

Aus dem Institut für Pathologie

(Prof. Dr. P. Ströbel)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Spermatozytäre Tumoren – Eine Optimierung des diagnostischen Prozesses

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Valerie Unterkircher

aus Münster

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: PD Dr. F. Bremmer

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent/in: PD Dr. F. Bremmer

Ko-Referent/in: PD Dr. S. Kaulfuß

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 30.10.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Spermatozytäre Tumoren – Eine Optimierung des diagnostischen Prozesses" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>II</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS.....</u>	<u>III</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>IV</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 HODENTUMOREN.....	1
1.2 WHO-EINTEILUNG	2
1.3 PRIMÄR TESTIKULÄRES DIFFUSES B-ZELL-LYMPHOM ALS NICHT-GERMINALER HODENTUMOR	4
1.4 DIAGNOSTIK	5
1.5 ZIELE DIESER ARBEIT	6
<u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>8</u>
2.1 MATERIAL.....	8
2.2 METHODEN.....	12
<u>3 ERGEBNISSE</u>	<u>16</u>
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV	16
3.2 IMMUNHISTOCHEMIE.....	17
3.3 FLUORESZENZ IN-SITU HYBRIDISIERUNG.....	27
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>29</u>
4.1 EPIDEMIOLOGISCHE DATEN DES PATIENTENKOLLEKTIVES	29
4.2 IMMUNHISTOCHEMIE.....	30
4.3 FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG NR4A3	39
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>42</u>
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>44</u>

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: EINTEILUNG DER TESTIKULÄREN KEIMZELLTUMOREN.....	2
ABBILDUNG 2: EXPRESSIONSMUSTER KZT MODIFIZIERT NACH (BREMNER UND STRÖBEL 2016)	5
ABBILDUNG 3: A: SPERMATOZYTÄRER TUMOR, B: SEMINOM, C: TESTIKULÄRES LYMPHOM.....	6
ABBILDUNG 4: AUFNAHMEN IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNGEN MIT DEN ANTIKÖRPERN SALL4, DMRT1, SAGE-1 UND SSX-2 AN NORMALEM TUMORFREIEN HODENGEWEBE	17
ABBILDUNG 5: AUFNAHMEN VON HE-FÄRBUNGEN UND IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT DEM ANTIKÖRPERPANEL AN EINEM SPERMATOZYTÄREN TUMOR.....	19
ABBILDUNG 6: AUFNAHMEN VON HE-FÄRBUNGEN UND IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT DEM ANTIKÖRPERPANEL IN SEMINOMEN	21
ABBILDUNG 7: AUFNAHMEN VON HE-FÄRBUNGEN UND IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT DEM ANTIKÖRPERPANEL AN TESTIKULÄREN LYMPHOMEN	23
ABBILDUNG 8: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER IRS-SCORES	25
ABBILDUNG 9: AUFNAHMEN DER FLUORESCENZMIKROSKOPIE: A+B SPERMATOZYTÄRER TUMOR, C+D SEMINOM, E+F TESTIKULÄRES LYMPHOM.....	28
ABBILDUNG 10: IMMUNHISTOCHEMISCHER ALGORITHMUS MIT DEM VERWENDETEN ANTI-KÖRPERPANEL	38

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE MATERIALIEN	8
TABELLE 2: VERWENDETE GERÄTE	10
TABELLE 3: IMMUNHISTOCHEMISCHE ANTIKÖRPER.....	11
TABELLE 6: EPIDEMIOLOGISCHE DATEN DES PATIENTENKOLLEKTIVS	16
TABELLE 7: IMMUNHISTOCHEMISCHE ANFÄRBBARKEIT VON SPERMATOZYTÄREN TUMOREN, SEMINOMEN, TESTIKULÄREN LYMPHOMEN, DOTTERSACKTUMOREN UND CHORIONKARZINOM MIT DEN VERSCHIEDENEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANTI-KÖRPERN	26
TABELLE 8: ÜBERSICHT DER NR4A3 POLYSOMIE POSITIVEN FÄLLE	27

Abkürzungsverzeichnis

CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
DLBCL	<i>diffuse large b-cell lymphoma</i>
DMRT1	<i>doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
GCNIS	<i>Germ Cell Neoplasia In Situ</i>
IHC	Immunhistochemie
INS	Intratubuläres Nicht-Seminom
ISe	Intratubuläres Seminom
KZT	Keimzelltumor
OCT2	<i>octamer binding protein 2</i>
OCT3/4	Octamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLAP	Plazentare Alkalische Phosphatase
SAGE-4	<i>sarcoma antigen 1</i>
SALL4	<i>sal-like protein 4</i>
SSX-2	<i>synovial sarcoma, breakpoint x 2</i>
TGCT	Testikulärer Keimzelltumor
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Hodentumoren

Hodentumoren sind mit 0,7% aller Tumoren beim Mann selten, repräsentieren jedoch mit 25% den am häufigsten vorkommenden Tumor bei Männern im Alter von 15-44 Jahren (Trabert et al. 2015; Bertz et al. 2016). Die höchste Inzidenzrate von 8,7/100.000 lässt sich in Nordeuropa festmachen (Ferlay et al. 2015). Hodentumoren lassen sich weiter unterteilen in Keimzelltumoren und Nicht-Keimzelltumoren/Tumoren des Gonadenstromas. Zu letzteren gehören unter anderem die Leydigzelltumoren und Sertolizelltumoren. Nicht-Keimzelltumoren/Tumoren des Gonadenstromas machen etwa 5-10% aller Hodentumoren aus (Dilworth et al. 1991), den großen Restanteil repräsentieren demnach gonadale Keimzelltumoren. Anerkannte Risikofaktoren und Umweltfaktoren sind unter anderem ein Maleszensus testis, eine positive Familienanamnese und Infertilität (Behre et al. 1995; Olesen et al. 2017). Klinisch äußert sich ein Keimzelltumor in den meisten Fällen durch eine schmerzlose Größenzunahme eines Hodens (Germà-Lluch et al. 2002).

Eine weitere (seltene) Tumorentität, die hier Erwähnung finden soll, ist als Vertreter der Nicht-Keimzelltumoren ein Non-Hodgkin-Lymphom. Es handelt sich meist um das primär testikuläre diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLCBCL) (Koch et al. 2022).

1.1.1 Keimzelltumoren

Keimzelltumoren (KZT) umfassen eine Gruppe von Neoplasien, die nach ihrer Lokalisation weiter in gonadale KZT und extragonadale KZT getrennt werden. An den gesamten KZT haben Patienten männlichen Geschlechts mit 91% eindeutig den größten Anteil, das weibliche Geschlecht macht nur 9% aus. Beim Mann entfallen davon wiederum 94% auf gonadale KZT und 6% auf extragonadale KZT in Mediastinum, Glandula pinealis, Retroperitoneum und Gehirn. Bei der Frau sind es 61% gonadale KZT und 39% extragonadale KZT in Plazenta, Becken, Uterus und Gehirn (Stang et al. 2012). Allgemein liegt die 5-Jahres Überlebensrate von gonadalen KZT über der entsprechenden Rate der extragonadalen KZT (Stang et al. 2012).

1.2 WHO-Einteilung

Die gonadalen KZT beim männlichen Geschlecht sind eine sehr heterogene Gruppe (siehe Abbildung 1) und lassen sich basierend auf dem Ursprung der malignen Zellen, dem typischen Erkrankungsalter, der Morphologie und der molekularpathologischen Charakteristika in drei Tumorgruppen einteilen.

Die World Health Organisation (WHO) hat 2016 eine neue Klassifikation beschlossen die auch in der aktuell gültigen WHO-Klassifikation Bestand hat, woraus diese grobe Unterscheidung resultiert (Moch et al. 2016). Typ I ist äußerst selten, tritt präpubertal oder neonatal auf und ist zumeist benigne. Dazu gehören reine Dottersacktumoren und reine Teratome. Typ II beschreibt Seminome und Nicht-Seminome und wird postpubertal manifest. Typ III beschreibt die spermatozytären Tumoren, die auch postpubertal, jedoch tendenziell später als die Typ II Tumoren auftreten und sehr selten vorkommen.

In dieser Arbeit soll es vornehmlich um die Typ III-KZT gehen und deren Abgrenzung zu den Typ II-KZT und Hodenlymphomen. Im Folgenden werden die Charakteristika der verschiedenen KZT-Subtypen vorgestellt.

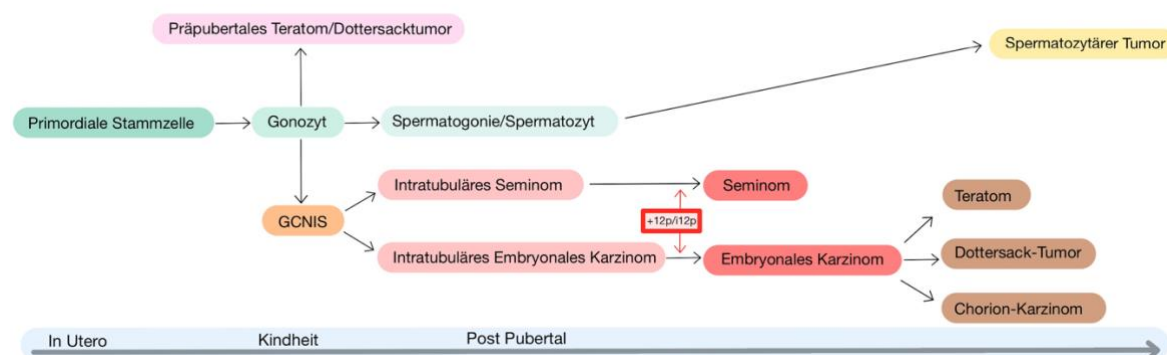


Abbildung 1: Einteilung der testikulären Keimzelltumoren

1.2.1 Typ I-KZT

Es wird davon ausgegangen, dass Typ I-KZT von einer unreiferen Form der Keimzellen ausgehen als Typ II und III (Bussey et al. 2001). Die Typ I Teratome sind benigne, können aber Dottersacktumorkomponenten ausbilden, wenn sie nicht in toto reseziert werden. In dem Fall besteht ein Metastasierungsrisiko und eine Chemotherapie ist erforderlich (Göbel et al. 2000).

1.2.2 Typ II-KZT

Die Seminome und Nicht-Seminome der Typ II-KZT entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferläsion, der Germ Cell Neoplasia In Situ (GCNIS). Sie wird oft im angrenzenden Gewebe an den invasiven KZT beobachtet und ist auf Wachstum in den Tubuli seminiferi contorti begrenzt (Mostofi et al. 1987; Skakkebak et al. 1987; Berney et al. 2016). Es wird davon ausgegangen, dass die bekannten Risikofaktoren für die Initiierung einer GCNIS bereits *in utero* sorgen (Skakkebaek et al. 1998). Durchbrechen die atypischen Keimzellen die Hodentubuli, dann entstehen invasive Keimzelltumoren. Die meisten Patienten mit einer bestehenden GCNIS entwickeln im Laufe der folgenden 5-7 Jahre einen invasiven testikulären KZT (Giwerzman und Skakkebaek 1993). Reine Seminome machen an den Typ II KZT 60% aus, ihr Anteil ist zunehmend (Ruf et al. 2014).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Intratubuläre Seminom (ISe) und das Intratubuläre Nicht-Seminom (INS) die Zwischenstufe von der GCNIS zum invasiv wachsenden Tumor ist (Oosterhuis et al. 2003; Donner et al. 2004). Die Nicht-Seminome entwickeln sich wohl aus dem embryonalen Karzinom, die direkte Entstehung aus einem Seminom heraus ist ebenfalls beschrieben und möglich (Bremmer et al. 2023). Das embryonale Karzinom besteht aus Zellen vom Stammzellniveau, die sich aus der GCNIS oder Seminomzellen zurückentwickelt haben. In der Regel entwickelt sich die GCNIS weiter in ein Seminom. Wenn die Zellen der GCNIS jedoch als pluripotent reprogrammiert werden, dann kann ein Nicht-Seminom entstehen (Oosterhuis und Looijenga 2005). Das embryonale Karzinom kann sich anschließend weiter differenzieren in ein Teratom, Dottersacktumor, Chorionkarzinom oder Mischformen der Genannten.

Typ II-KZT sprechen in der Regel sehr gut auf Chemotherapie an und selbst bereits metastasierte Formen sind in einem hohen Prozentsatz gut heilbar. Die Überlebenschancen sind also exzellent (Voutsadakis 2014).

1.2.3 Typ III-KZT

Spermatozytäre Tumoren machen 0,61% aller KZT aus, die allgemeine Inzidenz liegt bei 0,9/1 Mio. (Burke und Mostofi 1993; Ghazarian et al. 2018). Dieser Tumor ist weithin bekannt als Tumor des älteren Mannes. Der Altersgipfel der Inzidenz liegt in der sechsten Dekade, jedoch bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 52 Jahren. Besonders

anzumerken ist, dass immerhin 30% der Patienten in der vierten Dekade diagnostiziert werden (Carrière Philippe et al. 2007; Hu et al. 2019).

Spermatozytäre Tumoren metastasieren selten (Matoska et al. 1988; Steiner et al. 2006; Mikuz et al. 2014), haben dann aber eine sehr schlechte Prognose, da sie weitestgehend unempfindlich für Chemotherapien sind (Horn et al. 2011). Es gibt vereinzelte Fälle, bei denen eine sarkomatöse oder anaplastische Umwandlung beschrieben wurde (Horn et al. 2011; Wetherell et al. 2013). In Studien wurden in 5-6% der Fälle eine sarkomatöse Differenzierung beobachtet, die dann ebenfalls mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert war (Matoska und Talerman 1990). Da spermatozytäre Tumoren aber in der Regel indolent sind, ist die Orchiektomie die Therapie der Wahl. Von hodenerhaltenden Operationen oder neoadjuvanten Therapien wird abgeraten, da sich weder ihr Nutzen noch ihre Wirksamkeit bestätigt haben (Grogg et al. 2019).

1.3 Primär testikuläres diffuses B-Zell-Lymphom als nicht-germinaler Hodentumor

Primär testikuläre Lymphome machen knapp 1-9% der testikulären Neoplasien aus und haben ihre höchste Inzidenz in der sechsten Dekade (Shahab und Doll 1999; Hasselblom et al. 2004). Die Inzidenz wird auf 0,26/100 000 pro Jahr geschätzt. Bei Männern >60 Jahre ist es die häufigste testikuläre Neoplasie, ebenso wie die häufigste bilaterale Neoplasie (Cheah et al. 2014). Beim Erwachsenen ist die häufigste Form mit 80% das DLCL. Die Tumorzellen exprimieren verschiedene allgemeine B-Zell Marker (Gundrum et al. 2009). Die allgemeine Prognose ist bei dieser extrem aggressiven Tumorform sehr schlecht, insbesondere bei fortgeschrittenem Tumorstadium (Hasselblom et al. 2004). Selbst bei klinischer Remission treten bei den meisten Patienten mit Tumorstadium I oder II in den ersten zwei Jahren Rezidive auf (Vitolo et al. 2008).

1.4 Diagnostik

Wenn ein Hodentumor festgestellt wird, ist die operative Freilegung und Entfernung des Hodens essenziell für die Diagnostik und Therapie. Der weitere Therapieverlauf wird durch die pathologische Diagnostik und das Tumorstadium festgelegt.

