewiesen werden.

6 Ausblick

Um die Ergebnisse nochmals zu untermauern und den Erfolg von MACS - Sortierung auch langfristiger zu beweisen, sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Auf die Modalitäten mit unterschiedlichen Kulturmedien und der Zugabe von Y27632 kann inzwischen aufgrund der beschriebenen Ergebnisse verzichtet werden. Dies hätte den Vorteil, dass mehr Zellmaterial zur Verfügung stände, was die PCR-Interpretation vereinfachen würde.

Für Experimente an lebenden Seminomzellen könnte dann bei Inkulturnahme die MACS-Sortierung vorgenommen werden und diese Methode eventuell mit dem Wachstum auf Sertoli-Feederzellen kombiniert werden, um ein langes Überleben und damit Forschung an den Zellen zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, H. U., Arya, M., Muneer, A., Mushtaq, I., and Sebire, N. J. (2010). Testicular and paratesticular tumours in the prepubertal population. *The Lancet. Oncology*, 11(5):476–483.
- Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bokemeyer, C., Cohn-Cedermark, G., Horwich, A., Klepp, O., Laguna, M. P., and Pizzocaro, G. (2005). Guidelines on testicular cancer. *European urology*, 48(6):885–894.
- Andreassen, K. E., Grotmol, T., Cvancarova, M. S., Johannesen, T. B., and Fosså, S. D. (2011). Risk of metachronous contralateral testicular germ cell tumors: a population-based study of 7,102 norwegian patients (1953-2007). *International journal of cancer*, 129(12):2867–2874.
- Banks, K., Tuazon, E., Berhane, K., Koh, C. J., De Filippo, R. E., Chang, A., Kim, S. S., Daneshmand, S., Davis-Dao, C., Lewinger, J. P., Bernstein, L., and Cortessis, V. K. (2012). Cryptorchidism and testicular germ cell tumors: comprehensive meta-analysis reveals that association between these conditions diminished over time and is modified by clinical characteristics. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3:182–182.
- Bell, D. A., Flotte, T. J., and Bhan, A. K. (1987). Immunohistochemical characterization of seminoma and its inflammatory cell infiltrate. *Human pathology*, 18(5):511–520.
- Berends, J. C., Schutte, S. E., van Dissel-Emiliani, F. M., de Rooij, D. G., Looijenga, L. H., and Oosterhuis, J. W. (1991). Significant improvement of the survival of seminoma cells in vitro by use of a rat sertoli cell feeder layer and serum-free medium. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(19):1400–1403.
- Berthelsen, J. G., Skakkebaek, N. E., von der Maase, H., Sørensen, B. L., and Mogensen, P. (1982). Screening for carcinoma in situ of the contralateral testis

- in patients with germinal testicular cancer. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 285(6356):1683–1686.
- Beyer, J., Albers, P., Altena, R., Aparicio, J., Bokemeyer, C., Busch, J., Cathomas, R., Cavallin-Stahl, E., Clarke, N. W., Claßen, J., Cohn-Cedermark, G., Dahl, A. A., Daugaard, G., De Giorgi, U., De Santis, M., De Wit, M., De Wit, R., Dieckmann, K. P., Fenner, M., Fizazi, K., Flechon, A., Fossa, S. D., Germá Lluch, J. R., Gietema, J. A., Gillessen, S., Giwercman, A., Hartmann, J. T., Heidenreich, A., Hentrich, M., Honecker, F., Horwich, A., Huddart, R. A., Kliesch, S., Kollmannsberger, C., Krege, S., Laguna, M. P., Looijenga, L. H. J., Lorch, A., Lotz, J. P., Mayer, F., Necchi, A., Nicolai, N., Nuver, J., Oechsle, K., Oldenburg, J., Oosterhuis, J. W., Powles, T., Rajpert-De Meyts, E., Rick, O., Rosti, G., Salvioni, R., Schrader, M., Schweyer, S., Sedlmayer, F., Sohaib, A., Souchon, R., Tandstad, T., Winter, C., and Wittekind, C. (2013). Maintaining success, reducing treatment burden, focusing on survivorship: highlights from the third european consensus conference on diagnosis and treatment of germ-cell cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(4):878–888.
- Biermann, K., Klingmüller, D., Koch, A., Pietsch, T., Schorle, H., Büttner, R., and Zhou, H. (2006). Diagnostic value of markers m2a, oct3/4, ap-2gamma, plap and c-kit in the detection of extragonadal seminomas. *Histopathology*, 49(3):290–297.
- Biermann, K., Stoop, H., and Looijenga, L. (2012). c-kit protein expression does not discriminate neoplastic from non-neoplastic intratubular germ cells. *Histopathology*, 60(6):1017–1019.
- Biermann, K., Zhou, H., and Büttner, R. (2008). Molecular pathology of testicular germ cell tumors: an update. *Der Pathologe*, 29(5):348–353.
- Bignell, G., Smith, R., Hunter, C., Stephens, P., Davies, H., Greenman, C., Teague, J., Butler, A., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., Parker, A., Avis, T., Barthorpe, S., Brackenbury, L., Buck, G., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Edwards, K., Forbes, S., Gorton, M., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jones, D., Kosmidou, V., Laman, R., Lugg, R., Menzies, A., Perry, J., Petty, R., Raine, K., Shepherd, R., Small, A., Solomon, H., Stephens, Y., Tofts, C., Varian, J., Webb, A., West, S., Widaa, S., Yates, A., Gillis, A. J. M., Stoop, H. J., van Gurp, R. J. H. L. M., Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H. J., Futreal,

