

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Nachweis eines
Isochromosoms i[12p] in malignen
Keimzelltumoren mittels qPCR**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Simon Filmar

aus
Holzminden

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in PD Dr. med. F. Bremmer

Ko-Betreuer/in: PD Dr. rer. nat. S. Kaulfuß

Prüfungskommission

Referent/in PD Dr. med F. Bremmer

Ko-Referent/in: PD Dr. rer. nat. S. Kaulfuß

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 06.10.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Nachweis eines Isochromosoms i[12p] in malignen Keimzelltumoren mittels qPCR" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Fichtner A, Richter A, Filmar S, Gaisa NT, Schweyer S, Reis H, Nettersheim D, Oing C, Gayer FA, Leha A, Küffer S, Ströbel P, Kaulfuß S, Bremmer F (2020): 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*, www.doi.org/10.1111/his.14258 (im Druck)

Filmar S, Ströbel P, Kaulfuß S, Bremmer F (2020): Nachweis eines Isochromosoms i[12p] in malignen Keimzelltumoren mittels PCR. *Urologe* 59, 206

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	6
1.1 Keimzelltumoren – Inzidenz.....	6
1.2 Einteilung der World Health Organization.....	6
1.3 Histologische Einteilung KZT Typ II	7
1.4 Chromosomale Merkmale KZT Typ II.....	9
1.5 Diagnostik.....	10
1.6 Therapie von KZTs	11
1.7 Ziele der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.2 Biochemikalien und Enzyme.....	14
2.3 Gebrauchswaren.....	15
2.4 Geräte.....	15
2.5 Sterilisationsverfahren.....	15
2.6 Biologisches Material	16
2.6.1 Gewebeproben.....	16
2.6.2 Eukaryotische Zelllinien.....	16
2.6.3 Synthetische DNA-Oligonukleotide	16
2.7 Datenbanken	17
2.8 Ethikantrag.....	18
2.9 Isolation und Aufreinigung der Nukleinsäuren.....	18
2.9.1 Isolation der Nukleinsäuren aus dem FFPE-Gewebe und anschließende Konzentrationsbestimmung	18
2.9.2 Isolation der Nukleinsäuren der Zelllinien und anschließende Konzentrationsbestimmung	19
2.10 Methodik der qPCR.....	19
2.11 Statistische Datenverarbeitung.....	21
2.11.1 i[12p]-positive Proben	21
2.11.2 i[12p]-negative Proben und Zelllinien für das Amplikon 12p11.2-12p12.1.....	23
2.12 Statistik.....	27
2.12.1 Angleichung der Primer	27
2.12.2 Optischer <i>Cut-off</i>	28

3	Ergebnisse.....	30
3.1	Patientenkollektive	30
3.2	Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen	31
3.2.1	Primer.....	31
3.2.2	Kontrollkollektiv	34
3.2.3	Tumorkollektiv	35
3.2.4	Zelllinien	36
3.2.5	Untersuchung der i[12p]-negativen Fälle auf ein Amplikon 12p12.1-12p11.2.....	38
3.3	Besondere Fälle mit expliziter histopathologischer Fragestellung nach Keimzelltumorursprung.....	39
3.3.1	Fall 1	39
3.3.2	Fall 2	40
3.3.3	Fall 3	42
3.3.4	Fall 4	43
3.3.5	Fall 5	44
3.3.6	Fall 6	45
3.3.7	Fall 7	46
3.3.8	Fall 8	47
3.3.9	Fall 9	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Diagnostischer Mehrwert durch Verwendung der qPCR bei KZTs – ein Vergleich mit bereits etablierten Methoden.....	51
4.2	Zusammenstellung eines repräsentativen KZT-Kollektivs in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.....	55
4.3	Prävalenz des i[12p] in KZT.....	58
4.4	i[12p]-negative Fälle – Ermöglichung eines besseren Verständnis der KZT-Genetik.....	60
4.5	Ausgewählte Fälle mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung.....	61
4.6	Klinische Anwendung und Perspektiven	64
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichnis	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung KZTs.....	8
Abbildung 2: Immunhistochemie diagnostischer Algorithmus	11
Abbildung 3: Inkubations- und Reaktionsablauf.....	20
Abbildung 4: Amplifikationsverhältnis der p-Arm- und q-Arm- Primerpaare im Kontrollkollektiv	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primerpaare auf dem Chromosom 12.....	32
Abbildung 6: Vergleich 12p/12q-Arm-Amplifikation der Patientenkollektive	33
Abbildung 7: Verteilungskurve mit optischem <i>Cut-off</i>	34
Abbildung 8: Ergebnisse der qPCR-Untersuchung im Kontrollkollektiv.....	35
Abbildung 9: Verteilung von i[12p]-positiven (links) und -negativen (rechts) Fällen im Tumorkollektiv.....	36
Abbildung 10: Amplifikation 12p-Zelllinien	37
Abbildung 11: Amplifikation 12p-Zelllinien.....	37
Abbildung 12: Vergleich Mengenverhältnis des genetischen Materials des Amplikons zu $12p_{gesamt}MW$	38
Abbildung 13: Darstellung des i[12p]-Befundes links (negativ) und Nachweis einer Überrepräsentation des Amplikons rechts (positiv) bei einem i[12p]-negativen Fall.....	39
Abbildung 14: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 1)	40
Abbildung 15: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 2).	41
Abbildung 16: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 3)	43
Abbildung 17: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 4).	44
Abbildung 18: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 5).	45
Abbildung 19: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 6).	46
Abbildung 20: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 7).	47
Abbildung 21: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 8)	48
Abbildung 22: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 9).....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	14
Tabelle 2: Biochemikalien.....	14
Tabelle 3: Gebrauchswaren.....	15
Tabelle 4: Geräte.....	15
Tabelle 5: Zelllinien die in der Arbeit auf ein Vorliegen des i[12p]s untersucht wurden.....	16
Tabelle 6: Primernamen und Primersequenzen.....	17
Tabelle 7: Legende Lambert'sche Gleichung.....	19
Tabelle 8: Reaktionsansatz	20
Tabelle 9: Primer-Panel.....	21
Tabelle 10: Legende Formel <i>median of multiple</i>	22
Tabelle 11: Legende Mittelwertformel der <i>median of multiple</i>	22
Tabelle 12: Legende $12p_{\text{gesamt}}$ MW-Formel.....	23
Tabelle 13: $12q_{\text{gesamt}}$ MW.....	23
Tabelle 14: Erweitertes Primer-Panel	24
Tabelle 15: Legende MoM-Formel.....	26
Tabelle 16: Legende MoM _{MW} -Formel.....	26
Tabelle 17: Legende Amplikon _{gesamt} MW-Formel.....	27
Tabelle 18: Zusammensetzung der Patientenkollektive.....	30
Tabelle 19: Histologische Subtypen des Tumorkollektivs.....	31
Tabelle 20: Verteilung Ergebnisse i[12p]	36
Tabelle 21: Aufführung der Fallanzahl, der Methodik und i[12p]-Prävalenz in vergleichenden Studien.....	57

Abkürzungsverzeichnis

BP	Basenpaare
CGH	<i>Comparative Genome Hybridization</i> , Komparative-Genom-Hybridisierung
CT	<i>cyclus thresbold</i> , Schwellenwertzyklus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	embryonales Karzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GCT	<i>germ cell neoplasia</i>
GCNIS	<i>germ cell neoplasia in Situ</i> , Keimzellneoplasie <i>in Situ</i>
FFPE	Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
FISH	Flouresenz- <i>in-Situ</i> -Hybridisierung
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group
i[12p]	Isochromosom 12p
MMR	<i>mismatch repair</i> , Nichtübereinstimmungsreperatur
MoM	<i>median of multiple</i> , Median eines Vielfachen
NOS	<i>not otherwise specified</i> , nicht weiterspezifiziert
NGS	<i>Next Generation-Sequencing</i> , nächste Generation Sequenzierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative <i>Real-time</i> -PCR, quantitative Echtzeit-PCR
miRNA	Micro-Ribonucleinsäuren
WES	<i>Whole Exom Sequencing</i> , gesamte Exomsequenzierung
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Keimzelltumoren – Inzidenz

Der Begriff Keimzelltumor (KZT) umfasst eine Gruppe von Neoplasien, die sich beim weiblichen und männlichen Geschlecht aus den jeweiligen Keimzellen entwickeln. Während sich ca. 95 % der Tumoren in den Gonaden manifestieren, treten ungefähr 5 % außerhalb dieser auf (Stang et al. 2012). Aufgrund des Auftretens der Neubildungen unterscheidet man zwischen gonadalen und extragonadalen KZTs. Bei Frauen handelt es sich, bis auf wenige Ausnahmen, in den meisten Fällen um exzellent therapierbare Tumoren (Pectasides et al. 2008). Häufiger werden KZTs beim Mann beobachtet.

Weltweit umfassen gonadale und extragonadale KZTs nur etwa 1 % aller Tumorfälle beim Mann. Im Gegensatz dazu repräsentieren KZTs jedoch die häufigste Neoplasie des Mannes im Alter von 15 bis 40 Jahren (Trabert et al. 2015). Im Durchschnitt erkranken die Patienten im Alter von 36 Jahren (Ruf et al. 2014). Obwohl die Inzidenz weltweit zunimmt, unterscheidet sich die globale Verteilung der Tumorfälle stark. Während der letzten Jahrzehnte begegnen steigende Inzidenzzahlen in Europa, Nord-, Südamerika und Kanada niedrigen Inzidenzzahlen in Asien und Afrika. In Länder mit hohen Inzidenzen scheinen sich Plateaus zu bilden, während Länder mit niedrigeren Inzidenzzahlen weiterhin einen Anstieg verzeichnen (Shanmugalingam et al. 2013). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass sowohl ethnische Aspekte und Umwelteinflüsse als auch industrieller Lebensstil in der Entstehung von KZTs eine große Rolle spielen (Mikuz 2014).

1.2 Einteilung der World Health Organization

KZTs beim Mann stellen eine heterogene Gruppe an Tumoren dar, die von der World Health Organization (WHO) in fünf KZT-Typen aufgeteilt werden (Ulbright et al. 2016). Die drei häufigsten und relevantesten Typen sind meist durch spezifische chromosomale Veränderungen charakterisiert.

Bei den Typ I KZTs handelt es sich um seltene Tumoren wie das unreife Teratom, dem unreifen Dottersacktumor und Mischtumoren aus den zuvor genannten Differenzierungen, die beim präpubertären Knaben vor dem sechsten Lebensjahr auftreten. Diese Tumoren gehen auf Keimstammzellen, primordiale Keimzellen oder Gonozyten zurück. Während für

das unreife Teratom keine genetischen Veränderungen beschrieben sind, findet man beim unreifen Dottersacktumors vor allem chromosomale Verluste auf dem q-Arm des vierten und sechsten Chromosoms bei gleichzeitigem Zugewinn auf dem q-Arm des Chromosoms 20 (Mostert et al. 2000). Mit Exzision, Chemotherapie oder Beobachtung sind die meisten Tumoren behandelbar (Rogers et al. 2004; De Backer et al. 2006).

Der Typ III KZT betrifft vor allem den älteren Mann (> 50 Jahre). Auch wenn der sogenannte spermatozytäre Tumor nur ungefähr einen Prozent aller Seminome ausmacht (Carrière et al. 2007) handelt es sich um eine wichtige Differentialdiagnose zum Seminom einem Typ II KZT. Typ III KZT präsentieren sich als intratubuläre Proliferationen von entarteten Spermatogonien oder Spermatozyten. Das chromosomale Charakteristikum ist der genetische Zugewinn auf Chromosom Neun (Verdorfer et al. 2004). Der spermatozytäre Tumor zeigt aufgrund der intratubulären Proliferation fast nie Metastasen und ist mittels chirurgischer Eingriffe, Chemotherapie oder Beobachtung ebenfalls gut therapierbar (Steiner et al. 2006).

Die Typ II KZTs umfassen nicht nur mehr als 90 % aller KZT-Fälle, sondern auch eine Vielzahl von histologischen Subtypen. Zunächst unterteilt man die Tumoren in Seminome und Nicht-Seminome, die in 50 % bzw. 40 % der Fälle beobachtet werden. Die restlichen zehn Prozent zählen zu Mischformen aus seminomastösen und nicht-seminomatösen Anteilen (Verdorfer 2014). Nicht-Seminome untergliedern sich in Tumoren mit embryonaler Histologie wie das embryonale Karzinom (EC) und das Teratom, Tumoren mit extraembryonaler Histologie wie das Chorionkarzinom und der Dottersacktumors sowie Tumoren mit Mischformen aus den vorher genannten Differenzierungen. Als Vorläuferläsion dieser KZTs gilt die Keimzellneoplasie *in Situ* (*germ cell neoplasia in Situ* (GCNIS)). Sie wird häufig in angrenzenden Regionen bei invasiven KZTs, aber selten als alleinige Reinform beobachtet (Skakkebaek 1972). KZTs Typ II sind hauptsächlich durch den chromosomalen Zugewinn, z. B. durch ein Isochromosom 12p (i[12p]), auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms charakterisiert (Oosterhuis und Looijenga 2005).

1.3 Histologische Einteilung KZT Typ II

In der Entstehung der GCNIS wird angenommen, dass primordiale Keimzellen bzw. Gonozyten in ihrer Differenzierung arretieren (Rajpert-De Meyts 2006). Durch fehlendes Abschalten des *Octamer binding transcriptionfactor 3/4* (OCT3/4) bei der Reorganisation der Zelle von der Mitte an den Rand des Tubulus entsteht die Möglichkeit, dass dort zusätzlich

testis specific Y-encoded (TSPY) exprimiert wird. Die Koexpression von antiapoptotischem OCT3/4 (Kehler et al. 2004) und proliferativem TSPY (Oram et al. 2006) scheint ein früher Prozess in der GCNIS-Entstehung zu sein. In diesem Stadium fördern, über die Expression des Stammzellfaktors (*stem cell factor*, KITL), die Sertoli-Zellen die Progression der fehlentwickelten Zellen (Stoop et al. 2008; Kaprova-Pleskacova et al. 2014).

Der Entstehungsprozess des Seminoms und vor allem des Nicht-Seminoms sind bis jetzt nur wenig verstanden. Es wird angenommen, dass sich über das intratubuläre Seminom das Seminom entwickelt (Berney et al. 2006). Nicht-seminomatöse Tumorzellen entstehen aus malignen embryonalen Stammzellen eines EC. Diese gehen aus der Zurückentwicklung auf das Niveau einer Stammzelle von Zellen aus Seminomen oder GCNIS hervor (Oosterhuis und Looijenga 1993). Zellen eines ECs findet sich am häufigsten in Nicht-Seminomen (Krag Jacobsen et al. 1984). Es wird davon ausgegangen, dass sich aus dem EC die weiteren Differenzierungen der Nicht-Seminome entwickeln. Aufgrund der Pluripotenz einer malignen embryonalen Stammzellen ergeben sich zwei Konsequenzen (Andrews et al. 1984). Zum einen ermöglicht dieser Vorgang die Entwicklung der nicht-seminomatösen Subtypen mit embryonalem oder extraembryonalem Wachstumsmuster, zum anderen die daraus entstehende Möglichkeit der immunhistochemischen Differenzierung der Tumoren. Die histologischen Weiterdifferenzierungen sind auch dafür verantwortlich, dass Serummarker wie Alpha-Fetoprotein (AFP), beta-humanes-Choriongonadotropin (β -HCG) und die Laktatdehydrogenase (LDH) beim Patienten bestimmt werden können.

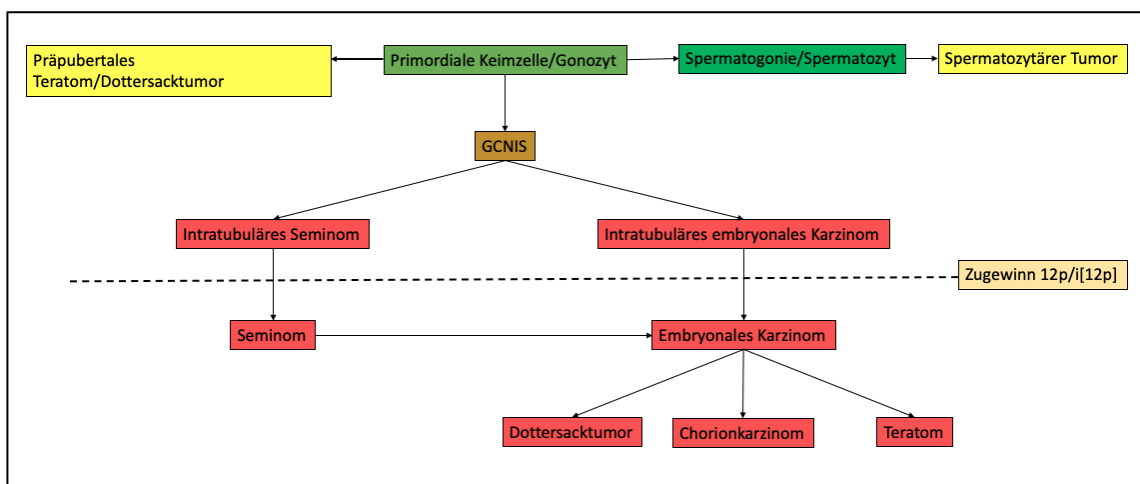


Abbildung 1: Einteilung KZTs: Histologische Entwicklungsstufen der KZTs aus Vorläuferzellen (grüne Textfelder) zu KZTs Typ I/II/III (gelbe/rote Textfelder); die gestrichelte Linie zeigt an, ab welcher Entwicklungsstufe ein i[12p] zu beobachten ist

In einigen Fällen lässt sich beobachten, dass sich aus den Tumorzellen eines Teratoms, nachdem sie sich in einen Zelltyp der drei Keimblätter differenziert haben, ein neues Malignom entwickelt. Dieser Vorgang wird als somatische Malignität beschrieben und ermöglicht, dass sich z. B. ein Karzinom oder ein Sarkom aus einem ausdifferenzierten Teratom entwickelt (Kum et al. 2012). Dabei können die somatischen malignen Neoplasien genetische Merkmale ihrer histologischen Differenzierung aufweisen. Diese Tumoren zeigen häufig dieselben chromosomalen Veränderungen wie Seminome und Nicht-Seminome (Motzer et al. 1998). Als Gegenstück zur somatischen Malignität bei Nicht-Seminomen lässt sich bei einigen Seminomen ausmachen, dass durch die körpereigene Immunantwort eine Regression des Tumors bis hin zur vollständigen Heilung erfolgt. In diesen Fällen spricht man von einem ausgebrannten Seminom (Azzopardi und Hoffbrand 1965; Balalaa et al. 2011). Histologisch zeigt sich schließlich oft nur noch eine fibrosierte Narbe im Hoden. Meist werden diese Fälle durch spätere Metastasen klinisch apparent (Angulo et al. 2009). In diesen Fällen (z. B. somatische Malignität oder Metastase eines regressiven Seminoms) kann die eindeutige histologische Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung erschwert sein.

1.4 Chromosomale Merkmale KZT Typ II

Im Übergang der Vorläuferläsion zu einem invasiven Tumor gewinnt der KZT pathognomonisch genetisches Material auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms, meist in Form eines $i[12p]$ (ca. 80 %) hinzu (Bosl et al. 1994; Rosenberg et al. 2000; Ottesen et al. 2003). Das $i[12p]$ wurde 1983 zum ersten Mal beschrieben (Atkin und Baker 1983) und sukzessiv als Tumormarkerchromosom bestätigt (Bosl et al. 1994; Idrees et al. 2019). So steht der Zugewinn an genetischem Material des p-Arms des zwölften Chromosoms aufgrund seiner Relevanz in der Tumorprogression im Blickpunkt vieler wissenschaftlicher Untersuchungen (Korn et al. 1996; Shen et al. 2018). Das $i[12p]$ wurde sporadisch in anderen soliden Tumoren, wie myeloischen und lymphatischen Leukämien, Kolonkarzinomen (Mertens et al. 1994; Heinonen et al. 1996; Van Kessel et al. 1999) und im Pallister-Killian Syndrom (Izumi und Krantz 2014) beobachtet. Dennoch hält das $i[12p]$, in Anbetracht der Häufigkeit, lediglich für die KZT Typ II einen herausragenden Wert für die Entstehung und den Nachweis eines invasiven KZT. Bis jetzt wurden viele verschiedene einzelne Gene untersucht, die in den Tumoren relativ häufig mutiert sind. Dabei fehlt es aber an Mutationen die bei allen KZT Typ II zu finden sind (Litchfield et al. 2015). Auch bei $i[12p]$ -negativen Fällen kommt es zum Zugewinn von genetischem Material auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms (Suijkerbuijk et al. 1993). Mehrere Mechanismen wie das Vervielfachen intakter Kopien des Chromosoms Zwölf oder die Translokation genetischen Materials des

p-Arms auf andere Chromosomen wurden beobachtet (Henegariu et al. 2004). Außerdem kann sich der chromosomale Zugewinn in zehn Prozent der i[12p]-negativen Fälle bei Seminomen in Form eines begrenzten amplifizierten Genabschnitts (Amplikon 12p11.2-p12.1) präsentieren (Mostert et al. 1998). Auch bei nicht vorliegendem Amplikon liegen typunabhängig genetische Veränderung in diesem Bereich vor (Zafarana et al. 2003).

1.5 Diagnostik

Klinisch präsentieren sich die Tumoren häufig über eine tastbare schmerzlose Schwellung des Hodens, obwohl zugleich ein großer Anteil an Tumoren nicht tastbar ist. Auch retroperitoneale oder mediastinale Raumforderungen und schon metastasierte Befunde können den Verdacht auf einen KZT lenken. Zum Erhärten des Verdachtes können Hodensonographie und Laboruntersuchungen hinzugezogen werden. Im Serum wird in Hinblick auf die Histologie LDH, AFP oder β -HCG bestimmt. Die Laborwerte fungieren gleichzeitig als prädiktive Werte sowie als Verlaufparameter (Barlow et al. 2010). Jüngst wurden histologisch unabhängige Serummarker gefunden (Murray et al. 2011). Unter vielen neuen Biomarkern scheinen die Micro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) am vielversprechendsten zu sein. Innerhalb der Gruppe der neu gefundenen miRNAs, positioniert sich der Marker miR-371a-3p als jeweils sensitivster und spezifischster dieser Gruppe. Nach neuestem Erkenntnisstand können mit diesen Markern nicht nur Patienten auf vorliegende KZTs untersucht werden, sondern auch Ansprechraten von Chemotherapie kontrollieren sowie Aussagen zum aktuellen Stadium der Erkrankung getroffen werden (Dieckmann et al. 2017). Damit könnte die Lücke zwischen den klassischen KZT Tumormarkern, denen es an hoher Sensitivität bzw. Spezifität mangelt (Mir et al. 2016), und neuen Tumormarkern geschlossen werden.

Weiterhin wurden schon früh die Tumoren mit Hilfe von Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FiSH) oder komparative-Genom-Hybridisierung (CGH) untersucht (Suijkerbuijk et al. 1993; Zafarana et al. 2003; Wehle et al. 2008). Auch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde im wissenschaftlichen Rahmen getestet (Malek et al. 1997). Mit diesen Methoden gelingt die Bestimmung von vermehrten 12p-Kopien, dem i[12p] selber und weiteren genetischen Veränderungen.

Die Diagnose eines KZT gelingt nur mit Hilfe von histologischen und immunhistologischen Untersuchungen (Abbildung 2). Dabei nimmt zurzeit die Immunhistologie eine wichtige, wenn nicht die wichtigste Stellung in der Diagnostik ein. Durch die Entwicklungsstufen und

Vermischungen von histologischen KZT-Subtypen ergeben sich unterschiedliche Expressionsmuster der Marker in Gewebe. So werden bei Seminomen vor allem die Marker OCT3/4 in Verbindung mit SOX17, KIT, *placental alkaline phosphatase* (PLAP) und Sal-like Protein 4 (SALL4) nachgewiesen (Nonaka 2009; Camparo und Comperat 2013). Bei den nicht-seminomatösen Tumoren hingegen werden häufig OCT3/4 zusammen mit SOX2, NANOG und den die Differenzierungen entsprechenden spezifischen Marker wie AFP oder β -HCG nachgewiesen (Looijenga et al. 2003; Kehler et al. 2004; Hart et al. 2005; Nonaka 2009).