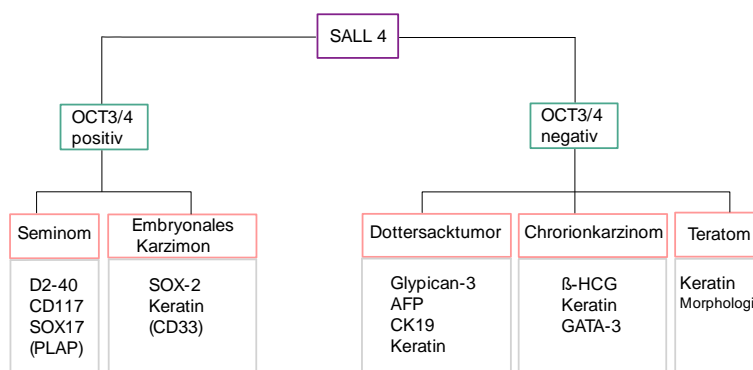


Abbildung 2: Expressionsmuster KZT modifiziert nach (Bremmer und Ströbel 2016)

Die Diagnostik der Typ II-KZT im Hoden erfolgt anhand morphologischer und vor allem immunhistochemischer Kriterien. Durch variable Morphologie und Mischformen der Nicht-Seminome kann durch verschiedene Kombinationen von Antikörpern der Tumor spezifiziert werden.

Bei Typ II-KZT ist in rund 80% der Fälle ein so genanntes Isochromosom 12p zu finden. Vereinzelt kommen auch Amplifikationen von Chromosom 12 oder 12p vor (Ottesen et al. 2003). Bei Typ III-KZT wird als einzig wiederkehrende konstante Chromosomenaberration eine Amplifikation des Chromosom 9 beschrieben (Rosenberg et al. 1998; Verdorfer et al. 2004; Looijenga et al. 2006). Die chromosomalen Veränderungen lassen sich im Allgemeinen mit Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung (FiSH), Comparative Genomic Hybridization (CGH) oder PCR (Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Es können zudem aktivierende Mutationen in den FGFR3- (fibroblast growth factor receptor 3) und HRAS- (HRas proto-oncogene) Genen zu finden sein, welche zur Gruppe der Paternal Age Effect (PAE) – Mutationen gezählt und in Zusammenhang mit einem erhöhten Alter des Vaters gebracht werden (Goriely et al. 2009; Goriely und Wilkie 2012; Giannoulatou et al. 2013).

Seminome stellen sich morphologisch mit großen rundlichen Zellen dar, die glykogenreich sind. Das Zellbild sieht sehr homogen und hell aus. Seminome werden typischerweise von dünnen Bindegewebssepten mit Lymphozyten durchzogen.

Spermatozytäre Tumoren bestehen histologisch aus einer homogenen Masse an Tumorzellen, die bei näherer Betrachtung aus drei verschiedenen großen Zellpopulationen bestehen. Die intermediären Zellen, mit kleinen bis hin zu unauffälligen Nukleoli, sind vorherrschend. Die kleinen Zellen weisen eher ein dichtes gleichmäßiges Chromatin auf, die großen Zellen sind zum Teil mehrkernig und haben eher körniges bis klumpiges Chromatin (Hu et al. 2019).

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom stellt sich als diffuse Infiltration großer lymphoider Zellen dar. Die Zellkerne sind groß und haben eine grobkörnige Chromatinstruktur. Die Kern-Plasma-Relation ist zu Gunsten des Kernes verschoben.

Wie in Abb. 3 zu sehen ist, besitzen alle drei oben beschriebenen Tumorentitäten eine ähnliche Morphologie. Größere Tumorzellen mit vergrößertem Zellkern, die ein aufgelockertes Chromatin aufweisen, kommen bei allen drei Tumorentitäten vor, sodass eine mögliche Verwechslung oder Fehldiagnose aufgrund der reinen Morphologie möglich ist.

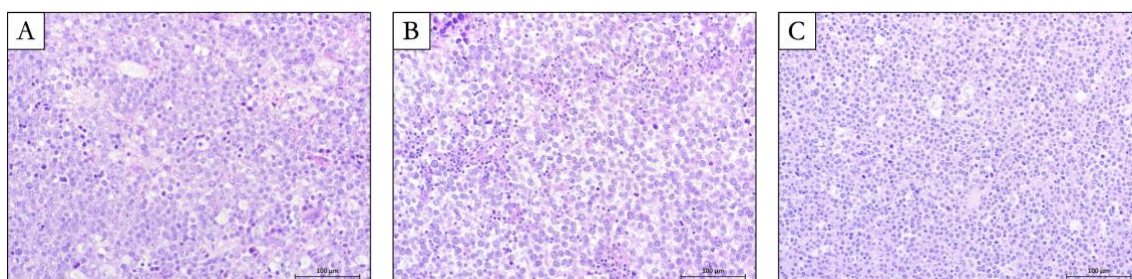


Abbildung 3: A: Spermatozytärer Tumor, B: Seminom, C: Testikuläres Lymphom

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die Diagnostik eines spermatozytären Tumors ist schwierig, da es sich um einen sehr seltenen Tumor handelt und gute immunhistochemische Marker rar sind. Es gibt jedoch einige potenzielle Marker. Ein sehr vielversprechender Kandidat davon ist das DMRT1 (Looijenga et al. 2006). Die Marker SAGE1 und SSX-2 sind ebenfalls vielversprechende Kandidaten aus der Gruppe der Chromosom X kodierten Cancer/Testis Antigene (CT-X Antigene). Die Immunhistochemie lässt sich bis dato eher dazu verwenden, um andere

Diagnosen auszuschließen (Mikuz 2014). So spielt die reine Morphologie, sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch, eine bedeutende Rolle (Hu et al. 2019). Patienten, die fälschlicherweise mit einem Seminom oder Nicht-Seminom, insbesondere dem Dottersacktumor oder dem Chorionkarzinom, diagnostiziert werden, anstatt einem spermatozytären Tumor, könnten eine Chemotherapie erhalten, welche sie eigentlich nicht bräuchten.

Das Ziel dieser Arbeit soll sein, einen diagnostischen Algorithmus zu etablieren um spermatozytäre Tumoren von Seminomen/ Nicht-Seminomen und Hodenlymphomen abzugrenzen. Dazu werden immunhistochemische Untersuchungen und molekulare Methoden etabliert und an den verschiedenen vorgestellten Tumorentitäten untersucht.

Daher werden die folgenden Ziele festgelegt:

(I) Zusammenstellung eines Fallkollektivs

(II) Etablierung immunhistochemischer Marker zur Erstellung eines diagnostischen Algorithmus mit besonderem Augenmerk auf DMRT1

(III) Etablierung einer Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zur Darstellung der 9q Amplifikation bei spermatozytären Tumoren

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Materialien

Produkt	Hersteller
0,2M HCL	CHEM SOLUTE T.H.Geyer, Höxter, Deutschland
2x SSC Waschpuffer	Abbot, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
4,5% Formaldehyd	CHEM SOLUTE T.H.Geyer, Höxter, Deutschland
Actinomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Alkohol 100%	CHEM SOLUTE T.H.Geyer, Höxter
Alkohol 96%	CHEM SOLUTE T.H.Geyer, Höxter
Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
CD117	Dako, Glostrup, Dänemark
CD45	Dako, Glostrup, Dänemark
D2-40	Dako, Glostrup, Dänemark
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Diamantschreiber	Usbeck, Tübingen, Deutschland
DMRT1	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, Vereinigte Staaten
Eindeck-Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
EnVision FLEX Detektionskit	Dako, Glostrup, Dänemark
EnVision FLEX Mouse LINKER	Dako, Glostrup, Dänemark
Färbekit	Dako, Glostrup, Dänemark

Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland
Glypican-3	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
Hematoxylin	Dako, Glostrup, Dänemark
Kleine Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Mikrotom Klingen A35	FEATHER SAFETY RAZOR CO., Osaka, Japan
NP40	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Objekträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
OCT2	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
OCT3/4	Dako, Glostrup, Dänemark
PLAP	Dako, Glostrup, Dänemark
Pretreatment-Reagenz	Abbot, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Protease	Abbot, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
SAGE1	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
SALL4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sonde NR4A3 (Prod. No. Z-2145-50)	Zytovision, Bremerhaven, Deutschland
SOX9	Abcam plc, Cambridge, Vereinigtes Königreich
SSX2	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, Californien, Vereinigte Staaten
Vimentin	Dako, Glostrup, Dänemark
Xylol	CHEM SOLUTE T.H.Geyer, Höxter, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Produkt	Hersteller
Automat FISH VP 2000 Processor	Abbot, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Autostainer Link 48	Dako, Glostrup, Dänemark
Fluoreszenzmikroskop DM550 B	Leica, Wetzlar, Deutschland
HE-Färbe- und Eindeckautomat Tissue-Tek Prisma Plus & Tissue- Tek Film –	Sakura Finetek Europe B.V., Alphe aan den Rijn, Niederlande
Hybridisierungsplatten Hybridizer Thermabrite	Abbot, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
Mikroskop Scope.A1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom pfm Slide 4004M	PFM Medical, Köln, Deutschland
Omnis	Dako, Glostrup, Dänemark
PT Link	Dako, Glostrup, Dänemark
Software Diskus	DISCUS Software Company, Fairborn, Ohio, Vereinigte Staaten
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Voretzer	Scientific Industries, Bohemia, New York, Vereinigte Staaten
Wärmeschrank 56°C	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank 60°C	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Cellpath, Powys, Vereinigtes Königreich

Tabelle 3: Immunhistochemische Antikörper

	REF-Nr.	Verdünnung	Vorbehandlung	Spezies	Inkubation	Detektionssystem
CD45	IR751	Ready to use	high	Maus, monoklonal	20	FLEX/HRP
CD117	A4502	1/50	high	Kaninchen, polyklonal	30	FLEX/HRP
DMRT1	Sc377167	1/100	low	Maus, monoklonal	30	FLEX/HRP
D2-40	IR072	Ready to use	high	Maus, monoklonal	20	FLEX/HRP
Glypican-3	GI829R06	Ready to use	low	Maus, monoklonal	30	FLEX/HRP + Mouse LINKER
OCT2	MSG073	Ready to use	high	Maus, monoklonal	30	FLEX/HRP + Mouse LINKER
OCT3/4	IR092	Ready to use	high	Maus, monoklonal	20	FLEX/HRP
PLAP	IR779	Ready to use	high	Maus, monoklonal	20	FLEX/HRP
SALL4	385M-16	1/100	high	Maus, monoklonal	30	FLEX/HRP + Mouse LINKER
SAGE1	HPA003033	1/400	low	Kaninchen, polyklonal	30	FLEX/HRP
SOX9	Ab90795	1/750	low	Maus, monoklonal	30	FLEX/HRP
SSX2	HPA045683	1/400	high	Kaninchen, polyklonal	30	FLEX/HRP
Vimentin	IR630	Ready to use	high	Maus, monoklonal	20	FLEX/HRP

2.1.1 Patientenkollektiv

Es wurde ein Kollektiv zusammengestellt, bestehend aus spermatozytären Tumoren (n=27), Seminomen (n=30), primär testikulären Lymphomen (n=4), Dottersacktumoren (n=14) und einem Chorionkarzinom (n=1). Es handelt sich dabei um in Paraffin eingebettete Proben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Anhand einer Diagnoseliste wurden die entsprechenden Hodentumoren ausgewählt, und anhand einer mikroskopischen Kontrolle auf Tauglichkeit geprüft. Die Benutzung und Einbeziehung der Patientenproben wurde durch die Ethikkommission bewilligt. (Antragsnummer: 20/9/20)

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemischen Färbungen wurden mit den im Folgenden beschriebenen automatisierten Färbesystemen gefärbt. Die Antikörper OCT3/4, SALL4, SOX9 und OCT2 werden zum Teil auch in der Routine des Immunlabors eingesetzt, wo sie für den entsprechenden Färbeautomat Omnis ausgetestet und für Routinefärbungen validiert sind. Die restlichen Antikörper wurden mit dem Autostainer gefärbt. Die Antikörper wurden entweder bereits für die Forschung ausgetestet und etabliert, die erstmals benutzten Antikörper wurden für diese Forschungsarbeit neu etabliert. Sowohl auf den Omnis als auch auf dem Autostainer wurde mit einem einheitlich aufeinander abgestimmten Färbe- und Detektionskit gefärbt, was einen gewünschten Qualitäts- und Validitäts-Standard gewährleistet.

2.2.1.1 Immunhistochemische Färbungen mit dem Gerät ‚Autostainer‘

Paraffinschnitte mit einer Dicke von 2 µm wurden hergestellt und für 2 Stunden bei 60°C getrocknet, bis das meiste Paraffin abgelaufen war. Die Schnitte wurden in die speziellen Objektträger-Racks des Autostainer Gerätes gesteckt. Die Schnitte wurden in dem PT-Vorbehandlungsmodul mit Target Retrieval Solution mit PH 6 (low) oder PH 9 (high) entparaffiniert und für 15 min bei 90°C gekocht. Anschließend wurden die Racks auf den Autostainer Färbeautomat geladen und automatisch gefärbt. Der Autostainer pipettierte je nach ausgewähltem Protokoll selbstständig alle Reagenzien auf die Schnitte. Nach einem Waschpuffer wird für 30 min HRP-Blocking Solution aufgetragen, um die endogene Peroxidase Aktivität des Gewebes zu blockieren und so eine unspezifische Farbentwicklung zu vermeiden. Danach wurde der Primärantikörper aufgetragen. Nach einem weiteren

Waschschritt folgte der Sekundärantikörper, abhängig von der Spezies in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde, war es dementsprechend ein Anti-mouse- oder Anti-rabbit-Antikörper. Die Sekundärantikörper waren gelabelt mit HRP. Nun erfolgte die Chromogen-Entwicklung mittels DAB für 8 min. Im letzten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin. Die fertigen Schnitte wurden luftgetrocknet und anschließend mit einem Eindeckautomaten eingedeckt.

2.2.1.2 Immunhistochemische Färbungen mit dem Gerät ‚Omnis‘

Die Schnitte wurden auf den Omnis geladen. Über einen Barcode auf den Objektträgern erkannte der Automat das vorher ausgewählte Protokoll, und das Gerät startete mit einer IHC-Zwei-Phasen-Wachsentsfernung. Zuerst wurde Clarify Cleaning Agent bei 25°C für 1 min inkubiert, dann mit A.dest gespült. Anschließend erfolgte die Demaskierung mit Kochpuffern, pH high oder low (entsprechend Tabelle 1) bei 97°C für 30 min. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer wurde der Primäre Antikörper aufgetragen. Nachdem der primäre Antikörper mit Puffer gewaschen wurde, kam als nächstes der Endogen-Enzymblock mit einem Blockierungs-Reagenz. Dann folgte der HRP-gelabelte Sekundärantikörper. Bei den Markern SALL4 und OCT2 wurde vorher noch mit einem Mouse-Linker für eine Signalverstärkung gesorgt. Die Farbentwicklung erfolgte mit dem Chromogen DAB für 5 min. Eine Gegenfärbung wurde anschließend mit Hämatoxylin für eine Dauer von 3 min durchgeführt. Anschließend wurden die fertigen Schnitte luftgetrocknet von dem Färbeautomaten ausgegeben. Die Schnitte wurden abschließend mit einem Eindeckautomaten eingedeckt.