- P. A., Wooster, R., and Stratton, M. R. (2006). Sequence analysis of the protein kinase gene family in human testicular germ-cell tumors of adolescents and adults. *Genes, chromosomes & cancer*, 45(1):42–46.
- Bokemeyer, C., Kuczyk, M. A., Dunn, T., Serth, J., Hartmann, K., Jonasson, J., Pietsch, T., Jonas, U., and Schmoll, H. J. (1996). Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 122(5):301–306.
- Boublikova, L., Buchler, T., Stary, J., Abrahamova, J., and Trka, J. (2014). Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application. *Critical reviews in oncology/hematology*, 89(3):366–385.
- Burke, A. P. and Mostofi, F. K. (1988). Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. *Human pathology*, 19(6):663–670.
- Çayan, S., Saylam, B., Tiftik, N., Ünal, N., Apa, D., Efesoy, O., Çimen, B., Bozlu, M., Akbay, E., and Büyükaşar, K. (2014). Rho-kinase levels in testicular ischemia-reperfusion injury and effects of its inhibitor, y-27632, on oxidative stress, spermatogenesis, and apoptosis. *Urology*, 83(3):675.e13–675.e18.
- Chaganti, R. S. and Houldsworth, J. (1998). The cytogenetic theory of the pathogenesis of human adult male germ cell tumors. review article. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 106(1):80–3; discussion 83–4.
- Cheville, J. C., Rao, S., Iczkowski, K. A., Lohse, C. M., and Pankratz, V. S. (2000). Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. *American journal of clinical pathology*, 113(4):583–588.
- Cortes, J. L., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Catalina, P., Elosua, C., Leone, P. E., Montes, R., Bueno, C., Ramos-Mejía, V., Maleno, I., García-Pérez, J. L., and Menendez, P. (2009). Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(8):1844–1851.
- Dahlke, M. H., Larsen, S. R., Rasko, J. E. J., and Schlitt, H. J. (2004). The biology of cd45 and its use as a therapeutic target. *Leukemia & lymphoma*, 45(2):229–236.