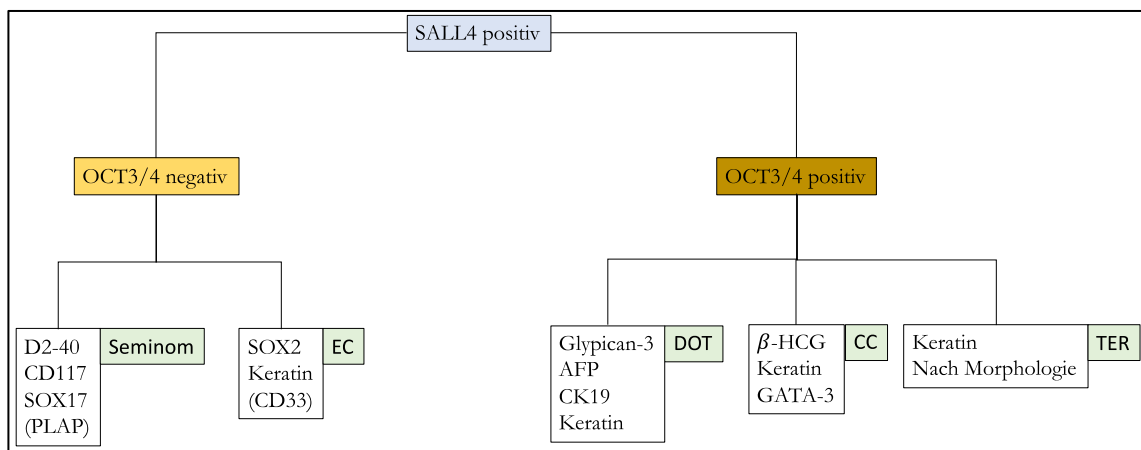


Abbildung 2: Immunhistochemie diagnostischer Algorithmus: Positiver SALL4-Marker zieht eine OCT3/4-Bestimmung nach sich; je nach positivem oder negativem Ergebnis folgt eine differentialdiagnostische Testung auf die KZT-Subtypen

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, ermöglichen die immunhistochemischen Marker und vor allem deren Kombinationen in den meisten Fällen die Diagnose eines KZT. Trotzdem gibt es immer wieder nicht eindeutige histologische sowie immunhistologische Befunde. Die große Vielfalt an histologischen Subtypen, erweitert durch die häufigen Mischformen, erschweren die Beurteilung von den immunhistochemischen Markern (Mikuz und Schweyer 2014). Fälle mit somatischer Malignität erfordern zusätzliche Aufmerksamkeit, damit der ursprüngliche KZT nicht übersehen wird. Metastasen von regressiven Seminomen und klinisch nicht apparente KZTs komplettieren das weite Feld der möglichen histologischen Präsentationen von Typ II KZTs. An dieser Stelle braucht es zusätzliche und verlässliche molekulargenetische Methoden, die die konventionellen diagnostischen Methoden unterstützen.

1.6 Therapie von KZTs

Im Vergleich zu anderen Malignomen nimmt der KZT Typ II eine onkologische Ausnahmestellung ein. KZTs des Typ II weisen eine exzellente Überlebensprognose auf.

Aufgrund der hohen Sensitivität der Tumoren gegenüber Bestrahlung und Cisplatin-basierter Chemotherapie in Verbindung mit chirurgischen Eingriffen, können bis zu 95 % der Patienten von ihrer Krankheit geheilt werden. Selbst im metastasierten Stadium können bis zu 80 % der Patienten erfolgreich behandelt werden (IGCCCG 1997; Hanna und Einhorn 2014). Die hervorragenden Behandlungserfolge haben dazu geführt, dass anhand der KZT versucht wurde, die Gründe für die hohe Empfänglichkeit gegenüber Chemotherapie sowie die gute Ansprechrate auf Bestrahlung zu verstehen (Sheikine et al. 2012).

Bei KZTs werden Aneuploidie und unterschiedliche Methylierungsmuster der DNA beobachtet. Seminome haben hypertriploide und hypomethylierte Genomsätze, während Nicht-Seminome meist hypotriploid und hypermethyliert sind. Seminome und Nicht-Seminome sprechen sehr gut auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie an. Seminome zeigen weiterhin eine hohe Strahlensensitivität. Teratome sind meist resistent gegen eine Cisplatin-basierte Chemotherapie (Comiter et al. 1998). Die hohe Ansprechrate auf Cisplatin-basierte Chemotherapie fußt wahrscheinlich auf der niedrigen Mutationsrate des Tumorsuppressorgens *TP53* in KZT. Dadurch werden Schäden der DNA in KZT nicht repariert, sondern die Zelle geht in die Apoptose (Peng et al. 1993; Taylor-Weiner et al. 2016).

Trotz der hohen Ansprechrate auf eine Chemotherapie stellen sich in Folge einer Cisplatin-Resistenz, bei fünf Prozent der Patienten Misserfolge in der Behandlung ein. Bei metastasierten Befunden liegt der Prozentsatz sogar bei zehn bis 20 Prozent. Der Mechanismus der Resistenzbildung kann durch Therapie induziert werden oder entsteht *de novo* (Raghavan 2003; Kelland 2007). Es gibt viele Erklärungsansätze für die Resistenzbildung. Der genaue Prozess konnte bis jetzt noch nicht erleuchtet werden (Honecker et al. 2009; Taylor-Weiner et al. 2016).

Aufgrund der guten Heilungschancen der KZT mangelt es aber diesen Fällen im Moment noch an weiteren Behandlungsalternativen wie z. B. zielgerichteter Therapie oder Immuntherapie (Oechsle et al. 2011).

1.7 Ziele der Arbeit

KZTs sind die häufigsten malignen Tumoren bei jungen Männern mit weltweit steigenden Inzidenzzahlen. Obgleich die Prognose auch bei metastasierten Fällen sehr gut ist, hängt diese vor allem von einer frühen Diagnose ab, da im frühen Stadium die Heilungschancen hoch sind (Sheikine et al. 2012; Hanna und Einhorn 2014).

Ein Großteil der Fälle lässt sich mittels histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen diagnostizieren. Nichtsdestotrotz ist bei einigen Fällen die Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung nicht präzise möglich. Hier sind objektive ergänzende molekulargenetische Methoden nötig, die die etablierte Diagnostik unterstützen. Dieser Umstand bildet den Anlass für die folgenden Ziele der Arbeit:

- (1) Zusammenstellen eines Fallkollektivs
- (2) Etablierung einer quantitativen *Real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Überprüfung auf das Vorliegen eines i[12p]
- (3) Untersuchung der i[12p]-negativen Fälle
- (4) Anwendung der etablierten Methode bei histopathologischer Fragestellung eines Keimzelltumorursprungs

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Aqua	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ethanol	Chemie Vertrieb Hannover, Hannover
Isopropanol	Chemie Vertrieb Hannover, Hannover

2.2 Biochemikalien und Enzyme

Tabelle 2: Biochemikalien

Biochemikalie	Hersteller
Cell Lysis Solution	QIAGEN GmbH, Hilden
Lysis Solution BC	Analytik Jena AG, Jena
MAG Suspension F	Analytik Jena AG, Jena
Proteinase K	Analytik Jena AG, Jena
Protein Precipitation Solution	QIAGEN GmbH, Hilden
Solution QPS	Analytik Jena AG, Jena
QuantiNova SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Rnase Solution A	QIAGEN GmbH, Hilden

2.3 Gebrauchswaren

Tabelle 3: Gebrauchswaren

Gebrauchswaren	Hersteller
Anheftungsrolle, schwarz	4titude, Großbritannien
Anheftungsapplikator, blau	4titude, Großbritannien
FrameStar® 384 <i>Well Skirted PCR</i> Platte, schwarz	4titude, Großbritannien
innuPREP FFPE DNA Kit-IPC16	Analytik Jena AG, Jena
Klarsichtfolie, durchsichtig	4titude, Großbritannien
Objektträger	Süsse Labortechnik GmbH+Co.KG, Gudensberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Puregene® Core Kit A	QIAGEN GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht

2.4 Geräte

Nur Geräte aus der Humangenetik und der Pathologie der Universitätsmedizin in Göttingen, die für spezielle Anwendungen gebraucht wurden, sind aufgeführt.

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Hersteller
InnuPure C16	Analytik Jena AG, Jena
QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System, 384 <i>well</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH, Neuendorf
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Neuendorf

2.5 Sterilisationsverfahren

Die Gebrauchswaren wurden bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert. Weitere Materialien im Prä-PCR-Bereich wurden durch UV-Strahlung behandelt.

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Gewebeproben

Das Fallkollektiv bestand aus in Formalin fixierten und Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben. Die Proben stammen aus dem Patientenarchiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

2.6.2 Eukaryotische Zelllinien

In Tabelle 5 sind die untersuchten Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 5: Zelllinien die in der Arbeit auf ein Vorliegen des i[12p]s untersucht wurden

Zelllinien	Informationen zu den Zelllinien
TCAM-2	Humane Seminomtumorzellen, freundlicherweise bereitgestellt von H. Schorle, Institut für Entwicklungspathologie medizinische Universität Bonn, Deutschland.
2102Ep	Humane gonadale EC Tumorzellen, freundlicherweise bereitgestellt von Christoph Oing Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, Deutschland.
2102Ep R	Cisplatinresistente Sublinie aus 2102Ep, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Christoph Oing Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, Deutschland.

2.6.3 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Zur Herstellung von qPCR-Produkten bzw. Analysen wurden synthetische Oligonukleotide (Primer) der Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe) verwendet. Die Sequenzabfolge ist immer in Richtung 5'- zum 3'-Ende aufgeschrieben.

Tabelle 6: Primernamen und Primersequenzen

Primernamen	Sequenz 5'-3'
244_12p13.32_AF 244_12p13.32_AR	GGCCTTCTTGCAACATGAGAGTAAG CAGACTGCACAAAAGGATGGCC
244_12p13.32_BF 244_12p13.32_BR	GCTCTGTTCGGCCTCCATGTCAG GTCCTCTGTGTGCTCCTCGGC
244_12p13.32_CF 244_12p13.32_CR	CATGCACTTCCCGCCCTTTTCC ACTGACAGCTATCTCGCAGACCAAC
539-12p-A_F 539-12p-A_R	CACAGTGCAAGGCTGGGGTAGTAAG GTGGCCAAGCCTCTTTATCTCCAAG
539-12p-H_F 539-12p-H_R	CTGGGATCTTGGACACTCAGGACAC TATGTGCCCTTAGACCAGGCAACTG
114-12q-D-F 114-12q-D-R	CCTATATCCCCTCTGCCACCAACAC ACCTCTGCCATGAGAGGCAGTCTTT
319-12q-A-F 319-12q-A-R	AGGAAACCTTTGAGAGGCACAGTCG CCGGGCAATCGCAATAGAGTGTAG
52B-3p-2_F 52B-3p-2_R	CACAGAGTAAAGGCCCGTGACTTT ACAGAAGGGCCAGAAAGAACCGAAC
17qF 17qR	TGGGCAGCCCTCATTTATCTGGGGCA ATCCACCCGCCATTGGCATCGAAGC
Britta-12p-F Britta-12p-R	GTGGCTCCTCTCCTTTCACACCG TTGTGTACCCTGGAGCCATCGC
Felix-12p-F Felix-12p-R	TGTTTGGGTCACAGGGGATGCC TCCTGTGCCAAGTTCCCAACCC
Königin-12p-F Königin-12p-R	GAGGTTGGGTCAGACGGTGGTG AATGTGCTCCCTCTTTCCCACCCC
Olga-12p-F Olga-12p-R	TGCAGTCACTCTACGCAACGCC CCAGCACATCCTCCTCCACGTG
Silke-12p-F Silke-12p-R	AGGCCCAATACTCACTGGTCCAC CGGAGGAAAAGAGCAACCCCAAG

2.7 Datenbanken

Zum Erstellen der Primer wurde die Plattform Primer3web Version 4.1.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) verwendet (Untergasser et al. 2012).

2.8 Ethikantrag

Die Nutzung der Gewebeproben der Patienten und der Zelllinien wurde durch den Ethikantrag (18/2/16) genehmigt.

2.9 Isolation und Aufreinigung der Nukleinsäuren

2.9.1 Isolation der Nukleinsäuren aus dem FFPE-Gewebe und anschließende Konzentrationsbestimmung

Die Extraktion der DNA aus dem FFPE-Gewebe erfolgte mit dem innuPREP FFPE DNA-Kit-IPC16 (Analytik Jena AG, Jena). Die Extraktion folgte der Anweisung des Herstellers. Statt 5 µm Gewebsschnitte wurden jeweils 10 µm starke Schnitte verwendet. Je nach Ausgangsgröße des Tumorareals wurden mehrere Schnitte zur Extraktion benutzt, um ausreichend genetisches Material zu isolieren. Die Tumorareale wurden in der Vorbereitung der DNA-Extraktion auf einem korrespondierenden histologischen Schnitt der Probe in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Felix Bremmer markiert.

Die Konzentrationsmessung wurde mit Hilfe des NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific GmbH, Neuendorf) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Absorptionsmaxima wurden bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Die Reinheit der isolierten DNA wurde mittels der Koeffizienten 260/280 nm und 260/230 nm angegeben. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch eine modifizierte Lambert'sche Gleichung.

Modifizierte Lambert'sche Gleichung:

$$c = (A \cdot \epsilon) / b$$

Tabelle 7: Legende Lambert'sche Gleichung

Variabel	Definition
c	Nukleinsäurenkonzentration in ng/ μ l
A	Absorption in AU
ϵ	Wellenlängen abhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/ μ l (Doppelsträngige DNA $\epsilon=50$ ng-cm/ μ l)
b	Wegstrecke in cm

2.9.2 Isolation der Nukleinsäuren der Zelllinien und anschließende Konzentrationsbestimmung

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus den Zelllinien erfolgte mit Hilfe des Puregene® Core Kit A (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Isolation erfolgte an Hand des Protokolls des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung wurde, wie im Kapitel 2.9.1 beschrieben, durchgeführt.

2.10 Methodik der qPCR

Die PCR ist ein Verfahren, bei dem durch zyklische Abläufe eine Ziel-DNA amplifiziert werden soll (Saiki et al. 1985). Essentiell für die Reaktion sind, die für den Zielbereich definierten Primer, die hitzestabile Taq-Polymerase und die zu untersuchende Ziel-DNA. Durch hohe Temperaturen (92°C) wird die doppelsträngige DNA denaturiert (Denaturierung). So entstehen DNA-Einzelstränge, an die Primer bei niedrigen Temperaturen binden (60°C) (*annealing*). Von den Primern ausgehend synthetisiert nun die Taq-Polymerase bei 72°C den komplementären DNA-Strang (Elongation). Die zyklische Wiederholung der Abläufe produziert eine exponentielle zunehmende Menge an neu amplifizierten DNA-Fragmenten.

Die qPCR ermöglicht zu der Amplifikation eines DNA-Abschnitts, eine Quantifizierung des entstandenen Produkts in Echtzeit. Die Quantifizierung erfolgt dabei über die Messung eines optischen Signals, das durch einen fluoreszierenden Farbstoff, der an die DNA bindet, erzeugt wird. In der Arbeit wurde QuantiNova SYBR Green PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Nach jedem Zyklus wird eine Messung des fluoreszierenden Signals vorgenommen. Durch das Entstehen von DNA-Produkten steigt die Intensität des

fluoreszierenden Signals. In dem Zyklus, in dem zum Ersten Mal eine exponentielle Steigerung des Fluoreszenzsignals des entstandenen DNA-Produktes über die Hintergrundfluoreszenz hinaus gemessen wird, wird ein sogenannter Schwellenwert (*threshold*) bestimmt. Der beschriebene Zyklus und Schwellenwert werden als *cycle-threshold* (Ct)-Wert zur Berechnung der Quantifizierung genutzt.

Mit der Methodik und dem QuantStudio 5 Real-Time-PCR-System (Thermo Fisher Scientific GmbH, Neuendorf) wurden in dieser Arbeit die DNA-Proben untersucht. Für den Versuchsansatz wurde die DNA mit H₂O jeweils auf eine Konzentration von 5 µg/µl verdünnt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz

Volumen (in µl)	Reagenz
2,5	DNA (5 µg/µl)
2,5	Primer (Forward/Reverse 100 pmol/µl)
5	QuantiNova SYBR® Green

Dieser Ansatz wurde, wie in Abbildung 3 beschrieben, inkubiert.

	50°C	2min	
	95°C	15min	Aktivierung <i>Taq</i> -Polymerase
40x	94°C	15sec	Denaturierung
	60°C	30sec	<i>annealing</i>
	72°C	1min	Elongation
	95°C	15sec	
	60°C	15sec	
	60°C-95°C	4,5°C/min	Schmelzkurve

Abbildung 3: Inkubations- und Reaktionsablauf

Die Daten wurden nach Versuchsende mit Hilfe der Quantstudio™ Design and Analysis Software v1.5 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Neuendorf) analysiert und in Microsoft Excel (Version 2019) für weitere Berechnungen exportiert.

Um die KZT-Proben auf eine vermehrte Amplifikation des p-Arms des zwölften Chromosoms zu untersuchen, wurde ein Protokoll für die qPCR-Versuchsläufe definiert. In diesem Protokoll wurden insgesamt 18 Proben mit jeweils acht Primerpaaren pro

Versuchslauf in Doppelbestimmung getestet. Um das Verhältnis der chromosomalen Veränderungen abzubilden, wurden vier Primerpaare für den p-Arm und zwei Primerpaare für den q-Arm des zwölften Chromosoms definiert. Weiterhin wurden zwei Referenzprimerpaare auf dem q-Arm des Chromosoms 17 bzw. auf dem p-Arm des dritten Chromosoms für das Panel festgelegt.

Tabelle 9: Primer-Panel

Primer-Panel		
1.	244_12p_A	(F/R)
2.	244_12p_B	(F/R)
3.	539_12p_A	(F/R)
4.	539_12p_H	(F/R)
5.	319_12q_A	(F/R)
6.	114_12q_D	(F/R)
7.	03p2	(F/R)
8.	17q	(F/R)

Die erhobenen Daten wurden zur statistischen Datenverarbeitung in Microsoft Excel (Version 2019) exportiert.

2.11 Statistische Datenverarbeitung

2.11.1 i[12p]-positive Proben

Das Ziel der Verarbeitung der Daten war, dass quantitative chromosomale Verhältnis zwischen dem p-Arm und q-Arm des zwölften Chromosoms abzubilden.

Dazu wurde ein sogenannter *median of multiple* (MoM)-Wert errechnet. Mit Hilfe eines MoM-Wertes gelingt es einen gemessenen Wert mit einem Durchschnittswert in Beziehung zu setzen. Um p-Arm und q-Arm vergleichen zu können, sollte in dieser Arbeit die gemessene Quantität für jedes Primerpaar in Beziehung zu der gemessenen Quantität für die Primerpaare des q-Arms gesetzt werden. Dieser Bezugswert spiegelte den Mittelwert der gemessenen Quantität der beiden q-Arm-Primer des zwölften Chromosoms wider.

Formel MoM:

$$\text{MoM} = \text{QTY}/\text{MW}[\text{QTY } 12\text{q}]$$

Tabelle 10: Legende Formel *median of multiple*

Variabel	Definition
MoM	<i>Median of multiple</i>
QTY	Quantität des gemessenen Primers
MW[QTY 12q]	Mittelwert der Quantität der 12q-Primer

Durch die Doppelbestimmung bei jeder Probe, ergaben sich zwei MoM-Werte pro Primer. Die beiden Werte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst.

Mittelwertformel MoM:

$$\text{MoM}_{\text{MW}} = (\text{MoM}_1 + \text{MoM}_2) / 2$$

Tabelle 11: Legende Mittelwertformel der *median of multiple*

Variabel	Definition
MoM _{MW}	MoM Mittelwert des Primers
MoM ₁	MoM Primer Erstbestimmung
MoM ₂	MoM Primer Zweitbestimmung

So wurden insgesamt für alle acht Primerpaare ein MoM_{MW} erzeugt. Vier MoM_{MW} drückten für den p-Arm und zwei MoM_{MW} drückten für den q-Arm des zwölften Chromosoms das Verhältnis aus. Damit diese Werte besser interpretierbar sind, wurde jeweils für die vier p-Arm- und zwei q-Arm-Primer ein einzelner Mittelwert der MoM_{MW} gebildet. Dadurch gelang es, dass man anhand eines Wertes die chromosomalen Veränderungen einer Probe interpretieren konnte.

12p_{gesamt}MW Formel:

$$12\text{p}_{\text{gesamt}}\text{MW} = (1\text{MoM}_{\text{MW}} + 2\text{MoM}_{\text{MW}} + 3\text{MoM}_{\text{MW}} + 4\text{MoM}_{\text{MW}}) / 4$$

Tabelle 12: Legende $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ -Formel

Variabel	Definition
$12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$	Mittelwert aus allen $12p$ - MoM_{MW}
1MoM_{MW}	MoM_{MW} erster $12p$ -Primer
2MoM_{MW}	MoM_{MW} zweiter $12p$ -Primer
3MoM_{MW}	MoM_{MW} dritter $12p$ -Primer
4MoM_{MW}	MoM_{MW} vierter $12p$ -Primer

 $12q_{\text{gesamt}}\text{MW}$ Formel:

$$12q_{\text{gesamt}}\text{MW} = (1\text{MoM}_{\text{MW}} + 2\text{MoM}_{\text{MW}}) / 2$$

Tabelle 13: $12q_{\text{gesamt}}\text{MW}$

Variabel	Definition
$12q_{\text{gesamt}}\text{MW}$	Mittelwert aus allen $12q$ - MoM_{MW}
1MoM_{MW}	MoM_{MW} erster $12q$ -Primer
2MoM_{MW}	MoM_{MW} zweiter $12q$ -Primer

Anhand dieser einzelnen Werte konnte nun eine Aussage über das chromosomale Verhältnis des p-Arms zum q-Arm des zwölften Chromosoms getroffen werden. Diese wurden genutzt, um Grafiken und Ergebnisse zu bestimmen.

2.11.2 i[12p]-negative Proben und Zelllinien für das Amplikon 12p11.2-12p12.1

Um die verschiedenen molekulargenetischen Mechanismen des Zugewinns von chromosomalem Material auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms bei KZT genauer zu untersuchen, wurden DNA-Proben, die bereits mit Hilfe des Versuchsprotokolls (Kapitel 2.10) als i[12p] negativ gemessen wurden, erneut untersucht. Ziel der Untersuchung war es, ob statt des i[12p] ein Amplikon 12p11.2-12p12.1 in den Fällen oder den Zelllinien vorlag. Deswegen bleiben die verwendete Methodik und der Reaktionsansatz gleich (Kapitel 2.10). In jedem Untersuchungslauf wurden sechs Proben mit einem erweiterten Primer-Panel

untersucht. Bei diesem Panel wurden in dem Bereich des Amplikons 12p11.2-12p12.1 zusätzlich vier Primerpaare definiert. Diese sollte in Addition zu den vorherigen Versuchsläufen auch das quantitative chromosomale Verhältnis zwischen dem q-Arm und dem Amplikon 12p11.2-12p12.1 ausdrücken. Genau wie bei den vorherigen Versuchsläufen erfolgte für jedes Primerpaar eine Doppelbestimmung.

Tabelle 14: Erweitertes Primer-Panel

Erweitertes Primer-Panel		
1.	244_12p_A	(F/R)
2.	244_12p_B	(F/R)
3.	539_12p_A	(F/R)
4.	539_12p_H	(F/R)
5.	319_12q_A	(F/R)
6.	114_12q_D	(F/R)
7.	Königin-12p	(F/R)
8.	Felix-12p	(F/R)
9.	Silke-12p	(F/R)
10.	Britta-12p	(F/R)
11.	Olga-12p	(F/R)
12.	539_12p_C	(F/R)
13.	3p2	(F/R)
14.	17q	(F/R)

Die Primer Felix-12p, Silke-12p, Britta-12p, Olga-12p und Königin-12p wurden in dem Bereich des Amplikons 12p11.2-12p12.1 auf dem p-Arms des zwölften Chromosoms definiert. Dort sollten sie eine Überrepräsentation der genetischen Abschnitte anzeigen. Genau wie bei den Versuchsläufen zuvor, wurden wieder MoM-Werte für die Primer berechnet werden. Mit Hilfe der MoM-Werte sollte nun nicht nur das Verhältnis zwischen p-Arm und q-Arm des zwölften Chromosoms, sondern auch das Verhältnis des Amplikons 12p11.2-12p12.1 zum q-Arm abgebildet werden. Somit bleibt der Durchschnittswert, auf den Bezug genommen wird, weiter der Mittelwert der Quantität für das der Primerpaar für den q-Arm des zwölften Chromosoms (Kapitel 2.11). Für die Primer, die schon im Kapitel 2.11 verwendet wurden, änderten sich die Berechnungen nicht. Diese sind im Kapitel 2.11 beschrieben. Für die Primer des Amplikons 12p11.2-12p12.1 galt die gleiche

Herangehensweise wie im Kapitel 2.11. Zuerst wurden wieder MoM-Werte für die einzelnen Primerpaare des Amplikons 12p11.2-12p.12.1 gebildet.

Formel MoM:

$$\text{MoM} = \text{QTY} / \text{MW}[\text{QTY } 12\text{q}]$$

Tabelle 15: Legende MoM-Formel

Variabel	Definition
MoM	<i>Median of multiple</i>
QTY	Quantität des gemessenen Primers des Amplikons
MW[QTY 12q]	Mittelwert der Quantität der 12q-Primer

Die MoM-Werte der Doppelbestimmung wurden wieder zu MoM_{MW}-Werten zusammengefasst.

