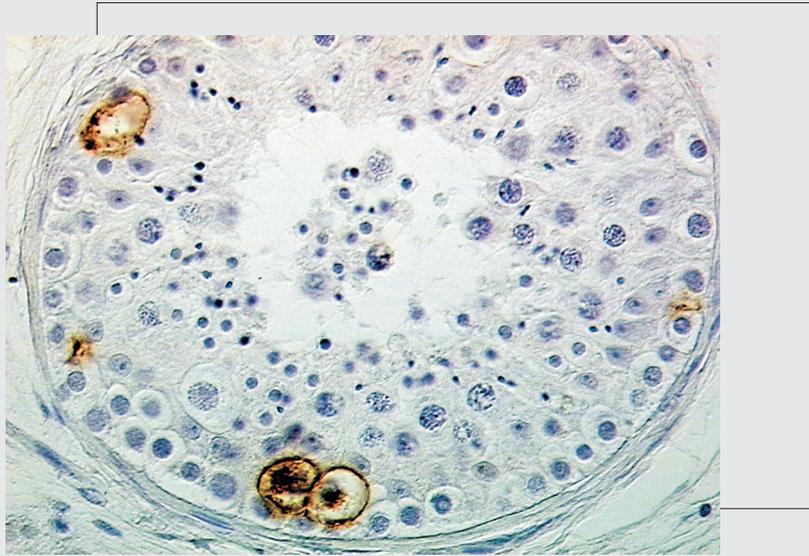


Immunhistochemische Untersuchungen über die Entwicklung vom testikulären Carcinoma in situ zum Seminom



**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Judith Cordula Elisabeth Donner

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-634-1

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer Prof. Dr. M. Bergmann

Immunhistochemische Untersuchungen über die Entwicklung
vom testikulären Carcinoma in situ zum Seminom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Judith Cordula Elisabeth Donner
Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2003

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Tag der mündlich Prüfung: 18.06.2003

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen bereits enthalten:

Donner J, Kliesch S, Brehm R, Bergmann M. From carcinoma in situ to testicular germ cell tumour. *Ann Anat Suppl.* 2002;184:205-206.

Donner J, Kliesch S, Brehm R, Bergmann M. From carcinoma in situ to testicular germ cell tumour. *APMIS*, in press

1. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT.....	1
1.1 CARCINOMA IN SITU	1
1.2 AUFBAU DES TUBULUS SEMINIFERUS	3
1.2.1 <i>Wand</i>	4
1.2.1.1 Basalmembran.....	4
1.2.1.2 Laminin	4
1.2.1.3 Integrine	6
1.2.1.4 Myofibroblasten	10
1.2.1.4.1 Actin	11
1.2.1.4.2 Myosin	12
1.2.2 <i>Keimepithel</i>	12
1.2.2.1 Intermediärfilamente	17
1.2.2.2 Cytokeratin.....	19
1.2.2.3 plazentale alkalische Phosphatase (PIAP)	20
2. AUFGABENSTELLUNG.....	22
3. MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1 MATERIAL	23
3.2 METHODEN.....	23
3.2.1 <i>Entnahme und Bearbeitung der Biopsien</i>	23
3.2.2 <i>Herstellung histologischer Schnittpräparate für die Immunhistochemie</i>	24
3.2.2.1 Beschichtung der Objektträger	24
3.2.2.2 Erstellung von Gefrierschnitten und deren Fixation.....	24
3.2.2.3 Erstellung von Paraffinschnitten und deren Fixation	24
3.2.2.4 Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE)	25
3.2.3 <i>Immunhistochemisches Nachweisverfahren</i>	26
3.2.3.1 Allgemeine Vorbemerkung	26
Abb. 9: Die indirekte ABC-Technik. (Erklärung im Text)	27
3.2.3.2 Antikörper	27
3.2.3.2.1 Primär-Antikörper.....	27
3.2.3.2.2 Sekundär-Antikörper.....	28
3.2.3.3 Färbeprotokolle	28
3.2.3.3.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte.....	28
3.2.3.3.2 PIAP-Färbung für Paraffinschnitte.....	29
3.2.3.3.3 PIAP-Färbung für Gefrierschnitte	30
3.2.3.3.4 Actin, Myosin, Laminin, Cytokeratin 18 und Vimentin	30
3.2.3.3.5 Integrin $\alpha 6$	30
3.2.3.3.6 Färbung der Schnitte und Eindeckeln	31
3.2.3.4 Auswertung der Immunreaktion und Fotografie	32
4. ERGEBNISSE	33
4.1 ALLGEMEINES ZUR ERFASSUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCH GEFÄRBTEN PARAFFIN- UND GEFRIERSCHNITTE	33
4.2 EINTEILUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE IN VERSCHIEDENE STADIEN	33
4.3 LOKALISATION UND VERTEILUNGSMUSTER DER REAKTION IM HISTOLOGISCHEN SCHNITT.....	34
4.4 HISTOLOGISCHE ABBILDUNGEN	36
5. DISKUSSION	50
5.1 LAMININ.....	50
5.2 INTEGRIN.....	54
5.3 BLUTGEFÄßE	57
5.4 ACTIN UND MYOSIN	58
5.5 CYTOKERATIN	60
5.6 CARCINOMA IN SITU BEI TIEREN.....	65
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	66
7. SUMMARY	68
8. LITERATURVERZEICHNIS	70

9. ANHANG	81
9.1 FIRMENVERZEICHNIS DER VERWENDETEN MATERIALIEN	81
9.2 BESCHICHTUNG VON OBJEKTTRÄGERN	81
9.2.1 Herstellung von Chromgelatine-Objektträgern für Gefrierschnitte	81
9.2.2 Beschichtung der Objektträger für Paraffinschnitte.....	82
9.3 VERWENDETE LÖSUNGEN	82
9.3.1 Bouin'sche Fixationslösung.....	82
9.3.2 Formalin nach Lillie	82
9.3.3 PBS (phosphate buffered saline).....	83
9.3.4 TRIS-Puffer	83
9.3.5 H ₂ O ₂	83
9.3.6 BSA-Stammlösung (Bovines Serumalbumin)	84
9.3.7 Citratpuffer	84
9.3.8 Proteinase.....	84
9.3.9 ELITE-ABC-Peroxidase-Gebrauchslösung.....	85

1. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1.1 Carcinoma in situ

Carcinoma in situ (CIS) im Hoden ist 1972 von Skakkebak erstmales beschrieben worden (Skakkebak 1972). Er berichtete von zwei infertilen Männern, die in den Biopsien atypische Spermatogonien aufwiesen und später Hodenkrebs entwickelten. Daraus postulierte er, dass Carcinoma in situ der nicht-invasive Vorläufer des Keimzelltumors sei. Carcinoma in situ heißt Karzinom „vor Ort“ und bedeutet bei der testikulären Malignität, dass sich atypische Keimzellen im Tubulus seminiferus befinden. Dieses Phänomen wird ebenfalls als intratubular germ cell neoplasia (IGCN), testicular intraepithelial neoplasia (TIN) oder auch gonocytoma in situ beschrieben. Heutzutage herrscht die allgemeine Übereinstimmung, dass allen testikulären Keimzelltumoren die Anwesenheit von CIS-Zellen vorausgeht, mit Ausnahme des infantilen Keimzelltumors und dem spermatocytischen Seminom, welches eher bei älteren Männern auftritt. Keimzelltumore werden in der Regel nach der WHO- oder der Britischen Klassifizierung eingeteilt (Rørth et al. 2000). In der hier vorliegenden Studie wird zwischen Seminom, welches das spermatocytische Seminom ausschließt, und Nichtseminom unterschieden. Letzteres beinhaltet das embryonale Karzinom, den Dottersacktumor, das Polyembryom, das Teratom sowie das Chorionkarzinom. Weiterhin gibt es noch die kombinierten Tumore, welche mehr als einen histologischen Typ mit einschließen, beispielsweise das Teratokarzinom. Das Seminom zeigt das höchste prozentuale Auftreten (40-50%) aller Keimzelltumore (Mikuz 2001).

Das Seminom wird weiter unterteilt in klassisches Seminom, Seminom mit syncytiotrophoblastischen Riesenzellen und spermatocytisches Seminom (Mikuz 2001).

In der hier vorliegenden Studie wurde das klassische Seminom untersucht, das histologisch heterogen ist. So einheitlich die Seminomzellen aussehen, so verschieden kann ihre Anordnung ausfallen. Ein Seminom kann diffus, blattartig, kribiform, trabekelförmig oder tubulär sein. Ein charakteristisches Merkmal ist das Auftreten lymphocytärer Infiltrate oder fremdkörperähnlicher Granulome (Takeshima et al. 1999).