- de Jong, J., Stoop, H., Gillis, A. J. M., Hersmus, R., van Gorp, R. J. H. L. M., van de Geijn, G.-J. M., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Schneider, D. T., Sherlock, J. K., Baeten, J., Kitazawa, S., van Zoelen, E. J., van Roozendaal, K., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. J. (2008). Further characterization of the first seminoma cell line tcam-2. *Genes Chromosomes Cancer*, 47(3):185–96.
- de Takats, P. G., Jones, S. R., Penn, R., and Cullen, M. H. (1996). Alpha-footoprotein heterogeneity: what is its value in managing patients with germ cell tumours? *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 8(5):323–326.
- Dieckmann, K. P. and Loy, V. (1996). Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 14(12):3126–3132.
- Dubois, C. M., Ruscetti, F. W., Stankova, J., and Keller, J. R. (1994). Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood*, 83(11):3138–3145.
- Dueñas, A., Saldívar, C., Castellero, C., Flores, G., Martínez, P., and Jiménez, M. (2001). A case of bilateral seminoma in the setting of persistent mullerian duct syndrome. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 53(2):193–196.
- Eble, J. N. (2004). *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*, volume 6. Iarc.
- Eckert, D., Nettersheim, D., Heukamp, L. C., Kitazawa, S., Biermann, K., and Schorle, H. (2008). Tcam-2 but not jkt-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res*, 331(2):529–538.
- Emre, N., Vidal, J. G., Elia, J., O'Connor, E. D., Paramban, R. I., Hefferan, M. P., Navarro, R., Goldberg, D. S., Varki, N. M., Marsala, M., and Carson, C. T. (2010). The rock inhibitor y-27632 improves recovery of human embryonic stem cells after fluorescence-activated cell sorting with multiple cell surface markers. *PLoS One*, 5(8).
- Eppelmann, U., Gottardo, F., Wistuba, J., Ehmcke, J., Kossack, N., Westernstroer, B., Redmann, K., Wuebbeling, F., Burger, M., Tuettelmann, F., Kliesch, S.,

- and Mallidis, C. (2013). Raman microspectroscopic discrimination of tcam-2 cultures reveals the presence of two sub-populations of cells. *Cell Tissue Res*, 354(2):623–32.
- Fend, F., Hittmair, A., Rogatsch, H., Gredler, E., Obrist, P., and Mikuz, G. (1995). Seminomas positive for epstein-barr virus by the polymerase chain reaction: viral rna transcripts (epstein-barr-encoded small rnas) are present in intratumoral lymphocytes but absent from the neoplastic cells. *Mod Pathol*, 8(6):622–625.
- Ferlay J, Soerjomataram I, E. M., Dikshit R, E. S., Mathers C, R. M., Parkin DM, F. D., and Bray, F. (2012). Globocan 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: iarc cancerbase no. 11 [internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 19/08/2014.
- Fosså, S. D., Chen, J., Schonfeld, S. J., McGlynn, K. A., McMaster, M. L., Gail, M. H., and Travis, L. B. (2005). Risk of contralateral testicular cancer: a population-based study of 29,515 u.s. men. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14):1056–1066.
- Gallegos, I., Valdevenito, J. P., Miranda, R., and Fernandez, C. (2011). Immunohistochemistry expression of p53, ki67, cd30, and cd117 and presence of clinical metastasis at diagnosis of testicular seminoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 19(2):147–152.
- Gauthaman, K., Fong, C.-Y., and Bongso, A. (2010). Effect of rock inhibitor y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hescs) in vitro: its benefits in hesc expansion. *Stem cell reviews*, 6(1):86–95.
- Goddard, N. C., McIntyre, A., Summersgill, B., Gilbert, D., Kitazawa, S., and Shipley, J. (2007). Kit and ras signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *International journal of andrology*, 30(4):337–48; discussion 349.
- Gondos, B., Berthelsen, J. G., and Skakkebaek, N. E. (1983). Intratubular germ cell neoplasia (carcinoma in situ): a preinvasive lesion of the testis. *Annals of clinical and laboratory science*, 13(3):185–192.
- Greene, M. H., Kratz, C. P., Mai, P. L., Mueller, C., Peters, J. A., Bratslavsky, G., Ling, A., Choyke, P. M., Premkumar, A., Bracci, J., Watkins, R. J., McMaster,

- M. L., and Korde, L. A. (2010). Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocrine-related cancer*, 17(2):R109–R121.
- Group, I. G. C. C. C. (1997). International germ cell consensus classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. international germ cell cancer collaborative group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(2):594–603.
- Hedinger, C., von Hochstetter, A. R., and Egloff, B. (1979). Seminoma with syncytiotrophoblastic giant cells. a special form of seminoma. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology*, 383(1):59–67.
- Heidenreich, A. (2009). Contralateral testicular biopsy in testis cancer: current concepts and controversies. *BJU international*, 104(9 Pt B):1346–1350.
- Hermiston, M. L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). Cd45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*, 21:107–137.
- Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R. R., Chris Lau, Y.-F., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. J. (2004). Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *The Journal of pathology*, 203(3):849–857.
- Hong, Y. and Stambrook, P. J. (2004). Restoration of an absent g1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40):14443–14448.
- Huyghe, E. (2008). Testicular cancer. In in Chief: Kris Heggenhougen, E., editor, *International Encyclopedia of Public Health*, pages 309 – 318. Academic Press, Oxford.
- Hvarness, T., Nielsen, J. E., Almstrup, K., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Claesson, M. H. (2013). Phenotypic characterisation of immune cell infiltrates in testicular germ cell neoplasia. *Journal of reproductive immunology*, 100(2):135–145.
- Ichikawa, H., Nakata, N., Abo, Y., Shirasawa, S., Yokoyama, T., Yoshie, S., Yue, F., Tomotsune, D., and Sasaki, K. (2012). Gene pathway analysis of the mechanism by which the rho-associated kinase inhibitor γ -27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells. *Cryobiology*, 64(1):12–22.