Mittelwertformel MoM:

$$\text{MoM}_{\text{MW}} = (\text{MoM}_1 + \text{MoM}_2) / 2$$

Tabelle 16: Legende MoM_{MW}-Formel

Variabel	Definition
MoM _{MW}	MoM-Mittelwert des Primers des Amplikons
MoM ₁	MoM-Primer-Erstbestimmung Amplikon
MoM ₂	MoM-Primer-Zweitbestimmung Amplikon

Um einen einzelnen aussagekräftigen Wert zu erhalten, wurden die MoM_{MW}-Werte der Primer des Amplikons 12p11.2-12p12.1 zu einem Amplikon_{gesamt}-MW-Wert gemittelt.

Formel Amplikon_{gesamt}MW:

$$\text{Amplikon}_{\text{gesamt}}\text{MW} = (\text{MoM}_{\text{MWFelix}} + \text{MoM}_{\text{MWSilke}} + \text{MoM}_{\text{MWBritta}} + \text{MoM}_{\text{MWOlga}} + \text{MoM}_{\text{MWKönigin}}) / 4$$

Tabelle 17: Legende Amplikon_{gesamt}MW-Formel

Variabel	Definition
Amplikon _{gesamt} MW	Mittelwert aller MoM _{MW} des Amplikons
MoM _{MWFelix}	MoM _{MW} Primer 12p-Felix
MoM _{MWSilke}	MoM _{MW} Primer 12p-Silke
MoM _{MWBritta}	MoM _{MW} Primer 12p-Britta
MoM _{MWOlga}	MoM _{MW} Primer 12p-Olga
MoM _{MWKönigin}	MoM _{MW} Primer 12p-Königin

Mit Hilfe der Berechnungen konnten nun Werte für die chromosomalen Verhältnisse zwischen dem p-Arm, dem Amplikon und dem q-Arm des zwölften Chromosoms bestimmt werden. Diese wurden genutzt, um Ergebnisse zu bestimmen und Grafiken zu erstellen.

2.12 Statistik

Die statistischen Arbeiten erfolgten in Kooperation mit der statistischen Beratung, unter der Leitung von Dr. Andreas Leha, des Instituts für medizinische Statistik der Universität Göttingen.

2.12.1 Angleichung der Primer

Um eine exakte Abbildung des chromosomalen Zugewinns der KZT-Proben zu erreichen, wurden die Amplifikationsdaten der Primer des tumorfreien Kontrollkollektivs separat aufgetragen und analysiert. Bei diesen Daten war klar, dass ein negatives Ergebnis für ein i[12p] vorliegen musste, da klinisch, histologisch und immunhistochemisch die Diagnose eines tumorfreien Gewebes, gestellt worden war. Dennoch wurde bei der Auswertung der Daten eine konsekutive Mehramplifikation bei drei von vier p-Arm-Primern beobachtet (Abbildung 4).

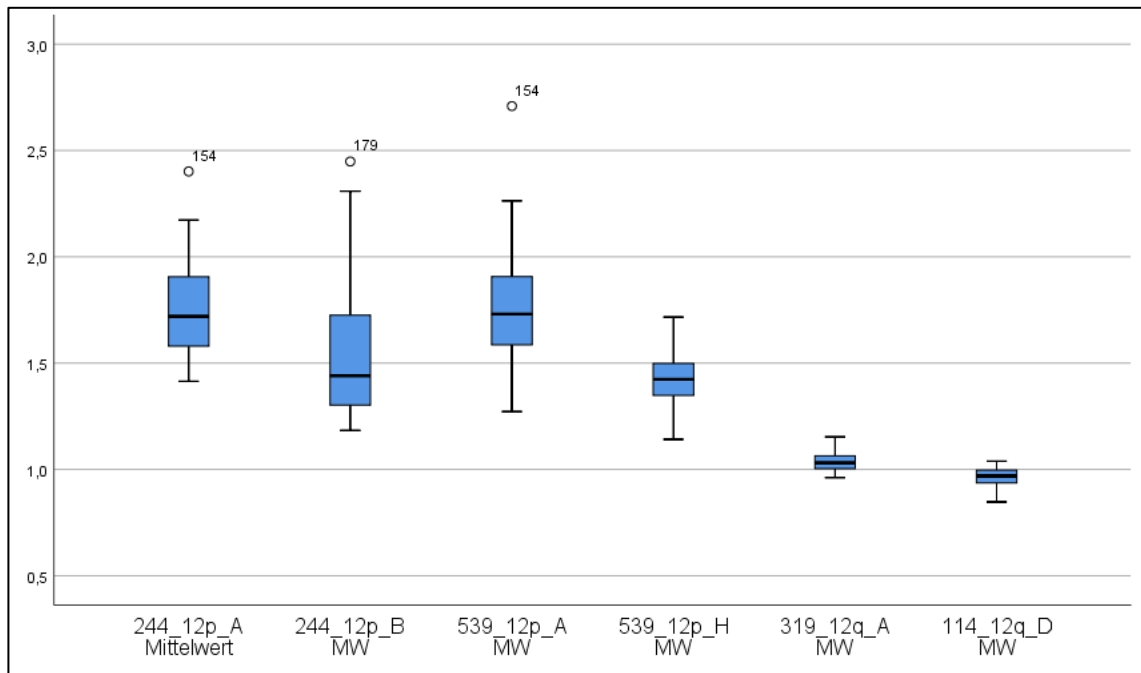


Abbildung 4: Amplifikationsverhältnis der p-Arm- und q-Arm-Primerpaare im Kontrollkollektiv als Boxplots

Da sich das Kontrollkollektiv nur aus tumorfreien Fällen zusammensetzt, konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Mehramplifikation der Primer eine Verzerrung der Ergebnisse resultiert. In der Abbildung 4 kann abgelesen werden, dass der Primer 539_12p_H der histologischen Diagnose einer tumorfreien Probe am ehesten entsprach. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Primer 539_12p_H zum Referenzprimer für die restlichen p-Arm-Primer des zwölften Chromosoms bestimmt. Durch Angleichung der p-Arm-Primer auf den Referenzprimer, konnte eine Verzerrung durch Mehramplifikation der Ergebnisse ausgeglichen werden. Hierzu wurde, unter Berücksichtigung der Messwiederholung, ein gemischtes lineares Modell für den Effekt der Primeramplifikation auf die gemessenen Verhältnisse von p-Arm- zu q-Arm-Primern des zwölften Chromosoms angepasst. Die Rechenoperationen wurden mithilfe von R (Version 3.4.0) und den Software Paketen dplyr (Version 0.8.0.1), readxl (Version 1.3.1), tidyr (Version 0.8.3), lme4 (Version 1.1.13), ggplot2 (Version 2.2.1) und grDevices (Version 3.4.0) durchgeführt. Vor allem das Paket lme4 (Version 1.1.13) war von elementarem Charakter für die Berechnung.

2.12.2 Optischer *Cut-off*

Um die Ergebnisse der qPCR-Versuchsläufe im Hinblick auf ein $i[12p]$ interpretieren zu können, musste ein *Cut-off*-Wert angegeben werden. Der *Cut-off*-Wert sollte ermöglichen, neben der Wiedergabe der chromosomalen Amplifikationsverhältnisse, ein Vorliegen eines $i[12p]$ in der Probe zu bestimmen. Die Festlegung des *Cut-off*-Wertes sollte mittels einer

visuellen statistischen Auftragung gelingen. Die visuell statistische Auftragung erfolgte durch Verteilungskurven. Verteilungskurven beschreiben eine Ausgleichskurve über eine Verteilung von Werten und Daten. Je nach Datenmenge wird der Scheitelpunkt der Ausgleichskurve über dem absoluten Maximum der Datenmenge liegen. In dieser Arbeit war die Annahme, dass sich das Kollektiv der KZT in einer Verteilungskurve der $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ -Werte mit zwei Gipfeln darstelle. Aufgrund der Vermehrung des chromosomalen Materials sollte sich ein Gipfel für die Daten der $i[12p]$ -positiven und ein weiterer Gipfel für $i[12p]$ -negative KZT bilden. Durch die Auftragung des Kontrollkollektivs in einer weiteren Verteilungskurve sollte es gelingen eine Gerade, die einen *Cut-off*-Wert beschreibt, der $i[12p]$ positive und negative Verteilungskurven voneinander trennt, durch die Verteilungskurven zu bestimmen. Diese Gerade sollte annähernd vollständig die Kurven des $i[12p]$ -negative Kontrollkollektivs und KZT-Kollektivs von der Verteilungskurve des $i[12p]$ -positiven KZT-Kollektivs abtrennen. Dadurch sollte mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass bei $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ -Werten oberhalb der Geraden ein $i[12p]$ vorliegt. Werte unterhalb der Geraden würden dementsprechend einen $i[12p]$ -negativen-Befund anzeigen. Der optisch bestimmte *Cut-off*-Wert wurde mittels des Statistikprogramm R (Version 3.4.0) und des Paketes ggplot2 (Version 2.2.1) ermittelt. Dafür wurde jeweils eine Dichtigkeitskurve (*density plot*) mit gauß'schem Kern für die erzeugten $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ der einzelnen Kollektive berechnet. Die jeweiligen Gruppen umschrieben das Kontrollkollektiv, das $i[12p]$ positive Tumorkollektiv ($12p_{\text{gesamt}}\text{MW} > 2$) und das $i[12p]$ negative Tumorkollektiv ($12p_{\text{gesamt}}\text{MW} < 2$). Durch diese drei Dichtigkeitskurven wurde dann annähernd eine Gerade beschrieben, die die Kurve des $i[12p]$ positiven Tumorkollektivs von den Kurven der $i[12p]$ negativen Kontrollkollektivs und KZT-Kollektivs passend abtrennte (Abbildung 7). Die x-Koordinate der Geraden im Diagramm stellte den *Cut-off*-Wert dar.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektive

In dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv mit KZT auf das Vorliegen eines i[12p] mittels qPCR untersucht.

Insgesamt wurden 193 Fälle und weitere drei Zelllinien analysiert. Diese Fälle wurden in vier Kollektive untergliedert. Den Hauptteil der Untersuchungen bildeten ein KZT-Kollektiv und ein tumorfreies Kontrollkollektiv. Darüber hinaus wurde die Methodik exemplarisch an Zelllinien sowie einem Kollektiv aus Fällen mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung angewandt.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Patientenkollektive

Kollektiv	Fallanzahl	Patientenanzahl
Insgesamt	193	193
Tumorkollektiv	148	148
Kontrollkollektiv	36	36
Besondere Fälle	9	9
Zelllinien	3	-

Die Verteilung der Diagnosen im Tumorkollektiv lässt sich in Tabelle 19 einsehen. Aus der absoluten Verteilung der Falldiagnosen errechnet sich eine relative Verteilung von $\approx 72\%$ Seminomen, $\approx 11\%$ Nicht-Seminomen und $\approx 17\%$ Tumoren mit seminomatösen und nicht-seminomatösen Anteilen. Im Durchschnitt erkrankten die Patienten mit der Diagnose Seminom ungefähr neun Jahre später als die Patienten mit der Diagnose Nicht-Seminom. Bei gemischten Tumoren lag das durchschnittliche Erkrankungsalter in der Nähe des Alters der Fälle mit Seminomen.

Tabelle 19: Histologische Subtypen des Tumorkollektivs

Diagnose	Fallanzahl	durchschnittliches Erkrankungsalter in Jahren	Histologische Einteilung
Seminom (SE)	106	40,11	SE
Nicht-Seminom (NSE)	26	31,16	7 EC 3 TE 16 gemischt
SE/NSE gemischt	16	38,01	

Die Nicht-Seminom-Fälle verteilten sich auf lediglich drei Entitäten (Tabelle 19). In Tabelle 19 wurden die jeweiligen durchschnittlichen Erkrankungsalter der nicht-seminomatösen Tumorentitäten nicht aufgeführt. Es sei aber erwähnt, dass Patienten mit gemischten Nicht-Seminomen durchschnittlich im Alter von 32,63 Jahren und Patienten mit Embryonalen Karzinom durchschnittlich im Alter von 26,86 Jahren erkrankten.

Das Kontrollkollektiv setzte sich aus Fällen zusammen, bei denen kein histologischer und immunhistochemischer Verdacht auf ein KZT bestand. Die Fälle beinhalteten Patienten mit Hodentorsion und diagnostischer Hodenentfernung. Auch Patienten aus dem Tumorkollektiv, die einer kontralateralen Hodenentfernung unterzogen wurden, sind im Kontrollkollektiv eingeschlossen. Des Weiteren wurden Proben von Patienten aus dem Tumorkollektiv untersucht, die aus tumorfreien Arealen außerhalb der invasiven Tumoren bestanden. Bei allen Fällen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Felix Bremmer eine Malignität ausgeschlossen.

3.2 Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen

3.2.1 Primer

Für das qPCR-Versuchsprotokoll der Proben wurden insgesamt 14 Primerpaare etabliert und definiert. Von 14 Primerpaare lagen zwölf auf dem zwölften Chromosom, während zwei weitere Primerpaare als Referenzen auf dem dritten bzw. auf dem siebzehnten Chromosom lagen (Abbildung 5).

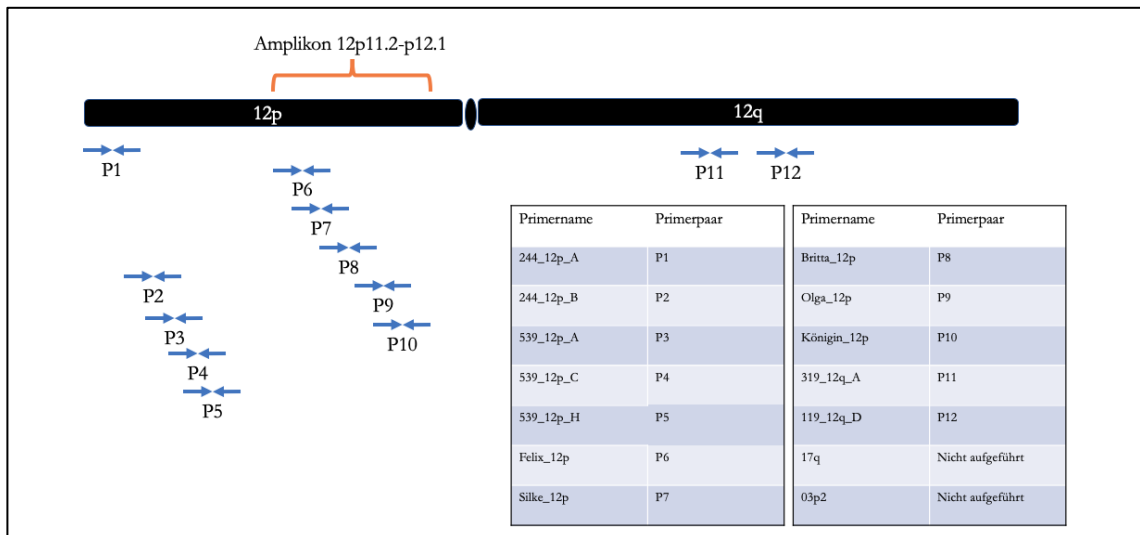


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primerpaare auf dem Chromosom 12

Die gemessenen Werte der Versuchsläufe wurden wie beschrieben verrechnet (Kapitel 2.11.1). Das Ziel der Berechnungen war, das Verhältnis der quantitativen Amplifikation des genetischen Materials von Primern des p-Arms zu Primern des q-Arms des zwölften Chromosoms auszudrücken. Dieses Verhältnis sollte eine Aussage darüber erlauben, ob eine Vermehrung des genetischen Materials auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms vorlag. Da bei KZT im Übergang zur Invasivität pathognomonisch ein chromosomaler Zugewinn auf dem p-Arm zu beobachten ist, wurde erwartet, dass sich das Mengenverhältnis des chromosomalen Materials des p-Arms zum q-Arms in Richtung der p-Arm-Primerpaare verschiebt. Aufgrund der Häufigkeit des genetischen Zuwachses in Form eines $i[12p]$ lag die Vermutung nahe, dass in den meisten gemessenen Fällen mindestens eine Verdopplung des Mengenverhältnisses zugunsten des p-Arms des zwölften Chromosoms vorliegen sollte.

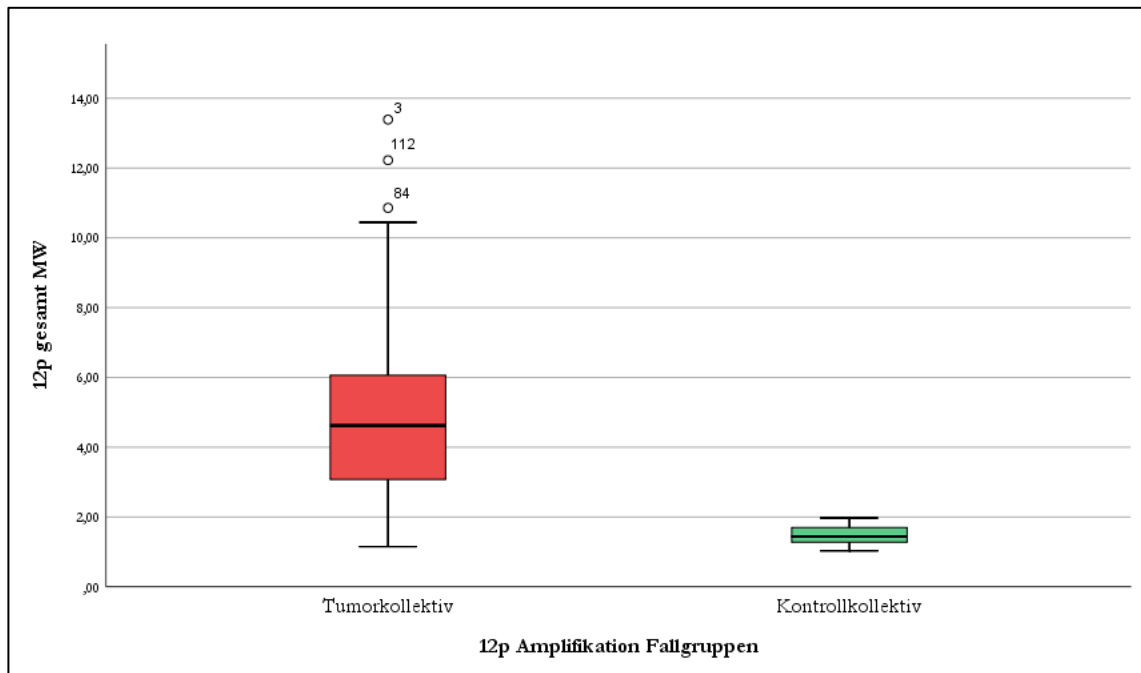


Abbildung 6: Vergleich 12p/12q-Arm-Amplifikation der Patientenkollektive

In der Abbildung 6 sind die relativen Mengenverhältnisse von p- zu q-Arm zusammengefasst für das Tumor- und Kontrollkollektiv dargestellt. Anhand der Abbildung 6 lässt sich gut erkennen, dass sich das Mengenverhältnis von p-Arm zu q-Arm beim KZT-Kollektiv und der Kontrollgruppe deutlich unterschieden. Die Tumorfälle zeigten einen Zugewinn von genetischem Material des p-Arms um das Vier- bis Fünffache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es konnte ein klar messbarer Unterschied im Mengenverhältnis von p-Arm- zu q-Arm-Primer des zwölften Chromosoms für KZT und tumorfreien Fällen demonstriert werden.

Durch den messbaren quantitativen Unterschied des amplifizierten genetischen Materials der Primer des p-Arms des zwölften Chromosoms im Kontrollkollektiv, konnte nach der Angleichung (Kapitel 2.12.1) der p-Arm-Primerpaare ein Diagramm der $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ (Kapitel 2.11.1) erzeugt werden. Dieses sollte dazu dienen, dass quantitative chromosomale Verhältnis des Tumorkollektivs und des Kontrollkollektivs zu visualisieren. Die Auftragung sollte eine optische Bestimmung eines *Cut-off*-Wertes ermöglichen. Bei der Auftragung handelt es sich um eine Dichtigkeitsberechnung, die über den Werten eine Ausgleichsgrade zieht (Abbildung 7). Mit Hilfe, der durch die drei Kurven gelegten Gerade sollte, der gesuchte *Cut-off* annähernd bestimmt werden. Bei diesem Annäherungsversuch wurden schon vorab alle Tumorfälle mit einem $12p_{\text{gesamt}}\text{MW} < 2,0$, als Tumoren ohne i[12p] bezeichnet. Es sollte gelingen einen *Cut-off*-Wert zu bestimmen, der zugleich Kontrollfälle und KZT-Fälle ohne

i[12p] genau passend von den restlichen Tumorfällen abtrennte. Wie in Abbildung 7 erkennbar ist, ließ sich durch die Verteilung und die Dichtigkeitskurven ein optischer *Cut-off*-Wert ermitteln. Dieser war somit 0,1 höher als der zuvor angenommene Wert von 2,0. Mittels dieses optischen *Cut-off*-Wertes wurden die einzelnen Kollektive analysiert.

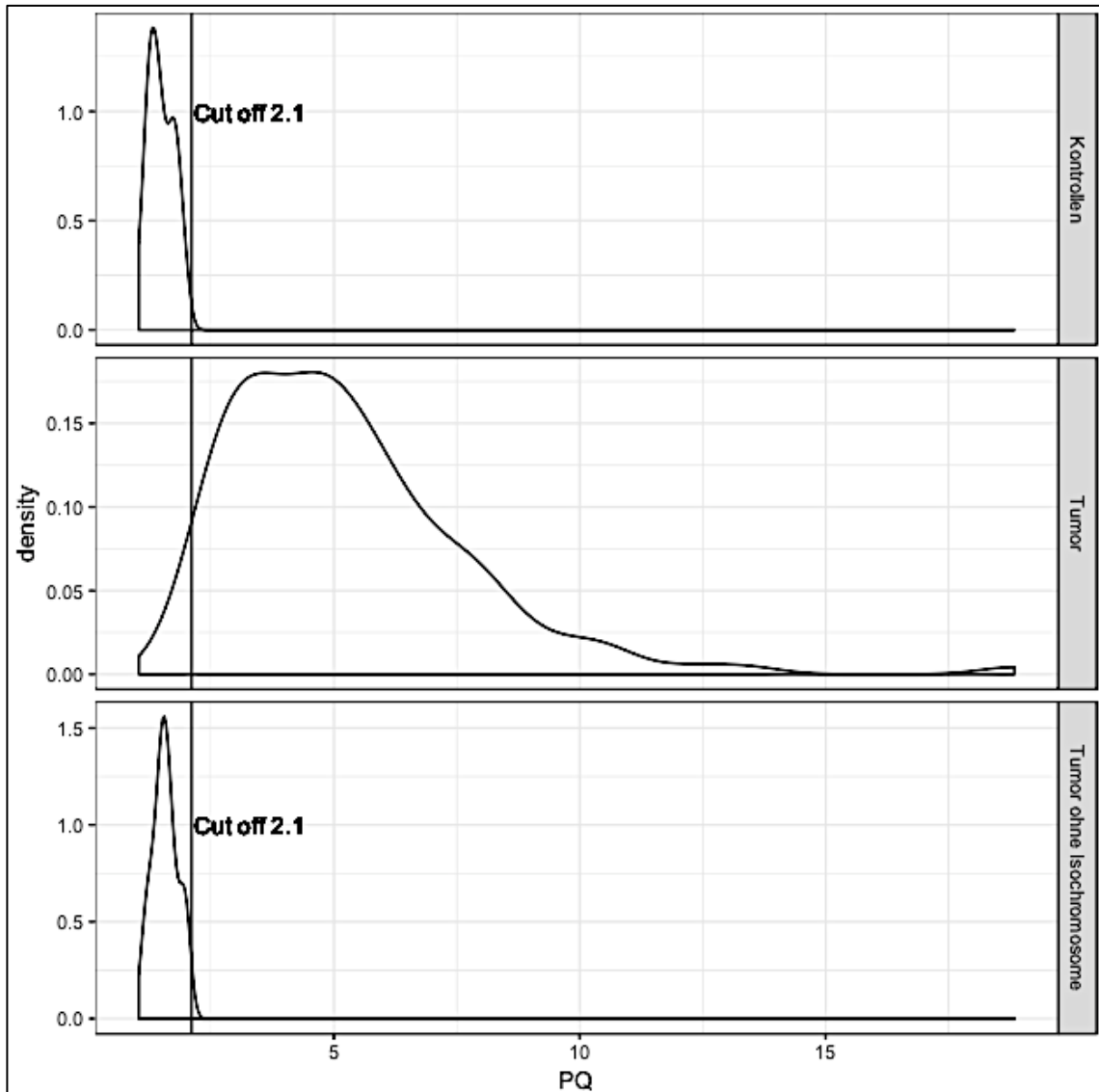


Abbildung 7: Verteilungskurve mit optischem *Cut-off*

3.2.2 Kontrollkollektiv

Von den 36 getesteten Fällen konnte bei keinem Fall eine Amplifikationsverhältnis nachgewiesen werden, dass höher als 2,1 war. Somit wurde bei keinem Kontrollfall, wie in Abbildung 8 zu sehen ist, ein Vorliegen des i[12p] bestätigt.