Überdies ist angrenzend an Seminome in einzelnen Fällen von Strukturen berichtet worden, die aufgrund ihrer prominenten und ungewöhnlich soliden, tubulären Architektur als tubuläres Seminom bezeichnet werden (Young et al. 1989, Zavala-Pompa et al. 1994, Takeshima et al. 1999, Al Nazer und Al Dayel 2001).

Ultrastrukturell weisen CIS-Zellen eine große Ähnlichkeit mit Seminomzellen auf (Rørth et al. 2000). Die unterschiedlichen Bezeichnungen beruhen in erster Linie auf der Lokalisation der Zellen. Intratubulär lokalisierte Zellen, die in Nachbarschaft von Sertolizellen der Basalmembran anliegen, werden – wie der Name „in situ“ bereits erkennen läßt – als CIS-Zellen bezeichnet (Parkinson et al. 2001). Die klassischen Seminomzellen liegen außerhalb des Tubulus. Ist der Tubulus angefüllt mit atypischen Keimzellen, dann gilt dies bei einigen Autoren als tubuläres Seminom und die Zellen werden als Keimzelltumorzellen bezeichnet (Young et al. 1989, Zavala-Pompa et al. 1994, Takeshima et al. 1999, Al Nazer und Al Dayel 2001, Parkinson et al. 2001). Untersuchungen mit der Durchfluß-Cytometrie-Analyse haben bei dem intratubulären und dem klassischen Seminom die gleichen Ergebnisse hinsichtlich des DNA-Indexes ergeben. Dies kann darauf hin deuten, dass sich das tubuläre Seminom nur aufgrund des histologischen Bildes vom klassischen Typ unterscheidet (Zavala-Pompa et al. 1994).

Die geläufige Entstehungshypothese über die Abstammung der Keimzellneoplasien geht von einer Störung der fetalen Programmierung der gonadalen Entwicklung aus, vielleicht aufgrund einer intrauterinen Hormonimbalance, welche die Differenzierung der Keimzellen verzögert und sie für eine Transformation empfänglicher macht. Eine vermehrte hormonelle Stimulation kann entweder in der frühen Kindheit oder während der Pubertät zu weiterer maligner Progression führen (Rørth et al. 2000).

Innerhalb von fünf Jahren entwickelt sich bei 50% der CIS-Fälle ein invasiver Keimzelltumor, und langfristige Beobachtungen zeigen, dass in beinahe allen Fällen diese Neoplasie entsteht (Skakkebak et al. 1982).

Die testikuläre Neoplasie zählt zur häufigsten Krebserkrankung bei Männern im Alter von 20-45 Jahren (Roelofs et al. 1999). Je jünger der Patient, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass ein Nichtseminom entsteht; je älter der Patient, desto wahrscheinlicher entsteht ein Seminom (Skakkebak et al. 1998). Die Inzidenz des Keimzelltumors

ist bei Männern hoch, die Störungen in der gonadalen Entwicklung und geschlechtlichen Differenzierung vorweisen. Männer mit Trisomie 21, idiopathischer Infertilität oder niedrigem Geburtsgewicht weisen ebenfalls ein erhöhtes Risiko auf. Mittlerweile werden aber auch Umwelteinflüsse diskutiert, die auf genetisch vorbelastete Individuen treffen (Rajpert-De Meyts et al. 1998).

Die Mechanismen, welche dem Phänomen der Latenzzeit zwischen der malignen Transformation, der Proliferation und Progression der CIS-Zellen zu der invasiven Malignität unterliegen, sind nicht bekannt.

Die gängige, nicht nachgewiesene Theorie besagt, dass die neoplastischen Zellen die tubuläre Wand penetrieren, um sich im Interstitium auszubreiten (Schulze und Holstein 1977, Jacobsen und Talermann 1989, Holstein und Lauke 1996). Dies entspräche der „three-step hypothesis“ der Tumorinvasion, welche Liotta et al. 1983 aufstellten. Der erste Schritt hierbei ist die Anheftung der Tumorzelle an die extrazelluläre Matrix. Daraufhin erfolgt die enzymatische Degradierung der Matrix und der anschließende Austritt von Tumorzellen in das umliegende Gewebe (Liotta et al. 1983). Diese Art der Tumorinvasion trifft offensichtlich auf viele Neoplasien zu. Defekte in der Basalmembran werden beim Karzinom mit Invasion assoziiert (Barsky 1983). So auch beim invasiven Brustkarzinom, bei dem die Basalmembran durch Invasion neoplastischer Zellen zerstört wird (Barsky et al. 1983, Liotta et al. 1983, Henning et al. 1999). Allerdings gibt es bis zum heutigen Tage keine Veröffentlichung, in der dieses Phänomen im Falle des Hoden eindeutig bewiesen worden ist.

1.2 Aufbau des Tubulus seminiferus

Der Keimtubulus (Tubulus seminiferus) ist der Ort, in dem die männlichen Keimzellen gebildet werden. Sein Durchmesser beträgt ca. 180-280 μm . Er besteht aus einer Wand, der Lamina propria, und dem Keimepithel.

1.2.1 Wand

Die Lamina propria ist durchschnittlich 8-9 μm breit und setzt sich aus der Basalmembran und 3-5 inneren Lagen kontraktiler Myofibroblasten (Myocyten) sowie ein oder zwei äußeren Lagen von Fibroblasten zusammen, die in einem Gerüst von faserbildenden Proteinen eingebettet sind (Bustos-Obregón und Holstein 1973, De Kretser et al. 1975, Davidoff et al. 1990).

Bei den faserbildenden Proteinen unterscheidet man funktionell die Strukturproteine Kollagen und Elastin sowie die Anheftungsproteine Fibronectin und Laminin (Alberts et al. 1995). Die faserbildenden Proteine sind ihrerseits in ein hydratisiertes Gel aus Glycosaminoglykan-Ketten (GAG) verwoben und bilden so die extrazelluläre Matrix (ECM). Produziert wird diese von Sertolizellen und Myofibroblasten (Skinner et al. 1985, Raychoudhury et al. 1993, Thompson et al. 1995). Sie ist beteiligt bei Organogenese und Keimzellendifferenzierung, an Ausbildung und Aufrechterhaltung der phänotypischen Struktur der Sertolizellen, bei sekretorischen Funktionen sowie dem transepithelialen Transport (Hadley und Dym 1987, Dym 1994).

1.2.1.1 Basalmembran

Diese amorphe, azelluläre Schicht ist eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix und ca. 0,3-0,4 μm breit (De Kretser et al. 1975). Sie besteht hauptsächlich aus Laminin, Typ IV Collagen, Proteoglycanen, Nidogen und calcium-bindenden Proteinen (Timpl 1996). Sie trennt die Epithelzellen vom interstitiellen Stroma, reguliert Polarität, Metabolismus der Zellen und induziert deren Migration und Differenzierung (Alberts et al. 1995).

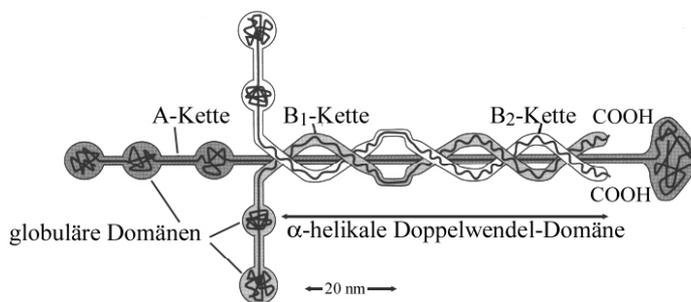
1.2.1.2 Laminin

Das erste Laminin wurde ursprünglich aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm-(EHS)-Tumor gewonnen (Tryggvason 1993). Es bestand aus einer A-Kette mit etwa 400 kDa, einer B1-Kette mit etwa 210 kDa und einer B2-Kette mit ca. 200 kDa (Dym 1994). Nach der Entdeckung weiterer Lamininisoformen führten Burgeson et al. (1994) eine neue Nomenklatur ein. Die Ketten werden heute mit α , β und γ bezeichnet. Die

neue Bezeichnung für das EHS-Laminin ist Laminin-1.

Das kreuzförmige Glycoprotein besteht aus einem sehr langen Arm, welcher sich aus drei spiralförmig verwobenen carboxyterminalen Polypeptidketten α , β und γ zusammensetzt und drei kurzen aminoterminalen Armen, welche durch die freien Enden der individuellen Ketten gebildet werden (Koch et al. 1999). Disulfidbrücken sorgen für den Zusammenhalt der einzelnen Ketten.