2.2.1.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die verschiedenen Färbungen der Schnitte wurden mittels einem IRS (Immunoreaktive Staining Score) beurteilt. Es gab ein Scoring von 0-8 Punkten, davon 0-4 Punkte für die Beurteilung zu in % gefärbten Tumorzellen und 0-4 Punkte für die Färbeintensität.

0 = 0% positive Zellen, 1 = <10% positive Zellen, 2 = 10-50% positive Zellen, 3 = 51-80% positive Zellen, 4 = >80% positive Zellen.

0 = negativ, 1 = schwache, 2 = leichte, 3 = mäßige, und 4 = starke Färbung

Die Punkte aus den beiden beurteilten Kategorien wurden anschließend addiert.

2.2.2 Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung

2µm dicke Paraffinschnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 56°C getrocknet. Der ausgewählte Bereich auf dem Gewebeschnitt wurde eingegrenzt, indem das überschüssige Gewebe mit einem Skalpell weggekratzt wurde. Der zu behandelnde Bereich wurde mit einem Diamantschreiber auf der Unterseite des Objektträgers markiert und im weiteren Verlauf behandelt. Die Schnitte wurden in den VP 2000 Processor eingehängt, der Stationen mit verschiedenen Lösungen automatisch abarbeitete. Die Schnitte wurden entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe bewässert und anschließend bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,2M HCl inkubiert, was dazu führte, dass die Geweboberfläche angeraut wurde. Der nächste wichtige Schritt war die 30-minütige Behandlung mit Pretreatment Reagenz bei 80°C. Dies erhöhte die Permeabilität des Gewebes, damit die Protease besser wirken konnte. Die Protease wirkte bei 37°C für 90 Minuten ein. Danach wurden die Schnitte bei 10 Minuten mit 4,5% gepuffertem Formaldehyd fixiert und somit stabilisiert. Nun wurden die Schnitte bei 37°C für 5 Minuten getrocknet. Zwischen allen Schritten erfolgten Waschschriffe mit Aqua dest. und zweimal mit SSC-Waschpuffer.

Nun wurde die Sonde aufgetragen. Die Sonden von ZytoVision waren gebrauchsfertig. Die Sonde wurde vor dem Verwenden gevortext und anzenrifugiert. Pro Schnitt wurden 3µl pipettiert und ein passendes Deckgläschen aufgelegt. Luftblasen wurden herausgedrückt und das Deckgläschen mit einem besonderen Kleber, dem Fixogum, luftdicht verschlossen. Nun kamen die Schnitte über Nacht auf den Hybridizer zur Denaturierung und Hybridisierung. Für die Sonde NR4A3 entsprach dies 10 min bei 75°C und anschließend 37°C.

Am nächsten Tag wurde das Fixogum und das Deckgläschen wieder entfernt. Die Schnitte wurden wieder auf dem VP 2000 Processor eingesetzt und die folgenden Stationen angesteuert: Es startete mit einem Waschschriffe mit 2x SSC/NP40 Waschpuffer bei 72°C, um die überschüssigen nicht hybridisierten Sonden oder unspezifische Signale abzuwaschen. Es folgte ein weiterer Waschschriffe mit 2x SSC Waschpuffer, welcher das Detergenz NP40 wegsplülte. Nach einem weiteren Wasch-Schriffe mit Aqua dest. kamen die Schnitte in 96%igen EtOH und wurden anschließend luftgetrocknet. Die hybridisierten Areale wurden mit einem Filzmarker auf der Rückseite des Objektträgers markiert und dann mit DAPI-Eindeckmedium eingedeckt. Es fungierte hier als cyaner Kernmarker. Es lagerte sich vor allem an Adenin-Thymin-reichen Bereichen der DNA an. Des Weiteren wurde dem

Eindeckmedium Vectashield beigesetzt, was verhinderte, dass die Fluoreszenz ausbleicht und Actinomycin, was ein erneutes Ablösen der Sonde verhinderte.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Es wurde ein Kollektiv aus 27 spermatozytären Tumoren, 30 Seminomen, vier primär testikulären Lymphomen, 14 Dottersacktumoren und einem Chorionkarzinom zusammengestellt. Die Fälle stammen aus dem Fallarchiv der Pathologie. Ein kleiner Teil wurde das Kollektiv durch eingesendete Konsil-Fälle ergänzt, zu diesen Fällen sind die klinischen Daten jedoch teilweise unvollständig.

Das Durchschnittsalter bei Diagnose der spermatozytären Tumoren betrug 58 Jahre (n=16). Die Tumorgöße betrug im Durchschnitt 2,7 cm (n=27). Bei den Seminomen betrug das Durchschnittsalter 43 Jahre (n=28) und die durchschnittliche Größe des Tumors bei 4,3 cm (n=30). Die Lymphome wurden bei einem Durchschnittsalter von 81 Jahren diagnostiziert, die Tumoren waren im Durchschnitt 4,9 cm groß. Bei den spermatozytären Tumoren befand sich der Tumor vier Patienten im linken Hoden und bei sechs Patienten im rechten Hoden (n=4+6=10), zu den restlichen Fällen gab es diese Angabe nicht. Bei den Seminomen waren 13 Tumoren im linken Hoden und 14 im rechten Hoden zu finden (n=13+14=27). Bei den Lymphomen gab es bei drei Fällen Angaben zur Seitenlokalisierung. In allen drei Fällen war das Lymphom im linken Hoden lokalisiert. Die epidemiologischen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst, zu den Dottersacktumoren und dem Chorionkarzinom sind keine Daten erhoben worden.

Tabelle 4: Epidemiologische Daten des Patientenkollektivs

	Spermatozytärer Tumor	Seminom	Primär testikuläres Lymphom
Anzahl (n)	27	30	4
Alter bei Diagnose (Jahre)	58 (n=16)	43 (n=28)	81 (n=3)
Tumorgöße (cm)	2,7 (n=27)	4,3 (n=30)	4,9 (n=4)
Seitenlokalisierung			
Rechts	6	14	0
Links	4	13	3

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Physiologische Anfärbung der immunhistochemischen Marker in Hodengewebe

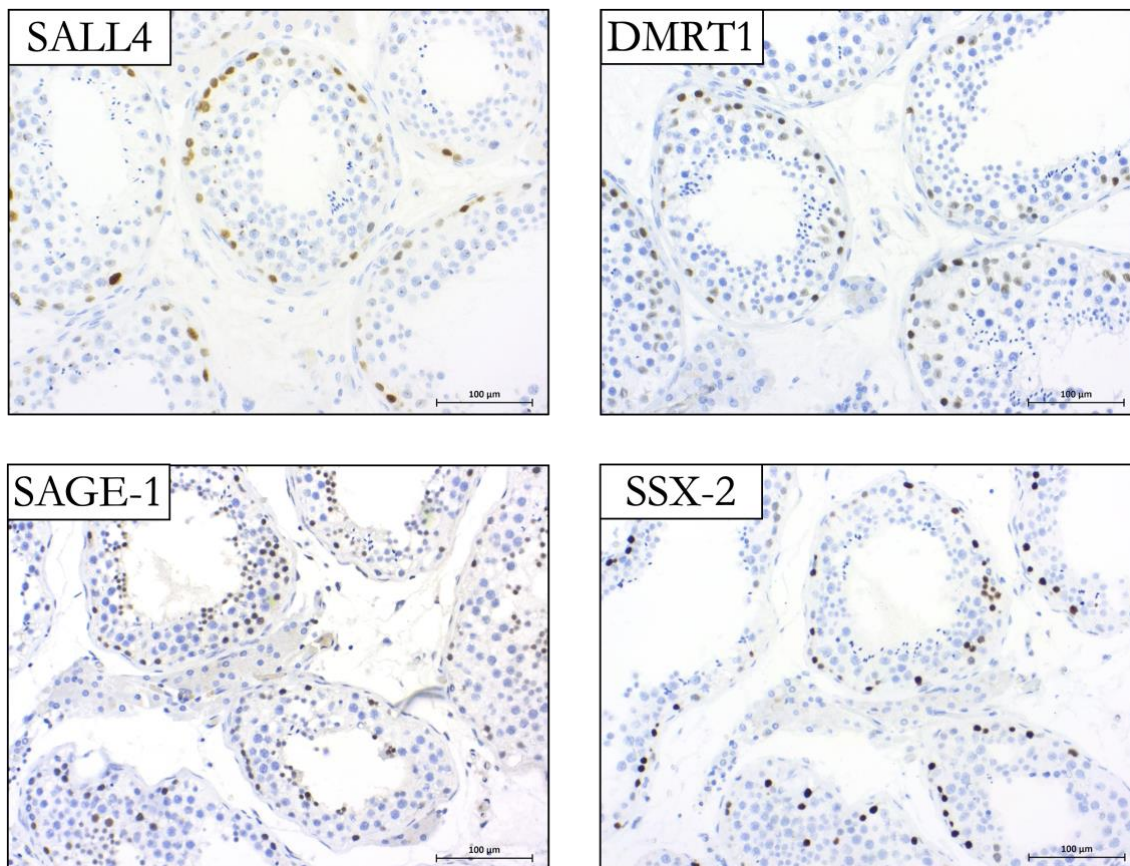


Abbildung 4: Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen mit den Antikörpern SALL4, DMRT1, SAGE-1 und SSX-2 an normalem tumorfreiem Hodengewebe

3.2.2 Spermatozytäre Tumoren

Alle spermatozytären Tumoren färbten sich mit SALL4 mit einem durchschnittlichen IRS von 7,3 an. Der Marker OCT3/4 war in allen Fällen negativ, der IRS betrug somit 0. 29/34 spermatozytären Tumoren waren positiv für CD117, der durchschnittliche IRS betrug 4,1. D2-40 färbte sich bei 30 von 34 spermatozytären Tumoren mit einem IRS von 4,0. PLAP ließ sich nicht anfärben, der IRS war 0. Mit Glypican-3 ließen sich 22 der 34 spermatozytären Tumoren anfärben, der IRS betrug hier durchschnittlich 2,1. Vimentin, CD45 und OCT2 zeigten keine Anfärbung, entsprechend war der IRS für diese Marker 0. DMRT1 zeigte einen IRS von durchschnittlich 7,5 und färbte sich in allen spermatozytären Tumoren an. SAGE1 wurde bei 26/31 spermatozytären Tumoren positiv angefärbt mit einem IRS von 2,8. SSX-2 war bei 29/32 Fällen positiv anfärbbar mit einem IRS von 3,5.

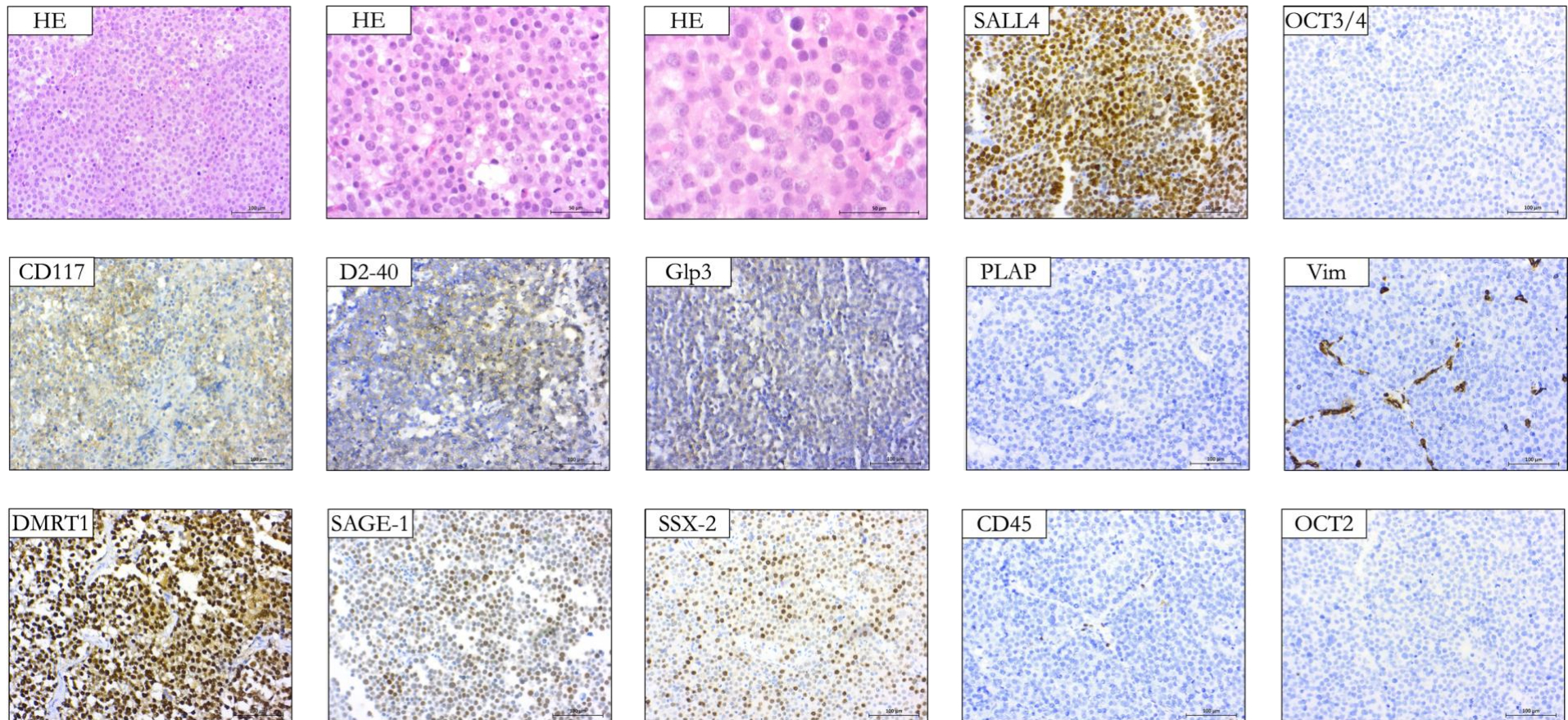


Abbildung 5: Aufnahmen von HE-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörperpanel an einem spermatocytären Tumor

3.2.3 Seminome

Alle 30 Seminome färbten sich mit den Markern SALL4 und OCT3/4 positiv an. SALL4 färbte sich mit einem durchschnittlichen IRS von 7,9 und OCT3/4 mit 7,7. 29 der 30 Seminome färbten sich mit CD117 an, der IRS betrug im Durchschnitt 6,8. D2-40 färbte sich in allen Seminomen an mit einem durchschnittlichen IRS von 8,0. PLAP färbte sich mit einem durchschnittlichen IRS von 6,5 bei 29 der 30 Seminome an. Glypican-3 färbte sich bei 5 der 30 Seminome an, der durchschnittliche IRS betrug 0,7. Vimentin färbte sich bei 11 von 30 Seminomen an, der durchschnittliche IRS betrug 1,4. CD45 und OCT2 zeigten keine Anfärbung, der IRS betrug 0. DMRT1 wurde bei 12 von 30 Seminomen angefärbt mit einem IRS von durchschnittlich 1,2. SAGE1 und SSX-2 erzielten im Seminom einen IRS von 0.