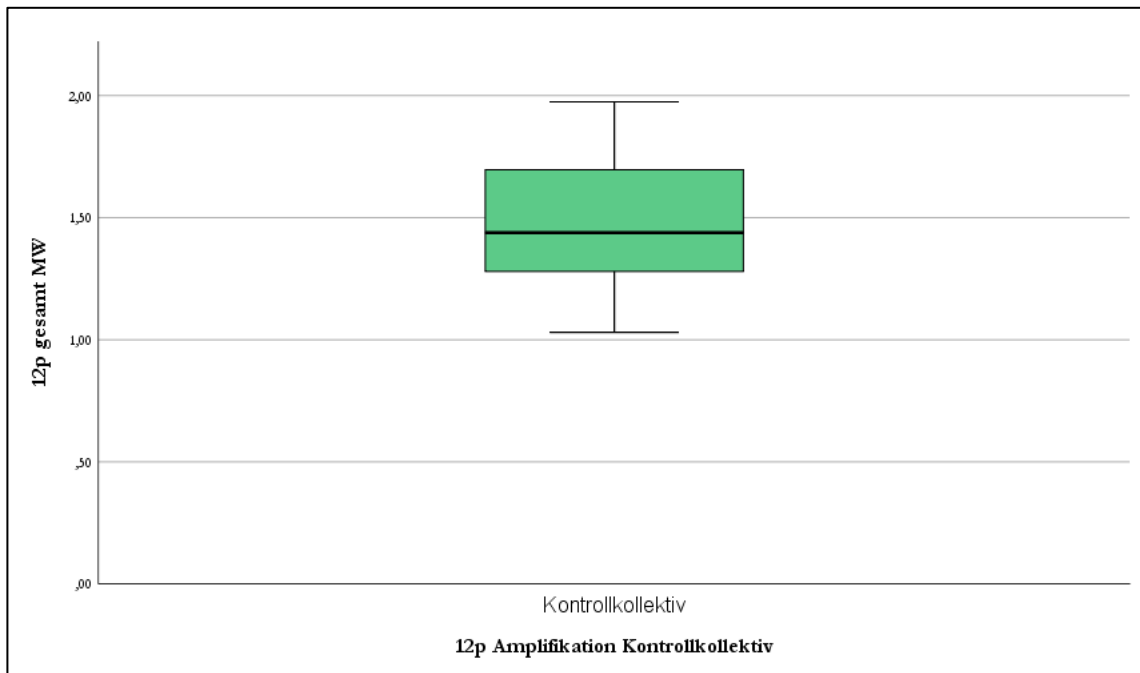


Abbildung 8: Ergebnisse der qPCR-Untersuchung im Kontrollkollektiv

3.2.3 Tumorkollektiv

Im Tumorkollektiv wurden 148 Fälle analysiert. Unter Berücksichtigung des *Cut-off*-Wertes wurden 133 Proben positiv und 15 Proben negativ für ein i[12p] getestet. So ergab sich eine relative Verteilung von $\approx 90\%$ i[12p]-positiven Fällen und $\approx 10\%$ i[12p]-negativen Fällen im Tumorkollektiv. In Abbildung 9 ist das relative Mengenverhältnis von 12q- zu 12p-Arm der i[12p]-positiven und i[12p]-negativen Fälle in einem Boxplot aufgetragen. Für die i[12p]-positiven Fälle wurden maximal die vierzehnfache Menge von 12p-DNA im Vergleich zur 12q-DNA nachgewiesen. Meist gruppierten sich die Ergebnisse um das Vier- bis Sechsfache der chromosomalen Vermehrung des p-Arms zum q-Arm des zwölften Chromosoms.

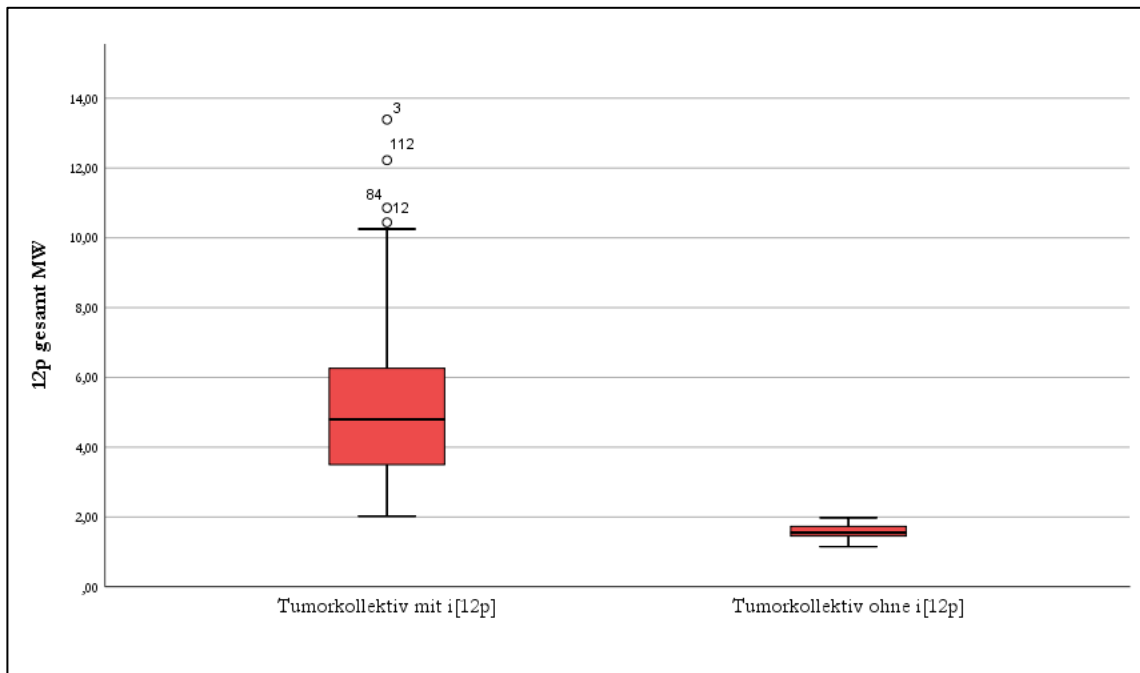


Abbildung 9: Verteilung von i[12p]-positiven (links) und -negativen (rechts) Fällen im Tumorkollektiv

Anschließend wurde analysiert wie sich die Ergebnisse der i[12p]-Analysen auf die histologischen Tumorentitäten des Tumorkollektivs verteilen. Dabei fiel auf, dass alle i[12p]-negativen Fälle als Seminom diagnostiziert worden sind (Tabelle 20).

Tabelle 20: Verteilung Ergebnisse i[12p]

Analyseergebnis	Fallanzahl	Histologische Einteilungen
i[12p]-positiv	133	91 SE 26 NSE 16 SE/NSE gemischt
i[12p]-negativ	15	15 SE

3.2.4 Zelllinien

Insgesamt wurden drei Zelllinien exemplarisch mit der gleichen Methodik wie die Patientenkollektive untersucht. Dabei zeigte eine Zelllinie eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin. Diese sind in Schaubildern und Diagrammen mit einem „R“ hinter dem Namen der Zelllinie gekennzeichnet. In dieser Arbeit wurde die resistente Zelllinie der 2102Ep untersucht. So war es möglich Vergleiche zwischen resistenten und

nichtresistenten Zelllinien vorzunehmen. Analog zu den Ergebnissen des KZT-Kollektivs wurde auch bei den Zelllinien ein Zugewinn an genetischem Material des p-Arms des zwölften Chromosoms sowie ein $i[12p]$ gemessen (Abbildung 10).

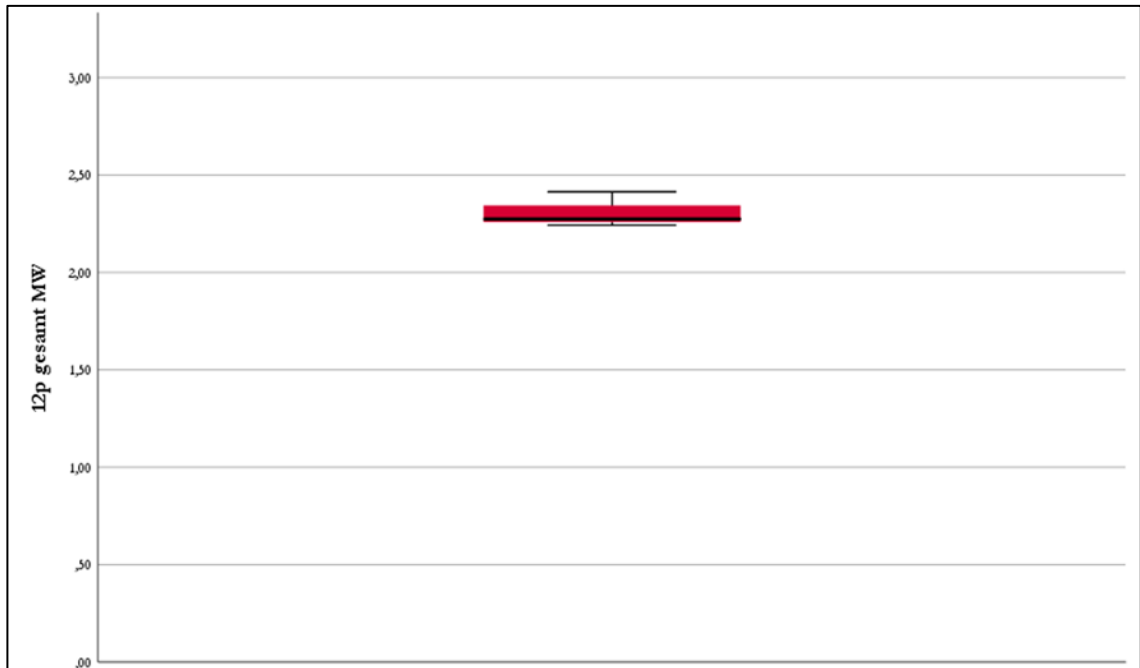


Abbildung 10: Amplifikation 12p-Zelllinien

In Abbildung 10 lässt sich auch ablesen, dass die Spannweite des Boxplots sehr gering war. Um eine genaue Beurteilung jeder einzelnen Zelllinie zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse nochmals separat in Abbildung 11 aufgetragen.

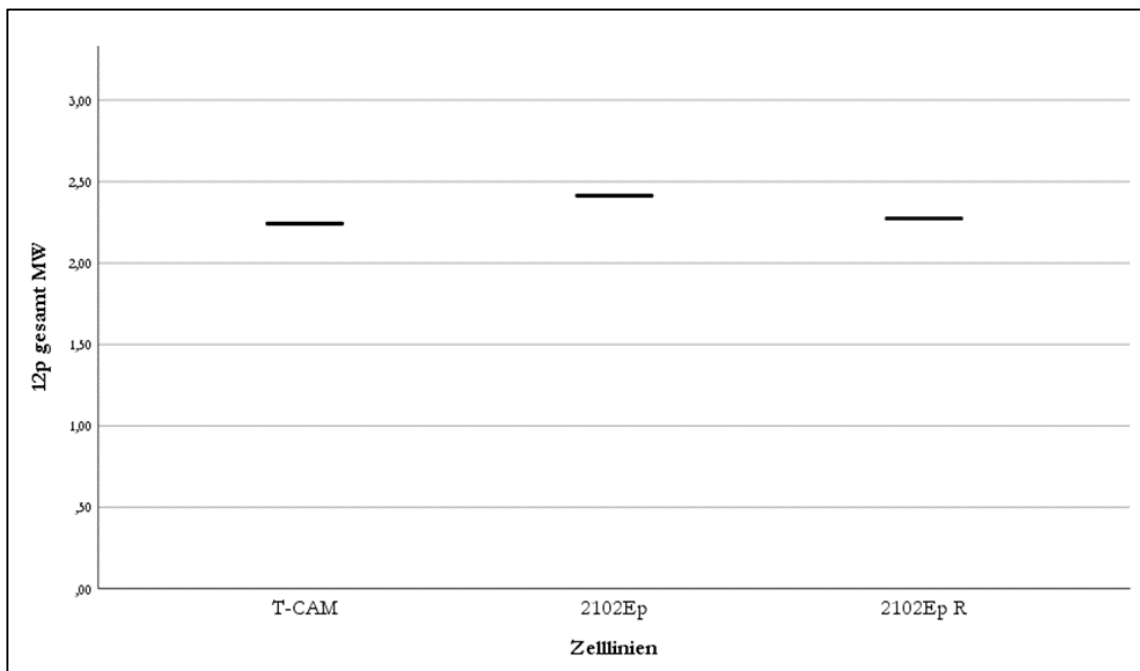


Abbildung 11: Amplifikation 12p-Zelllinien

In dieser Auftragsung fiel auf, dass neben dem Nachweis eines $i[12p]$ kaum Unterschiede im Mengenverhältnis des chromosomalen Materials des p-Arms des zwölften Chromosoms zwischen den resistenten und nicht resistenten Zelllinien zu beobachten waren.

3.2.5 Untersuchung der $i[12p]$ -negativen Fälle auf ein Amplikon 12p12.1-12p11.2

Um die verschiedenen Mechanismen des chromosomalen Zugewinns von KZT auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms abzubilden, wurden die $i[12p]$ -negativen Fälle weiterführend untersucht. Es wurden Untersuchungen auf das Vorliegen einer restriktiven amplifizierten DNA-Sequenz eines sogenannten Amplikons im Bereich 12p12.1-12p11.2 vorgenommen. Diese chromosomale Aberration wurde bei $i[12p]$ -negativen Fällen beschrieben. Zu diesem Zweck wurden die Proben mit einem erweiterten Primer-Panel untersucht (Kapitel 2.11.2). In diesem Panel waren zusätzlich sechs Primer für den gesamten Amplikonbereich definiert. Mit Hilfe dieser Primer sollte eine genetische Überrepräsentation des Amplikons im Vergleich zum restlichen p-Arm und q-Arm des zwölften Chromosoms detektiert werden (Abbildung 5). In der Abbildung 12 wird die Amplifikation des $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$ gegen die Amplifikation des $\text{Amplikon}_{\text{gesamt}}\text{MW}$ in Boxplots gegeneinander aufgetragen.

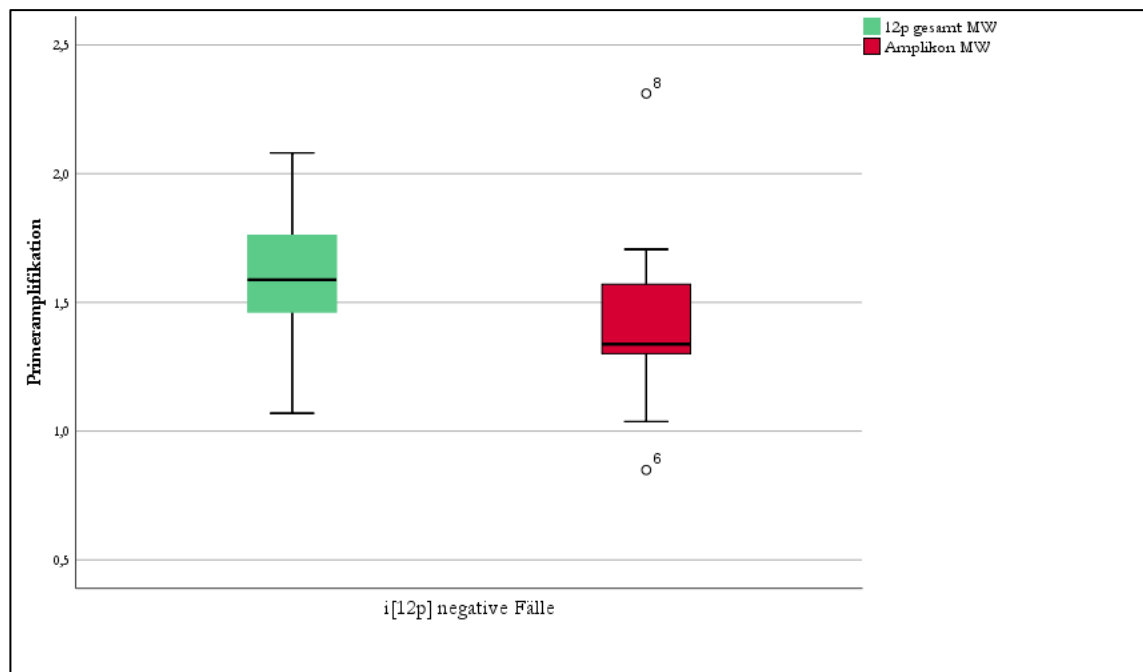


Abbildung 12: Vergleich Mengenverhältnis des genetischen Materials des Amplikons zu $12p_{\text{gesamt}}\text{MW}$

Dort ließ sich fast kein Unterschied für die Amplifikation der $i[12p]$ -negativen Fälle im Hinblick auf das erweiterte und normale Versuchsprotokoll feststellen. Die separate Auftragsung jedes einzelnen Falles zeigte, dass ein einziger Fall einen genetischen Zugewinn für das Amplikon aufwies (Abbildung 13).

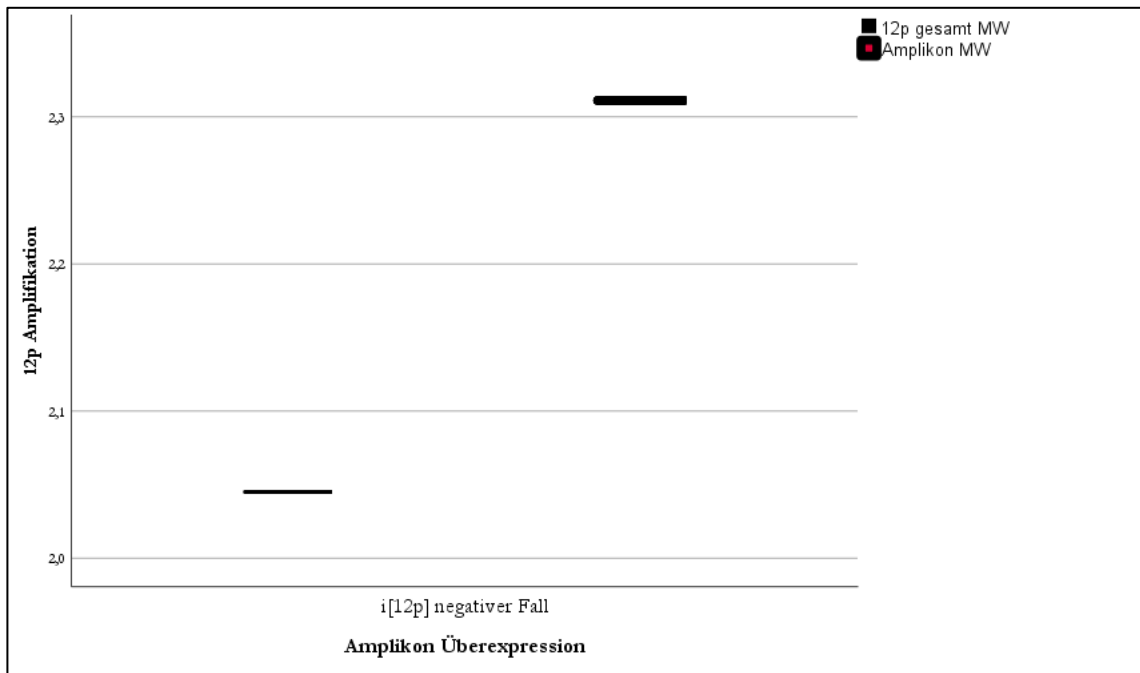


Abbildung 13: Darstellung des i[12p]-Befundes links (negativ) und Nachweis einer Überrepräsentation des Amplikons rechts (positiv) bei einem i[12p]-negativen Fall

So konnte nachgewiesen werden, dass ein i[12p]-negativer Fall statt des i[12p] eine Überrepräsentation des Amplikons 12p11.2-12.1 aufwies.

3.3 Besondere Fälle mit expliziter histopathologischer Fragestellung nach Keimzelltumorursprung

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der Kollektive wurden mit Hilfe der qPCR neun ausgewählte Fälle untersucht. Diese Fälle umfassten unklare histologische und immunhistochemische Befunde bei Tumoren, bei denen der begründete Verdacht auf einen Keimzelltumorursprung bestand. Die Ergebnisse dieser Fälle sollten separat vorgestellt werden. Dabei werden histologische und immunhistochemischen Ausschnitte der Tumoren mit den jeweiligen molekulargenetischen Ergebnissen der qPCR dargestellt.

3.3.1 Fall 1

Im ersten Fall handelt es sich um eine unklare Raumforderung im Hoden bei einem 64-jährigen Patienten. Zur routinemäßigen diagnostischen Abklärung einer Neoplasie der Hoden erfolgte eine histologische und immunhistochemische Beurteilung. In der histologischen Begutachtung der Probe ließ sich ein multinodulärer, infiltrierend wachsender Tumor erkennen (Abbildung 14 A). Die immunhistochemische Aufarbeitung zeigte eine fehlende Expression für OCT3/4 (Abbildung 14 B) und eine starke Expression von DMRT-

1 (Abbildung 14 C). Somit bestand der histologische und immunhistochemische Verdacht auf einen spermatozytären Tumor. Spermatozytäre Tumoren weisen statt einer Vermehrung des chromosomalen Materials auf dem zwölften Chromosom, eine Vermehrung von chromosomalem Material auf dem neunten Chromosom auf. Somit war die Erwartung für die molekulargenetische Untersuchung, dass die Gewebeprobe negativ für ein $i[12p]$ sein sollte. In unseren Untersuchungen gelang kein Nachweis eines $i[12p]$ (Abbildung 14 D), sodass in Zusammenschau der histologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Befunde die Diagnose eines spermatozytären Tumors gestellt werden konnte.

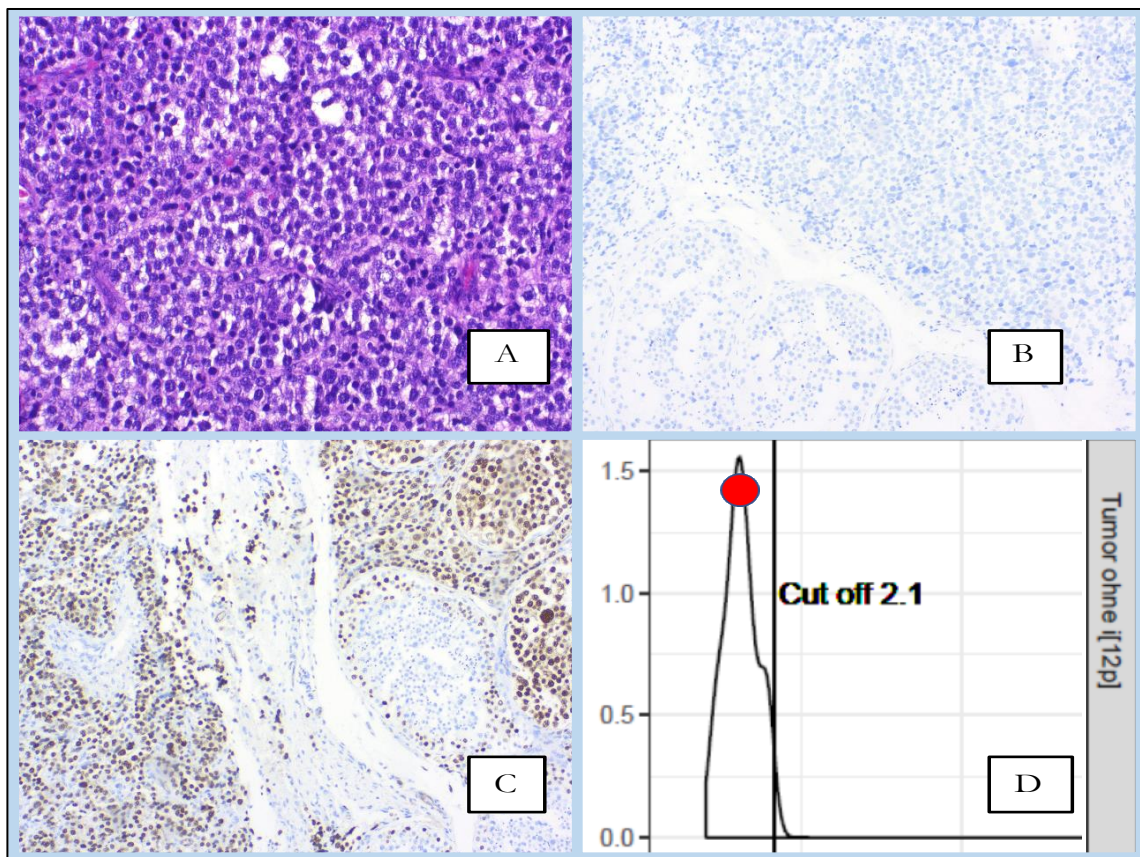


Abbildung 14: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 1): (A) HE 200-fach, (B) OCT3/4 200-fach, (C) DMRT-1 200-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines $i[12p]$ (negativ).