Abb. 1: Die schematische Struktur von Laminin (aus Alberts et al. 1995)



Durch Kombination einzelner Untereinheiten – bis heute sind 5 α -, 3 β - und 3 γ -Ketten bekannt (Koch et al. 1999) – entstehen verschiedene Isoformen: Laminin-1 bis -12, -14, -15 (Timpl 1996, Koch et al. 1999, Kikkawa et al. 2000, Libby et al. 2000).

Mit der globulären Domäne des langen Arms binden sich die Laminine an Zelloberflächenrezeptorproteine, wie z.B. Integrine, während sie sich mit den Seitenarmen netzförmig miteinander oder über Nidogen mit Collagen Typ IV oder anderen Matrixkomponenten der Basalmembran zusammenlagern (Miosge 2001). Zu den zahlreichen Aufgaben der Laminine zählen Stabilität und Formation der Basalmembran. Bei den Sertolizellen sind sie für die Aufrechterhaltung des säulenförmigen und polarisierten Phänotyps sowie bei der Verhinderung der Apoptose von Bedeutung (Virtanen et al. 1997). Sie regulieren die tight junctions zwischen den Sertolizellen und die Blut-Hodenschranke (Tung und Fritz 1993). Laminine und deren Rezeptoren spielen somit eine Rolle bei der Spermatogenese (Schaller et al. 1993). In vitro Studien haben gezeigt, dass Sertolizellen Laminin und Collagen Typ IV synthetisieren (Skinner et al. 1985).

Sie stimulieren Zelladhäsion, -differenzierung, -migration und -proliferation. Außerdem sind sie an Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt (Übersicht bei Dym 1994).

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit diesem Thema befasst, allerdings gibt es nur wenige, die sich mit dem Carcinoma in situ, beziehungsweise mit dem testikulären Keimzelltumor befassen. Schon seit einigen Jahren ist bekannt, dass manche Karzinomzellen die Fähigkeit besitzen, Laminin und andere extrazelluläre Matrixkomponenten zu synthetisieren und sezernieren (Albrechtsen et al. 1986).

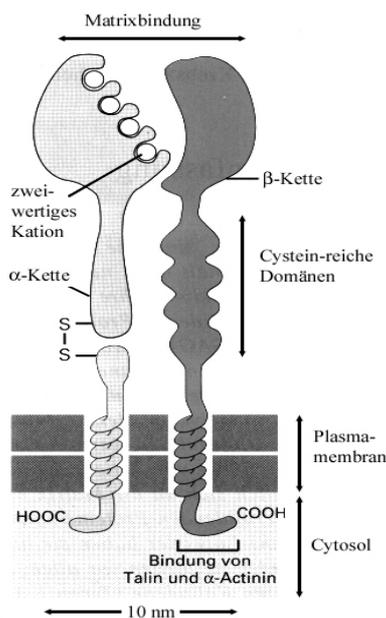
Laminin hat viele verschiedene aktive Bereiche in seinen Domänen, von denen einige den Metastasierungsprozess modulieren. An Melanomzelllinien der Maus wurde nachgewiesen, dass Laminin-1 ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$) die Adhäsion, Migration und Metastasierung von Tumorzellen steigert, während andere Peptide desselben Moleküls diese Metastasierung inhibieren (Kuratomi et al. 1999). Laminin-5 ($\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$) wird in zahlreichen Karzinomen, wie beispielsweise Colon, Mundhöhle, Bauchspeicheldrüse und Magen hochreguliert (Henning et al. 1999). Deswegen gilt es als wichtiger invasionsfördernder Faktor. Beim Mamma- sowie beim Prostatakarzinom jedoch ist Invasivität mit dem Verlust an Laminin-5 gekoppelt. Dies suggeriert einen anderen Invasionsmechanismus (Henning et al. 1999, Hao et al. 1996). Die $\alpha 5$ -Kette des Laminin-10 wird in Karzinomzelllinien der Lunge, Niere, Bauchspeicheldrüse und Colon exprimiert. Dadurch stellt sich die Frage, ob dies bei sämtlichen Karzinomzellen der Fall ist (Tani et al. 1999). Da Laminin-10 je nach Zelltyp über unterschiedliche Integrine ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$) anheftet, scheint der Adhäsionsmechanismus zelltypspezifisch zu sein (Tani et al. 1999, Kikkawa et al. 2000).

1.2.1.3 Integrine

Diese Transmembranproteine sind praktisch auf jedem Zelltyp zu finden. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Kette, die nicht kovalent gebunden sind. Die Heterodimere haben eine große, pilzförmige, extrazelluläre aminoterminalen Region, die von beiden Untereinheiten gebildet wird, zwei transmembrane Domänen und zwei kurze, cytoplasmatische, carboxyterminale Enden (Hughes und Pfaff 1998).

Die extrazelluläre Domäne bindet sich an Liganden der extrazellulären Matrix, wie Collagen, Laminin und Fibronectin oder an der Oberfläche anderer Zellen. So sorgt sie für Adhäsion zwischen Zelle und Substratum oder zwischen den Zellen untereinander. Im Zellinneren sind sie über Anheftungsproteine wie Talin und α -Actinin mit dem Actin-Cytoskelett verbunden. Vinculin hat actin-, talin- und α -actinin-bindende Seiten und stabilisiert die Verbindungen untereinander (Ben-Ze'ev 1997). Eine Ausnahme bildet das Integrin $\alpha 6\beta 4$, das in Hemidesmosomen vorkommt und an Intermediärfilamente gekoppelt ist (Quaranta und Jones 1991).

Abb. 2: Ingrinheterodimer (schematisch) als Matrix-Rezeptor, bestehend aus einer α - und β -Kette (aus Alberts et al. 1995)



Für die Bindung an den Liganden dienen spezielle Aminosäuresequenzen, die von den Integrinen erkannt werden. Ein Beispiel hierfür ist die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp), welche in Liganden wie Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Vitronectin, Laminin und Collagen Typ I nachgewiesen wurden (Ruoslathi und Pierschbacher 1987). Die Adhäsion ist bei der Mehrheit der Liganden von divalenten Kationen (v. a. Ca^{2+} , Mg^{2+}) abhängig, denn der extrazelluläre Teil der α -Kette enthält drei oder vier kationen-bindende Domänen (Longhurst und Jennings 1998).

Die Transmembranproteine binden ihre Liganden mit relativ geringer Affinität, liegen auf der Zelle aber in sehr hoher Konzentration vor (Alberts et al. 1995). Zellen können die Integrinfunktionen rapide ändern, indem sie die Affinität für den Liganden ändern. Integrine haben im inaktivierten Zustand eine geringe Affinität zu ihren Liganden. Werden sie jedoch durch entsprechende Signale aktiviert, zeigen sie eine hohe Bindungsaffinität. Diese Affinitätsmodulierung nennt man „inside-out signalling“. Sie wird wahrscheinlich über die cytoplasmatische Domäne vermittelt, welche auf intrazelluläre Ereignisse reagiert und somit Informationen aus der Zelle nach außen übermittelt. Bei den $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Integrinfamilien ist eine solche Aktivierung nachgewiesen. Das „inside-out signalling“ wird auf verschiedene, noch nicht restlos geklärte Wege erreicht.

Thrombin, Proteinkinasen und GTP-bindende Proteine aktivieren über „intracellular signalling pathways“ den Affinitätsstatus, während Cytoskelett-Proteine wie Talin, α -Actinin und Filamin oder Regulationsproteine wie Calreticulin, Paxilin, Integrin linked Kinase (ILK) sich direkt an die cytoplasmatische Domäne anlagern (Hughes und Pfaff 1998).

Durch Wechselwirkungen der Integrine untereinander, mit ihren Liganden oder anderen Rezeptoren, die sich zusammenlagern, können auch Signale ins Zellinnere übertragen werden. Diese Informationen werden ebenfalls über die cytoplasmatische Domäne vermittelt. Den Vorgang bezeichnet man als „outside-in signalling“. Diese Wechselwirkungen führen zu Veränderungen in der Organisation des Cytoskeletts, so dass die Transmembranproteine dadurch an zahlreichen Prozessen wie Zellmigration, Gewebeorganisation, Zellwachstum, Hämostasis, Entzündungen und Differenzierungen der einzelnen Zelltypen teilnehmen (Longhurst und Jennings 1998).