- Izquierdo, M. A., Van der Valk, P., Van Ark-Otte, J., Rubio, G., Germa-Lluch, J. R., Ueda, R., Scheper, R. J., Takahashi, T., and Giaccone, G. (1995). Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *The Journal of pathology*, 177(3):253–258.
- Janssens, K., Van den Haute, C., Baekelandt, V., Lucas, S., van Horssen, J., Somers, V., Van Wijmeersch, B., Stinissen, P., Hendriks, J. J. A., Slaets, H., and Hellings, N. (2015). Leukemia inhibitory factor tips the immune balance towards regulatory t cells in multiple sclerosis. *Brain, behavior, and immunity*, 45:180–188.
- Kaatsch, P., Hentschel, S., et al. (2012). Krebs in deutschland 2007/2008. 8. ausgabe. *Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV: Berlin*.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., and Shinohara, T. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119(7):1001–1012.
- Kier, M. G. G., Lauritsen, J., Almstrup, K., Mortensen, M. S., Toft, B. G., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Rørth, M., von der Maase, H., Agerbaek, M., Holm, N. V., Andersen, K. K., Dalton, S. O., Johansen, C., and Daugaard, G. (2015). Screening for carcinoma in situ in the contralateral testicle in patients with testicular cancer: a population-based study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26(4):737–742.
- Kinugawa, K., Hyodo, F., Matsuki, T., Jo, Y., Furukawa, Y., Ueki, A., and Tanaka, H. (1998). Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, jkt-1. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 5(3):282–287.
- Klein, B., Klein, T., Konichezky, M., Nyska, A., Livini, E., Levine, I., Zamir, R., Kooperman, O., and Lurie, H. (1990). The expression of hla class i antigens in germ cell testicular cancer. *American journal of clinical pathology*, 93(2):202–207.
- Klein, E. A. (1993). Tumor markers in testis cancer. *The Urologic clinics of North America*, 20(1):67–73.

- Kleinsmith, L. J. and Pierce, G. B. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res*, 24:1544–1551.
- Koshida, K., Stigbrand, T., Munck-Wikland, E., Hisazumi, H., and Wahren, B. (1990). Analysis of serum placental alkaline phosphatase activity in testicular cancer and cigarette smokers. *Urological research*, 18(3):169–173.
- Krege, S., Beyer, J., Souchon, R., Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Cavallin-Ståhl, E., et al. (2008). European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the european germ cell cancer consensus group (egcccg): part i. *European urology*, 53(3):478–496.
- Kubota, H., Avarbock, M. R., and Brinster, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47):16489–16494.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(1):16–43.
- Linke, J., Loy, V., and Dieckmann, K.-P. (2005). Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males. *The Journal of urology*, 173(5):1577–1579.
- Looijenga, L. H., Gillis, A. J., Stoop, H. J., Hersmus, R., and Oosterhuis, J. W. (2007). Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1120:187–214.
- Mazumdar, M., Bajorin, D. F., Bacik, J., Higgins, G., Motzer, R. J., and Bosl, G. J. (2001). Predicting outcome to chemotherapy in patients with germ cell tumors: the value of the rate of decline of human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein during therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(9):2534–2541.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M., and Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by gdnf. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457):1489–1493.

- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and es cells. *Cell*, 113(5):631–642.
- Mizuno, Y., Gotoh, A., Kamidono, S., and Kitazawa, S. (1993). [establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (tcam-2)]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 84(7):1211–8.
- Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., and Ulbright, T. M. (2016). The 2016 who classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part a: Renal, penile, and testicular tumours. *European urology*.
- Moore, G. E., Gerner, R. E., and Franklin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, 199(8):519–524.
- Mosbech, C. H., Rechnitzer, C., Brok, J. S., Rajpert-De Meyts, E., and Hoei-Hansen, C. E. (2014). Recent advances in understanding the etiology and pathogenesis of pediatric germ cell tumors. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 36(4):263–270.
- Mostofi, F. K. (1998). *Histological typing of testis tumours*. International histological classification of tumours. Springer, Berlin, 2. ed edition.
- Mostofi, F. K. and Sesterhenn, I. (1978). Plenary lecture: lymphocytic infiltration in relationship to urologic tumors. *National Cancer Institute monograph*, (49):133–141.
- Motzer, R. J., Agarwal, N., Beard, C., Bhayani, S., Bolger, G. B., Buyyounouski, M. K., Carducci, M. A., Chang, S. S., Choueiri, T. K., Gupta, S., Hancock, S. L., Hudes, G. R., Jonasch, E., Kuzel, T. M., Lau, C., Levine, E. G., Lin, D. W., Margolin, K. A., Michaelson, M. D., Olencki, T., Pili, R., Ratliff, T. W., Redman, B. G., Robertson, C. N., Ryan, C. J., Sheinfeld, J., Wang, J., Wilder, R. B., and National Comprehensive Cancer Network (2012). Testicular cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 10(4):502–535.
- Myrup, C., Schnack, T. H., and Wohlfahrt, J. (2007). Correction of cryptorchidism and testicular cancer. *The New England journal of medicine*, 357(8):825–7; author reply 825–7.
- Nakamura, H., Takeshima, H., Makino, K., and Kuratsu, J.-I. (2005). C-kit expression in germinoma: an immunohistochemistry-based study. *Journal of neuro-oncology*, 75(2):163–167.

- Nakanoma, T., Nakamura, K., Deguchi, N., Fujimoto, J., Tazaki, H., and Hata, J. (1992). Immunohistological analysis of tumour infiltrating lymphocytes in seminoma using monoclonal antibodies. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 421(5):409–413.
- Neumann, A., Keller, T., Jocham, D., and Doehn, C. (2011). [human placental alkaline phosphatase (hplap) is the most frequently elevated serum marker in testicular cancer]. *Aktuelle Urologie*, 42(5):311–315.
- Neuvians, T. P., Gashaw, I., Sauer, C. G., von Ostau, C., Kliesch, S., Bergmann, M., Häcker, A., and Grobholz, R. (2005). Standardization strategy for quantitative pcr in human seminoma and normal testis. *Journal of biotechnology*, 117(2):163–171.
- Nozaki, Y., Kinoshita, K., Hino, S., Yano, T., Niki, K., Hirooka, Y., Kishimoto, K., Funachi, M., and Matsumura, I. (2015). Signaling rho-kinase mediates inflammation and apoptosis in t cells and renal tubules in cisplatin nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 308(8):F899–F909.
- Oosterhuis, J. W. and Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*, 5(3):210–222.
- Parker, C., Milosevic, M., Panzarella, T., Banerjee, D., Jewett, M., Catton, C., Tew-George, B., Gospodarowicz, M., and Warde, P. (2002). The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage i testicular seminoma managed by surveillance. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(15):2014–2019.
- Peoples, G. E., Blotnick, S., Takahashi, K., Freeman, M. R., Klagsbrun, M., and Eberlein, T. J. (1995). T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14):6547–6551.
- Pettersson, A., Richiardi, L., Nordenskjold, A., Kaijser, M., and Akre, O. (2007). Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *The New England journal of medicine*, 356(18):1835–1841.
- Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Brondum-Nielsen, K., Müller, J., and Skakkebaek, N. E. (1998). Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS*, 106(1):198–204.