3.3.2 Fall 2

Der zweite Fall zeigt einen klinisch neu aufgetretenen Tumor des Mediastinums bei einem 30-jährigen Patienten. Bei dem Patienten war ein testikulärer Keimzelltumor in der Vorgeschichte bekannt. In Abbildung 15 sind die histologischen Ausschnitte dargestellt. In Abbildung 15 A zeigt sich im HE-Schnitt ein diffus infiltrierend wachsender mesenchymaler Tumor mit länglichen spindelförmigen Tumorzellen. Stellenweisen zeigt sich eine rhabdoide Morphologie. Aufgrund der Histologie bestand der Verdacht auf ein invasiv wachsendes

Rhabdomyosarkom beim Patienten. Um diesen Verdacht zu erhärten, wurde der immunhistochemische Marker Desmin für das Präparat gefärbt. Es zeigt sich eine starke Expression des Markers (Abbildung 15 B) für die Tumorzellen. Aufgrund des vorbeschriebenen KZT in der Krankengeschichte des Patienten musste differentialdiagnostisch auch die Metastase eines KZT bedacht werden. Zur differentialdiagnostischen Abklärung eines KZT wurde noch der Marker SALL4 für das Präparat angefertigt. In Abbildung 15 C zeigt sich eine sehr schwache Expression des Markers im Gewebe. So präsentierte sich der Fall mit stark positiven Färbungen für myokontraktile Filamente, im Sinne eines Rhabdomyosarkoms, bei fehlender Expression für Stammzelltranskriptionsfaktoren, im Sinne eines KZT. Durch den KZT in der Vorgeschichte des Patienten stellte sich nun die Frage, ob es sich um einen primären mediastinalen Tumor oder um eine Metastase des bekannten KZT unter Ausbildung einer somatischen Malignität handelt. Anhand der Histologie und der Immunhistochemie ist diese Frage, ohne weitere molekulargenetischen Untersuchungen nicht sicher zu beantworten.

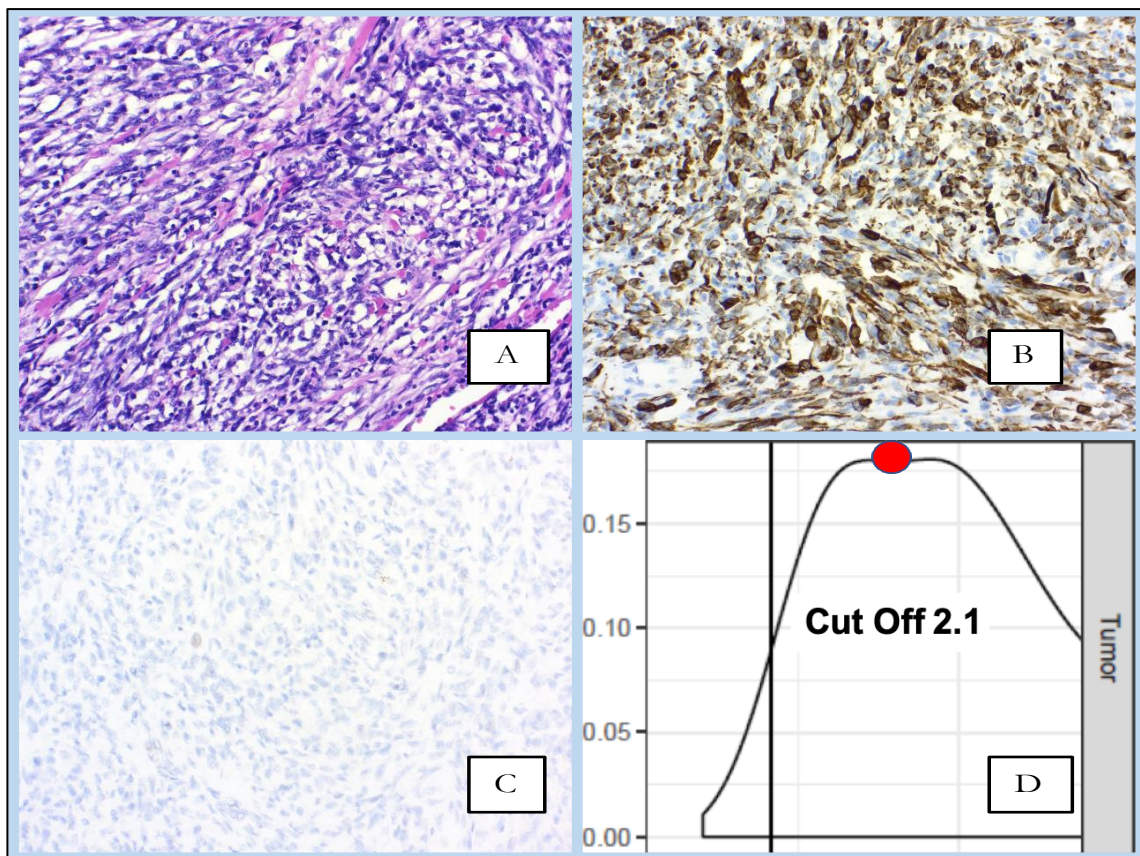


Abbildung 15: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 2): (A) HE 100-fach, (B) Desmin 200-fach, (C) SALL4 200-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (positiv).

In der durchgeführten qPCR konnte gezeigt werden, dass für den Fall eine deutliche Steigerung der Amplifikation des p-Arms und ein i[12p] vorlag. Somit stützte das molekulargenetische Ergebnis den Verdacht einer KZT-Metastase mit somatischer Malignität. Durch den Nachweis des i[12p] belegt das Ergebnis der qPCR den Keimzelltumorursprung des Tumors und ermöglicht die Diagnose eines KZT.

3.3.3 Fall 3

In diesem Fall lag eine mediastinale Raumforderung bei einem 40-jährigen Patienten vor. Im histologischen Schnitt (Abbildung 16 A) lässt sich ein drüsig differenzierter Tumor erkennen. Aufgrund der Morphologie des Tumors wurde die Verdachtsdiagnose eines Adenokarzinoms unklarer Herkunft gestellt. In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich eine mäßige Expression für den Marker SALL4 (Abbildung 16 B) bei gleichzeitiger Expression von β -HCG (Abbildung 16 C) im Tumor. Ähnlich zum vorherigen Fall ergibt sich bei der immunhistochemischen Begutachtung der Proben ein unklares Expressionsmuster der Marker. Die fehlende Expression von SALL4 legt eher keinen KZT-Ursprung nahe, während die β -HCG-Expression für den Subtyp des Chorionkarzinoms im Sinne eines Nicht-Seminoms sprechen könnte. Zur unklaren Immunhistochemie präsentiert sich der Tumor morphologisch als wenig differenziertes Adenokarzinom, weswegen mit Hilfe der Befunde in Abbildung 16 keine sichere Aussage zu einem Keimzelltumorursprung getätigt werden konnte.

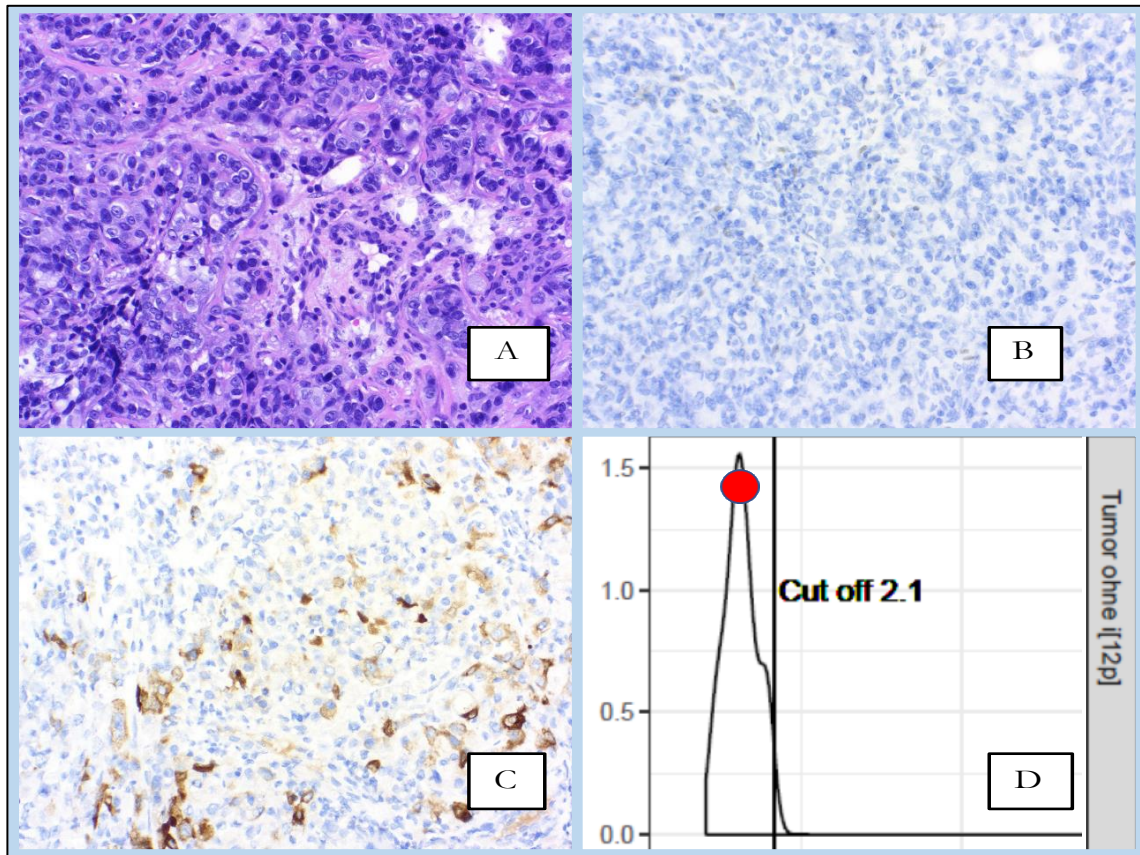


Abbildung 16: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 3): (A) HE 200-fach, (B) SALL4 200-fach, (C) β -HCG 200-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (negativ).

In der durchgeführten molekulargenetischen Diagnostik konnte kein i[12p] für die Probe nachgewiesen werden. Somit war die Diagnose eines KZT in dieser Befundkonstellation sehr unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Zur weiteren differentialdiagnostischen Abklärung wurden zusätzliche Untersuchungen vorgenommen. Abschließend wurde der Tumor als Adenokarzinom *not otherwise specified* (NOS) diagnostiziert.

3.3.4 Fall 4

Bei einem jungen 32-jährigen Mann wurde eine zervikale Lymphknotenmetastase gefunden. In der histologischen Aufarbeitung des Gewebes (Abbildung 17) zeigte sich ein drüsig differenzierter Tumor (Abbildung 17 A). Dieser war stark positiv für die immunhistochemischen Marker CEA (Abbildung 17 C), sodass die Histologie und Immunhistochemie für die Diagnose eines Adenokarzinom sprachen. Aufgrund des jungen Alters des Patienten wurde zusätzlich SALL4 (Abbildung 17 B) gefärbt. In diesem Fall war die Probe kräftig positiv für den Marker. Daraufhin wurde die Verdachtsdiagnose eines Adenokarzinoms im Rahmen einer somatischen Malignität bei einem KZT gestellt. Analog

zum zweiten Fall fehlte auch bei diesem Fall ein verlässlicher Beweis für einen Keimzelltumorsprung. Deswegen wurde die molekulargenetische Untersuchung mit Hilfe der qPCR angewandt. Dabei wurde ein Amplifikationsverhältnis oberhalb des *Cut-off*-Wertes und somit ein i[12p] nachgewiesen (Abbildung 17 D). In der Zusammenschau der einzelnen Befunde konnte somit die Diagnose einer somatischen Malignität bei einer Metastase eines KZT gestellt werden.

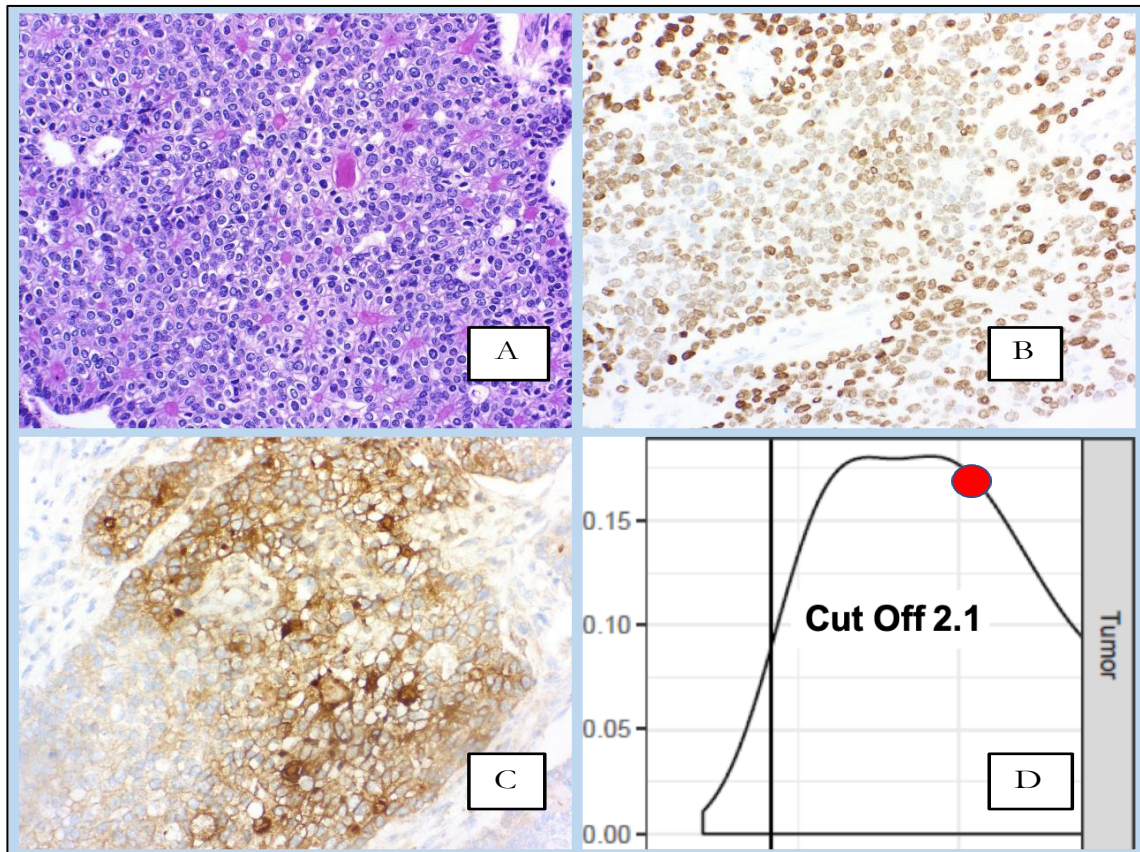


Abbildung 17: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 4): (A) HE 200-fach, (B) SALL4 200-fach, (C) CEA 200-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (positiv).

3.3.5 Fall 5

Ähnlich wie im Fall vier (Kapitel 3.3.4) handelte es sich hier um einen Tumor, der bei der histologischen Betrachtung ein drüsiges Wachstum zeigt (Abbildung 18 A). Hierbei fällt auf, dass der Tumor in den drüsigen Anteilen stark positiv für den immunohistochemischen Marker CK19 (Abbildung 18 C) ist. Gleichzeitig exprimiert der Tumor im subepithelialen Gewebe kräftig SALL4 (Abbildung 18 B). So präsentierte die Probe gleichzeitig immunohistochemische Marker im Sinne eines Adenokarzinoms und eines KZT. Klinisch bestand die Diagnose einer peritonealen Metastase eines Keimzelltumors. Da peritoneale Metastasen eines Keimzelltumors extrem selten sind sollten weiterführende Untersuchungen

die Diagnose eines Keimzelltumors bekräftigen. In der molekulargenetischen Untersuchung der Probe konnte auch hier ein Mengenverhältnis oberhalb des *Cut-off*-Wertes nachgewiesen werden (Abbildung 18 D). Der Nachweis des $i[12p]$ konnte somit den Keimzelltumorursprung beweisen, sodass die Diagnose einer Peritonealmetastase eines Dottersacktumors gestellt wurde.

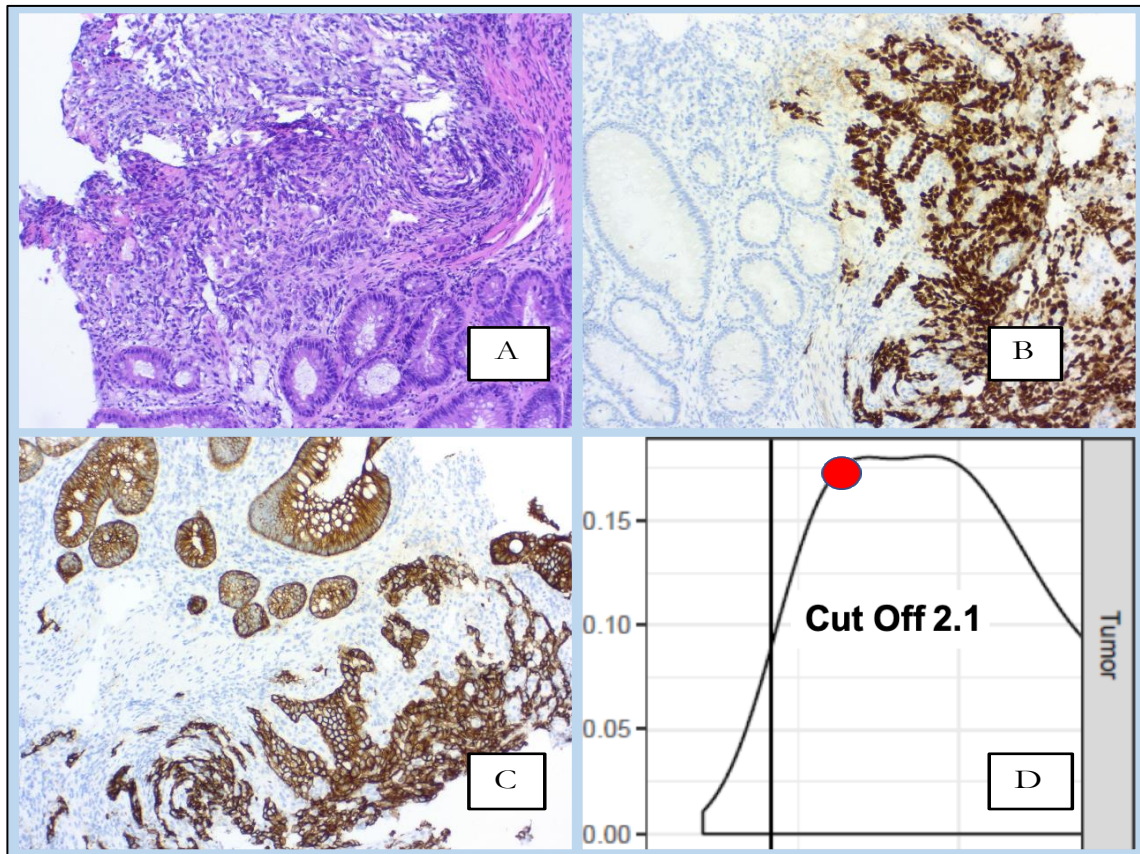


Abbildung 18: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 5): (A) HE 100-fach, (B) SALL4 100-fach, (C) CK19 100-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines $i[12p]$ (positiv).

3.3.6 Fall 6

Beim sechsten Fall handelt es sich um einen 30-jährigen Patienten mit einem großen peritonealen Tumor. Histologisch präsentiert sich der Tumor in Abbildung 19 mit ausdifferenzierten epithelialen Zellverbänden (Abbildung 19 A). Konkordant zum histologischen Erscheinungsbild war die Probe positiv für den immunhistochemischen Marker CDX-2 (Abbildung 19 B). Gleichzeitig exprimierte die Probe kein SALL4 (Abbildung 19 C). Um eine somatische Malignität eines extragonadalen KZT oder eine KZT-Metastase auszuschließen, wurde die Probe mit Hilfe der qPCR untersucht. In der Untersuchung konnte kein $i[12p]$ festgestellt werden (Abbildung 19 D). Die Zusammenschau des histologischen Wachstums, des immunhistochemischen

Expressionsmuster und des negativen i[12p]-Ergebnisses der molekulargenetischen Untersuchung schließen einen Keimzelltumorsprung nahezu aus. Aufgrund der diagnostischen Befunde wurde die Diagnose einer bronchiogenen Zyste gestellt.

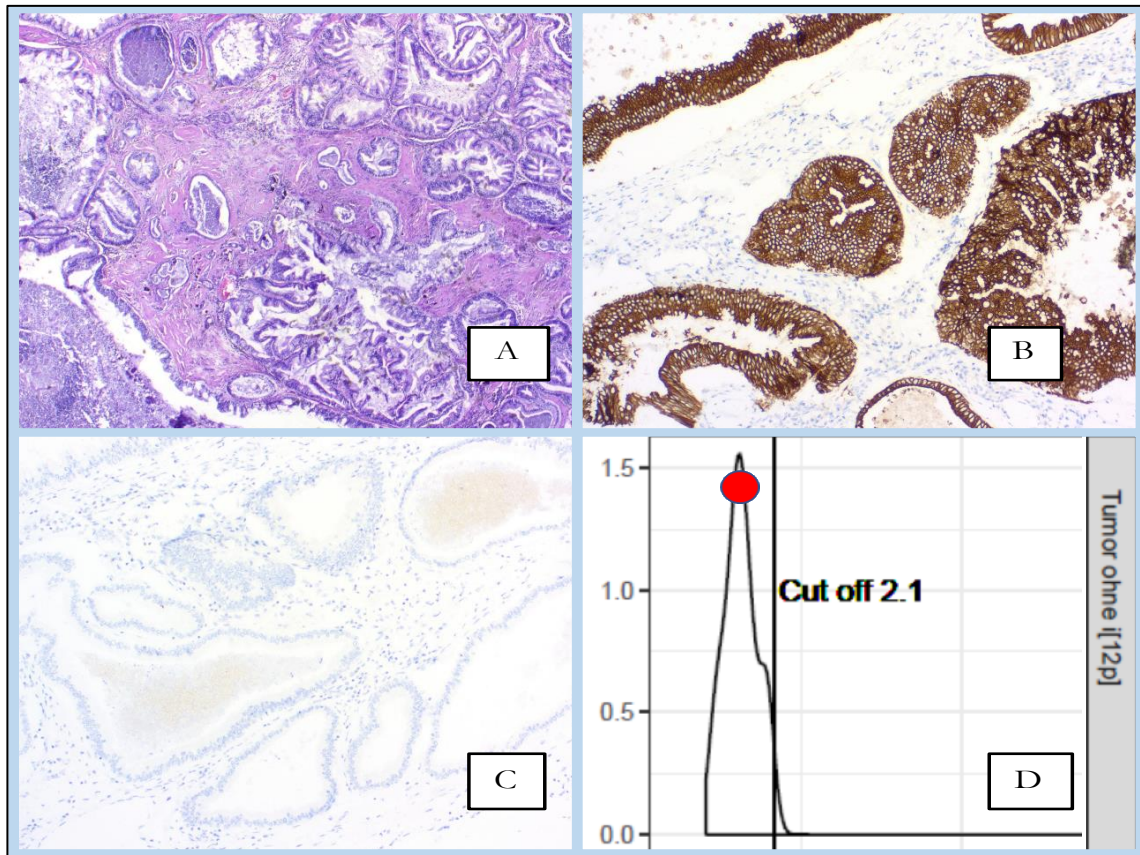


Abbildung 19: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 6): (A) HE 5-fach, (B) CDX-2 100-fach, (C) SALL4 100-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (negativ).

3.3.7 Fall 7

In diesem Fall handelt es sich um einen 50-jährigen Patienten mit einer neu aufgetretenen, unklaren Raumforderung im Retroperitoneum. In der Vorgeschichte des Patienten war ein kurativ behandeltes KZT sowie ein Dickdarmkarzinom bekannt. Die histologische Untersuchung des Tumors ist in Abbildung 20 dargestellt. Dort zeigte sich im HE-Schnitt (Abbildung 20 A) ein maligner epithelialer, drüsig gewachsener Tumor im Sinne eines Adenokarzinoms. Dieser war kräftig positiv für die immunhistochemischen Marker CDX-2 (Abbildung 20 B) und SALL4 (Abbildung 20 C). Somit exprimierte der Tumor gleichermaßen stark immunhistochemische Marker eines Adenokarzinoms der Dickdarmschleimhaut und eines KZT. In dieser Konstellation konnte die Histologie und die Immunhistochemie die Frage, ob es sich um ein Adenokarzinom des vorbeschriebenen Dickdarmkarzinoms oder um eine Metastase des vorbeschriebenen KZT handelt, nicht beantworten.