Mittlerweile sind 16 α und 8 β Integrin-Untereinheiten bekannt, welche sich zu 22 Isoformen zusammenlagern (Longhurst und Jennings 1998). Vom Integrin $\beta 1$ ist bekannt, dass es mit mindestens neun α Untereinheiten Dimere bilden kann (Alberts et al. 1995). Viele Matrixproteine werden von mehreren Integrinen erkannt. Allein neun verschiedene Integrine können als Lamininrezeptor fungieren. Die bekanntesten, die als Lamininrezeptor auf Karzinomzellen fungieren, sind hier $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ (Mercurio 1995).

Insbesondere das Integrin $\alpha 6\beta 4$ ist Gegenstand vieler Studien, die sich mit verschiedenen Karzinomen beschäftigen. Die Expressionsmuster fallen dabei sehr unterschiedlich aus. Während die Basalzellen der normalen Acini in der Prostata dieses Integrin exprimieren und es auch noch bei der intraepithelialen Neoplasie der Prostata beibehalten, ist es beim invasiven Karzinom nicht mehr nachzuweisen (Knox et al. 1994). Auf der anderen Seite ist beim Karzinom der Schilddrüse nachgewiesen, dass dieses Integrin im gesunden Gewebe zwar nicht exprimiert wird, dafür aber beim Karzinom auftritt (Serini et al. 1996). Im Plattenepithelkarzinom des Kopf und Halses geht eine Hochregulierung mit einem Polaritätsverlust einher (Wolf et al. 1990, Van Waes et al. 1991).

In Zelllinien primärer Mammakarzinome ist die mRNA- und Proteinexpression von Integrin $\alpha 6$ im Vergleich zum gesunden Gewebe deutlich reduziert (Sager et al. 1993). Die Ergebnisse von Juliano und Varner (1993) bestätigen dies und zeigen zusätzlich den Verlust von Integrin $\beta 1$ und $\beta 4$ an. In einer anderen Studie wird das Auftreten integrin- $\alpha 6$ -negativer, invasiver Mammakarzinome ebenfalls beobachtet, aber die aggressiveren Tumore sind integrin $\alpha 6$ positiv (Friedrichs et al. 1995). Darauf aufbauend zeigen Tagliabue et al. (1998), dass die Integrin $\alpha 6\beta 4$ Expressierung zwar unabhängig von dem Tumorgrad oder anderen prognostischen Faktoren zu sein scheint, allerdings trotzdem signifikant mit der höchsten Rückfall- und Todesrate assoziiert ist. Überdies ist in jener Studie gezeigt worden, dass Patienten mit Laminin-positiven, Integrin-negativen Mammatumoren die besten Perspektiven haben, während die schlechteste Prognose bei laminin- und integrin-positiven Tumoren gestellt wird. Eine Erklärung für die fehlende Aggressivität der Laminin-positiven und Integrin- $\alpha 6\beta 4$ -negativen Tumore wäre, dass sich die Adhäsionsmoleküle mit anderen Lamininrezeptoren verbinden, die Adhäsion statt Proliferation vermitteln. Diese Theorie ist deswegen plausibel, weil die Fähigkeit der Integrine an Laminin zu binden durch intrazelluläre Signale, einschließlich derer von Wachstumsfaktoren und aktivierten Onkogenen, geändert werden kann. Dies geschieht, in dem sie die Konformation der ligandenbindenden Integrindomänen verändern (Mercurio 1995).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Integrin $\alpha 6\beta 4$ bei der Tumorentwicklung nur mitwirkt, wenn es mit dem geeigneten Substrat (Laminin) interagieren kann. Dies würde die These unterstützen, dass Laminin eine aktive Rolle bei Tumorprogression einnimmt (Tagliabue et al. 1998).

Weitere Hinweise, dass Integrine an der Invasion beteiligt sind, liefern in vitro Versuche an $\beta 4$ -defekten Karzinomzelllinien aus Rektum und Brust. Diese zeigen nach Expression von Integrin $\alpha 6\beta 4$ eine erhöhte Invasivität (Chao et al. 1996). Am Integrin $\alpha v\beta 3$ ist nachgewiesen worden, dass es sich direkt an die Matrixmetalloproteinase (MMP-2) auf der Oberfläche invasiver Melanoma- und angiogenetischer Zellen bindet und somit Tumorzellen die Invasion durch das Abbauen der ECM bei gleichzeitiger Adhäsion erleichtern könnte (Brooks et al. 1996). Ein ähnlicher Mechanismus könnte eventuell auch für das Integrin $\alpha 6\beta 4$ zutreffen.

Der Integrin $\alpha 6 \beta 1$ Expressierung auf Karzinomzellen wird nachgesagt, dass es deren Adhäsion und Migration durch die Lamininmatrix erleichtert (Rabinovitz und Mercurio 1996). In der Lunge von Mäusen wird durch Inhibition des Rezeptors mit einem Antikörper gegen Integrin $\alpha 6$ das Metastasieren verhindert. Daraus wurde gefolgert, dass dieses Integrin zirkulierende Tumorzellen am vaskulären Endothel stoppen, den Kontakt zur endothelialen Basalmembran herstellen und den Zell-Zell-Kontakt am Zielort herstellen kann (Friedrichs et al. 1995, Ruiz et al. 1993).

1.2.1.4 Myofibroblasten

Myocyten oder Myofibroblasten sind in vielen Organen vorhanden, einschließlich der Lamina propria des Hodens. Wie der Name schon sagt, sind diese Zellen ein Intermedium aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Es handelt sich um kontraktile Zellen, welche die Mikrofilamente Actin und Myosin sowie Intermediärfilamente enthalten (Santamaria et al. 1992).

Zur Definition der Myofibroblasten zählen drei essentielle morphologische Elemente: (1) Stress-Fibres, welche für gewöhnlich unterhalb der Zellmembran lokalisiert sind, (2) Fibronexus, die Anheftungsstelle an der Zelloberfläche, an der intrazelluläre Myofilamente und extrazelluläre Fibronectinfilamente konvergieren, (3) interzelluläre intermediate und gap junctions. Weitere Charakteristika sind ein gut entwickeltes, rauhes endoplasmatisches Retikulum, ein Golgi-Apparat sowie ein spindelförmiger Zellkern (Schürch et al. 1998, Eyden 2001).

Im Unterschied zu glatten Muskelzellen zeigen die Myofibroblasten der Lamina propria einen geringeren Gehalt an GB-42 und Pan-Actin, dafür einen höheren an Vimentin (Holstein et al. 1996). Die peritubulären Zellen weisen einen unterschiedlichen Gehalt an Intermediärfilamenten auf. So sind in den epithelnahen Schichten Desmin, als muskelzelltypisches Protein, und Vimentin, charakteristisch für Fibroblasten, zu finden, während in den äußeren ein oder zwei Schichten lediglich Vimentin zu finden ist (Virtanen et al. 1986). Daraus läßt sich schließen, dass die äußeren Schichten ausschließlich von Fibroblasten gebildet werden (Davidoff et al. 1990). Das Cytoplasma der Zellenden teilt sich in ein oder zwei Fortsätze.

Die kontraktilen Zellen sind partielle Permeabilitätsbarrieren. Sie tragen so zur Erhaltung der Blut-Hodenschranke bei und sind verantwortlich für die Formation der Sertolizellen (Raychoudhury et al. 1993, Thompson et al. 1995, Maekawa et al. 1996). Zusammen mit den Sertolizellen sorgen sie für den intratubulären Druck, die Abgabe und den Transport der Spermien in das Rete testis (Konrad et al. 1998).

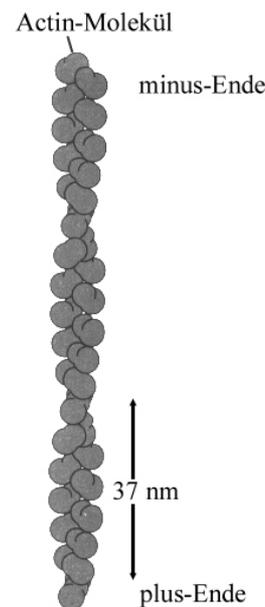
1.2.1.4.1 Actin

Das polymere F-Actin (filamentous actin) besteht aus einer eng gewundenen Helix aus gleich orientierten, monomeren G-Actinmolekülen (globular actin). Ein G-Actin wird von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ungefähr 42 kDa gebildet.

In Säugetierzellen werden wenigstens sechs verschiedene Actin-Typen exprimiert: zwei Nichtmuskel-Actine (β und γ), α -Actin des Herzmuskels, α -Actin der gestreiften Muskulatur und zwei Actine (α und γ) der glatten Muskulatur (Bershadsky und Vasiliev 1988). In den Myofibroblasten des Hodens ist eine Immunreaktivität auf γ -Actin der glatten Muskulatur, Pan-Actin, welches die Epitope sämtlicher Actine erkennt, und GB-42-Antigen, das mit dem γ -Actin der glatten Muskulatur verwandt oder sogar identisch ist, nachzuweisen (Kohnen et al. 1995).