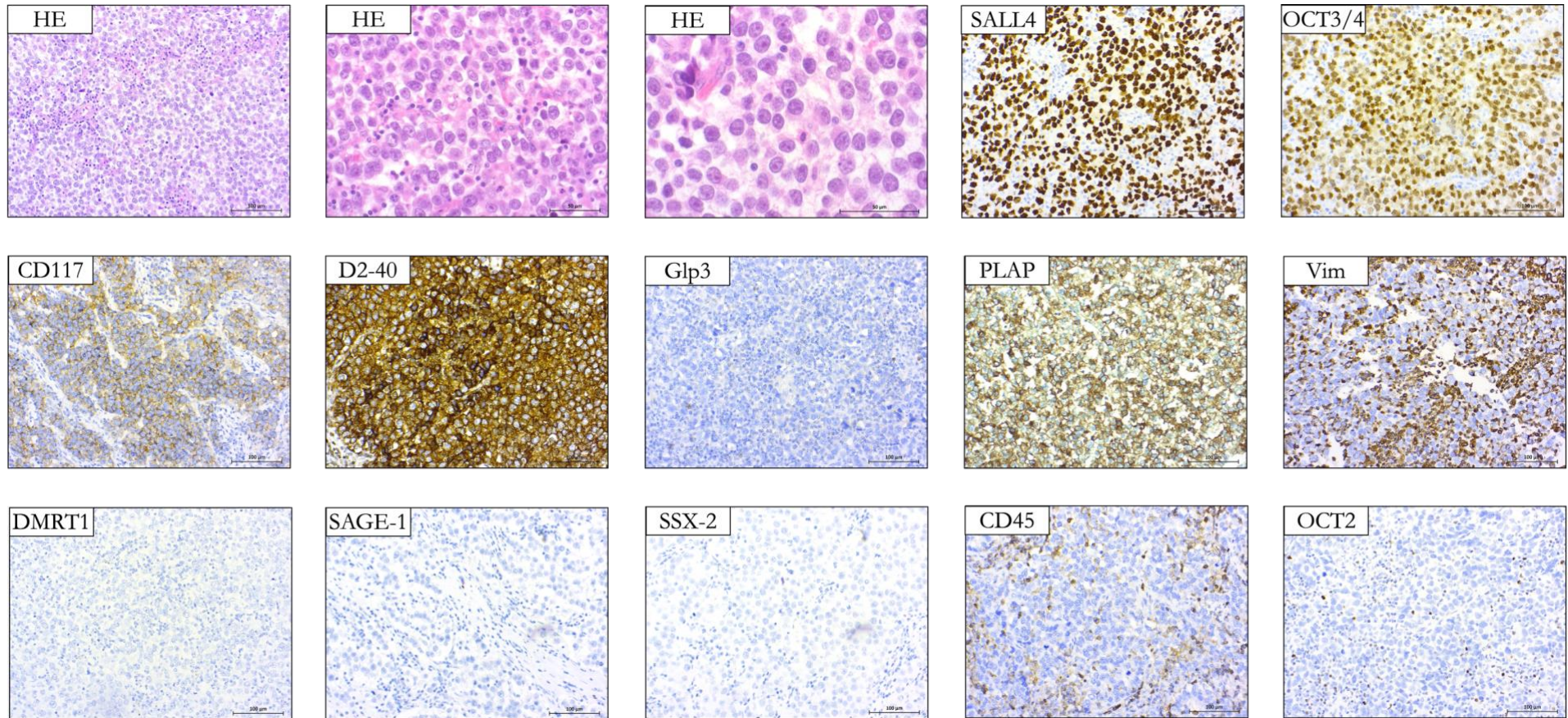


Abbildung 6: Aufnahmen von HE-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörperpanel in Seminomen

3.2.4 Lymphom

Die testikulären Lymphome färbten negativ für die Marker SALL4, OCT3/4, CD117, D2-40, PLAP und Glypican-3. Der IRS dieser Marker ist folglich jeweils 0. Vimentin färbte sich mit einem durchschnittlichen IRS von 6,7 bei 3 von 4 Lymphomen an. CD45 färbte sich bei allen 4 Lymphomen mit einem durchschnittlichen IRS von 7,8 an. OCT2 färbte sich bei allen Lymphomen mit einem IRS von 7,5 an. Die Marker SAGE1 und SSX-2 ließen sich nicht anfärben und ergeben ebenfalls einen IRS von 0.

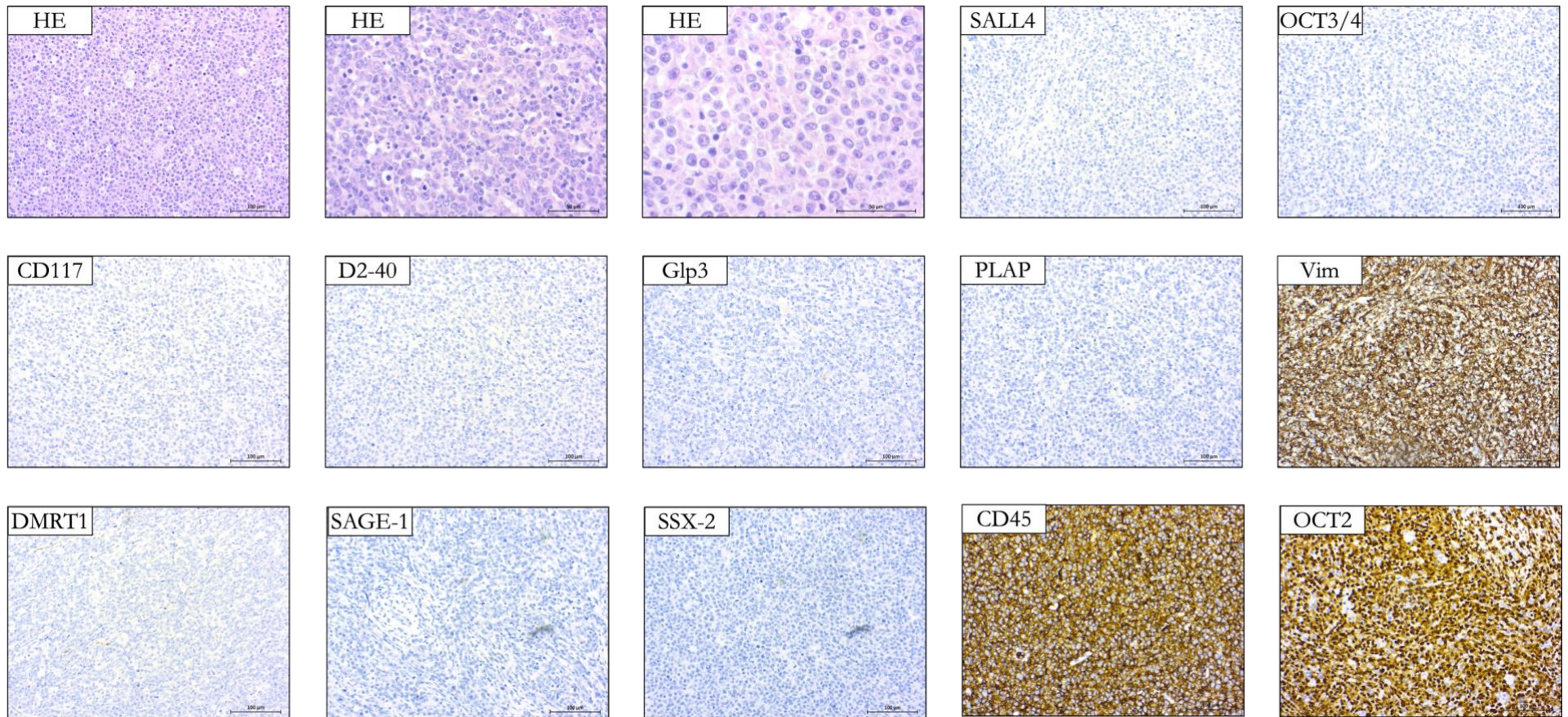


Abbildung 7: Aufnahmen von HE-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörperpanel an testikulären Lymphomen

3.2.5 Dottersacktumoren und Chorionkarzinom

Die Miteinbeziehung dieser Tumorentitäten ist rein formal. Es soll beispielhaft den Fall abdecken, dass ein morphologisch schwierig einzuordnender Tumor, welcher sich SALL4 positiv und OCT3/4 negativ anfärbt, fälschlicherweise als potenzieller spermatozytärer Tumor angesehen wird. Alle von uns untersuchten Dottersacktumoren und das Chorionkarzinom ließen sich im Gegensatz zu den spermatozytären Tumoren nicht mit den Markern DMRT1, SSX-2 oder SAGE1 anfärben. Der IRS für diese Marker betrug demnach 0. Auf eine Darstellung von immunhistochemischen Färbungen dieser Tumorentitäten wurde verzichtet.

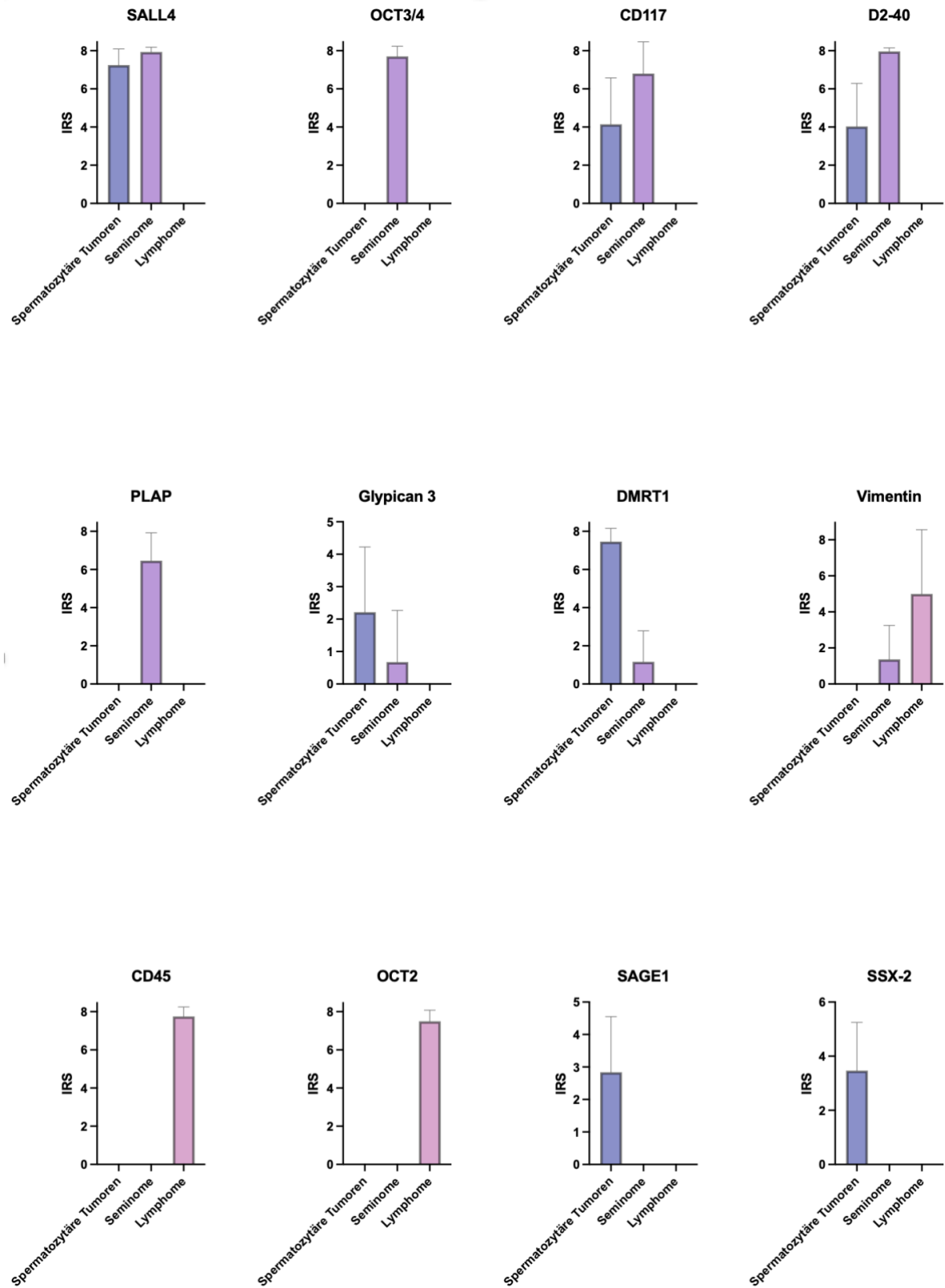


Abbildung 8: Graphische Darstellung der IRS-Scores

Tabelle 5: Immunhistochemische Anfärbarkeit von spermatozytären Tumoren, Seminomen, testikulären Lymphomen, Dottersacktumoren und Chorionkarzinom mit den verschiedenen immunhistochemischen Antikörpern

	Spt	SEM	LYP	DOT	CC
Vim	0/34	11/30	3/4	13/13	1/1
CD45	0/34	0/30	4/4	0/13	0/1
CD117	29/34	29/30	0/4	0/13	0/1
D2-40	30/34	30/30	0/4	0/13	0/1
PLAP	0/34	29/30	0/4	9/13	1/1
OCT3/4	0/34	30/30	0/4	0/13	0/1
Gly.3	22/34	5/30	0/4	13/13	1/1
SALL4	34/34	30/30	0/4	13/13	1/1
OCT2	0/34	0/30	4/4	0/13	0/1
DMRT1	34/34	12/30	0/4	0/13	0/1
SAGE1	26/31	0/30	0/4	0/13	0/1
SSX-2	29/32	0/30	0/4	0/13	0/1

3.3 Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung

Die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung ergab als Ergebnis den Prozentanteil der polysomen Zellen bezogen auf die Sonde. Es wurde ein Cut-Off Wert von 25% festgelegt. Werte <25% werden als negativ, und Werte >25% als positiv gewertet. Bei den spermatozytären Tumoren lag der polysome Anteil bei 88,5% der untersuchten Tumoren im Gegensatz dazu waren bei den Seminomen 13,3 % der untersuchten Tumoren positiv. Die Lymphome stellten sich in keinem Fall als polysom dar.