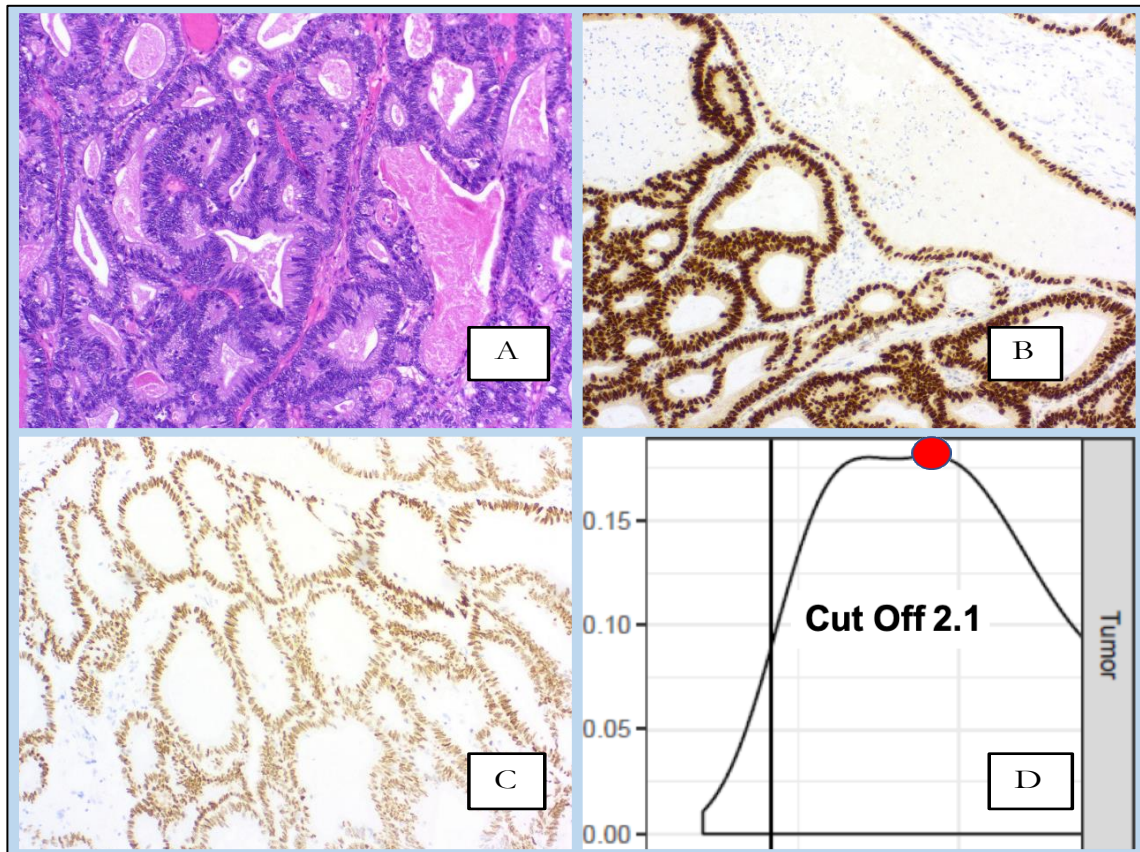


Abbildung 20: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 7): (A) HE 100-fach, (B) CDX-2 100-fach, (C) SALL4 100-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (negativ)

Unter dieser Fragestellung erfolgte die molekulargenetische Untersuchung. Dabei wurde eine deutliche Überrepräsentation des p-Arms des zwölften Chromosoms und somit ein i[12p] nachgewiesen. Das Ergebnis ermöglichte zuverlässig die Zuordnung der Gewebeprobe zu einem Keimzelltumorsprung. In diesem Zusammenhang konnte die Diagnose eines KZT im Rahmen einer Metastase mit somatischer Malignität gestellt werden.

3.3.8 Fall 8

Bei diesem Fall handelt es sich um die Probe eines 22-jährigen Patienten mit einer sogenannten Epidermoidzyste. Histologisch ist eine plattenepithelial ausgekleidete Zyste mit Nachweis von Hornlamellen (Abbildung 21 A+B) zu erkennen, ohne immunhistochemischen Nachweis einer Keimzellneoplasie *in situ* in der OCT3/4-Färbung (Abbildung 22 C). Mittels qPCR konnte auch kein i[12p] nachgewiesen werden (Abbildung 22 D). Diese Befunde stützen die Diagnose einer Epidermoidzyste und schließen einen KZT-Ursprung nahezu aus.

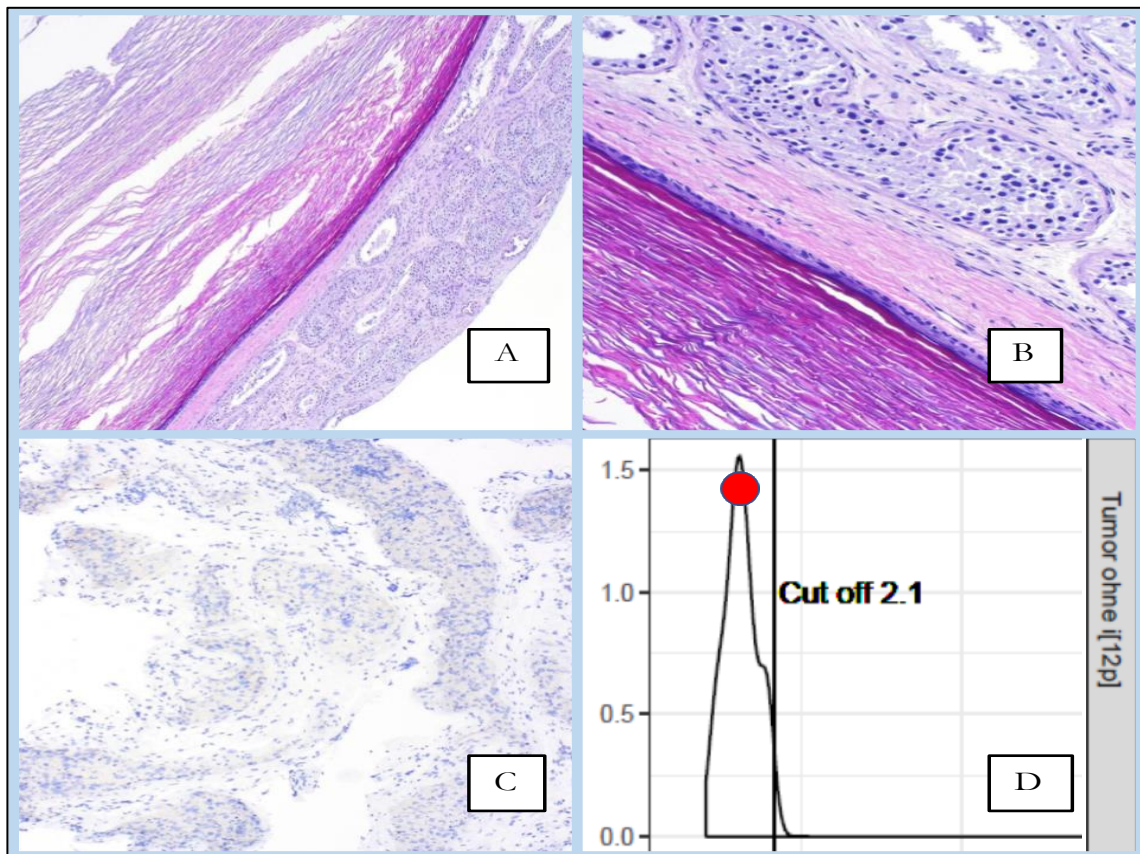


Abbildung 21: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 8): (A) HE 5-fach, (B) HE 200-fach, (C) OCT3/4 100-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (negativ)

3.3.9 Fall 9

Im letzten Fall handelte es sich um eine unklare pigmentierte Raumforderung bei einem 69-jährigen Patienten im Hoden. Im histologischen Schnittbild lässt sich ein invasiv wachsendes malignes Melanom erkennen (Abbildung 22 A). Der Tumor ist negativ für OCT3/4

(Abbildung 22 B) und kräftig positiv in der immunhistochemischen Färbung für SALL4 (Abbildung 22 C).

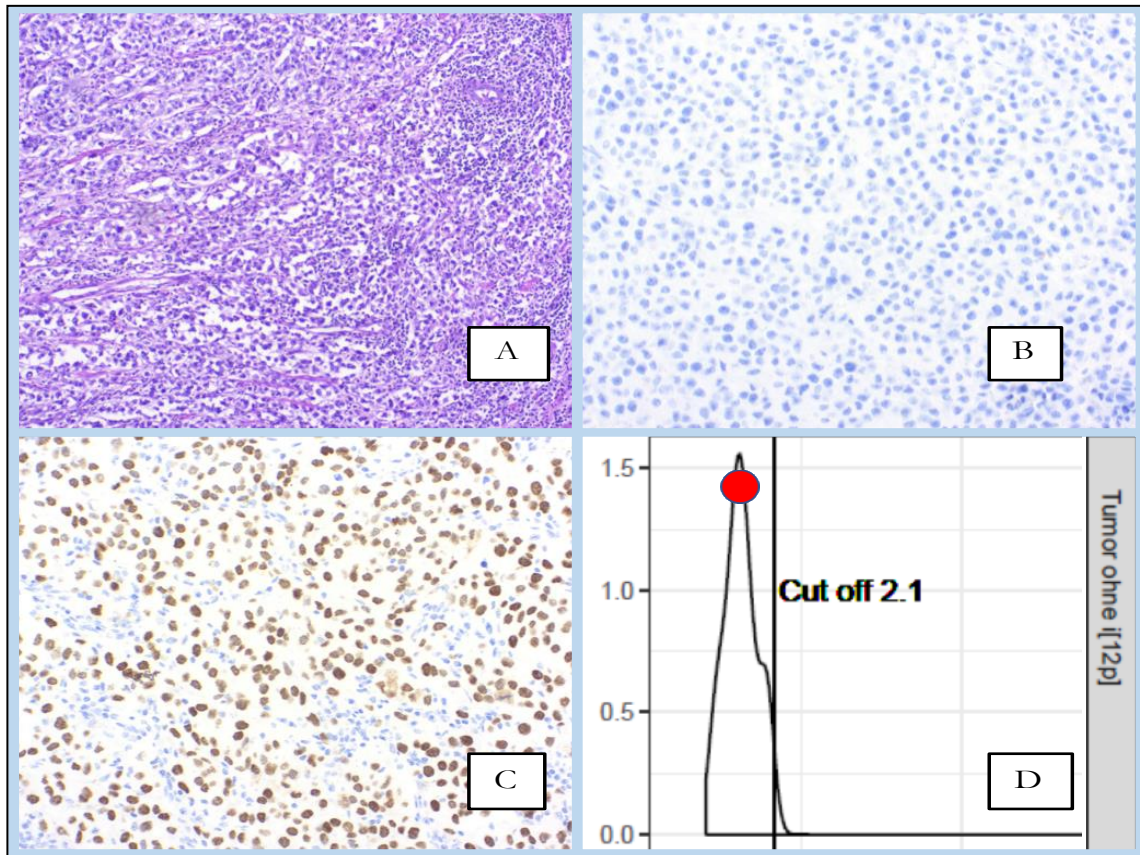


Abbildung 22: Histopathologische Darstellung des Tumors (Fall 9): (A) HE 100-fach, (B) OCT3/4 200-fach, (C) SALL4 200-fach, (D) molekularpathologisches Ergebnis zum Nachweis eines i[12p] (negativ)

Obwohl an Hand der Histologie kein Verdacht auf einen Keimzelltumor bestand, sollte gezeigt werden, dass auch für Metastasen keimzellfremder Malignome keine i[12p]-positiven Ergebnisse erzielt würden. In Abbildung 22 wurden auch die Ergebnisse der qPCR aufgetragen (Abbildung 22 D). Es bestätigte sich, dass die Melanom-Metastase für ein i[12p] deutlich negativ war.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte mittels der molekulargenetischen Methode qPCR gezeigt werden, ob ein i[12p] in KZT bzw. histologischen Geweben vorliegt. Mit diesem Nachweis sollte es gelingen, unklare Gewebeproben einem Keimzelltumorursprung zuzuordnen.

Seit der ersten Beschreibung eines i[12p] in malignen KZTs Typ II vor mehr als 35 Jahren (Atkin und Baker 1983), war das i[12p] substantieller Gegenstand der Untersuchungen an KZTs. Heute scheint es sicher, dass der chromosomale Zugewinn auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms, wie z. B. in Form eines i[12p], eine entscheidende Rolle beim Übergang von einer GCNIS in einen invasiven KZT spielt (Ottesen et al. 2003). Verantwortliche Genabschnitte, die bei allen KZTs gleichermaßen exprimiert werden, konnten bis jetzt nicht identifiziert werden (Litchfield et al. 2015). Zur Untersuchung und Identifizierung eines i[12p] in KZTs wurden verschiedene molekulargenetische Methoden angewandt und etabliert. Schon früh wurde mit Hilfe von zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen versucht, die pathognomonische chromosomale Veränderung des p-Arms des zwölften Chromosoms in KZTs Typ II aufzuschlüsseln. In Form der FiSH (Suijkerbuijk et al. 1993), der CGH (Mostert et al. 2000) und der PCR (Malek et al. 1997) wurden verschiedene Methoden zu wissenschaftlichen und diagnostischen Zwecken erprobt. Dabei scheint die qPCR bis jetzt noch keinen diagnostischen Wert in der molekulargenetischen Untersuchung eines i[12p] in KZTs zu haben. So wurde die qPCR bisher lediglich zur Untersuchung von Genexpressionsmustern genutzt (Hart et al. 2005; Kim et al. 2013).

Bei einer Untersuchung mit der klassischen, nicht quantitativen PCR konnte hingegen bereits an einem kleinem Kollektiv gezeigt werden, dass es möglich ist eine Amplifikation für den p-Arm des zwölften Chromosoms festzustellen (Malek et al. 1997). Daraufhin erfolgten jedoch keine weiterführenden Untersuchungen mit Hilfe dieser Methodik. Bis heute hat sich vor allem die FiSH als diagnostische molekulargenetische Untersuchung der chromosomalen Aberrationen der KZT durchgesetzt (Bosl et al. 1994; Shen et al. 2016; Idrees et al. 2019).

KZTs werden im Wesentlichen mit Hilfe der Histologie und der Immunhistochemie identifiziert und diagnostiziert. Dennoch finden sich immer wieder Fälle, bei denen die konventionelle Diagnostik einen Keimzelltumorursprung nicht klar beweisen oder ausschließen kann. Besonders häufig sind davon Fälle mit somatischer Malignität oder Metastasen betroffen (Balalaa et al. 2011; Kum et al. 2012).

Ziel dieser Arbeit war es eine molekulargenetische diagnostische qPCR, die in Ergänzung zu Histologie und Immunhistochemie den Keimzelltumorursprung sichern oder ausschließen kann, zu etablieren. Für diesen Zweck wurden Fallkollektive zusammengestellt, an denen die qPCR erprobt wurde. Im Verlauf der Arbeit wurden die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zu weiterführenden, vertiefenden Analysen an Fällen mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung genutzt.

4.1 Diagnostischer Mehrwert durch Verwendung der qPCR bei KZTs – ein Vergleich mit bereits etablierten Methoden

Die qPCR stellt seit vielen Jahren eine verlässliche und sichere Methode in wissenschaftlichen und diagnostischen Untersuchungen dar (Holland et al. 1991; Higuchi et al. 1992). Der Mehrwert liegt vornehmlich in der direkten Messung des vervielfachten Chromosomenabschnittes und der unmittelbaren Interpretation dieser Ergebnisse (Klein 2002). Aufgrund dessen scheint die qPCR besonders geeignet zu sein, um auf die hochfrequente chromosomale Aberration des i[12p] bei KZT angewandt zu werden. An dieser Stelle muss erneut darauf verwiesen werden, dass molekulargenetische Untersuchungen bei KZT-Methoden sind, die benötigt werden, wenn die konventionellen Untersuchungen nicht ausreichen um einen Keimzelltumorursprung zu beweisen (Korn et al. 1996; Shen et al. 2016). Trotz der Anwendung der bewährten diagnostischen Algorithmen gelingt nicht immer eine klare Zuordnung zum Keimzelltumorursprung in Gewebeproben, weshalb zusätzliche molekulargenetische Methoden wie z. B. die qPCR notwendig sind.

Die Notwendigkeit der zusätzlichen Methodik konnte am Kollektiv der Fälle mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung gezeigt werden (Kapitel 3.3). Meist entsteht die Problematik der Diagnosestellung durch unklare immunhistochemische Expressionsmuster und fehlende histologische Hinweise auf einen Keimzelltumorursprung. Ein klarer Hinweis auf einen Keimzelltumorursprung ist der chromosomale Zugewinn auf dem p-Arm des zwölften Chromosoms (Ottesen et al. 2003). Die qPCR scheint zur Detektion dieser Veränderung eine geeignete Methode zu sein, da die chromosomale Aberration zum einen äußerst häufig auftritt und zum anderen leicht quantifizierbar ist (Malek et al. 1997). Neben der Anwendbarkeit der Methodik ist die Sicherung des Qualitätsstandards im Ablauf erforderlich, um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten. Ein wichtiges Qualitätskriterium stellt die Exaktheit der Isolation des zu untersuchenden Gewebes dar. Ansonsten könnte die Abbildung der chromosomalen Zusammensetzung der Gewebeprobe durch chromosomal gesunde, den Tumor umliegende Zellen verzerrt werden. Um ein verlässliches Ergebnis zu

erhalten, ist die genaue Extraktion des zu analysierenden Gewebes essentiell (Lehmann und Kreipe 2001).

Auch in Bezug auf die vorliegende Arbeit könnten umliegende Zellen Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR haben. Bekanntlich lassen sich in Seminomen und weiteren KZTs Typ II lymphozytäre Infiltrate beobachten (Sung et al. 2008; Shen et al. 2018). Die normale chromosomale Konstitution der Immunsystemzellen könnten nach der DNA-Extraktion eine Verschleierung eines abnormen Chromosomensatzes des Tumorgewebes im Ergebnis der qPCR verursachen. Einhergehend mit der immunologischen Abwehrreaktion des Körpers auf das Tumorgewebe treten auch vermehrt Zellnekrosen und avitale Tumorzellverbände auf (Angulo et al. 2009). So könnte sich die Anzahl der analysierbaren Tumorzellen weiter verringern. In Folge dessen könnte fälschlicherweise ein verzerrtes Verhältnis von chromosomal auffälligen Tumorzellen, zu einem großen Anteil von chromosomal unauffälligen Immunzellen nachgewiesen werden. In Anbetracht dieser Effekte, könnte durch eine ungenaue Extraktion von Gewebearealen eine nicht abschätzbare Verzerrung der qPCR-Messergebnisse entstehen.

In dieser Arbeit wurde manuell unter mikroskopischer Sicht, die Markierung des zu analysierenden Gewebes vorgenommen. Einer Beeinflussung der Ergebnisse durch umliegende Gewebezellen bzw. Zellnekrosen sollte durch diese Verfahren Sorge getragen werden. Dieses Extraktionsverfahren wurde aufgrund der großen Praktikabilität gewählt, welche besonders im klinisch diagnostischen Rahmen wichtig ist. Den höchsten Qualitätsstandard bietet die mikroskopische Laser-Mikrodissektion von Zellen aus einem Gewebepreparat (Emmert-Buck et al. 1996). Die Technik ermöglicht es ausgewählte Zellen aus einem heterogenen Gewebeverband zu isolieren. Somit könnte die Verzerrung der Ergebnisse einer anschließenden molekulargenetischen Untersuchung durch gewebeumgebende Zellen verhindert werden. Sollten sich Mängel des Extraktionsverfahrens dieser Untersuchung zeigen, könnten die Mängel durch die Laser-Mikrodissektion behoben werden.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle bei Analysen mittels der qPCR bildet die Fixierung des Gewebes. Es ist allgemein anerkannt, dass durch die Fixierung der Gewebeproben mit Formaldehyd und Paraffin eine Fragmentierung der DNA stattfindet (Srinivasan et al. 2002). Dies hat Konsequenzen für die Auswahl der Primer. Es konnte gezeigt werden, dass Primer, die einen zu großen Genabschnitt umfassen, aufgrund der Fragmentierung des zu

untersuchenden Genabschnittes, keine ausreichende Amplifikation aufzeigen. Um die Reliabilität der Analysen von FFPE-Proben zu steigern, wurden die Primer in den vorliegenden Untersuchungen für möglichst kurze Genabschnitte definiert (Rodríguez et al. 2015). Zusätzlich sollten durch die Verwendung von mehreren Primern für den p-Arm des zwölften Chromosoms Fehlmessungen vermieden werden. Außerdem wurde auf die Analyse von Fällen, die älter als zehn Jahre waren verzichtet. So sollten keine Fälle analysiert werden, die aufgrund der fortschreitenden Fragmentierung, falsch positive oder falsch negative Ergebnisse hervorbringen könnten (Srinivasan et al. 2002).

Ein weiteres Qualitätskriterium ist die Reinheit der aus dem Präparat extrahierten Nukleinsäuren. Hier könnten Verunreinigungen durch organische Salze und Proteine vorliegen. Deswegen wurde nebst der Beurteilung der DNA-Konzentration durch photometrische Messung, die Koeffizienten für die Reinheit einer DNA-Probe bestimmt (Kapitel 2.9.1). Diese indizieren eine Verunreinigung der DNA durch spezifische Absorptionsmaxima der verunreinigenden Stoffe. Somit sollte auch bei der verwendeten DNA sichergestellt werden, dass keine falschen Ergebnisse in Folge von verunreinigter DNA gemessen werden (Lehmann und Kreipe 2001; Lee et al. 2010).

Neben möglichen Fehlerquellen innerhalb der Methodik müssen auch die Vorteile anderer molekulargenetischer Methoden betrachtet werden. In diesem Zusammenhang spielt in der Diagnostik von KZTs die FiSH eine übergeordnete Rolle. Obgleich beide Methoden einen sicheren Nachweis für ein i[12p] erbringen können, ist der größte Vorteil der FiSH, dass die chromosomale Veränderung einer KZT-Probe über eine spezifische Sonde direkt im Gewebe nachgewiesen werden kann (Wehle et al. 2008). Der Vorteil, der Beobachtung des i[12p] in den Zellen (Idrees et al. 2019), steht dem indirekten Nachweis eines i[12p] der in dieser Arbeit verwendeten qPCR gegenüber. Allerdings erfordert die FiSH eine subjektive Beurteilung einer repräsentativen Anzahl von Zellen. In der Arbeit von Idrees et al. (2019) wurden für jeden Fall insgesamt 60 Zellen ausgewertet. Dabei wurde aus den fluoreszierenden Signalen der Zentromersonde und der Sonde des Abschnittes 12p12.1 ein Verhältnis errechnet. Ab einem Verhältnis von 1,3 wurde eine Überrepräsentation des p-Arms des zwölften Chromosoms angenommen. Hier stellt sich analog zu dem indirekten qPCR-Nachweis die Frage, ab welcher Anzahl von einer ausreichenden Menge an Zellen ausgegangen werden darf, um eine Aussage anhand des *Cut-off*-Wertes zu treffen.