Das Mikrofilament gehört zu den wesentlichen Bestandteilen des Cytoskeletts aller eukaryoten Zellen. Ob polymerisiert oder nicht, kann es mit vielen Proteinen interagieren. Diese Proteine nennt man Actin-bindende Proteine. Sie regulieren den Polymerisationsgrad von Actin und die Stabilität, Länge und Verteilung der Actinfilamente (Bershadsky und Vasiliev 1988). Die äußeren Schichten der Myofibroblasten enthalten Bündel von dicken und parallel angeordneten Actinfilamenten (Stress-Fibres), wohingegen im Cytoplasma der inneren Myofibroblasten feinstrukturierte Actinfilamente zu finden sind (Holstein et al. 1996).

Abb. 3: Actinfilament (schematisch), bestehend aus helikal angeordneten Actin-Molekülen (aus Alberts et al. 1995)

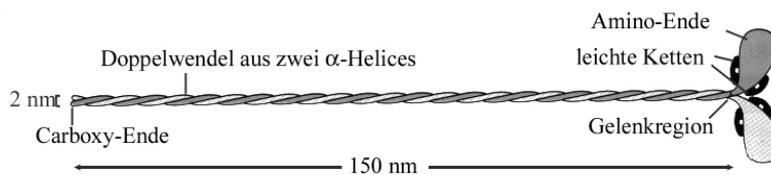


1.2.1.4.2 Myosin

Myosine zählen zu den Actin-bindenden Proteinen. Sie bilden eine große Familie mit relativ verschiedenen Proteinen. Elektronenmikroskopisch erkennt man einen langen Schwanz und zwei birnenförmige Köpfe. Ein Molekül besteht aus sechs Polypeptidketten, zwei schweren (ca. 200 kDa) und vier leichten (ca. 20 kDa). Die schweren Ketten formen mit dem aminoterminalen Teil den globulären Kopf, mit dem die leichten

Ketten assoziiert sind, während die carboxyterminale Hälfte als lange α -Helix vorliegt und den Schwanz bildet.

Abb. 4: Schematische Myosin-Molekül (aus Alberts et al. 1995)



Die zwei α -helikalen Abschnitte der schweren Ketten winden sich in einer Doppelwendel umeinander und bilden so ein stabiles Dimer (Alberts et al. 1995). Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten unterscheiden sich im fetalen Organismus von dem adulten. Die Myosine der schnellen und langsamen Skelettmuskeln, der Herzmuskeln, glatten Muskeln und der Nichtmuskelzellen differieren ebenfalls voneinander (Bershadsky und Vasiliev 1988).

Allen gemeinsam ist, dass sie an Actin binden und diese Bindung mit ATP-Verbrauch verbunden ist. Jeder der Myosinköpfe besitzt eine ATPase und ist bewegungsfähig. Wenn Myosine durch Bindung an Actinfilamente stimuliert werden, dann hydrolysieren sie ATP. Mit der durch diesen Vorgang gewonnenen Energie bewegen sich die Myosinmoleküle an den Actinfilamenten entlang. Dies kann zu der Bewegung der Actin-Mikrofilamente führen und ist somit molekulare Grundlage für die verschiedenen Arten der Bewegung.

1.2.2 Keimepithel

Das auf der Basalmembran liegende Keimepithel enthält die somatischen Sertolizellen und die Keimzellen. Die auf der Basalmembran fußenden Sertolizellen umgeben mit ihren charakteristischen, cytoplasmatischen Fortsätzen sämtliche Keimzellstadien und ragen bis ins Tubuluslumen hinein. Deswegen werden sie auch als Stützgerüst des Keimepithels angesehen (Weinbauer et al. 1996). Die Funktionen der Sertolizellen sind

vielseitig: Ausbildung der Blut-Hodenschranke (BHS), Ernährungsfunktion, Phagozytose und endokrine Funktionen.

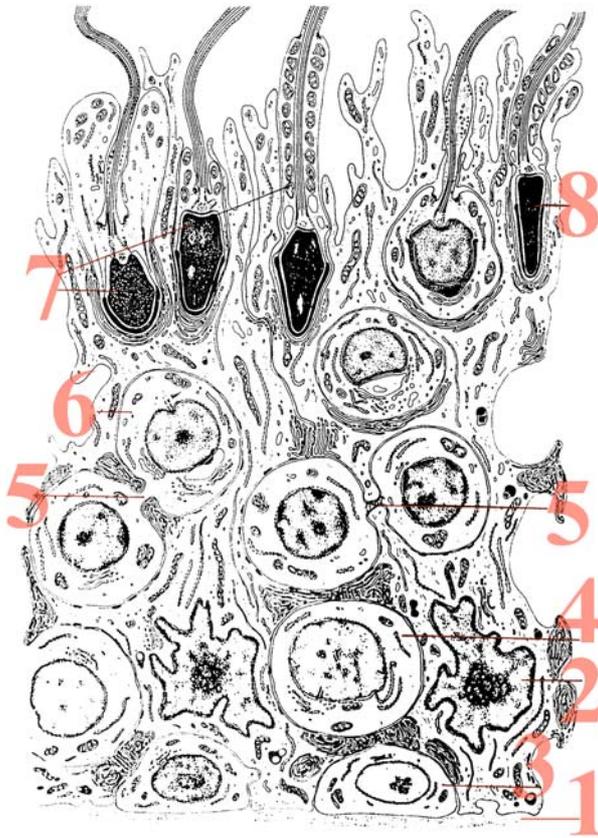


Abb. 5: Keimepithel des Menschen (modifiziert aus Sinowatz 1999)

Legende: 1 Basalmembran; 2 Sertolizelle; 3 Spermatogonie; 4 Spermatozyte I. Ordnung; 5 Interzellularbrücke; 6 Spermatische in der Golgi-Phase; 7 verschiedene Differenzierungsstufen auf dem Weg von der elongierten Spermatische zur Samenzelle (8).

Die Ausbildung der BHS trifft zeitlich mit dem Beginn der ersten Meiose der Keimzellen und dem Proliferationsarrest der Sertolizellen zusammen (Weinbauer et al. 1996). Mit den Interzellularkontakten, die aus tight, gap und adherent junctions bestehen, bilden Sertolizellen die Blut-Hodenschranke und unterteilen somit das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment (Pelletier und Byers 1992). Im basalen Kompartiment befinden sich die Spermatoγονien und die präleptotänen Spermatozyten I, während im adluminalen Teil die weiter fortgeschrittenen meiotischen Stadien der Spermatozyten und deren nachfolgenden Reifestadien ihren Platz haben. Diese effektive Diffusionsbarriere schützt die adluminal gelegenen Keimzellstadien vor

schädlichen Einflüssen und außerdem vor der körpereigenen Abwehr. Im Verlauf der Spermiogenese treten an den Zellmembranen der Keimzellen neue Antigene auf, die eine Autoimmunorchitis hervorrufen könnten.

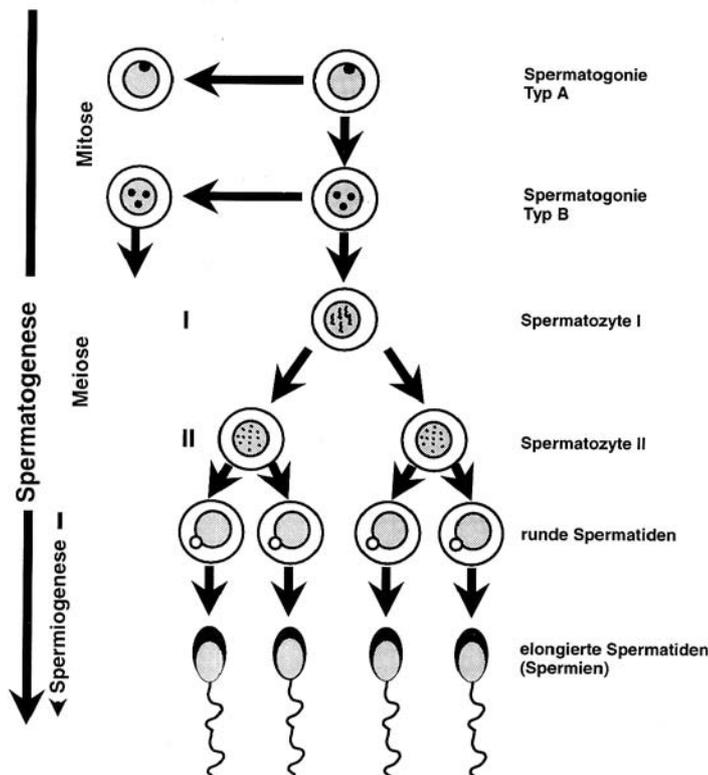
Sertolizellen erzeugen eine intratubuläre Flüssigkeit, die ein spezielles, metabolisches Mikromillieu für die Entwicklung der Keimzellen bildet und überdies für die Bildung des Tubuluslumen verantwortlich ist.