Tabelle 6: Übersicht der NR4A3 Polysomie positiven Fälle

	Spt	SEM	LYP	DOT	CC
NR4A3 Polysomie positiv	23/26	3/30	0/4	0/13	0/1

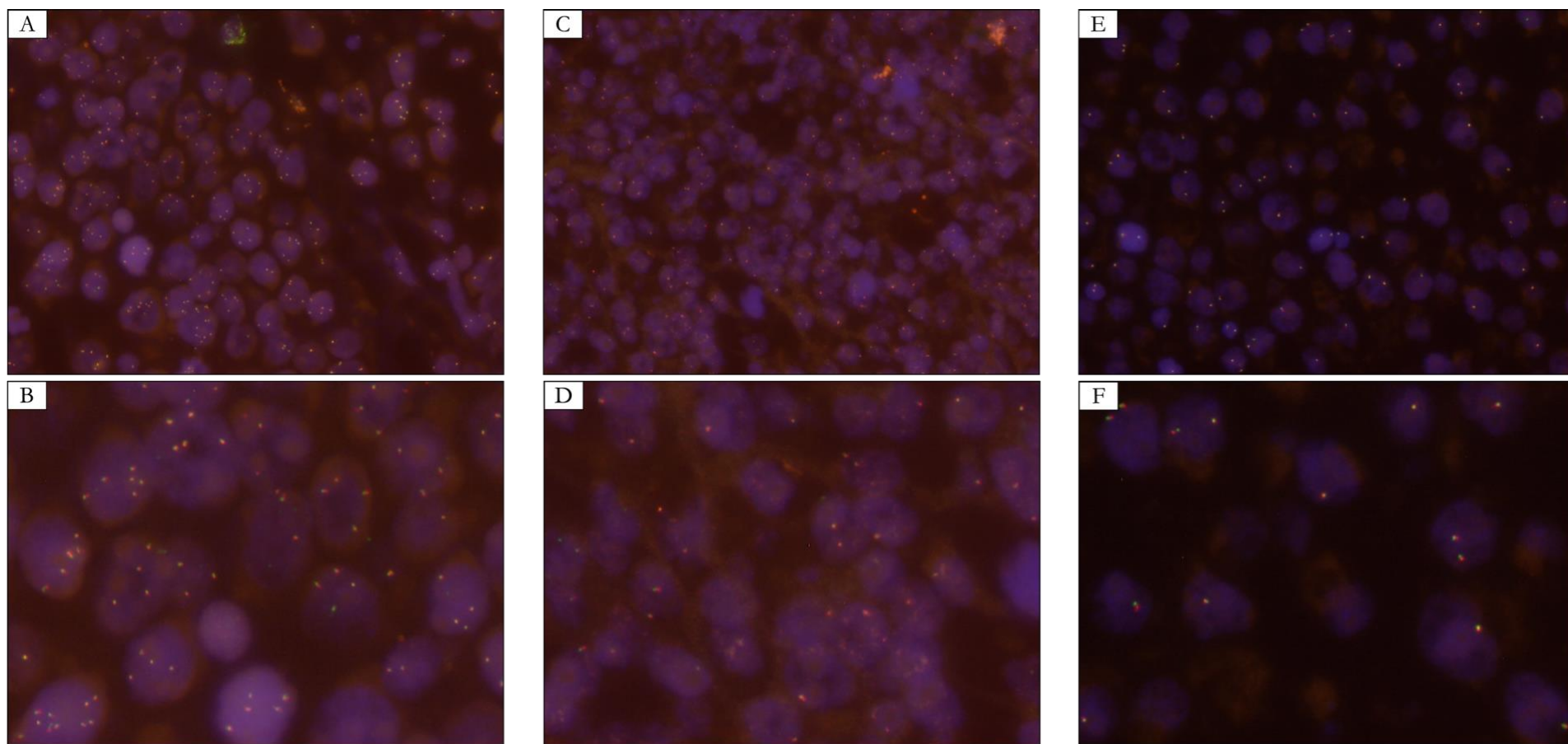


Abbildung 9: Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie: A+B Spermatozytärer Tumor, C+D Seminom, E+F testikuläres Lymphom

4 Diskussion

4.1 Epidemiologische Daten des Patientenkollektives

Das durchschnittliche Alter bei der Diagnose bei der Patientengruppe mit spermatozytären Tumoren dieser Arbeit betrug 58 Jahre, was im Einklang mit den offiziellen epidemiologischen Angaben der WHO-Klassifikation testikulärer KZT steht (Burke und Mostofi 1993; Carrière Philippe et al. 2007; Ghazarian et al. 2018). Unser Ergebnis der durchschnittlichen Tumorgröße von 2,7 cm liegt unter der prävalenten Tumorgröße, die durchschnittlich mit 5-6 cm angegeben wird (Hu et al. 2019). Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen ist möglicherweise die Tatsache, dass bei einigen der spermatozytären Tumoren keine Angaben zu der Größe des Tumors bekannt waren und somit bei unserem Kollektiv aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe die Tumorgröße abgeschätzt wurde.

Bei den Patienten mit einem Seminom betrug das Durchschnittsalter 43 Jahre. Ein Ergebnis, was etwas vom dem einer recht aktuellen epidemiologischen Studie von Ghazarian und Kollegen von 2015 aus den Vereinigten Staaten abweicht (Ghazarian et al. 2015). Die Studie kommt zu einem durchschnittlichen Alter bei Diagnose von insgesamt 36 Jahren. Insgesamt betrug die Anzahl der Seminome, die in die Studie eingeschlossen waren 12419 und lag somit weit über dem Umfang unseres Kollektivs. Einvernehmlich mit dem Ergebnis der medianen Tumorgröße der Seminome von 3,7-5,6 cm in derselben Studie liegt das Ergebnis unseres Kollektivs ebenfalls in dieser Größengegend.

Die Patienten mit einem primär testikulären Lymphom wurden im Schnitt mit einem Alter von 81 Jahren diagnostiziert. In der retrospektiven Populations-basierten Studie von Hasselblom et al. dagegen wurde bei 35 Patienten mit einem testikulären Lymphom ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 69 Jahren festgestellt (Hasselblom et al. 2004). Erneut muss hier auf unsere Kollektivgröße von vier Fällen dieser Tumorart hingewiesen werden und die damit verbundene geringe allgemeine Aussagekraft. Jedoch zählt diese Tumorart zu den Tumoren des höheren Lebensalters beim Mann. Dahingehend ist unser durchschnittliches Alter von 81 Jahren bei Diagnose entsprechend stimmig. Vergleichbares trifft für die Tumorgröße zu, die

von Horne et al. mit durchschnittlich 6 cm angegeben wird (Horne und Adeniran 2011), sich jedoch leicht über unserem Durchschnitt von 4,9 cm befindet.

4.2 Immunhistochemie

Mit einem Panel aus den folgenden immunhistochemischen Markern sollte ein Algorithmus erstellt werden, der die Diagnostik erleichtert und die Abgrenzung der Differentialdiagnosen voneinander vereinfacht: SALL4 (Sal-like protein 4), OCT3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), D2-40 (Podoplanin), CD117 (c-KIT), Glypican-3, Vimentin, CD45 (Leucocyte Common Antigen), PLAP (Plazentare alkalische Phosphatase), OCT2, SOX9, DMRT1 (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1), SAGE-4 (Sarcoma Antigen 1), SSX-2 (Synovial Sarcoma, Breakpoint X 2).

Um nachzuvollziehen, was die oben genannten gonadalen KZT im Hoden voneinander auf entwicklungs-genetischer und pathophysiologischer Ebene voneinander trennen lässt, ist es lohnenswert einen Blick auf die Keimzellentwicklung und anschließende Spermatogenese zu werfen. Die durchlaufenen Entwicklungsstadien eröffnen verschiedene Zeitpunkte einer malignen Transformation. Die verschiedenen immunhistochemischen Marker lassen Rückschlüsse auf den Ursprung der entarteten Zellen führen, was wiederum eine Abgrenzung der verschiedenen Tumorentitäten voneinander zulässt.

Bereits in der zweiten Schwangerschaftswoche entwickeln sich Primordiale Keimzellen am kranialen Ende des Epiblasten. Sie sind Vorläufer der späteren Keimzellen und gehen aus den Embryonalen Stammzellen hervor. Dies kann über Stammzellmarker wie c-Kit oder OCT3/4 Expression nachgewiesen werden (Sheikine et al. 2012). Während der Gastrulation wandern die Primordialen Keimzellen über den Primitivstreifen in den Dottersack, später von dort aus über das dorsale Mesenterium in die Genitalleiste und werden ab diesem Zeitpunkt Gonozyten genannt. Auf dieser Wanderung können einzelne Primordiale Stammzellen an den unterschiedlichsten Stellen verbleiben und entarten. So erklärt sich ebenfalls das Auftreten von Keimzelltumoren auch an Orten außerhalb der Keimepithelien, im Mediastinum oder Retroperitoneum (Mamsen et al. 2013; Busch et al. 2016). Die Zellen einer GCNIS haben ein ähnliches biallelisches genomisches Imprintings- und Expressionsmuster wie die primordialen Keimzellen, weshalb die Schlussfolgerung naheliegt, dass sie die Ursprungszelle der Seminome repräsentieren. Das Färbemuster der immunhistochemischen Marker, die spezifisch für primordiale Keimzellen sind, wie unter anderem PLAP oder CD117, sind bei den Seminomen in unserem Kollektiv mit dieser Hypothese einhergehend positiv (van Gurp et al. 1994;

Almstrup et al. 2004). Bei den spermatozytären Tumoren kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest einige dieser Tumoren aus Zellen entstehen, die dem Expressionsmuster der primordialen Keimzellen und derer Reifestufe sehr nahekommen. Dieser Schlussfolgerung steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass die spermatozytären Tumoren sich nicht mit dem Marker PLAP anfärben lassen. Der Fakt, dass sich die spermatozytären Tumoren hingegen mit dem Marker DMRT1 eindeutig charakterisieren lassen, spricht für eine reifere Ursprungszelle dieser Tumorentität.

4.2.1 SALL4

Alle Seminome und spermatozytären Tumoren aus unserem Kollektiv waren stark SALL4 positiv. Dies war zu erwarten, denn SALL4 ist ein Marker für TGCT. SALL4 formt mit anderen Transkriptionsfaktoren wie OCT4, NANOG und SOX-2 eine regulatorische Einheit, die die Pluripotenz embryonaler Stammzellen erhält (Wang et al. 2006; Wu et al. 2006). Somit ist es plausibel, dass SALL4 in pluripotenten Keimzellen (siehe Abb. 5) und Keimzelltumoren eine positive Färbung zeigt.

4.2.2 OCT3/4

Auch OCT3/4 ist ein Marker für Zellen mit pluripotentem Potenzial und ist somit durchweg anfärbbar in testikulären Vorläuferläsionen, Embryonalen Karzinomen und Seminomen (Looijenga et al. 2003). Nach finaler Differenzierung von Gonozyten in infantile Spermatogonien, 3-4 Monate nach der Geburt wird OCT4 nicht mehr exprimiert (Rajpert-De Meyts et al. 2004). Übereinstimmend dazu zeigten in unserem Kollektiv ausschließlich die Seminome eine positive Anfärbung. SALL4 agiert upstream von OCT4 und reguliert dessen Transkription (Zhang et al. 2006). Es hat somit ein breiteres Expressionsmuster als OCT4, da es ebenfalls in normalen Spermatogonien exprimiert ist (Cao et al. 2009). Da keiner der spermatozytären Tumoren mit OCT3/4 anfärbbar war, ist es ein weiterer Hinweis für eine reifere Ursprungszelle, wie die Spermatozyten, als Ursprung dieser Tumorart. Bei den Seminomen ist bekannt, dass sie höchstwahrscheinlich von Gonozyten ausgehen, und bereits in den intratubulären Vorläuferläsionen ist OCT3/4 anfärbbar. Unser Ergebnis, dass spermatozytäre Tumoren und Dottersacktumoren im Gegensatz zu Seminomen und Embryonalen Karzinomen OCT3/4 negativ sind, steht in Konkordanz mit dem aktuellen Forschungsstand (Looijenga et al. 2003; Rajpert-De Meyts et al. 2004; Ulbright 2008; Roth et al. 2018).

4.2.3 CD117

CD117 ist das Produkt des Protoonkogens MYC und hat eine wichtige Funktion beim Überleben, Proliferation und Migration von Primordialen Keimzellen und Gonozyten. Die Anfärbbarkeit in normalem Hodengewebe eines Erwachsenen reicht von den Spermato gonien und Spermatischen zu den Leydig Zellen (Unni et al. 2009). In unserem Kollektiv zeigten die Seminome und spermatozytären Tumoren entsprechend eine mittlere bis starke Anfärbbarkeit, wobei die Seminome deutlich stärker angefärbt und einzelne spermatozytäre Tumoren negativ für CD117 waren. Gegenätzlich zu dieser Beobachtung fanden Stoop und Kollegen 2001 keine Anfärbung dieses Markers in spermatozytären Tumoren. Eine variable Anfärbbarkeit des Markers CD117 bei spermatozytären Tumoren wurde bereits in der Literatur beschrieben. Es wurde bislang zum Teil als Schlussfolgerung gezogen, dass eine partielle CD117-Positivität in spermatozytären Tumoren für einen Ursprung aus Primordialen Keimzellen bei zumindest manchen Fällen sprechen kann (Kraggerud et al. 1999). Embryonale Karzinome färben sich im Allgemeinen nicht mit CD117 an (Lau et al. 2007).

4.2.4 D2-40

D2-40 (Podoplanin) ist ein membranständiges Glykoprotein, was vermutlich unter anderem an der Entwicklung des Lymphsystems beteiligt ist und als Marker für Lymphgefäße dient (Baluk und McDonald 2008). In den von uns immunhistochemisch gefärbten spermatozytären Tumoren und Seminomen war D2-40 positiv anfärbbar. In den Seminomen war insgesamt ein sehr hoher IRS von 8,0 nachweisbar, in den spermatozytären Tumoren war der IRS mit 4,0 durchweg eher im mittleren Bereich und vier spermatozytäre Tumoren zeigten keine Anfärbung. Gegenätzlich hierzu geben Sonne und Kollegen 2006 spermatozytäre Tumoren als negativ für D2-40 an, andererseits befand sich repräsentativ leider nur ein einziger spermatozytärer Tumor in dem von ihnen untersuchten Kollektiv. Daher wird in dem Review von (Meys et al. 2015) für die spermatozytären Tumoren eine D2-40 Negativität dokumentiert, die wir nicht reproduzieren können. In einer weiteren Studie, in die vier spermatozytäre Tumoren eingeschlossen waren, wurde ebenfalls keine immunhistochemische Anfärbung bestätigt (Sesterhenn et al. 2006). Da in unserem Kollektiv nur vier spermatozytäre Tumoren für diesen Marker keine Anfärbung zeigten, jedoch die restlichen 24 Fälle sich mit einem durchschnittlichen IRS von 4,0 positiv anfärbten, gelange ich zu der Schlussfolgerung, dass spermatozytäre Tumoren sich in manchen Fällen auch mit D2-40 anfärben lassen können. Der Grund dafür könnte auf der Tatsache beruhen, dass unterschiedliche Antikörper Klone verwendet wurden.

4.2.5 DMRT1

Alle spermatozytären Tumoren waren stark positiv anfärbbar für DMRT1. Bei den Seminomen ließen sich im Gegensatz dazu nur 12 Fälle positiv anfärben, und das mit einem deutlich schwächeren IRS. Die Anfärbung war zum Teil fokal. DMRT Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine Zink-Finger ähnliche DNA-Bindungs-Domäne besitzen (Raymond et al. 1998). Bereits Punktmutationen im DMRT1 Gen führen zu einer männlich zu weiblich Geschlechtsumwandlung bei Geburt, was darauf schließen lässt, dass DMRT1 haploinsuffizient für die Hodenentwicklung ist (Murphy et al. 2015). Ab Gestationswoche 22-40, in der Kindheit und postpubertal ist DMRT1 reichlich in Spermatogonien anfärbbar. Bei Meioseintritt wird DMRT1 in den Spermatozyten vollständig herunterreguliert (Jørgensen et al. 2012). Da die DMRT1 Expression phasenweise und nach Reifegrad der Zellen variiert, stellt sich die Frage, ob die teilweise DMRT1 positiven Seminome womöglich auch von Primordialen Keimzellen oder Gonozyten entsprungen sind, welche ebenfalls DMRT1 exprimierten. Es ist bis dato nicht geklärt, was genau DMRT1 in der embryonalen Entwicklung für eine Rolle hat. In den spermatozytären Tumoren ist DMRT1 aufgrund der wiederkehrenden Amplifikation des Chromosom 9 überexprimiert (Rosenberg et al. 1998; Verdorfer et al. 2004; Looijenga et al. 2006). Unsere Ergebnisse sind konkordant mit anderen Studien, welche sich ebenfalls mit der Expression von DMRT1 in spermatozytären Tumoren befasst haben (Looijenga et al. 2006; Roth et al. 2018). Sie beschreiben ebenfalls eine starke Anfärbung des Markers DMRT1 in der Immunhistochemie von spermatozytären Tumoren, in Seminomen dagegen wird eine überwiegende bis vollständige Negativität für diesen Marker beschrieben.