Darüber hinaus bieten neu etablierte Serummarker in der KZT-Diagnostik Anlass zur Diskussion. Insbesondere die microRNA (miR-371a-3p) die durch Dieckmann et al. (2017) untersucht und validiert wurden, bildeten die Grundlage für Untersuchungen zum histologischen Ursprung der microRNA (Boellaard et al. 2019). Wie schon beschrieben, zeigten die Untersuchungen zu miR-371a-3p, dass es sich hierbei um einen hoch sensitiven und spezifischen Marker im Serum von KZT-Patienten handelt (Dieckmann et al. 2017). Boellaard et al. (2019) haben daraufhin versucht zu untersuchen, welche histologischen Gewebe miR-371a-3p produzieren. Der histologische Ursprung des Markers ist bis jetzt noch nicht klar bewiesen (Boellaard et al. 2019). In Bezug auf die verwendete qPCR könnte der Nachweis des miR-371a-3p-Markers in Gewebeproben ebenfalls eine Möglichkeit darstellen, einen Keimzelltumorursprung zu beweisen. Die hohe Sensitivität und Spezifität der microRNA für KZTs weisen darauf hin, dass der Nachweis von microRNA im Gewebe mittels qPCR eine gute Herangehensweise sein könnte. In 30 KZTs wurde von Shen et al. (2018) bereits die Expression von miR-371a-3p untersucht. Es wurden deutliche erhöhte Expressionsmuster in den KZTs nachgewiesen (Shen et al. 2018). Darüber hinaus könnte ein Vergleich der Ergebnisse der Gewebsanalysen der qPCR mit den Serumanalysen eine weitere Ergebniskontrolle darstellen. Kritisch zu betrachten ist jedoch, dass für reine Teratome keine Erhöhung der miR-371a-3p-Serumlevel beobachtet wurde (Terbuch et al. 2018). Die fehlende Überexpression des Markers im Gewebe wurde auch bei der Untersuchung von Shen et al. (2018) bestätigt. Besonders in Anbetracht möglicher Differentialdiagnosen schränken diese Ergebnisse die Aussagekraft eines Nachweises von microRNA in Tumorgewebe ein. Vor allem bei Fällen mit somatischer Malignität, die zur Diagnosestellung einer sicheren Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung bedürfen, kann das Vorliegen von miR-371a-3p im Gewebe keinen ausreichenden Nachweis eines Keimzelltumorursprunges liefern. Zum sicheren Nachweis eines Teratoms müsste zusätzlich ein Marker wie miR-375 untersucht werden (Shen et al. 2018). Der mit dem Nachweis zweier microRNA in einer Gewebeprobe verbundene Mehraufwand steht dem einfachen Nachweis des ubiquitären i[12p] gegenüber. Ein weiterer Nachteil des Nachweises der microRNA im Gewebe stellt die zusätzliche Fixierung der Gewebeproben dar. In der Routinediagnostik erfolgt die Fixierung der Gewebeproben in Formalinaldehyd sowie Paraffin. Um verlässliche Analysen der microRNA an Gewebeproben durchführen zu können, müssten schon vor der histologischen sowie immunhistochemischen diagnostischen Aufarbeitung Gewebeproben bei -80°C sowie in speziellen Nährlösungen fixiert werden (Dieckmann et al. 2017, Cheng et al. 2017). Dieser Vorgang würde erfolgen, ohne Sicherheit für die diagnostische Notwendigkeit einer anschließenden Untersuchung auf microRNA im Gewebe. Hingegen

ist die Bestimmung und der Nachweis eines i[12p] aus dem Routinegewebe der FFPE-Proben im Nachgang jederzeit möglich. Hieraus ergibt sich somit kein Mehraufwand in der Fixierung und diagnostischer Routine und bildet einen großen Vorteil der qPCR im diagnostischen Prozess der KZT. Dennoch könnte der Nachweis von microRNA-Marker im Gewebe mittels qPCR einen weiteren methodischen Ansatz darstellen, um eine noch genauere diagnostische Abklärung, nach initialer i[12p] Bestimmung, zu leisten.

In der Zusammenschau der genannten Aspekte wird deutlich, dass die qPCR anhand des Nachweises eines i[12p] eine verlässliche Methode zum Nachweis eines Keimzelltumorursprungs bei KZTs Typ II sein kann. Dies spielt hauptsächlich im Rahmen einer erweiterten Diagnostik bei unklarem Befund durch Histologie und Immunhistochemie eine entscheidende Rolle. Bei korrekter Anwendung und unter Sicherung der Qualitätsstandards ist die qPCR ein einfaches und sicheres diagnostisches Instrument, um die konventionellen Methoden zur Diagnostik eines KZT zu vervollständigen.

4.2 Zusammenstellung eines repräsentativen KZT-Kollektivs in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse

In der Zusammenstellung der Kollektive lag der Fokus auf der Repräsentativität der daraus zu erzielenden Ergebnissen. Es sollte gelingen eine möglichst große Anzahl an Fällen zusammenzustellen, damit die neu angewandte Methodik ausreichend erprobt wird. Nebst der Etablierung der qPCR sollte die Fallzahl die Aussagekraft über die Prävalenz eines i[12p] bestärken. Zusätzlich zu den Grundlagenuntersuchungen sollten Analysen an exemplarischen, ausgewählten Fällen mit Fragestellung nach einem Keimzelltumorursprung durchgeführt werden. Auf diese Weise sollte der diagnostische Wert der qPCR zum Ausschluss oder zur Bestätigung eines Keimzelltumorursprung verdeutlicht werden.

Insgesamt wurden 193 Fälle von KZTs, tumorfreien Proben, Zelllinien und exemplarischen Fällen untersucht. Der Großteil der Fälle waren Seminome (106 Fälle) und der geringere Anteil nicht-seminomatöse Tumoren (42 Fälle) (Tabelle 19). Die übrigen Proben stellten tumorfreie Kontrollgewebe und Fälle mit unklarem histologischen Keimzelltumorursprung dar. Damit liegt dieser Arbeit eine der größten Fallsammlungen zu Grunde, die je bei molekulargenetischen Untersuchungen zu chromosomalen Veränderungen bei KZTs Typ II analysiert wurden (Tabelle 21). Aufgrund der führenden Rolle der FiSH als molekulargenetischen Methode in der Diagnosestellung der KZTs Typ II, stammen die meisten Ergebnisse aus Untersuchungen mit dieser Methodik. In mehreren Studien wurde

die klinische und diagnostische Relevanz des i[12p] als Markerchromosom mittels FiSH geprüft (Bosl et al. 1994; Ottesen et al. 2003; Shen et al. 2016). Darüber hinaus wurden aktuelle große Studien veröffentlicht, die mittels neuer Untersuchungsmethoden wie dem *Next Generation Sequencing* (NGS) oder dem *Whole Exom Sequencing* (WES) versuchen, die Genetik der KZTs zu entschlüsseln (Shen et al. 2018). Exemplarisch werden die Fallkollektive von drei Arbeiten, die eine ähnlich hohe Fallzahl aufweisen, zu molekulargenetische Untersuchungen an KZTs mit der hier vorliegenden Untersuchung verglichen und diskutiert.

In der Studie von Bosl et al. (1994) wurden 178 KZT-Proben von 150 Studienteilnehmern durch konventionelle zytogenetische, wie der Karyotypisierung, und molekulargenetische Methoden wie der FiSH untersucht. Von den 178 KZT-Fällen wurden 143 als Nicht-Seminom und 35 als Seminom diagnostiziert. 101 KZT-Proben von 85 Studienteilnehmern hatten einen nicht normalen Karyotyp. In 79 dieser KZT-Fälle wurde unter der Anwendung von konventionellen genetischen Methoden ein i[12p] gefunden. Im Nachgang wurden bei 96 Fällen, die entweder bereits als i[12p]-positiv bezeichnet wurden oder bei denen die konventionelle genetische Untersuchung fehlgeschlagen war, mit Hilfe der FiSH das Vorhandensein eines i[12p] untersucht (Tabelle 21). In 47 Fällen waren die Ergebnisse der FiSH mit den vorherigen genetischen Untersuchungen übereinstimmend. In den restlichen 49 Fällen, die konventionell zytogenetisch nicht untersucht werden konnten und kein i[12p] aufwiesen, wurde durch die FiSH in 13 Fällen zusätzlich ein i[12p] nachgewiesen.

In einer zweiten Studie haben Shen et al. (2016) 97 KZT-Fälle im Hinblick auf den diagnostischen Wert der Immunhistochemie und der FiSH analysiert (Tabelle 21). In dieser Untersuchung waren der Großteil der Fälle Seminome (75 Fälle), während die restlichen Fälle entweder als nicht-seminomatöse KZTs oder als KZTs Typ I diagnostiziert wurden. Bei 29 von 30 KZT, die mit FiSH analysiert wurden, konnte auch bei dieser Untersuchung ein i[12p] nachgewiesen werden.

In einer neu angelegten Studie wurden, unter der Zuhilfenahme von neuen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden, insgesamt 137 KZT-Fälle von 133 Patienten untersucht. Davon waren 72 Fälle als Seminom und 65 Fälle als Nicht-Seminom diagnostiziert worden. Von 131 untersuchten KZT-Fällen wiesen 114 Fällen ein i[12p] auf (Tabelle 21) (Shen et al. 2018).

Es lässt sich festhalten, dass die Verteilung von Seminomen und Nicht-Seminomen in der Studie von Shen et al. (2016) und Shen et al. (2018), der Zusammensetzung der Kollektive dieser Arbeit annähernd gleicht. Da das Seminom eine geringfügig höhere Prävalenz als das Nicht-Seminom aufweist (Verdorfer 2014), war auch in dieser Arbeit ein Großteil der Fallzahlen Seminome. Folglich ist es umso beachtlicher, dass in der Arbeit von Bosl et al. (1994) mehrheitlich Nicht-Seminome im KZT-Kollektiv zu finden sind. In welchem Maß die Ergebnisse durch die unterschiedliche Zusammenstellung der Kollektive in diesen Arbeiten beeinflusst wurden, lässt sich nicht sicher feststellen. Um eine Verzerrung der Ergebnisse auszuschließen, müsste ein ähnlich großes Fallkollektiv von Nicht-Seminomen zusammengestellt werden. Es könnte also von Interesse sein, die Fallkollektive der Seminome und der Nicht-Seminome fortführend zu vergrößern, um mehr Daten zu akquirieren. So könnte eine Aussage zu dem Einfluss der Tumorentität auf die molekulargenetischen Untersuchungen von KZTs überprüft werden. Aufgrund dessen werden an der Universitätsmedizin Göttingen mit Hilfe der qPCR auch weiterhin prospektiv KZTs untersucht.

Tabelle 21: Aufführung der Fallanzahl, der Methodik und i[12p]-Prävalenz in vergleichenden Studien

Studie	Fallanzahl	Methoden	Molekulargenetisch untersuchte Fallanzahl	i[12p] Prävalenz
Bosl et al. 1994	101	Karyotypisierung/FiSH	96	80 %
Shen et al. 2016	97	Immunhistochemie/FiSH	30	96 %
Shen et al. 2018	131	WES/NGS	131	86 %
Filmar	148	Histologie/qPCR	148	90 %

Vergleichend mit weiteren molekulargenetischen Untersuchungen zu KZTs, die an dieser Stelle nicht ausführlich diskutiert wurden, lässt sich feststellen, dass es in dieser Arbeit

gelingen ist eine große Fallzusammenstellung von KZTs zu realisieren (Suijkerbuijk et al. 1993; Zafarana et al. 2003; Wehle et al. 2008).

4.3 Prävalenz des i[12p] in KZT

Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen konnte eine große Datenmenge gesammelt werden, welche auch die Prävalenzbestimmung des i[12p] erlaubte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Prävalenz des i[12p], die in vielen Publikationen immer noch mit 80 % bei KZTs Typ II beziffert wird (Bosl et al. 1994; Buljubašić et al. 2018), nicht mehr exakt zu sein scheint. Vermutlich liegt die Häufigkeit dieser chromosomalen Aberration höher als bis jetzt angenommen. In unseren Untersuchungen konnten wir eine Prävalenz von ≈ 90 % des i[12p] feststellen (Kapitel 3.2.3).

Wie im Kapitel 4.2 schon angedeutet wurde, sollte eine repräsentative Fallanzahl zusammengestellt werden, um eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse in Bezug auf die Etablierung der qPCR zu erreichen. Da diese Arbeit mit ähnlichen Untersuchungen vergleichbar ist (Bosl et al. 1994; Shen et al. 2016; Shen et al. 2018), drängt sich die Fragestellung auf, welche Prävalenzangaben für ein i[12p] in KZTs am ehesten zutrifft.

In den Arbeiten von Shen et al. (2016) und Shen et al. (2018) konnten jeweils eine Prävalenz des i[12p] von fast 96 % und 87 % in den KZTs gemessen werden. Diese Ergebnisse kommen also denen in dieser Arbeit sehr nah. Im Wesentlichen begründet sich die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf den annähernd gleichen Zusammenstellungen der KZT-Kollektive in diesen Arbeiten (Kapitel 4.2). In der Untersuchung von Shen et al. (2016) wurden lediglich 30 KZT-Fälle unter Zuhilfenahme der FiSH beurteilt, wodurch sich minimale Unterschiede in der Prävalenzangabe erklären könnten.

Die zu geringe Anzahl an KZT-Fällen, die mit Hilfe der FiSH analysiert wurden, scheint auch der Hintergrund für die Prävalenz von 80 % i[12p]-positiver Fälle in der Studie von Bosl et al. (1994) zu sein. In dieser Arbeit wurde die Aussage getroffen, dass die molekulargenetische Untersuchung der KZTs in Hinsicht auf ein i[12p] deutlich sensitiver sei, als die konventionellen genetischen Methoden. Diese Behauptung konnte anhand exemplarischer Falluntersuchungen, die zuvor durch konventionelle Karyotypisierung als i[12p]-negativ oder nicht befundbar erkannt wurden, mittels eines durch die FiSH geleisteten Nachweises eines i[12p] gestützt werden (Bosl et al. 1994). Trotz dieser Erkenntnis, wurden nicht alle KZT-Fälle mit Hilfe der molekulargenetischen Methode erneut untersucht. Es lässt

sich daher vermuten, dass die Prävalenz eines i[12p] auch in dieser Arbeit höher gelegen haben könnte. Zudem liegt der Studie von Bosl et al. (1994) ein nur eingeschränkt mit dieser Arbeit vergleichbares KZT-Kollektiv zu Grunde (Kapitel 4.3).

Auch wenn das i[12p] hauptsächlich im KZT Typ II beobachtet werden kann, wurden sporadisch Fälle anderer Tumorentitäten, die ein i[12p] aufwiesen, beschrieben (Mertens et al. 1994; Heinonen et al. 1996; Van Kessel et al. 1999). Diese Beobachtung könnte den spezifischen diagnostischen Wert des i[12p] Nachweises für die Diagnosestellung eines KZT einschränken. Dabei wurde vor allem von zwei Tumorentitäten berichtet, in deren Kontext ein i[12p] beobachtet wurde. In malignen Neoplasien des Knochenmarkes wurde das i[12p] in akuten myeloischen Leukämien wie auch in chronischen lymphatischen Leukämien nachgewiesen (Heinonen et al. 1996; Van Kessel et al. 1999). Weiterhin konnte das Vorliegen eines i[12p] in mehreren Fällen, die ein Adenokarzinom aufwiesen, bestätigt werden. Hierbei handelte es sich vor allem um Neoplasien des Kolons (drei von 155 Fällen) und der Ovarien (vier von 173 Fällen) (Mertens et al. 1994). Aufgrund der niedrigen Prävalenz des i[12p] in anderen soliden Tumoren, besitzt das i[12p] lediglich für die KZTs Typ II einen pathognomonischen Stellenwert als diagnostisches Kriterium. Dennoch ist es wichtig zu beachten, dass diese chromosomale Aberration nicht ausschließlich bei KZTs Typ II auftreten kann. Es ist daher immer notwendig die Diagnose eines KZT in Zusammenschau des molekulargenetischen Ergebnisses der qPCR, der klinischen Symptome, der Vorgeschichte des Patienten, der Histologie und der Immunhistochemie zu stellen.

Die Analysen und die Diskussion der vergleichbaren Arbeiten deuten darauf hin, dass die zurzeit angenommene Prävalenz des i[12p] von 80 % zu niedrig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer weiterer Untersuchungen (Shen et al. 2016; Shen et al. 2018) begründen diese Annahme. Wird von einer höheren Prävalenz des i[12p] in KZTs ausgegangen, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit durch die molekulargenetische Untersuchung, wie der qPCR, einen möglichen Keimzelltumorursprung zu beweisen. Weiterhin wird die Frage aufgeworfen, warum das i[12p] in manchen KZTs nicht zu beobachten ist, wenn es eigentlich einen so hohen Prozentsatz von KZTs betrifft.

In der Bewertung der ermittelten Prävalenz in dieser Arbeit muss auch bedacht werden, dass es sich bei der qPCR um eine neu etablierte Methodik handelt und weitere Erfahrungswerte und Anwendungen nötig sind. So kann die qPCR langfristig eine neue Rolle in der Detektion eines i[12p] und in der Diagnosestellung eines KZT übernehmen. Zusätzlich muss kritisch

angemerkt werden, dass die Ergebnisse der qPCR nicht durch eine weitere Methode wie konventionelle Karyotypisierung überprüft wurden. So ist für die Zukunft geplant, die mit qPCR erhobenen Ergebnisse mittels der FiSH-Technik zu validieren, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung der vorgelegten Arbeit nicht zur Verfügung stand.

4.4 i[12p]-negative Fälle – Ermöglichung eines besseren Verständnis der KZT-Genetik

Bei allen KZTs lässt sich ein chromosomaler Zugewinn auf dem p-Arm finden. Es weist jedoch nicht jeder KZT ein i[12p] auf. Daher gilt es zu verstehen, welche chromosomalen Veränderungen auf dem p-Arm bei den KZTs auftreten, die kein i[12p] aufweisen (Rodriguez et al. 1993). Es ist als wahrscheinlich anzunehmen, dass sich in diesen Fällen, anstatt eines i[12p], auf dem p-Arm entscheidende und essentielle chromosomale Veränderungen für die Pathogenese von KZTs Typ II befinden (Suijkerbuijk et al. 1993). In verschiedenen Untersuchungen zu i[12p]-negativen Fällen konnte gezeigt werden, dass spezifische Abschnitte auf dem p-Arm, wie z. B. der Genabschnitt 12p11.2-12.1, amplifiziert werden (Korn et al. 1996; Mostert et al. 1998; Zafarana et al. 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde auch in dieser Arbeit versucht die Überrepräsentation von umschriebenen genetischen Abschnitten auf dem p-Arm bei i[12p]-negativen KZTs mit Hilfe der qPCR zu bestimmen. Für diesen Zweck wurden neue Primerpaare für den Abschnitt des Amplikons 12p11.2-12.1 definiert. Durch den Nachweis der Überrepräsentation des Amplikons in einem i[12p]-negativen Fall (Kapitel 3.2.5) können unser Ergebnisse Beobachtungen anderer Untersuchungen stützen. Dort wurden in ca. 10 % der Fällen ein Amplikon 12p.11.2-12.1 in i[12p]-negativen KZTs beschrieben (Mostert et al. 1998; Zafarana et al. 2003).

Aufgrund des niederfrequenten Auftretens reicht der Nachweis des Amplikons 12p11.2-12.1 in i[12p]-negativen KZTs nicht aus, um einen Keimzelltumorursprung zu beweisen. Hier wären weitere molekulargenetische Untersuchungen hilfreich, um einen Keimzelltumorursprung auch dann nachzuweisen, wenn weder ein i[12p] noch ein Amplikon im Gewebe vorliegt. In diesen Fällen könnte es gelingen den Keimzelltumorursprung anhand von microRNA in der Probe nachzuweisen (Kapitel 4.1) (Shen et al. 2018). Diese Marker werden unabhängig vom Vorliegen eines i[12p] in jedem KZT exprimiert. Die Marker miR-371a-3p und miR-375 weisen in Kombination eine hohe Spezifität und Sensitivität für alle KZTs Typ II auf (Dieckmann et al. 2017; Shen et al. 2018). Da miR-371a-3p nicht von

Teratomen exprimiert wird (Terbuch et al. 2018), müssten jedoch stets beide Marker im Gewebe nachgewiesen werden.

Über die molekulargenetischen Untersuchungen von überrepräsentierten genetischen Bereichen hinaus, haben wir in dieser Arbeit eine histologische und immunhistochemische Aufarbeitung der i[12p]-negativen Fälle vorgenommen. Dabei konnten in allen Gewebeproben lymphozytäre Infiltrate mit einem granulomatösem Entzündungsmuster festgestellt werden. Diese Beobachtungen wurden auch in anderen Arbeiten gemacht (Sung et al. 2008; Shen et al. 2018). In Folge einer primären Regression des Tumorgewebes im Hoden durch die körpereigene Immunantwort, können einige KZTs erst sekundär durch das Auftreten von Metastasen klinisch auffällig werden (Angulo et al. 2009; Balalaa et al. 2011). So könnte die immunologische Reaktion des Körpers auf das Tumorgewebe mit dem Fehlen des i[12p] in Zusammenhang stehen. Es bleibt jedoch fraglich, ob das Immunsystem einen derartigen Einfluss auf die Genetik der KZTs nehmen kann. Außerdem ist kritisch zu betrachten, dass lymphozytäre Infiltrate sowohl in i[12p]-negativen Fällen als auch i[12p]-positiven Fällen häufig beschrieben wurden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen lymphozytären Infiltraten und dem Fehlen eines i[12p] kann aufgrund der Beobachtungen in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Dennoch ist es auffällig, dass in der Arbeit von Shen et al. (2018) die gleichen Beobachtungen in Bezug auf die Prävalenz des i[12p], die i[12p]-negativen Fälle, sowie das Auftreten von lymphozytären Infiltraten bei KZTs gemacht wurden. Besonders hervorzuheben ist, dass auch in den Untersuchungen von Shen et al. (2018) die i[12p]-negativen Fälle ausschließlich Seminome waren. Diese übereinstimmenden Beobachtungen in zwei unabhängigen molekulargenetischen Untersuchungen sind bemerkenswert und bieten Anlass für weitere Forschungsansätze, um besser zu verstehen warum einzelne KZTs kein i[12p] aufweisen. In diesen Fällen könnte es von gesteigertem Interesse sein, dass einzelne Zellen (z. B. mit Laser-Mirkodissektion) aus den Zellverband heraus isoliert werden. Diese ausgewählten Tumorzellen könnten dann erneut molekulargenetisch untersucht werden. Auch eine Untersuchung durch neue molekulargenetische Methoden wie z. B. WES wären denkbar, um in i[12p]-negativen Fällen die möglichen essentiellen Mutationen auf dem zwölften Chromosom zu entdecken.

4.5 Ausgewählte Fälle mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung

Die Fälle des Kollektivs mit expliziter Fragestellung nach Keimzelltumorursprung bildeten einen wichtigen Bestandteil der Untersuchungen mit Hilfe der qPCR. Hier sollte nochmals

verdeutlicht werden, wie entscheidend eine molekulargenetische Untersuchung im diagnostischen Prozess eines KZT sein kann. In den meisten Fällen kann die Diagnose eines KZT anhand von Histologie und Immunhistochemie gestellt werden. Sollten Histologie und Immunhistochemie nicht ausreichen einen Keimzelltumorursprung zu belegen, ist eine zuverlässige Sicherung des Keimzelltumorursprungs mittels einer molekulargenetischen Untersuchung notwendig (Shen et al. 2016).

Dies wird vor allem auch im Hinblick auf die häufigsten Typen maligner Neoplasien des Hodenparenchyms deutlich. So schließt ein i[12p]-positiver Befund alle anderen KZTs Typen, durch die klare Charakterisierung des i[12p] als Markerchromosom für KZTs Typ II, aus (Oosterhuis und Looijenga 2005). Durch die Ausprägung der chromosomalen Aberration bei KZTs Typ III in Form eines chromosomalen Zugewinns auf dem neunten Chromosom, bestehen weitere Möglichkeiten KZTs molekulargenetisch zu unterscheiden (Verdorfer et al. 2004). So konnte z. B. im ersten Fall durch den i[12p]-negativen Befund in der qPCR die Verdachtsdiagnose eines spermatozytären Tumors bestärkt werden (Kapitel 3.3.1). Einen Nachweis des KZT Typ III liefert das qPCR-Ergebnis jedoch nicht. Wenn es gelingen würde ein Versuchsprotokoll für den Nachweis einer chromosomalen Amplifikation auf dem neunten Chromosom bei KZTs Typ III zu etablieren, wäre eine Kombination beider Versuchsprotokolle denkbar. Obwohl spermatozytäre Tumoren nur ca. 1 % aller Seminome darstellen, könnte die molekulargenetische Untersuchung beider KZT-Typen nahezu einen Nachweis für die Gesamtheit aller KZT-Fälle erbringen (Steiner et al. 2006; Carrière et al. 2007). KZTs Typ I treten hauptsächlich bei präpubertären Knaben auf und zeigen keine spezifische chromosomale Aberration. Durch das Alter der Patienten einerseits und dem molekulargenetischen Ausschluss von KZTs Typ II und Typ III andererseits, würde auch in diesen Fällen eine noch sichere Zuordnung zu KZTs Typ I gelingen. Im achten Fall handelt es sich um einen KZT Typ I (Kapitel 3.3.8). Dort konnte gezeigt werden, dass auch dieser Fall i[12p]-negativ ist. Durch den Ausschluss eines i[12p] konnte auch in diesem Fall die Verdachtsdiagnose eines KZT Typ I gestärkt werden. Die kombinierte Untersuchung des neunten und zwölften Chromosoms mittels qPCR, könnte so das gesamte KZT-Spektrum abdecken. Falls ein i[12p]-negativer KZT Typ II vorliegt, bedarf es jedoch einer erweiterten Diagnostik, da in diesen Fällen keine endgültige Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung durch die qPCR geleistet werden kann. Daraus folgt, dass ein i[12p]-negativer Befund in der molekulargenetischen Untersuchung die Diagnose eines KZT Typ II unwahrscheinlicher macht und andere Malignome bzw. KZT-Entitäten

differentialdiagnostisch relevant werden. Der Keimzelltumorursprung muss in diesen Fällen durch weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Beispielhaft konnten wir im neunten Fall zeigen, dass metastatische Absiedlungen im Hoden von Neoplasien, die sich nicht aus Keimzellen ableiten, i[12p]-negativ sind (Kapitel 3.3.9). Somit ist mit der Anwendung der qPCR sowohl der Beweis für ein KZT Typ II als auch der Beweis für Metastasen anderer Tumorentitäten, die im Hoden lokalisiert sind, möglich. Für letztere wird eine histologische und immunhistochemische Beurteilung benötigt. Zusätzlich hat der Fall demonstriert, dass das Ergebnis der qPCR nicht durch tumorfreie, gesunde Hodenparenchymzellen verzerrt wird (Kapitel 4.4).