Die Versorgung der adluminal gelegenen Keimzellen wird durch selektiven Transport oder Eigensynthese und vektorieller Sekretion gewährleistet, da freie Diffusion sämtlicher Moleküle nicht mehr möglich ist (Bergmann 1998). Durch Phagozytose beseitigen

Sertolizellen den Residualkörper reifer Spermatisiden, sowie nicht freigesetzte Spermatozoen.

In den Sertolizellen werden eine Reihe von Substanzen synthetisiert und sezerniert; unter anderem das androgenbindende Protein, die Wachstumsfaktoren Inhibin und Activin

Abb. 6: Schematische Darstellung der Spermatogenese (modifiziert nach Bergmann 1998)



sowie der Plasminogenaktivator (Weinbauer et al. 1996).

Mit der Geschlechtsreife setzt in den Tubuli seminiferi die zyklisch ablaufende Spermatogenese ein. Durch mitotische Teilung vermehren sich die Spermatogonien, die alle in Kontakt zur Basalmembran stehen.

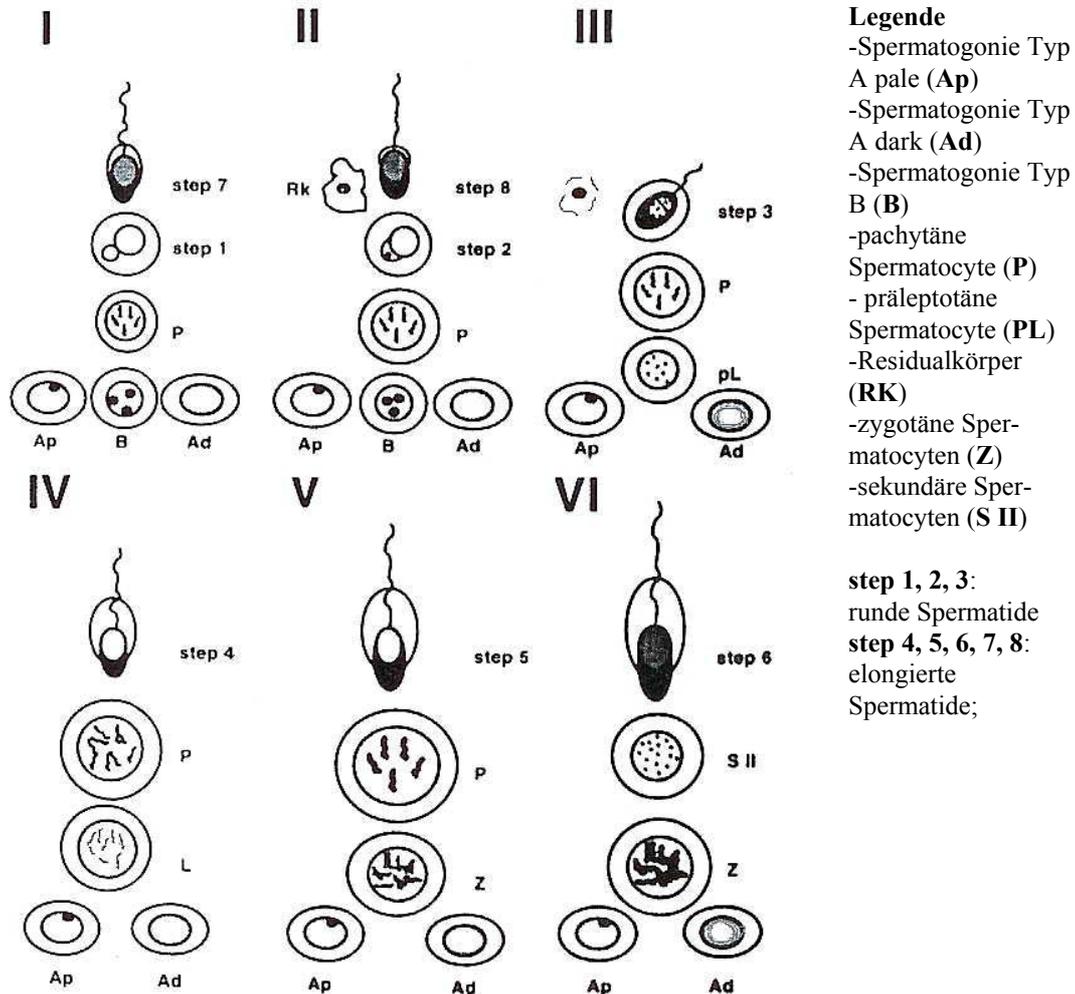
Bei den Spermatogonien unterscheidet man nach Typ A und B (siehe Abb.

6). Bei den Spermatogonien Typ A differenziert man – aus morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten – weiter in A „dark“-Spermatogonien, welche unter normalen Umständen nicht mehr proliferieren und Stammzelleigenschaften haben, und in A „pale“-Spermatogonien. Letztere differenzieren sich zu den Spermatogonien Typ B, aus denen die präleptotänen Spermatozyten hervorgehen, die sich von der Basalmembran ablösen. Dies ist der erste Schritt in die Meiose I, welche mit der DNA Reduplikation (Präleptotän) in der Prophase beginnt. Die tetraploiden Keimzellen durchlaufen die Prophase, in der es zur Paarbildung mit anschließendem Austausch des genetischen Materials zwischen den homologen Chromosomen kommt. Am Ende dieser Phase sind die Chromosome wieder getrennt, und die Kernmembran hat sich aufgelöst. Nach der sich anschließenden Metaphase, Anaphase und Telophase ist die erste Reifeteilung abgeschlossen mit dem Resultat zweier Tochterzellen, der sekundären

Spermatocyten. Diese Keimzellen enthalten einen haploiden Chromosomensatz, jedoch in doppelter Ausführung. Aus der zweiten Reifeteilung entstehen die haploiden Spermatiden, welche teilungsinaktiv sind. Diese runden Zellen differenzieren sich zum fertigen Spermium (Spermatozoon) in der so genannten Spermiogenese. Diese wird in vier Phasen unterteilt: Golgiphase, Kappenphase, Akrosomenphase und Reifungsphase. Hierbei kommt es zur Kondensation des Zellkerns, der Akrosombildung und Ausbildung einer Geißel.

Die Spermatogonien sind über Interzellularbrücken miteinander verbunden. Diese lösen sich erst während der Spermatidenreifung auf. Die Klonbildung sorgt für eine weitgehend synchrone Entwicklung. Bei der anschließenden Spermiation wird die elongierte Spermatide in das Tubuluslumen abgegeben (Weinbauer et al. 1996). Die Spermatidenreifung lässt sich beim Menschen anhand charakteristischer Merkmale in sechs Stadien unterteilen (siehe Abb.7).

Abb. 7: Organisation des Keimepithels (modifiziert nach Bergmann 1998)



Stadium I beginnt mit der Golgiphase der runden Spermatisde. Da hierbei die Entwicklung der vorherigen Spermatisdengeneration noch nicht abgeschlossen ist, kann man in diesem Stadium zwei Spermatisdentypen beobachten (step 1, step 7). Im Stadium II, in dem adluminal ebenfalls noch zwei Generationen übereinander existieren (step 2, step 8), wird der Residualekörper (abgeschnürter Cytoplasmarest) der Spermatisde sichtbar. Nach der Freisetzung der reifen Spermatisde beginnt sich die nächste Generation zu entwickeln: die Spermatogonie Typ B tritt in die Meiose ein. Die zweite Reifeteilung erfolgt im Stadium VI, und ein neuer Zyklus beginnt mit dem Stadium I. Beim Menschen dauert ein Spermatogenesezyklus (Stadium I bis VI) 16 Tage. Damit sich aus einer Spermatogonie ein Spermium entwickeln kann, muss es den Zyklus ca. 4,6 mal durchlaufen, so dass für diesen Vorgang 74 Tage benötigt werden. Zählt man den Weg durch den Nebenhoden hinzu, dann ergeben sich vom Beginn der Spermatogenese bis zum

Auftreten des Spermiums im Ejakulat 86 Tage. Da die Stadien der Spermatogenese spiralförmig in der Längsachse eines Tubulus angeordnet sind, kann man in einem Tubulusquerschnitt meist verschiedene Stadien gleichzeitig beobachten (Bergmann 1998).