4.2.6 Glypican-3

Glypican-3 wurde in fünf Seminomen minimal, und in einem Großteil der spermatozytären Tumoren leicht positiv angefärbt. Laut Meyts et al. soll jedoch gegensätzlich hierzu Glypican-3 negativ in spermatozytären Tumoren sein, ebenso wie das oben bereits genannte D2-40. Glypican-3 ist ein extrazelluläres Membranprotein auf der Zelloberfläche, welches in Trophoblasten und vielen fetalen Zellen exprimiert wird, die Expression ist dagegen in adulten Zellen jedoch begrenzt (Pellegrini et al. 1998). Des Weiteren ist Glypican-3 ein spezifischer Marker für Dottersacktumoren und Chorionkarzinome, der hingegen in Seminomen und Embryonalen Karzinomen negativ ist (Zynger et al. 2007). Wie bereits erwähnt ist der Dottersacktumor eine wichtige Differenzialdiagnose bei OCT3/4-Negativität. Dass spermatozytäre Tumoren, die OCT3/4-negativ sind, ebenfalls Glypican-3 als spezifischen Marker für Dottersacktumoren und Chorionkarzinome besitzen können, kann den diagnostischen Prozess verkomplizieren.

4.2.7 PLAP

PLAP ist ebenfalls ein Marker, der in Primordialen Keimzellen und Gonozyten, also pluripotenten Zellen, jedoch nicht in adulten Stammzellen anfärbbar ist. PLAP ist ebenfalls in GCNIS und Seminomen anfärbbar, ganz im Gegensatz zu den spermatozytären Tumoren, die bei diesem Marker negativ sind (Meyts et al. 2015). In dem von uns zusammengestellten Kollektiv waren die Ergebnisse mit den Ergebnissen der Studie von Meyts et al. übereinstimmend. Es ließen sich somit ausschließlich die Seminome positiv für PLAP anfärben, was im Allgemeinen dem prognostizierten Expressionsmuster von PLAP entspricht (Burke und Kash Mostofi 1988; Kraggerud et al. 1999).

4.2.8 Vimentin

Der Marker Vimentin war in den spermatozytären Tumoren durchgehend negativ, bei den Seminomen waren 11 Fälle moderat positiv, die zu einem durchschnittlichen IRS der Seminom-Gruppe von 1,3 geführt haben. Die Lymphome zeigten eine durchschnittliche Färbeintensität von einem IRS von 6,7. Vimentin ist ein Marker, der z.B. bei der EMT (Epithelialen Mesenchymalen Transition), ähnlich wie E-Cadherin, verloren geht und was mit einem Verlust der Zellintegrität und Zellpolarität einhergeht (Lamouille et al. 2014; Pradella et al. 2017). Dieser Prozess begünstigt den Prozess der Metastasierung und des invasiven Wachstums eines Tumors im Allgemeinen.

4.2.9 CD45

Bekanntermaßen ist der Marker CD45, auch LCA (Leukocyte Common Antigen) genannt, hochspezifisch für Leukozyten (Kurtin und Pinkus 1985). Übereinstimmend mit dieser Annahme färbte sich CD45 exklusiv in den testikulären Lymphomen an. Für die Abgrenzung eines testikulären Lymphoms als Differentialdiagnose zu einem Seminom oder spermatozytären Tumor kann man schlussendlich die Konsequenz ziehen, dass der Marker CD45 eindeutig den lymphatischen Ursprung des Tumors beweist und einen Keimzelltumor als Diagnose ausschließt. Ferner besteht auch die Möglichkeit spezifische T- und B-Zellmarker zu Rate zu ziehen, um zu differenzieren, ob es sich um eine Metastase eines Lymphoms handelt oder ob es ein primäres Lymphom ist, beziehungsweise ob es sich um ein T- oder B-Zell-Lymphom handelt.

4.2.10 OCT2

OCT2 ist ein Transkriptionsfaktor der POU(Pit-Oct-Unc)-Familie (Latchman 1996). Es reguliert in diversen Zellen die Transkription neben der Aktivierung von Immunglobulin-

Genexpression (Scheidereit et al. 1988). OCT2 wird laut der WHO-Klassifikation als positiver Marker für spermatozytäre Tumoren angegeben, basierend auf einer Publikation von Lim et al. aus dem Jahr 2011, in der erstmals eine seltene Untergruppe von spermatozytären Tumoren beschrieben wurde, die durch den Marker OCT2 anfärbbar waren. In dem von Lim und Kollegen ausgewerteten Kollektiv von 36 spermatozytären Tumoren finden sich in 5 Fällen OCT2 positive Tumorzellen, was einen Anteil von 14% am Gesamtkollektiv ausmacht. In unserem Kollektiv färbte sich OCT2 ausschließlich in den testikulären Lymphomen positiv an, in allen spermatozytären Tumoren und Seminomen war dieser Marker negativ. Es ist denkbar, dass in unserem Kollektiv aufgrund der Rarität der spermatozytären Tumoren kein Fall der von Lim und Kollegen beschriebenen Untergruppe zuzuordnen war.

4.2.11 CT-X Antigene SAGE1 und SSX-2

Eine weitere interessante Gruppe von Markern, die zur Abgrenzung von Seminomen und spermatozytären Tumoren zur Rate gezogen werden können, ist die Gruppe der Chromosom X kodierten Cancer/Testis Antigene (CT-X Antigene). Wenn die OCT3/4 Expression herunterregelt wird, bei der Entwicklung von Gonozyten zu Keimzellen, beginnt die Expression von CT-X Antigenen. Dieser Wechsel lässt einen Pluripotenzverlust und eine unwiderrufliche Weiterentwicklung zu Keimzellen mutmaßen. Aubry und Kollegen (2001) untersuchten ebenfalls das immunhistologische Färbemuster des CTAs MAGE-A4, das in vielen verschiedenen Tumoren exprimiert wird, aber im normalen Hoden nur in den primären Spermatozyten und Spermatogonien zu finden ist. Sie beschrieben eine Färbung der Spermatogonien, die jedoch auf die Spermatogonien begrenzt bleibt. Primäre Spermatozyten werden ebenfalls angefärbt, wenn auch schwächer. Aus dieser Erkenntnis wird abgeleitet, dass durch die zweite meiotische Zellteilung die Expression von MAGE-A4 herunterreguliert wird. Des Weiteren wurde eine Färbung aller 12 untersuchten Seminomen beschrieben, sowie einer Untergruppe von GCNIS. Dieses Ergebnis steht in Konkurrenz zu der Auswertung von Bode und Kollegen (2014), die eine Anfärbung mit MAGE-A4 in nur 10% der 254 untersuchten Seminomen beschrieben. Spermatozytäre Tumoren waren in der Untersuchung von Aubry und Kollegen nicht eingeschlossen. Dieses Beispiel soll zeigen, dass es innerhalb der Gruppe der CT-X-Antigene ein sehr variables Expressionsmuster gibt und sich bei weitem nicht alle CT-X Antigene für eine Abgrenzung von spermatozytären Tumoren und Seminomen taugen. Alle von Aubry und Kollegen untersuchten spermatozytären Tumore waren OCT3/4 negativ und positiv für die CT-X Antigene CTAG1B, GAGE1, MAGEA3, MAGEA4 und MAGEC1. Seminome zeigten eine variable Anfärbung mit einem positiven Anteil von Fällen von 3-40%. Es wird die Annahme gestärkt, dass spermatozytären Tumoren und Seminome in Konkordanz mit der

allgemeinen Hypothese unterschiedliche Ursprungszellen haben. Die CTAs, die in der frühen Tumorgenese verloren gehen, können zudem in einer Untergruppe von Seminomen wieder exprimiert werden. Eine solche Untergruppe können wir aufgrund konstanter fehlender Anfärbbarkeit der Seminome nicht bestätigen.

Looijenga und Kollegen (2006) untersuchten in einem mRNA Expressions Mikroarray Marker, die signifikant unterschiedlich in spermatozytären Tumoren und Seminomen exprimiert werden. Neben OCT3/4 und, wie bereits erwähnt DMRT1, zeigten die SSX2-SSX4 Gene einen 20-fachen Unterschied in der Expression. Stoop und Kollegen (2001) testeten das immunhistochemische Färbeprofil von verschiedenen CT-X Antigenen. Einer der verwendeten Antikörper, SSX, richtete sich gegen die Subtypen SSX2-SSX4. Von den 12 untersuchten Seminomen zeigte sich außer sporadischen angefärbten Zellen keine positive Anfärbung, bei den spermatozytären Tumoren dagegen färbten sich alle 13 der untersuchten Gewebeproben positiv an. Bei der Auswertung unserer Seminome ließ sich kein Seminom mit SSX2 anfärben, entgegen der beschriebenen leichten Variabilität in dem Färbeverhalten.

Die Expression von OCT3/4 und der CT-X Antigene schließt sich in den sich entwickelnden Keimzellen gegenseitig aus. Dieses Phänomen ist jedoch nicht auf Seminome übertragbar (Chen et al. 2011). Die Anfärbung von CT-X Antigenen allgemein in Seminomen ist sehr variabel und zeigt ein eher heterogenes Färbemuster. Die von Chen und Kollegen untersuchten Seminome zeigten bei 5/73 Fällen mit SSX-2 und 3/73 Fällen mit SAGE-1 eine fokale Anfärbung. Im Gegensatz dazu war bei den zwei untersuchten spermatozytären Tumoren bei den beiden Markern SSX-2 und SAGE-1 bei 50-70% der Tumorzellen eine moderate Färbung zu beobachten. Das Färbemuster verallgemeinert auf alle untersuchten CT-X Antigene, beschrieben sie bei den Seminomen als weniger intensiv und heterogener im Vergleich mit den spermatozytären Tumoren. Lim und Kollegen untersuchten das immunhistochemische Färbemuster der Marker OCT2, SSX2-4 und SAGE1 an 36 spermatozytären Tumoren, 4 intratubulären spermatozytären Tumoren, normalem Hodengewebe und unterschiedlichen Entwicklungsstadien der fetalen und kindlichen Hodenentwicklung (Lim et al. 2011). 89% der spermatozytären Tumoren färbten sich mit dem Marker SSX2-4 positiv und 39% waren positiv für SAGE1. Wie bereits erwähnt war für den Marker OCT2 eine Anfärbung nur in einer kleinen Gruppe, nämlich bei 14% der spermatozytären Tumoren zu finden. In dieser besagten Gruppe waren die beiden anderen untersuchten Marker SSX2-4 und SAGE1 entweder beide positiv oder negativ. Anhand der Untersuchung der intratubulären spermatozytären Tumoren, im Vergleich mit den spermatozytären Tumoren und Lokalisation der immunhistochemischen

Anfärbung, beschreiben Lim und Kollegen eine eher konstante Färbung der Zellen mit SSX2-4 und eine tendenziell abnehmende Anfärbbarkeit der Zellen mit SAGE1 im Verlauf der Tumorprogression. Als Basis für diese Vermutung wird die Tatsache angenommen, dass das intratubuläre spermatozytäre Seminom eine Art Vorläuferläsion oder benigne Vorstufe in der frühen Tumorgenese repräsentiert (Müller et al. 1987). Die Anfärbung der Spermatogonien mit OCT2 und SSX2-4 fiel entweder positiv zugunsten des einen oder des anderen Markers aus, eine Positivität für beide Marker wurde nicht beschrieben. OCT2 färbte sich bevorzugt in A_{dark} und SSX2-4 präferiert in A_{pale} Spermatogonien an. SAGE1 fand sich eher in B Spermatogonien. Basierend auf dem Färbeprofil der Zellen der Spermatogenese wird die Hypothese formuliert, dass die spermatozytären Tumoren vornehmlich aus A_{pale} oder B Spermatogonien entstehen und eine kleine Untergruppe möglicherweise von A_{dark} Spermatogonien.

Chen und Kollegen (2013) verglichen die immunhistochemische Anfärbbarkeit von 77 Seminomen, 2 spermatozytären Tumoren, 24 Embryonalen Karzinomen und diversen Dottersacktumoren in Bezug auf verschiedene CT-X Antigene. Unter anderem wurde die Anfärbbarkeit von SAGE-1 untersucht. Eine Anfärbung mit SAGE-1 wurde bei 4% der Seminome, 4% der Embryonalen Karzinome, 24% der Dottersacktumoren und bei 100% der spermatozytären Tumoren beschrieben.

Die von uns analysierten spermatozytären Tumoren zeigten durchgehend eine leichte bis mäßige Anfärbung. Vereinzelt zeigten keine Anfärbung der Marker SAGE-1 oder SSX-2. Im Gegensatz dazu ließ sich weder bei den Seminomen noch den Lymphomen eine Färbung beobachten. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den bereits oben genannten Untersuchungen an spermatozytären Tumoren und Seminomen mit SSX-2 und SAGE-1. Es wird der Eindruck gewonnen, dass diese Marker einen Nutzen haben können bei der Abgrenzung der Tumorentitäten gegeneinander.

Ein weiteres Mitglied der CT-Familie, NY-ESO-1 wurde von Satie und Kollegen (2002) untersucht. Sie zeigten, dass NY-ESO-1 in Gonozyten und spermatozytären Tumoren anfärbbar ist, jedoch nicht in Seminomen. Es gibt dementsprechend noch weitere potenzielle CT-X Antigene, die für das Vorliegen eines spermatozytären Tumors sprechen würden.

4.2.12 Zusammenfassung Immunhistochemie

Zusammenfassend kann zu den Ergebnissen der Immunhistochemie gesagt werden, dass sie weitestgehend mit bereits bestehenden Erkenntnissen bezüglich des immunhistochemischen Färbemusters der untersuchten Tumoren übereinstimmen beziehungsweise dieses an einzelnen

Stellen sinnvoll ergänzen. SALL 4 grenzt Keimzelltumoren von Nicht-Keimzelltumoren des Hodens ab, OCT3/4 unterscheidet Seminome und Embryonale Karzinome von Nicht-Seminomen wie Dottersacktumoren oder spermatozytären Tumoren. CD117 sowie D2-40 sind im Lymphom zwar negativ, lassen sich jedoch aufgrund der beobachteten Variabilität nicht sicher dazu verwenden, um ein Seminom sicher von einem spermatozytären Tumor zu unterscheiden. Glypican 3 ist ein Marker, der für einen Dottersack spricht. In unserem Kollektiv konnte jedoch eine variable Anfärbung bei den spermatozytären Tumoren beobachtet werden. Das ist insofern gefährlich, als dass ein OCT3/4 negativer und Glypican 3 positiver spermatozytärer Tumor schnell vermeintlich für ein Dottersack Tumor gehalten werden kann. PLAP färbt sich ausschließlich im Seminom an. DMRT1 zeigt nur im spermatozytären Tumor eine konstant kräftige Anfärbung, im Seminom hingegen kann eine schwächere, fokale Anfärbung gesehen werden. SAGE1 und SSX-2 sprechen für ein spermatozytären Tumor. Vimentin, CD45 und OCT2 sind Marker, die ausschließlich in den Lymphozyten des Lymphoms angefärbt werden.