- Rajpert-De Meyts, E., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., and Almstrup, K. (2015). Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-rnas. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 53(3):177–188.
- Rajpert-De Meyts, E. and Skakkebaek, N. E. (1994). Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *International journal of andrology*, 17(2):85–92.
- Raspolini, M. R. (2014). Histologic variants of seminoma mimicking lymphatic malignancies of the testis: a literature review with a report of case series focusing on problems in differential diagnosis. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 22(5):348–357.
- Reuter, V. E. (2005). Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18 Suppl 2:S51–S60.
- Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W., and Staudt, L. M. (1990). A pou-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345(6277):686–692.
- Rud, C. N., Daugaard, G., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebæk, N. E., Petersen, J. H., and Jørgensen, N. (2013). Sperm concentration, testicular volume and age predict risk of carcinoma in situ in contralateral testis of men with testicular germ cell cancer. *The Journal of urology*, 190(6):2074–2080.
- Russell, S. M., Lechner, M. G., Mokashi, A., Megiel, C., Jang, J. K., Taylor, C. R., Looijenga, L. H. J., French, C. A., and Epstein, A. L. (2013). Establishment and characterization of a new human extragonadal germ cell line, sem-1, and its comparison with tcam-2 and jkt-1. *Urology*, 81(2):464.e1–464.e9.
- Sandlow, J. I., Feng, H. L., and Sandra, A. (1997). Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology*, 49(3):494–500.
- Schulster, M., Bernie, A. M., and Ramasamy, R. (2016). The role of estradiol in male reproductive function. *Asian journal of andrology*, 18(3):435–440.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation

- of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23):13726–13731.
- Sharma, P., Dhillon, J., and Sexton, W. J. (2015). Intratubular germ cell neoplasia of the testis, bilateral testicular cancer, and aberrant histologies. *The Urologic clinics of North America*, 42(3):277–285.
- Shirazi, M. S., Heidari, B., Shirazi, A., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M., Rahmati-Ahmadabadi, M., Naderi, M. M., Behzadi, B., Farab, M., Sarvari, A., Borjian-Boroujeni, S., and Akhondi, M. M. (2014). Morphologic and proliferative characteristics of goat type a spermatogonia in the presence of different sets of growth factors. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(11):1519–1531.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(1):10–29.
- Skakkebaek, N. E. (1972). Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet (London, England)*, 2(7776):516–517.
- Skakkebaek, N. E., Holm, M., Høi-Hansen, C., Jørgensen, N., and Rajpert-De Meyts, E. (2003). Association between testicular dysgenesis syndrome (tds) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. *APMIS*, 111(1):1–9.
- Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., and Thomson, J. A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13350–13355.
- Strohmeyer, T., Peter, S., Hartmann, M., Munemitsu, S., Ackermann, R., Ullrich, A., and Slamon, D. J. (1991). Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer research*, 51(7):1811–1816.
- Suzuki, T., Higgins, P. J., and Crawford, D. R. (2000). Control selection for rna quantitation. *BioTechniques*, 29(2):332–337.
- Takeda, N., Kondo, M., Ito, S., Ito, Y., Shimokata, K., and Kume, H. (2006). Role of rhoa inactivation in reduced cell proliferation of human airway smooth muscle by simvastatin. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 35(6):722–729.

- Takeshima, H., Kaji, M., Uchida, H., Hirano, H., and Kuratsu, J.-i. (2004). Expression and distribution of c-kit receptor and its ligand in human cns germ cell tumors: a useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Brain tumor pathology*, 21(1):13–16.
- Toppari, J., Virtanen, H. E., Main, K. M., and Skakkebaek, N. E. (2010). Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (tds): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88(10):910–919.
- Torres, A., Casanova, J. F., Nistal, M., and Regadera, J. (1997). Quantification of immunocompetent cells in testicular germ cell tumours. *Histopathology*, 30(1):23–30.
- Ulbright, T. M. (2005). Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18 Suppl 2:S61–S79.
- van Leeuwen, F. E., Stiggelbout, A. M., van den Belt-Dusebout, A. W., Noyon, R., Eliel, M. R., van Kerkhoff, E. H., Delemarre, J. F., and Somers, R. (1993). Second cancer risk following testicular cancer: a follow-up study of 1,909 patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 11(3):415–424.
- Verhoeven, R. H., Gondos, A., Janssen-Heijnen, M. L., Saum, K. U., Brewster, D. H., Holleczeck, B., Crocetti, E., Rosso, S., Hakulinen, T., Aareleid, T., Brenner, H., and The EUNICE Survival Working Group (2012). Testicular cancer in europe and the usa: survival still rising among older patients. *Ann Oncol*.
- von der Maase, H., Rørth, M., Walbom-Jørgensen, S., Sørensen, B. L., Christophersen, I. S., Hald, T., Jacobsen, G. K., Berthelsen, J. G., and Skakkebaek, N. E. (1986). Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 293(6559):1398–1401.
- Wahren, B., Hinkula, J., Stigbrand, T., Jeppsson, A., Andersson, L., Esposti, P. L., Edsmyr, F., and Millán, J. L. (1986). Phenotypes of placental-type alkaline phosphatase in seminoma sera as defined by monoclonal antibodies. *International journal of cancer*, 37(4):595–600.