1.2.2.1 Intermediärfilamente

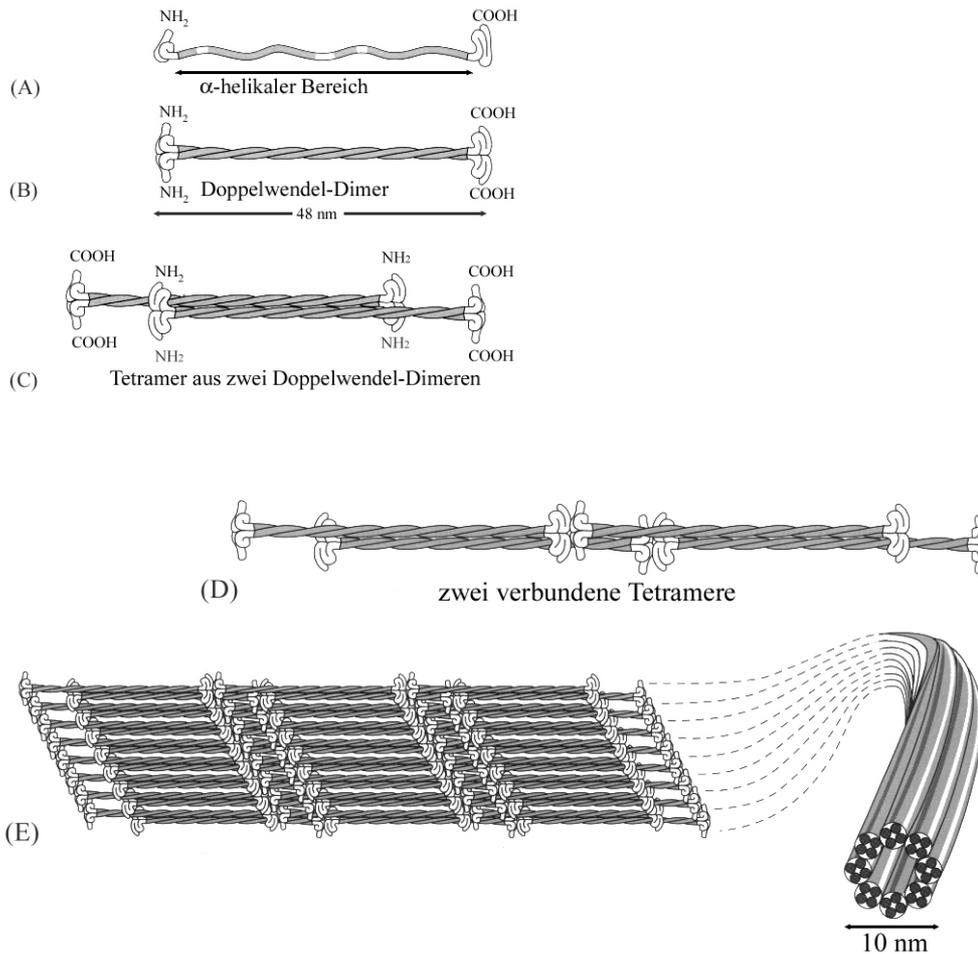
Alle Säugetierzellen enthalten ein komplexes intracytoplasmatisches Cytoskelett, das drei Hauptelemente beinhaltet: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (IF). Mikrotubuli ähneln hohlen Zylindern, die aus 13 Protofilamenten bestehen. Letztere werden durch linear angeordnete Tubulinmoleküle geformt, wobei jedes Molekül aus einer α - und β -Untereinheit gebildet wird.

Die Intermediärfilamente kann man immunologisch und biochemisch in fünf verschiedene Gruppen unterteilen: Keratinfilamente, Desminfilamente, Vimentinfilamente, Gliafilamente und Neurofilamente. Filamente aus keratinartigen Proteinen (Cytokeratine) sind charakteristisch für epitheliale Zellen. Vimentinfilamente kommen in Zellen mesenchymalen Ursprungs, Desminfilamente in den meisten Arten myogener Zellen vor, während Gliafilamente in Astrozyten und Neurofilamente in Nervenzellen zu finden sind (Lazarides 1980).

Zu den Intermediärfilamenten, die in humanen Sertolizellen zu finden sind, zählen Vimentin, Cytokeratin 8 und 18 sowie Desmin (Ramaekers et al. 1983, Stosiek et al. 1990, Rogatsch et al. 1996). Während Vimentin in allen physiologischen Stadien der Sertolizelle zu finden ist, treten die restlichen Intermediärfilamente nur in den fetalen, undifferenzierten Sertolizellen auf (Stosiek et al. 1990, Rogatsch et al. 1996).

Sie sind dort normalerweise um den Zellkern versammelt und formen ein korbähnliches Netzwerk. Von der perinukleären Gegend reichen sie bis an die Zellmembran, mit der sie entweder direkt oder über intermediärfilament-assoziierte Proteine in Wechselwirkung treten (Aumüller et al. 1992). Diese Verbindung könnte neben der verankernden Funktion, Auswirkungen auf die Organisation des Cytoplasmas, der zellulären Kommunikation und eventuell auf den Informationstransport in den Nukleus und darüber hinaus haben (Chu und Weiss 2002).

Abb. 8: Schematisches Modell für den Aufbau der Intermediärfilamente
(Modifiziert nach Alberts et al. 1995)



(A) Monomer, (B) Dimer aus zwei gepaarten Monomeren, (C) antiparalleles Tetramer aus vier Polypeptidketten, (D) zwei versetzt zueinander angeordnete Tetramere, (E) seilartiges Intermediärfilament bestehend aus Tetrameren, die in Spiralanordnung zusammengelagert sind.

Die langen Faserproteine bestehen aus einem aminoterminalen Kopf und einem carboxyterminalen Schwanz. Der Körper wird von einer stabförmigen Domäne gebildet, die aus einer lang gestreckten α -Helix mit langen Tandem-Wiederholungen eines ganz bestimmten Aminosäuren-Sequenzmotivs besteht. Diese Sequenz wird von sieben Aminosäuren gebildet. Die monomeren Ketten assoziieren parallel und axial, um ein stabförmiges Dimer zu bilden. Zwei Dimere verbinden sich anti-parallel und formen so das Keratin-Tetramer. Diese Tetramere verbinden sich Kopf-an-Schwanz untereinander, um lineare Protofilamente zu bilden. Zwei Protofilamente verflechten sich zu einer Protofibrille, welche sich ihrerseits mit drei weiteren ihrer Art verflechtet und so die 10 nm breiten Filamente bildet (Alberts et al. 1995, Chu und Weiss 2002).

1.2.2.2 Cytokeratin

Keratine bilden die größte und vielfältigste Untereinheit: bis heute sind 20 verschiedene bekannt. Basierend auf dem Molekulargewicht unterteilt man sie in niedrige und hohe Molekularklassen oder – aus Sicht des isoelektrischen Punktes – in saure und basische Formen. Die größeren und eher basischen Keratine bilden die Gruppe II der Keratine (K1 – K8), während die Gruppe I die Keratine 9 – 20 enthält, welche ein geringeres Molekulargewicht aufweisen und dem sauren Typ zugeordnet werden. In der Regel paaren sich die meisten niedrigen Molekularuntereinheiten mit denen der höheren Klasse zu heteropolymeren Keratinfilamenten. Die Expression ändert sich je nach Epitheltyp, der Differenzierung und dem Entwicklungsstadium. Der Antikörper gegen Cytokeratin 18, der in dieser Studie untersucht wird, paart sich mit dem Cytokeratin 8. Dieses Cytokeratinpaar ist ausschließlich in den einschichtigen Epithelien, wie z.B. in den Sertolizellen des Tubulus seminiferus, nachweisbar. Sein Molekulargewicht beträgt 45 kDa (Moll et al. 1982, Chu und Weiss 2002).

Physiologischerweise ist Cytokeratin 18 im fetalen Hoden nachzuweisen (Stosiek et al. 1990). Fetale Sertolizellen sind hinsichtlich ihrer Funktion und histologischen Erscheinung noch nicht voll differenziert. Erst in der präpubertären Phase lassen sich Sertolizellen deutlich von Keimzellen unterscheiden. Hauptcharakteristika dieser Differenzierung sind die basale Lokalisation, Invaginationen des elongierten Zellkerns und der Zellmembran. Das Intermediärfilament lässt sich zu diesem Zeitpunkt und bei murenen Sertolizellen nicht mehr nachweisen. Es tritt physiologischerweise erst wieder bei senilen Hoden auf (Stosiek et al. 1990, Rogatsch et al. 1996).