Aus der Literatur und den Ergebnissen der vorliegenden Doktorarbeit ergibt sich ein immunhistochemischer Algorithmus, der in Abbildung 10 graphisch dargestellt ist.

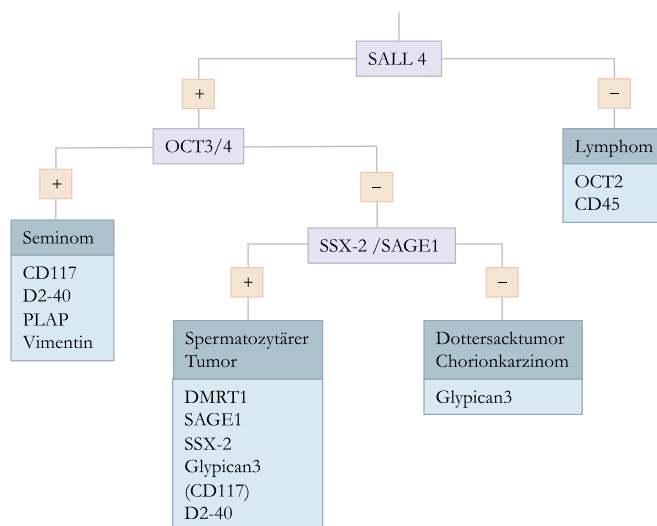


Abbildung 10: Immunhistochemischer Algorithmus mit dem verwendeten Antikörperpanel

4.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung NR4A3

Um die charakteristische chromosomale Veränderung in spermatozytären Tumoren zu detektieren haben wir an den Tumoren eine FISH durchgeführt. Hierzu wurde eine Sonde für 2 Regionen auf dem langen Arm des Chromosom 9 verwendet, die ursprünglich eine Break-apart-Sonde ist. Sie wird hier verwendet, um eine Amplifikation des gesamten Chromosom 9 darzustellen. Die Sonde NR4A3 deckt die Region 9q22.33-9q31.1 ab. Laut unserer FISH-Auswertung fand sich eine Vermehrung des Chromosom 9 pro Tumorzelle in 21/28 spermatozytären Tumoren, in 4/30 Seminomen und 0/4 testikulären Lymphomen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass in spermatozytären Tumoren das Chromosom 9 weitestgehend vermehrt vorliegt, und dass ebendiese Amplifikation auch mit der FISH nachgewiesen werden kann. Diese Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit ähnlichen Studien, die zu der gleichen Erkenntnis kamen, beziehungsweise die Annahme geprägt haben, dass eine Amplifikation des Chromosom 9 für spermatozytären Tumoren spezifisch ist. Von der festgestellten Anzahl der Sondensignale pro Zellkern können nur Schlussfolgerungen über die Anzahl des Chromosom 9 gemacht werden. Dieses Ergebnis kann nicht auf den gesamten Chromosomensatz übertragen werden. Es hätte zur Sicherheit und zum Vergleich zur allgemeinen Anzahl der Chromosomensätze eine weitere Sonde zur Kontrolle eingesetzt werden können. So kann bei unseren Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierte Vermehrung des Chromosom 9, die anhand der Sondensignale pro Zelle festgemacht wird, durch beispielsweise einen tetraploiden Chromosomensatz der Tumorzelle zustande kommt. So muss in Frage gestellt werden, ob es sich tatsächlich um eine isolierte Vermehrung des Chromosom 9 handelt und nicht um einen Effekt, der durch eine bestehende Poliploidie zustande kommt.

Es gab bereits diverse Studien, die sich mit der Untersuchung der Amplifikation des Chromosom 9 befassen beziehungsweise zu dem Schluss kamen, dass zusätzliche Kopien des 9. Chromosom durchgehend bei spermatozytären Tumoren gefunden werden können (Rosenberg et al. 1998; Verdorfer et al. 2004; Looijenga et al. 2006). Das Kollektiv von Verdorfer und Kollegen bestand aus 8 spermatozytären Tumoren von 7 Patienten. Die Proben wurden mittels Comparative Genomic Hybridization (CGH) und FISH untersucht. Sie kommen unter anderem zu dem Ergebnis, dass zumindest die chromosomale Region des 9p21 vermehrt in allen untersuchten Proben vorliegt.

Rosenberg und Kollegen untersuchten 4 Fälle mittels CGH, FISH und einer zytogenetischen Untersuchung. Das Chromosom 9 war in allen Fällen vermehrt, die Chromosomensätze stellten sich des Weiteren als di- bis tetraploid dar. Looijenga und Kollegen untersuchten ihr Kollektiv mittels CGH. Eine Vermehrung des Chromosom 9 war die einzige konstante Anomalie, die bei

den 5 untersuchten spermatozytären Tumoren gefunden wurde. Hier zeigte einer der Tumoren eine isolierte Vermehrung der 9p21.3 Region, eine Vermehrung des kurzen Arms des Chromosom 9 im Bereich der p22 Bande bis zu 9p13.3 war somit eingeschlossen.

Es ist plausibel, dass die spermatozytären Tumoren, die mit ihrem Polysomie-Wert unter dem Cut-off liegen, eigentlich eine isolierte Vermehrung der 9p21.3 Region aufweisen können. Eine derartige Amplifikation wurde bereits von Looijenga und Kollegen beschrieben bei spermatozytären Tumoren, die bei Tumoren gefunden wurde, und keine Amplifikation des gesamten Chromosom 9 aufwies. Diese isolierte Vermehrung kann jedoch leider nicht mit der von uns verwendeten Sonde NR4A3 detektiert werden, da die Sonde die Region 9q22.33-q31-1 abdeckte. Somit kann aufgrund dieser von uns gewonnenen Ergebnissen keine Aussage über die Häufigkeit einer isolierten 9p21.3 Vermehrung im Vergleich mit einer Chromosom 9 Amplifikation getroffen werden.

Die durchgehende Vermehrung des Chromosom 9 kann somit genutzt werden, um im Großen und Ganzen spermatozytäre Tumoren von Seminomen abzugrenzen, und das bereits mit einer beispielsweise simplen Untersuchung wie der FISH. Seminome sind im Allgemeinen aneuploid (Kysela und Matoska 1991; Kraggerud et al. 1999), und können so gegenüber spermatozytären Tumoren abgegrenzt werden.

Es gab, wie bereits angerissen, ebenfalls Untersuchungen die sich auf die genaue Ploidität der Tumorzellen bezog (Kraggerud et al. 1999; Giannoulatou et al. 2017). Bei den 5 spermatozytären Tumoren des Kollektivs von Giannoulatou fand sich eine ausgedehnte Aneuploidität. 1 Tumor war fast tetraploid, 3 Tumoren waren fast triploid und 1 Tumor war fast diploid. Das Kollektiv von Kraggerud und Kollegen bestand aus insgesamt 14 spermatozytären Tumoren. Die Proben wurden mit einer DNA Durchflusszytometrie analysiert, woraufhin ein Histogramm bezüglich des DNA-Gehalts der Zellen erstellt wurde, was wiederum Rückschlüsse auf die Anzahl der vorhandenen Chromosomensätze zuließ. 6 der untersuchten Fälle stellten sich als diploid dar, 7 als tetraploid, 1 Fall war octoploid und die restlichen Tumoren waren aneuploid. Schlussfolgernd ist es theoretisch möglich, dass die von uns detektierten vermehrt vorliegenden Signale bei den spermatozytären Tumoren durch eine Polyploidie zustande kommen. Auf der anderen Seite ist es jedoch auch nicht von der Hand zu weisen, dass die besagte Chromosom 9 Vermehrung durchgängig beschrieben wird und unsere Ergebnisse somit auch ohne vorhandene Polyploidie-Kontrolle sehr plausibel und valide sind.

Um mit einer anderen technischen Methode ebenfalls zu zeigen, dass spermatozytäre Tumoren eine Amplifikation des Chromosom 9 besitzen, würde sich eine quantitative PCR empfehlen. Die Amplifikation würde sich darstellen lassen, indem Primer-Sequenzen verwenden würden, die verschiedene Bereiche auf Chromosom 9 abdecken. Eine solche Methode wurde bereits von Fichtner und Kollegen für den Nachweis des Isochromosoms 12 bei malignen Keimzelltumoren beschrieben und etabliert (Fichtner et al. 2021). Mit diversen Primern auf Chromosom 9 könnte zudem untersucht werden, ob sich, wie oben beschrieben, Fälle finden lassen, welche nur eine isolierte Amplifikation der Region 9p21.3 aufweisen. Eine weitere Möglichkeit bietet eine Array CGH, die technisch gesehen bereits das Auflösungsvermögen einer FISH übersteigt, jedoch in der Durchführung deutlich aufwändiger und kostenintensiver ist.

5 Zusammenfassung

Da bislang keine empfohlenen Marker für die Diagnostik von spermatozytären Tumoren verfügbar sind, besteht diesbezüglich eine Dringlichkeit. SALL4 positive und OCT3/4 negative Tumoren können Unsicherheiten in der Diagnostik aufwerfen, die mit einem simplen Diagnosealgorithmus aus dem Weg geräumt werden können. Spermatozytären Tumoren unterscheiden sich von anderen Keimzelltumoren wie den Seminomen dahingehend, dass eine grundlegend unterschiedliche Therapie empfohlen wird. Daher ist eine sichere Abgrenzung dieser Tumoren für das weitere Verfahren für den Patienten wichtig. Es wurde ein Kollektiv bestehend aus 34 spermatozytären Tumoren, 30 Seminomen, 4 primär testikulären Lymphomen, 13 Dottersacktumoren und einem Chorionkarzinom zusammengestellt. Eine Auswahl an immunhistochemischen Markern wurde getroffen. Die Marker CD45, CD117, DMRT1, D2-40, Glypican-3, OCT2, OCT3/4, PLAP, SALL4, SOX9 und Vimentin wurden für immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten des Kollektivs verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen, oder vielmehr die Anfärbbarkeit des Tumorgewebes wurden mit einem IRS bewertet. Die durchschnittlichen Scores jeder Tumorgruppe wurden für jeden Marker graphisch dargestellt, um kategorische Unterschiede festzustellen. Es wurden qualitativ hochwertige Aufnahmen der Färbungen angefertigt, um ein repräsentatives Färbeprofil zu jeder Tumorentität zu erstellen. Eine Break-apart Sonde, die den Abschnitt 9q22.33-9q31.1 abdeckte, wurde verwendet, um mit der FISH eine Vervielfältigung des Chromosom 9 darzustellen. Mit einer Fluoreszenzmikroskopie wurden auf jedem Schnitt mehrere Bereiche analysiert, genauer wurden die Signale pro Zellkern gezählt. Des Weiteren wurden Aufnahmen erstellt, die repräsentativ für die jeweilige Tumorentität die Vervielfältigung der Signale von dem Chromosom 9 zeigen, sowie bei den spermatozytären Tumoren. Zwei Signale pro Zellkern, wie bei den meisten Seminomen, sprach für keine Vermehrung des Chromosom 9. Die FISH erbrachte das Ergebnis, dass ein Großteil der spermatozytären Tumoren eine Amplifikation des Chromosom 9 aufwies. Im Gegensatz dazu konnte eine Amplifikation des Chromosom 9 nur bei wenigen Seminomen beobachtet werden.

Bei der Analyse der epidemiologischen Daten konnte festgestellt werden, dass das zusammengestellte Kollektiv in Bezug auf Erkrankungsalter und Tumorgroße mit den allgemein bekannten Angaben zu den Tumorentitäten übereinstimmt. Die ausgesuchten Fälle sind somit in ihrer Ganzheit repräsentativ für die Bevölkerungsgruppen, die klassischerweise an jenen Tumoren erkranken.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte eine eindeutig starke Anfärbbarkeit von DMRT1 bei den Spermatozytären Tumoren. Bei den Seminomen konnte vereinzelt eine fokale Anfärbbarkeit beobachtet werden, die jedoch schwächer ausfiel als bei den spermatozytären Tumoren. Die Marker SAGE1 und SSX-2 konnten isoliert in den

spermatozytären Tumoren angefärbt werden. Es konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, dass DMRT1 einen zuverlässigen immunhistochemischen Marker für spermatozytäre Tumore darstellt, da dieser Marker in dieser Tumorentität überexprimiert ist, wie bereits von Looijenga und Kollegen gezeigt wurde (Looijenga et al. 2006). Es bekräftigt ebenfalls die allgemein bestätigte Annahme, dass spermatozytäre Tumoren aus Spermatogonien oder frühen Spermatozyten hervorgehen (Rajpert-De Meyts et al. 2003; Looijenga et al. 2006; Lim et al. 2011). DMRT1 wird physiologisch in normalem Hodengewebe und in den Anfangsstadien der Spermatogenese exprimiert. Für den Eintritt in die Meiose ist es essentiell, dass DMRT1 herunterreguliert wird (Jørgensen et al. 2012). Mit diesem Kollektiv an spermatozytären Tumoren konnte des Weiteren die durchgehend beschriebene Chromosom 9 Amplifikation bestätigt werden (Looijenga et al. 2006; Giannoulatou et al. 2017). Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die herausgearbeiteten Marker DMRT1, SAGE1 und SSX-2 verwendet werden können, um spermatozytäre Tumoren von Seminomen und testikulären Lymphome abzugrenzen. Dies ist mit einer vergleichbar simplen und kostengünstigen Methode wie der Immunhistochemie zu erzielen. Ferner kann die Darstellung der Amplifikation des Chromosom 9 bei spermatozytären Tumoren mittels FISH zu Hilfe genommen werden. Die genannten Methoden stellen eine Erweiterung des bereits etablierten Spektrums an immunhistochemischen Antikörpern für gonadale Keimzelltumoren da, die dringend beachtet werden sollten bei fraglicher Morphologie und Immunhistochemie.