- Wanderås, E. H., Fosså, S. D., and Tretli, S. (1997). Risk of a second germ cell cancer after treatment of a primary germ cell cancer in 2201 norwegian male patients. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 33(2):244–252.
- Weissbach, L., Bussar-Maatz, R., and Mann, K. (1997). The value of tumor markers in testicular seminomas. results of a prospective multicenter study. *European urology*, 32(1):16–22.
- Williams, A. and Barclay, A. (1986). Glycoprotein antigens of the lymphocyte surface and their purification by antibody affinity chromatography. *Handbook of Experimental Immunology*, 1:22–1.
- Wolf, U., Barnes, B., Bertz, J., Haberland, J., Laudi, A., Stöcker, M., Schönfeld, I., Kraywinkel, K., and Kurth, B.-M. (2011). [the (german) center for cancer registry data (zfd) at the robert koch institute (rki) in berlin]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 54(11):1229–1234.
- Wu, Y., Shu, J., He, C., Li, M., Wang, Y., Ou, W., and He, Y. (2016). Rock inhibitor y27632 promotes proliferation and diminishes apoptosis of marmoset induced pluripotent stem cells by suppressing expression and activity of caspase-3. *Theriogenology*, 85(2):302–314.
- Yakirevich, E., Lefel, O., Sova, Y., Stein, A., Cohen, O., Izhak, O. B., and Resnick, M. B. (2002). Activated status of tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis in testicular seminoma. *The Journal of pathology*, 196(1):67–75.
- Yamamoto, H., Rudén, U., Ljungdahl-Stähle, E., Brehmer-Andersson, E., Hirano, K., Hisazumi, H., Stigbrand, T., and Wahren, B. (1987). Patterns of seminoma tissue markers and deletions. *International journal of cancer*, 40(5):615–619.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18):6907–6912.
- Yue, X., Wu, L., and Hu, W. (2015). The regulation of leukemia inhibitory factor. *Cancer cell & microenvironment*, 2(3).
- Zhao, Y., Lin, J., Wang, L., Chen, B., Zhou, C., Chen, T., Guo, M., He, S., Zhang, N., Liu, C., Liu, M., and Huang, J. (2011). Derivation and characterization of ovine embryonic stem-like cell lines in semi-defined medium without feeder cells. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 315(10):639–648.

- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., and Bray, F. (2014). International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. *European urology*, 65(6):1095–1106.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen an der Klinik für Urologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl durchgeführt.

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

Die Seminomverteilung erfolgte durch Jörg Hennenlotter und durch direkten Kontakt von mir zu den umliegenden Kliniken.

Alle Versuche wurden selbstständig von mir in Zusammenarbeit mit Tamara Brenauer, Mitdotorandin, durchgeführt. Auch die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den _____

Unterschrift Doktorand

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl für die Annahme der Doktorarbeit, die Betreuung und Begutachtung.

Vielen Dank auch Herrn Dr. Markus Renninger, der mir bei der Ideenfindung und der Umsetzung meiner Arbeit zur Seite stand.

Danke sagen möchte ich auch dem Labor für Tissue Engineering, das mir bei den alltäglichen Laborfragen stets weiterhalf.

Lieber Flolie, du hast den Schreibprozess durch deine Unterstützung mit LaTeX deutlich erleichtert!

Meiner Familie ein riesengroßes Dankeschön für das Mitfiebern, Anfeuern und die Unterstützung in allen Belangen. Danke für die Ermöglichung meines Weges bis hierher!

Tamara, du hast nie locker gelassen, bis auch ich fertig war! Danke!

Lieber Tobi, dein offenes Ohr, deine wissenschaftliche Beratung und deine Hilfe in allen Situationen haben mich immer wieder gerettet! Jetzt habe ich zwar den Doktorarbeits-Wettbewerb gewonnen, aber du bist mein Sieger des Herzens.