Den möglicherweise größten Nutzen hat die molekulargenetische Untersuchung von Gewebeproben, bei denen ein unbestätigter Verdacht auf einen Keimzelltumorursprung besteht bzw. für KZTs die eine somatische Malignität aufweisen. In den Fällen zwei, vier, fünf und sieben wurden jeweils Proben untersucht, die aufgrund der Vorgeschichte des Patienten, der histologischen Präsentation und des immunhistochemischen Expressionsmusters nicht eindeutig als KZT Typ II charakterisiert werden konnten (Kapitel 3.3.2; 3.3.4; 3.3.5; 3.3.7). In diesen Fällen ergeben sich durch fehlende histologische Anhaltspunkte und veränderte immunhistochemische Expressionsmuster häufig Probleme in der sicheren Diagnosestellung (Motzer et al. 1998; Kum et al. 2012). Die gemeinsame chromosomale Aberration des i[12p] bildet in diesen Gewebeproben eine Möglichkeit den Keimzelltumorursprung zu beweisen. An dieser Stelle kann die in dieser Arbeit etablierte qPCR unterstützend in den diagnostischen Prozess eingreifen und die Diagnose des KZT Typ II durch den Nachweis eines i[12p] sichern.

In der Zusammenschau der Ergebnisse des Kollektivs mit besonderen Fällen, bei denen ein Keimzelltumorursprung fraglich war, lässt sich feststellen, dass der Nachweis eines i[12p] mittels qPCR eine geeignete molekulargenetische Methode ist, um einen Keimzelltumorursprung zu beweisen. Diese Erkenntnis hat vor allem für die Fälle mit unklarer Patientenvorgeschichte, nicht eindeutiger Histologie und unklarem immunhistochemischen Expressionsmuster eine hohe diagnostische Relevanz. Mit Erweiterung des Versuchsprotokolls für einen kombinierten Nachweis von KZTs Typ I und Typ III könnte in Zukunft eine noch genauere diagnostische Abklärung mit Hilfe der qPCR gelingen.

4.6 Klinische Anwendung und Perspektiven

KZTs haben im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen eine sehr hohe Heilungschance dank einer hohen Ansprechrate auf Chemotherapie, Bestrahlung und Resektion (IGCCCG 1997; Hanna und Einhorn 2014). Von entscheidendem Charakter bei diesen erfolgreichen Therapieansätzen ist die frühe und sichere Diagnose eines KZT (Sheikine et al. 2012). Das Kollektiv mit ausgewählten Fällen konnte eindrücklich demonstrieren, dass eine sichere Zuordnung zu einer Keimzelltumorursprung in einigen Fällen nicht gelingt. In besonderem Maße sind Fälle mit somatischer Malignität, Metastasen oder mediastinalen KZTs von dieser Problematik betroffen. Gerade in diesen Fällen kann der Nachweis eines $i[12p]$ mittels qPCR von elementarer Wichtigkeit für die klinische Behandlung der Patienten sein, da in Geweben mit somatischer Malignität Resistenzen gegen Chemotherapeutika beobachtet wurden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht vollständig verstanden, ob Patienten mit somatischen Malignitäten von einer KZT-basierten Chemotherapie oder von einer auf der Histologie der somatischen Malignität basierenden Therapie profitieren (Giannatempo et al. 2016; Speir et al. 2018). Eine definitive Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung durch den Nachweis eines $i[12p]$ ermöglicht in diesen Fällen eine weitere Therapieoption. Zusätzlich kann der molekulargenetische Nachweis eines $i[12p]$ eine frühe Diagnose bei allen KZT-Fällen ermöglichen.

In Zusammenschau der diskutierten Argumente, die in dieser Arbeit etablierten qPCR, lässt sich erkennen, dass die qPCR eine einfache und kosteneffektive molekulargenetische Untersuchung darstellt, um ein $i[12p]$ in Gewebeproben nachzuweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Methode nützlich in die bestehende diagnostische Routine einfügt und einen Mehrwert an diagnostischer Sicherheit bei unklaren Fällen generiert. Im weiteren Verlauf der klinischen Anwendung der Methode wäre von gesteigertem Interesse, welche Ergebnisse eine gemeinsame Analyse von KZT-Fällen durch qPCR und einer weiteren molekulargenetischen Methode erbringen würde. Auch die erneute Analyse der $i[12p]$ -negativen Fälle könnte sich als interessant erweisen. So könnte durch Laser-Mikrodissektion eine ausgewählte Anzahl an reinen Tumorzellen zusammengestellt werden und auf das Vorliegen von chromosomalen Aberrationen nachuntersucht werden. Zu letzt könnte die Evaluation des klinischen Outcomes der Patienten anhand des molekulargenetischen Profils der Gewebeproben ein besseres Verständnis von chromosomalen Veränderungen in Bezug zur Klinik der Patienten ermöglichen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob das Vorliegen eines $i[12p]$ oder das Fehlen des selbigen einen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Patienten nimmt.

5 Zusammenfassung

Der Keimzelltumor ist die häufigste maligne Neoplasie beim jungen Mann. Der Hauptanteil sind Keimzelltumoren Typ II, die sich in Seminome und Nicht-Seminome aufteilen. Diesen Tumoren ist gemein, dass ein pathognomonischer Zuwachs von chromosomalem Material auf dem p-Arm des Chromosoms Zwölf (in über 80 % als Isochromosoms 12p) vorliegt. Die Diagnose wird hauptsächlich mit Hilfe von Histologie und Immunhistochemie gestellt. Dennoch gibt es Fälle, in denen keine eindeutige Zuordnung zu einem Keimzelltumorursprung, durch konventionelle Methoden (z. B. somatische Malignität) geleistet werden kann. Hier kann das Isochromosom 12p als molekulargenetischer Beweis eines Keimzelltumorursprungs dienen. Daher wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der quantitativen *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion ein Isochromosom 12p in Keimzelltumoren nachgewiesen.

Insgesamt wurden 193 Fälle von Keimzelltumoren, tumorfreien Hodengewebsproben, Zelllinien und Tumoren mit unklarem Keimzelltumorursprung untersucht. Die Gewebe wurden mikroskopisch markiert und die DNA aus den Tumorarealen extrahiert. Um die chromosomalen Veränderungen der Proben abbilden zu können, wurden jeweils Primerpaare auf dem p- und q-Arm des zwölften Chromosoms definiert. Das gemessene Amplifikationsverhältnis sollte den chromosomalen Zugewinn und ein Isochromosom 12p nachweisen. Isochromosom 12p negative Fälle wurden auf einen spezifisch überrepräsentierten Genabschnitt, ein Amplikon 12p11.2-12.1, untersucht.

In 90 % der Keimzelltumorfälle konnte ein Isochromosom 12p und in einem Isochromosom 12p-negativen Fall ein Amplikon bestätigt werden. In fünf Fällen mit unklarem Keimzelltumorursprung konnten in vier Proben der Keimzelltumorursprung durch ein Isochromosom 12p bewiesen werden. Weiterhin konnte bei einer Melanom-Metastase, einer Epidermoidzyste (Keimzelltumor Typ I) und einem spermatozytären Tumor (Keimzelltumor Typ III) gezeigt werden, dass kein Isochromosom 12p vorlag.

Die molekulargenetische Untersuchung von Keimzelltumoren wurde bereits erfolgreich mit verschiedenen Methoden (z. B. Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung) erprobt. Der Nachweis eines Isochromosoms 12p mittels quantitativer *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion kann in Proben, in denen Histologie und Immunhistochemie nicht ausreichen, um einen Keimzelltumorursprung zu beweisen, die Diagnose eines Keimzelltumors sichern.

6 Literaturverzeichnis

- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Føgh J (1984): Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* 50, 147–162
- Angulo JC, González J, Rodríguez N, Hernández E, Núñez C, Rodríguez-Barbero JM, Santana A, López JI (2009): Clinicopathological study of regressed testicular tumors (apparent extragonadal germ cell neoplasms). *J Urol* 182, 2303–2310
- Atkin NB, Baker MC (1983): i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* 10, 199–204
- Azzopardi JG, Hoffbrand AV (1965): Retrogression in testicular seminoma with viable metastases. *J Clin Pathol* 18, 135–141
- Balalaa N, Selman M, Hassen W (2011): Burned-out testicular tumor: a case report. *Case Rep Oncol* 4, 12–15
- Barlow LJ, Badalato GM, McKiernan JM (2010): Serum tumor markers in the evaluation of male germ cell tumors. *Nat Rev Urol* 7, 610–617
- Berney DM, Lee A, Shamash J, Oliver RTD (2006): The association between intratubular seminoma and invasive germ cell tumors. *Hum Pathol* 37, 458–461
- Boellaard WPA, Gillis AJM, van Leenders GJLH, Stoop H, van Agthoven T, Dorssers LCJ, Dinkelman-Smit M, Boormans JL, Looijenga LHJ (2019): Cellular origin of microRNA-371a-3p in healthy males based on systematic urogenital tract tissue evaluation. *Andrology* 7, 463–468
- Bosl GJ, Ilson DH, Rodriguez E, Motzer RJ, Reuter VE, Chaganti RS (1994): Clinical relevance of the i(12p) marker chromosome in germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86, 349–355
- Buljubašić R, Buljubašić M, Bojanac AK, Ulamec M, Vlahović M, Ježek D, Bulić-Jakuš F, Sinčić N (2018): Epigenetics and testicular germ cell tumors. *Gene* 661, 22–33
- Camparo P, Comperat EM (2013): SALL4 is a useful marker in the diagnostic work-up of germ cell tumors in extra-testicular locations. *Virchows Arch* 462, 337–341
- Carrière P, Baade P, Fritschi L (2007): Population based incidence and age distribution of spermatocytic seminoma. *J Urol* 178, 125–128
- Cheng YS, Chung CL, Chen CF, Lin YM (2017): Differential expression of microRNAs and their messengerRNA targets in men with normal spermatogenesis versus Sertoli cell-only syndrome. *Urol Sci* 28, 42–49

- Comiter CV, Kibel AS, Richie JP, Nucci MR, Renshaw AA (1998): Prognostic features of teratomas with malignant transformation: a clinicopathological study of 21 cases. *J Urol* 159, 859–863
- De Backer A, Madern GC, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Hakvoort-Cammel FG, Hazebroek FWJ (2006): Testicular germ cell tumors in children: management and outcome in a series of 20 patients. *J Pediatr Urol* 2, 197–201
- Dieckmann KP, Radtke A, Spiekermann M, Balks T, Matthies C, Becker P, Ruf C, Oing C, Oechsle K, Bokemeyer C et al. (2017): Serum levels of microRNA miR-371a-3p: a sensitive and specific new biomarker for germ cell tumours. *Eur Urol* 71, 213–220
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996): Laser capture microdissection. *Science* 274, 998–1001
- Giannatempo P, Pond GR, Sonpavde G et al. (2016): Treatment and clinical outcomes of patients with teratoma with somatic-type malignant transformation: an international collaboration. *J Urol* 196, 95-100
- Hanna NH, Einhorn LH (2014): Testicular cancer - discoveries and updates. *N Engl J Med* 371, 2005–2016
- Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LHJ, Pauchnik M, Chow CW, Robb L (2005): The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* 104, 2092–2098
- Heinonen K, Rao PN, Slack JL, Cruz J, Bloomfield CD, Mrózek K (1996): Isochromosome 12p in two cases of acute myeloid leukaemia without evidence of germ cell tumour. *Br J Haematol* 93, 677–680
- Henegariu O, Heerema NA, Thurston V, Jung SH, Pera M, Vance GH (2004): Characterization of gains, losses, and regional amplification in testicular germ cell tumor cell lines by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 148, 14–20
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10, 413–417
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276–7280
- Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJM, Stoop H, van Gurp RJLM, Oechsle K, Steyerberg E, Hartmann JT, Dinjens WNM et al. (2009): Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27, 2129–2136

- Idrees MT, Ulbright TM, Epstein JI (2019): Fluorescence in situ hybridization analysis for 12p alterations in sarcomatoid yolk sac tumors. *Am J Surg Pathol* 43, 1566–1573
- International Germ Cell Cancer Collaborative Group (1997): International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J Clin Oncol* 15, 594–603
- Izumi K, Krantz ID (2014): Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C, 406–413
- Kaprova-Pleskacova J, Stoop H, Brüggewirth H, Cools M, Wolffenbuttel KP, Drop SLS, Snajderova M, Lebl J, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2014): Complete androgen insensitivity syndrome: factors influencing gonadal histology including germ cell pathology. *Mod Pathol* 27, 721–730
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomelí H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR, Tomilin A (2004): Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 5, 1078–1083
- Kelland L (2007): The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573–584
- Kim D, Lee DH, Choi J, Shim KW, Kim SH (2013): Validation of tumor markers in central nervous system germ cell tumors by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mol Med Rep* 7, 337–341
- Klein D (2002): Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol Med* 8, 257–260
- Korn WM, Oide Weghuis DE, Suijkerbuijk RF, Schmidt U, Otto T, du Manoir S, van Kessel AG, Harstrick A, Seeber S, Becher R (1996): Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 17, 78–87
- Krag Jacobsen G, Barlebo H, Olsen J, Schultz HP, Starklint H, Søgaaard H, Vaeth M (1984): Testicular germ cell tumours in Denmark 1976-1980. Pathology of 1058 consecutive cases. *Acta Radiol Oncol* 23, 239–247
- Kum JB, Ulbright TM, Williamson SR, Wang M, Zhang S, Foster RS, Grignon DJ, Eble JN, Beck SDW, Cheng L (2012): Molecular genetic evidence supporting the origin of somatic-type malignancy and teratoma from the same progenitor cell. *Am J Surg Pathol* 36, 1849–1856
- Lee JH, Park Y, Choi JR, Lee EK, Kim HS (2010): Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Med J* 51, 104–110

- Lehmann U, Kreipe H (2001): Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 25, 409–418
- Litchfield K, Summersgill B, Yost S, Sultana R, Labreche K, Dudakia D, Renwick A, Seal S, Al-Saadi R, Broderick P et al. (2015): Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun* 6, 5973
- Looijenga LHJ, Stoop H, de Leeuw HPJC, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJM, van Roozendaal KEP, van Zoelen EJJ, Weber RFA, Wolffenbittel KP, van Dekken H et al. (2003): POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63, 2244–2250
- Malek NP, Casper J, Looijenga LHJ, Strohmeyer T, Schmoll HJ, Nordheim A, Janknecht R (1997): Quantification of additional short arms of chromosome 12 in germ cell tumours using the polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 33, 1488–1494
- Mertens F, Johansson B, Mitelman F (1994): Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 221–230
- Mikuz G (2014): Hodenkrebs - eine Frage der Geographie? *Epidemiologie und Ätiopathogenese der Keimzelltumoren. Pathologe* 35, 211–217
- Mikuz G, Schweyer S (2014): Hodentumoren. *Faszination einer bunten Morphologie. Pathologe* 35, 209–210
- Mir MC, Pavan N, Gonzalgo ML (2016): Current clinical applications of testicular cancer biomarkers. *Urol Clin North Am* 43, 119–125
- Mostert M, Rosenberg C, Stoop H, Schuyer M, Timmer A, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2000): Comparative genomic and in situ hybridization of germ cell tumors of the infantile testis. *Lab Invest* 80, 1055–1064
- Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (1998): Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* 16, 2617–2627
- Motzer RJ, Amsterdam A, Prieto V, Sheinfeld J, Murty VV, Mazumdar M, Bosl GJ, Chaganti RS, Reuter VE (1998): Teratoma with malignant transformation: diverse malignant histologies arising in men with germ cell tumors. *J Urol* 159, 133–138
- Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N (2011): Identification of microRNAs from the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 135, 119–125
- Nonaka D (2009): Differential expression of SOX2 and SOX17 in testicular germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 131, 731–736

- Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F, Waller CF, Hartmann JT, Boehlke I, Bokemeyer C, German Testicular Cancer Study Group (2011): Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors. *Eur Urol* 60, 850–855
- Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (1993): The biology of human germ cell tumours: retrospective speculations and new prospectives. *Eur Urol* 23, 245–250
- Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2005): Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5, 210–222
- Oram SW, Liu XX, Lee TL, Chan WY, Lau YFC (2006): TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells. *BMC Cancer* 6, 154
- 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
- Pectasides D, Pectasides E, Kassanos D (2008): Germ cell tumors of the ovary. *Cancer Treat Rev* 34, 427–441
- Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, Jewett M, Buchanan J, Goss PE (1993): Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 53, 3574–3578
- Raghavan D (2003): Testicular cancer: maintaining the high cure rate. *Oncology (Williston Park)* 17, 218–228
- Rajpert-De Meyts E (2006): Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 12, 303–323
- Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ (2015): Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol* 1275, 31–56
- Rodríguez E, Houldsworth J, Reuter VE, Meltzer P, Zhang J, Trent JM, Bosl GJ, Chaganti RSK (1993): Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 8, 230–236
- Rogers PC, Olson TA, Cullen JW, Billmire DF, Marina N, Rescorla F, Davis MM, London WB, Lauer SJ, Giller RH et al. (2004): Treatment of children and adolescents with stage II testicular and stages I and II ovarian malignant germ cell tumors: A Pediatric Intergroup Study - Pediatric Oncology Group 9048 and Children's Cancer Group 8891. *J Clin Oncol* 22, 3563–3569

- Rosenberg C, Van Gorp RJ, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ (2000): Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 19, 5858–5862
- Ruf CG, Isbarn H, Wagner W, Fisch M, Matthies C, Dieckmann KP (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
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354
- Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Van Hemelrijck M (2013): Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clin Epidemiol* 5, 417–427
- 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
- Shen H, Shih J, Hollern DP, Wang L, Bowlby R, Tickoo SK, Thorsson V, Mungall AJ, Newton Y, Hegde AM et al. (2018): Integrated molecular characterization of testicular germ cell tumors. *Cell Rep* 23, 3392–3406
- Shen Q, Rao Q, Yu B, Xia QY, Bao W, Lu ZF, Shi QL, Zhou XJ (2016): Diagnostic value of immunohistochemistry and FISH for chromosome 12p in type II testicular germ cell tumors. *Zhonghua Nan Ke Xue* 22, 692–697
- Skakkebaek NE (1972): Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2, 516–517
- Speir R, Cary C, Foster RS et al. (2018): Management of patients with metastatic teratoma with malignant somatic transformation. *Curr Opin Urol* 28, 469–473
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961–1971
- 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, Honecker F, van de Geijn GJM, Gillis AJM, Cools MC, de Boer M, Bokemeyer C, Wolfenbittel KP, Drop SLS, de Krijger RR et al. (2008): Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *J Pathol* 216, 43–54
- Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Meloni AM, Parrington JM, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Sandberg AA, van Kessel AG (1993): Overrepresentation of chromosome 12p

- sequences and karyotypic evolution in i(12p)-negative testicular germ cell tumors revealed by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 70, 85–93
- Sung MT, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Montironi R, Cheng L (2008): Primary mediastinal seminoma: a comprehensive assessment integrated with histology, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization for chromosome 12p abnormalities in 23 cases. *Am J Surg Pathol* 32, 146–155
- Taylor-Weiner A, Zack T, O'Donnell E, Guerriero JL, Bernard B, Reddy A, Han GC, AlDubayan S, Amin-Mansour A, Schumacher SE et al. (2016): Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. *Nature* 540, 114–118
- Terbuch A, Adiprasito JB, Stiegelbauer V, Seles M, Klec C, Pichler GP, Resel M, Posch F, Lembeck AL, Stöger H et al. (2018): MiR-371a-3p serum levels are increased in recurrence of testicular germ cell tumor patients. *Int J Mol Sci* 19, 3130
- 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, Guo C, Skakkebaek NE, Armin MB, Idrees MT, Tickoo SK, Balzer B, Looijenga LHJ, Yilmaz A, Berney DM et al.: Germ cell tumours. In: Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (Hrsg.): *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs - Part A*. 4. Auflage; International Agency for Research of Cancer, Lyon 2016, 189-226
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012): Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40, e115
- Van Kessel AG, Stellink F, Janssen I, Schaap N (1999): Trisomy 12 resulting from isochromosomes of both 12p and 12q in a case of B-CLL. *Cancer Genet Cytogenet* 108, 85–86
- Verdorfer I (2014): Genetik der testikulären Keimzelltumoren. *Pathologe* 35, 218–223
- Verdorfer I, Rogatsch H, Tzankov A, Steiner H, Mikuz G (2004): Molecular cytogenetic analysis of human spermatocytic seminomas. *J Pathol* 204, 277–281
- Wehle D, Yonescu R, Long PP, Gala N, Epstein J, Griffin CA (2008): Fluorescence in situ hybridization of 12p in germ cell tumors using a bacterial artificial chromosome clone 12p probe on paraffin-embedded tissue: clinical test validation. *Cancer Genet Cytogenet* 183, 99–104
- Zafarana G, Grygalewicz B, Gillis AJM, Vissers LELM, van de Vliet W, van Gurp RJHLM, Stoop H, Debiec-Rychter M, Oosterhuis JW, van Kessel AG et al. (2003): 12p-amplicon

structure analysis in testicular germ cell tumors of adolescents and adults by array CGH.
Oncogene 22, 7695–7701

Lebenslauf

Mein Name ist Simon Filmar und ich wurde am 20.06.1994 in Holzminden geboren. Meine Mutter, Claudia Filmar geborene Fischer, und mein Vater, Bernd Josef Ulrich Filmar, arbeiten als Verwaltungsfachangestellte und Meister der Elektrotechnik. Nach dem Kindergarten besuchte ich die katholische Grundschule Albaxen von 2000 bis 2004. Mit der Empfehlung für die mittlere und gymnasiale Reife verließ ich die Grundschule und besuchte von 2005 das König-Wilhelm-Gymnasium in Höxter. Mit dem Erwerb des Abiturs und der allgemeinen Hochschulreife beendete ich die fortführende schulische Laufbahn 2013. Im Anschluss begann ich ein dreimonatiges Praktikum in der stationären Versorgung und Pflege von Patienten im AGAPLESION EVANGELISCHES KRANKENHAUS HOLZMINDEN gemeinnützige GmbH. Ich wollte Einsichten in die Arbeit von sozialen Berufen und im Besonderen von medizinischen Fachberufen gewinnen. Über die ausgeübten pflegerischen Tätigkeiten hinaus, die ich in dieser Zeit leistete, wuchs das Interesse für die Medizin und das Studium der Humanmedizin. Aufgrund des fortbestehenden Interesses für die Medizin und der sozialen Arbeit bewarb ich mich um einen Bundesfreiwilligendienst in der Versorgung und Pflege von stationären Patienten im selbigen Krankenhaus. Von 2013 bis 2014 durfte ich als Bundesfreiwilligendienstleistender eigenständig pflegerische Aufgaben in der stationären Krankenversorgung wahrnehmen. Dem Entschluss, durch die Arbeitserfahrung bestärkt, einen medizinischen Fachberuf zu ergreifen, folgte im Auswahlverfahren der Hochschulen die Zulassung für einen Studienplatz im Wintersemester 2014/2015 an der Georg-August-Universität in Göttingen. Seit dem Wintersemester 2014/2015 studiere ich im Fach der Humanmedizin an der Universitätsmedizin in Göttingen. Mit dem erfolgreichen Abschluss des ersten Staatsexamens beschloss ich den vorklinischen Abschnitt und begann den klinischen Abschnitt meines Studiums. Im Frühjahr 2020 konnte ich ebenfalls das zweite Staatsexamen erfolgreich ablegen. Während meines klinischen Abschnittes des Studiums begann ich im Oktober 2018 mit der Arbeit an meiner Dissertation. Im Juli 2019 hatte ich die Gelegenheit im Rahmen eines Posters meine Ergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Frankfurt vorzustellen. Im weiteren Verlauf des Jahres durfte ich zusätzlich einen Vortrag zu meinen Ergebnissen auf dem Symposium der Arbeitsgruppen urologischer Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Tübingen halten. Dieser Vortrag wurde mit dem Pathologie-Preis 2019 ausgezeichnet. Im Mai 2020 begann ich mein praktisches Jahr.