6 Literaturverzeichnis

Almstrup K, Høi-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H (2004): Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 64, 4736–4743

Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Chomez P, De Backer O, Jégou B, Samson M (2001): MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778–2785

Baluk P, McDonald DM (2008): Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1131, 1–12

Behre HM, Kliesch S, Schädel F, Nieschlag E (1995): Clinical relevance of scrotal and transrectal ultrasonography in andrological patients. *Int J Androl* 18 Suppl 2, 27–31

Berney DM, Looijenga LHJ, Idrees M, Oosterhuis JW, Rajpert-De Meyts E, Ulbright TM, Skakkebaek NE (2016): Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology* 69, 7–10

Bertz J, Buttman-Schweiger N, Kraywinkel K (2016): Epidemiologie bösartiger Hodentumoren in Deutschland. *Der Onkologe*

Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014): Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod Pathol* 27, 899–905

Bremmer F, Lubk L, Ströbel P, Nettersheim D (2023): Updating germ cell tumour pathogenesis – the ability of seminomas for FOXA2-driven extra-embryonic differentiation. *Histopathology* 83, 477–481

Burke A, Mostofi FK (1993): Spermatocytic Seminoma. A clinicopathologic study of 79 cases. *J Urol Pathol* 21–32

Burke AP, Kash Mostofi F (1988): Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. *Hum Pathol.* 19, 663–670

Busch J, Seidel C, Zengerling F (2016): Male Extragonadal Germ Cell Tumors of the Adult. *Oncol Res Treat* 39, 140–144

Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, Shu XO, Heerema NA, Perlman EJ, Olson SB, Magenis RE (2001): SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* 32, 342–352

Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA (2009): SALL4 is a novel diagnostic marker

for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* **33**, 1065–1077

Carrière Philippe, Baade Peter, Fritschi Lin (2007): Population Based Incidence and Age Distribution of Spermatocytic Seminoma. *J Urol* **178**, 125–128

Cheah CY, Wirth A, Seymour JF (2014): Primary testicular lymphoma. *Blood* **123**, 486–493

Chen Y-T, Chiu R, Lee P, Beneck D, Jin B, Old LJ (2011): Chromosome X-encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Hum Reprod* **26**, 3232–3243

Chen Y-T, Cao D, Chiu R, Lee P (2013): Chromosome X-encoded Cancer/Testis antigens are less frequently expressed in non-seminomatous germ cell tumors than in seminomas. *Cancer Immun* **13**

Dilworth JP, Farrow GM, Oesterling JE (1991): Non-germ cell tumors of testis. *Urology* **37**, 399–417

Donner J, Kliesch S, Brehm R, Bergmann M (2004): From carcinoma in situ to testicular germ cell tumour. *APMIS* **112**, 79–88

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359–E386

Fichtner A, Richter A, Filmar S, Gaisa NT, Schweyer S, Reis H, Nettersheim D, Oing C, Gayer FA, Leha A, et al. (2021): The detection of isochromosome i(12p) in malignant germ cell tumours and tumours with somatic malignant transformation by the use of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Histopathology* **78**, 593–606

Germà-Lluch JR, Garcia del Muro X, Maroto P, Paz-Ares L, Arranz JA, Gumà J, Alba E, Sastre J, Aparicio J, Fernández A, et al. (2002): Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: the experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). *Eur Urol* **42**, 553–562; discussion 562-563

Ghazarian AA, Trabert B, Devesa SS, McGlynn KA (2015): Recent trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Andrology* **3**, 13–18

Ghazarian AA, Rusner C, Trabert B, Braunlin M, McGlynn KA, Stang A (2018): Testicular cancer among US men aged 50 years and older. *Cancer Epidemiol* **55**, 68–72

Giannoulatou E, McVean G, Taylor IB, McGowan SJ, Maher GJ, Iqbal Z, Pfeifer SP, Turner I, Burkitt Wright EMM, Shorto J, et al. (2013): Contributions of intrinsic mutation rate and selfish selection to levels of de novo HRAS mutations in the paternal germline. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 20152–20157

Giannoulatou E, Maher GJ, Ding Z, Gillis AJM, Dorssers LCJ, Hoischen A, Rajpert-De Meyts E, WGS500 Consortium, McVean G, Wilkie AOM, et al. (2017): Whole-genome sequencing of spermatocytic tumors provides insights into the mutational processes

operating in the male germline. *PLoS ONE* 12, e0178169

Giwerzman A, Skakkebaek NE (1993): Carcinoma in situ of the testis: biology, screening and management. *Eur Urol* 23 Suppl 2, 19–21

Göbel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D (2000): Germ-cell tumors in childhood and adolescence. *Ann of Oncol* 11, 263–272

Goriely A, Wilkie AOM (2012): Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *Am J Hum Genet* 90, 175–200

Goriely A, Hansen RMS, Taylor IB, Olesen IA, Jacobsen GK, McGowan SJ, Pfeifer SP, McVean GAT, Rajpert-De Meyts E, Wilkie AOM (2009): Activating mutations in *FGFR3* and *HRAS* reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors. *Nat Genet* 41, 1247–1252

Grogg JB, Schneider K, Bode P-K, Wettstein MS, Kranzbühler B, Eberli D, Sulser T, Beyer J, Hermanns T, Fankhauser CD (2019): A systematic review of treatment outcomes in localised and metastatic spermatocytic tumors of the testis. *J Cancer Res Clin Oncol* 145, 3037–3045

Gundrum JD, Mathiason MA, Moore DB, Go RS (2009): Primary Testicular Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Population-Based Study on the Incidence, Natural History, and Survival Comparison With Primary Nodal Counterpart Before and After the Introduction of Rituximab. *JCO* 27, 5227–5232

Hasselblom S, Ridell B, Wedel H, Norrby K, Baum MS, Ekman T (2004): Testicular lymphoma A Retrospective, Population-based, Clinical and Immunohistochemical Study. *Acta Oncologica* 43, 758–765

Horn T, Schulz S, Maurer T, Gschwend JE, Kübler HR (2011): Poor efficacy of BEP polychemotherapy in metastatic spermatocytic seminoma. *Med Oncol* 28 Suppl 1, S423-425

Horne MJ, Adeniran AJ (2011): Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Testis. *Arch Pathol Lab Med* 135, 1363–1367

Hu R, Ulbright T, Young R (2019): Spermatocytic Seminoma: A Report of 85 Cases Emphasizing Its Morphologic Spectrum Including Some Aspects Not Widely Known. *Am J Surg Pathol* 43, 1–11

Jørgensen A, Nielsen JE, Blomberg Jensen M, Græm N, Rajpert-De Meyts E (2012): Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of *DMRT1* in meiotic entry. *Mol Hum Reprod* 18, 523–534

Koch K, Oshlies I, Klapper W (2022): [Lymphomas and other hematological neoplasms in the testicles]. *Pathologie (Heidelb)* 43, 441–448

Kraggerud SM, Berner A, Bryne M, Pettersen EO, Fosså SD (1999): Spermatocytic seminoma as compared to classical seminoma: An immunohistochemical and DNA flow

cytometric study. *APMIS* 107, 297–302

Kurtin PJ, Pinkus GS (1985): Leukocyte common antigen—a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: Correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum Pathol* 16, 353–365

Kysela B, Matoska J (1991): Flow cytometry analysis of ploidy and proliferation activity in classical and spermatocytic seminoma. *Neoplasma* 38, 3–11

Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014): Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178–196

Latchman DS (1996): The Oct-2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 1081–1083

Lau SK, Weiss LM, Chu PG (2007): D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30. *Mod Pathol* 20, 320–325

Lim J, Goriely A, Turner GD, Ewen KA, Jacobsen GK, Graem N, Wilkie AO, Rajpert-De Meyts E (2011): OCT2, SSX and SAGE1 reveal the phenotypic heterogeneity of spermatocytic seminoma reflecting distinct subpopulations of spermatogonia. *J Pathol* 224, 473–483

Looijenga LHJ, Stoop H, Leeuw HPJC de, Brazao CA de G, Gillis AJM, Roozendaal KEP van, Zoelen EJJ van, Weber RFA, Wolffenbuttel KP, Dekken H van, et al. (2003): POU5F1 (OCT3/4) Identifies Cells with Pluripotent Potential in Human Germ Cell Tumors. *Cancer Res* 63, 2244–2250

Looijenga LHJ, Hersmus R, Gillis AJM, Pfundt R, Stoop HJ, Gulp RJHLM van, Veltman J, Beverloo HB, Drunen E van, Kessel AG van, et al. (2006): Genomic and Expression Profiling of Human Spermatocytic Seminomas: Primary Spermatocyte as Tumorigenic Precursor and DMRT1 as Candidate Chromosome 9 Gene. *Cancer Res* 66, 290–302

Mamsen LS, Brøchner CB, Byskov AG, Møllgaard K (2013): The migration and loss of human primordial germ stem cells from the hind gut epithelium towards the gonadal ridge. *Int J Dev Biol* 56, 771–778

Matoska J, Talerma A (1990): Spermatocytic Seminoma Associated with Rhabdomyosarcoma. *Am J Clin Pathol* 94, 89–95

Matoska J, Ondrus D, Hornák M (1988): Metastatic spermatocytic seminoma. A case report with light microscopic, ultrastructural, and immunohistochemical findings. *Cancer* 62, 1197–1201

Meyts ER-D, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K (2015): Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol* 53, 177–188

- Mikuz G (2014): [Spermatocytic seminoma. A tumor with many faces]. *Pathologie* 35, 232–237
- Mikuz G, Böhm GW, Behrend M, Schäfer G, Colecchia M, Verdorfer I (2014): Therapy-resistant metastasizing anaplastic spermatocytic seminoma: a cytogenetic hybrid: a case report. *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 36, 177–182
- Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (2016): The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 70, 93–105
- Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ (1987): Immunopathology of germ cell tumors of the testis. *Semin Diagn Pathol* 4, 320–341
- Müller J, Skakkebaek NE, Parkinson MC (1987): The spermatocytic seminoma: views on pathogenesis. *Int J Androl* 10, 147–156
- Murphy MW, Lee JK, Rojo S, Gearhart MD, Kurahashi K, Banerjee S, Loeuille G-A, Bashamboo A, McElreavey K, Zarkower D, et al. (2015): An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. *Nat Struct Mol Biol* 22, 442–451
- Olesen IA, Andersson A-M, Aksglaede L, Skakkebaek NE, Rajpert-de Meyts E, Joergensen N, Juul A (2017): Clinical, genetic, biochemical, and testicular biopsy findings among 1,213 men evaluated for infertility. *Fertil Steril* 107, 74-82.e7
- Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2005): Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5, 210–222
- Oosterhuis JW, Kersemaekers AMF, Jacobsen GK, Timmer A, Steyerberg EW, Molier M, Weeren PCV, Stoop H, Looijenga LHJ (2003): Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS* 111, 32–42
- Ottesen AM, Skakkebaek NE, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J, Rajpert-De Meyts E (2003): High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 117–125
- Pellegrini M, Pilia G, Pantano S, Lucchini F, Uda M, Fumi M, Cao A, Schlessinger D, Forabosco A (1998): Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev Dyn* 213, 431–439
- Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C (2017): EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Mol Cancer* 16
- Rajpert-De Meyts E, Jacobsen GK, Bartkova J, Aubry F, Samson M, Bartek J, Skakkebaek NE (2003): The immunohistochemical expression pattern of Chk2, p53, p19INK4d, MAGE-A4 and other selected antigens provides new evidence for the premeiotic origin of spermatocytic seminoma. *Histopathology* 42, 217–226

- Rajpert-De Meyts E, Hanstein R, Jørgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE (2004): Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod* 19, 1338–1344
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D (1998): Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391, 691–695
- Rosenberg C, Mostert MC, Schut TB, van de Pol M, van Echten J, de Jong B, Raap AK, Tanke H, Oosterhuis JW, Looijenga LH (1998): Chromosomal constitution of human spermatocytic seminomas: comparative genomic hybridization supported by conventional and interphase cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 23, 286–291
- Roth LM, Michal Michal, Michal Michael, Cheng L (2018): Protein expression of the transcription factors DMRT1, TCLF5, and OCT4 in selected germ cell neoplasms of the testis. *Hum Pathol* 82, 68–75
- Ruf CG, Isbarn H, Wagner W, Fisch M, Matthies C, Dieckmann K-P (2014): Changes in epidemiologic features of testicular germ cell cancer: age at diagnosis and relative frequency of seminoma are constantly and significantly increasing. *Urol Oncol* 32, 33.e1–6
- Satie A-P, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Henno S, Olivo L, Jacobsen GK, Rioux-Leclercq N, Jégou B, Samson M (2002): The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. *Lab Invest* 82, 775–780
- Scheidereit C, Cromlish JA, Gerster T, Kawakami K, Balmaceda CG, Currie RA, Roeder RG (1988): A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homoeobox protein. *Nature* 336, 551–557
- Sesterhenn I, Davis C, Furusato B (2006): MP-11.15: M2A antigen (podoplanin) distribution in prepubertal and adult testes and testicular tumors. *Urology* 68, 126
- Shahab N, Doll DC (1999): Testicular lymphoma. *Semin Oncol* 26, 259–269
- Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H (2012): Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res* 2, 153–167
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J (1987): Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19–28
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Müller J (1998): Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 106, 3–11; discussion 12
- Sonne SB, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E (2006): Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and

germ-cell tumours. *Virchows Arch* 449, 200–206

Stang A, Trabert B, Wentzensen N, Cook MB, Rusner C, Oosterhuis JW, McGlynn KA (2012): Gonadal and extragonadal germ cell tumours in the United States, 1973–2007. *Int J Androl* 35, 616–625

Steiner H, Gozzi C, Verdorfer I, Mikuz G, Bartsch G, Hobisch A (2006): Metastatic spermatocytic seminoma--an extremely rare disease. *Eur Urol* 49, 183–186

Stoop H, van Gurp R, de Krijger R, Geurts van Kessel A, Köberle B, Oosterhuis W, Looijenga L (2001): Reactivity of germ cell maturation stage-specific markers in spermatocytic seminoma: diagnostic and etiological implications. *Lab Invest* 81, 919–928

Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA (2015): International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology* 3, 4–12

Ulbright TM (2008): The Most Common, Clinically Significant Misdiagnoses in Testicular Tumor Pathology, and How to Avoid Them. *Adv Anat Pathol* 15, 18–27

Unni SK, Modi DN, Pathak SG, Dhabalia JV, Bhartiya D (2009): Stage-specific Localization and Expression of c-kit in the Adult Human Testis. *J Histochem Cytochem* 57, 861–869

van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH (1994): Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86, 1070–1075

Verdorfer I, Rogatsch H, Tzankov A, Steiner H, Mikuz G (2004): Molecular cytogenetic analysis of human spermatocytic seminomas. *Journal Pathol* 204, 277–281

Vitolo U, Ferreri AJM, Zucca E (2008): Primary testicular lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 65, 183–189

Voutsadakis IA (2014): The chemosensitivity of testicular germ cell tumors. *Cell Oncol* 37, 79–94

Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH (2006): A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364–368

Wetherell D, Lawrentschuk N, Gyomber D (2013): Spermatocytic Seminoma With Sarcoma: An Indication for Adjuvant Chemotherapy in Localized Disease. *Korean J Urol* 54, 884–887

Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh Y-H, Low T-Y, Zhang Weiwei, Zhang Wensheng, Sze S-K, Lim B, Ng H-H (2006): Sall4 Interacts with Nanog and Co-occupies Nanog Genomic Sites in Embryonic Stem Cells*. *J Biol Chem* 281, 24090–24094

Zhang J, Tam W-L, Tong GQ, Wu Q, Chan H-Y, Soh B-S, Lou Y, Yang J, Ma Y, Chai L, et al. (2006): Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* 8, 1114–1123

Zynger D, Dimov N, Luan C, Teh B, Yang X (2007): Glypican 3: A Novel Marker in Testicular Germ Cell Tumors. *Am J Surg Pathol* 30, 1570–5

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachfolgenden Personen aussprechen, ohne deren Unterstützung und Mithilfe diese wissenschaftliche Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank an erster Stelle gilt zunächst PD Dr. F. Bremmer, meinem Doktorvater, für die exzellente Unterstützung. Die zahlreichen motivierenden Gespräche, haben zu einer effektiven Herangehensweise meiner Arbeit geführt und werden mir als sehr bereichernd und konstruktiv in Erinnerung bleiben.

Ich danke Prof. Dr. Hubertus Jarry für die hilfsbereite und wissenschaftliche Unterstützung als Zweitbetreuer.

O. Dschun und S. Hugo danke ich für die hilfreiche technische Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. P. Ströbel für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der technischen Ausrüstung.

Prof. H.H. Kreipe, Prof. S. Schweyer, PD Dr. H. Reis, Dr. J. Ritter und Prof. S. Porubsky danke ich für das zur Verfügung stellen von Proben von spermatozytären Tumoren. Dank Ihnen konnte ich das Kollektiv um einige Fälle dieser seltenen Entität erweitern.

Der Wilhelm Sander Stiftung möchte ich für die generelle finanzielle Förderung von PD Dr. F. Bremmer's Forschung danken.