Es ist bereits bekannt, dass Cytokeratin 18 von Sertolizellen in CIS-infiltrierten Tubuli exprimiert wird (Soosay et al. 1991, Kliesch et al. 1998). Diese Reexpression ist überdies bei infertilen und kryptorchiden, adulten Männern, die mit Spermatogenesearestart, Atrophie oder Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCO-Syndrom) einhergehen, beschrieben worden (Miettinen et al. 1985, Bergmann und Kliesch 1994, Steger et al. 1996, Rogatsch et al. 1996). Da man bis heute nicht weiß, ob die Cytokeratinexpression eine Aufrechterhaltung oder Wiedererlangung des undifferenzierten, unreifen Status ist, spricht man von der Dedifferenzierung der Sertolizelle (Miettinen et al. 1985, Stosiek et al. 1990, Aumüller et al. 1992, Bergmann und Kliesch 1994).

Neben der Reexpression des Intermediärfilamentes zeigt diese Zelle weitere morphologische Ähnlichkeiten mit der fetalen oder infantilen Zelle. Die Zellen runden sich ab und werden flacher. Sie verlieren ihre Indentationen, der Zellkern wird rund bis ovoid. Statt der „inter Sertoli cell junctional contacts“ treten Punkt-Desmosomen auf, die mit den Intermediärfilamenten verbunden sind (Bergmann und Kliesch 1994).

1.2.2.3 plazentale alkalische Phosphatase (PIAP)

Die humane alkalische Phosphatase wird von einem nicht-gewebespezifischen (tissue-non-specific alkaline phosphatase, TNAP) Gen und drei gewebespezifischen alkalischen Phosphatase-Genen enkodiert. Zu den gewebespezifischen Genen gehören die intestinale (IAP), plazentale (PIAP) und die keimzellspezifische (germ-cell-specific, GCAP) alkalische Phosphatase. PIAP und GCAP sind zu 98% identisch, deswegen kann man sie im Gegensatz zu den beiden anderen Isozymen mit immunhistochemischen Methoden nicht unterscheiden (Roelofs et al. 1999).

Obwohl frühe Keimzellen und CIS-Zellen charakteristische Ähnlichkeiten aufweisen, lassen sie sich lichtmikroskopisch differenzieren. Der Zelldiameter der CIS-Zellen ist größer, außerdem sind die Nukleoli deutlicher und oft multipel. Auch der DNS-Gehalt ist unterschiedlich. Das Cytoplasma wirkt klar, da durch den Fixationsprozess das Glykogen ausgewaschen wird. Insgesamt ist der Diameter der Tubuli mit CIS-Zellen gewöhnlich verkleinert und zeigt eine verdickte Basalmembran (Rørth et al. 2000). Die Expression derselben Marker bestätigt allerdings die Abstammungstheorie der CIS-Zellen von den fetalen Keimzellen. Zu diesen zählen PIAP, c-kit Protein, TRA-1-60 und M2A, welche in normalen, adulten Hoden nicht exprimiert werden (Jørgensen et al. 1995).

PIAP wird nicht nur bei CIS, sondern auch im Seminom und embryonalen Karzinom von den atypischen Keimzellen exprimiert (Jacobsen und Nørgaard-Pedersen 1984; Hustin et al. 1987). Deswegen kann man den Antikörper gegen das membrangebundene Enzym als frühe Diagnose bei Keimzelltumoren einsetzen. Die biologische Bedeutung der starken PIAP-Expression in CIS-Zellen bleibt zu klären (Rørth et al. 2000). Untersuchungen mit der reversen-transkriptasen Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) haben

ergeben, dass CIS und Seminome vorwiegend GCAP exprimieren, während in embryonalen Karzinomen die Expression von PLAP und GCAP variiert. Diese Methode kann aber nicht zur Früherkennung von Keimzellumoren herangezogen werden, weil sie auch im normalen Gewebe alkalische Phosphatase-Transkripte erkennt (Roelofs et al. 1999).

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Studie war es, mit immunhistochemischen Methoden die Entwicklung vom Carcinoma in situ zum Seminom zu untersuchen, um Einsicht in den Ausbreitungsmechanismus zu erlangen. Da nach dem oben erwähnten, postulierten Invasionsmechanismus nach Liotta (Liotta et al. 1983) die Basalmembran von der Tumorzelle überwunden werden muss und dies vermutlich mit Defekten einhergeht (Barsky et al. 1983), wurde genaues Augenmerk auf die Tubuluswand mit Carcinoma in situ gerichtet. Die Myofibroblasten der Lamina propria wurden mit Antikörpern gegen Actin und Myosin auf ihre Funktionalität untersucht. Die Basalmembran wurde mit den Antikörpern gegen Integrin $\alpha 6$ und Laminin dargestellt, die beide über die morphologische Darstellung hinaus zusätzlich im Tumorgeschehen eine Rolle zu spielen scheinen.

Bei Auswahl der Präparate fielen Areale angrenzend an Carcinoma in situ oder Semineome auf, die Tumorzellansammlungen zeigten, welche von bindegewebigen Septen umschlossen waren. Diese intratubuläre Neoplasien ähnelten vergrößerten Tubuli, die in einem Übergangsstadium zum Seminom zu sein schienen.

Daher drängte sich die Frage auf, ob CIS-Zellen tatsächlich die Wand penetrieren oder ob sie nicht innerhalb des Tubulus proliferieren, bis dieser zugrunde geht. Um diese Theorie näher zu erleuchten, wurden die Zellen innerhalb der Tubuli seminiferi untersucht. Die CIS-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen die plazentale alkalische Phosphatase (PIAP) angefärbt. Für die Darstellung der Sertolizellen fand ein Antikörper gegen Cytokeratin 18 Anwendung, von dem bekannt ist, dass er Sertolizellen in Anwesenheit von CIS markiert. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen Vimentin eingesetzt, der Sertolizellen in gesundem Epithel und bei CIS markiert.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Untersucht wurden 37 Biopsien, die von 25 Patienten aufgrund des Verdachtes auf Hodenkrebs beziehungsweise Carcinoma in situ entnommen worden waren. Das Alter dieser Patienten lag zwischen 20 und 54 Jahren bei einem Durchschnittsalter von 31,72 Jahren. Es standen mehrere Biopsien pro Patient zur Verfügung, da in der Regel zur Diagnosesicherheit pro Patient mehrere Biopsien an verschiedenen Stellen entnommen wurden.

Die Probenentnahme erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Urologie der westfälischen Wilhelms-Universität Münster, die histologische Beurteilung und Befunderhebung wurde in der Veterinäranatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgenommen. Als Kontrollgewebe dienten Biopsien von Patienten, die wegen Prostatakarzinomen operiert worden waren und die qualitativ wie quantitativ eine intakte, normale Spermatogenese zeigten.

3.2 Methoden

3.2.1 Entnahme und Bearbeitung der Biopsien

Nach einem ca. 2 cm langen Skrotalschnitt wurde die Tunica albuginea am dorsalen Hodenpol mit einer ca. 1 cm langen Incision eröffnet. Mit einer gebogenen Schere wurde eine etwa reiskorngroße Gewebeprobe abgetrennt, auf eine sterile Oberfläche verbracht und anschließend mit einem Skalpell halbiert. Eine Hälfte der Probe wurde in Bouin'sche Fixationslösung verbracht, die andere Hälfte in einem sterilen Röhrchen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C zwischenzulagern. Nach Zurückverlagerung des Hodens in das Skrotum erfolgte der Wundverschluss.

3.2.2 Herstellung histologischer Schnittpräparate für die Immunhistochemie

3.2.2.1 Beschichtung der Objektträger

Für eine bessere Haftfähigkeit wurden die Glasobjektträger vor der Verwendung beschichtet. Die Gefrierschnitte wurden mit Chrom-Alaun-Gelatine, die Paraffinschnitte hingegen mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTEX) beschichtet.

3.2.2.2 Erstellung von Gefrierschnitten und deren Fixation

Die Biopsien wurden mit Tissue-Tek[®]-Gewebekleber ummantelt, um sie auf dem Objektisch des Kryostat der Firma Reichert und Jung (2800 Frigocut) fixieren zu können. Bei einer Temperatur von -20°C wurden 12 µm dicke histologische Präparate mit dem Gefriermikrotom unter Verwendung eines Anti-Rollplättchens hergestellt. Durch einfaches Berühren des Messers mit dem raumtemperaturwarmen Objektträger wurden die Schnitte auf denselben übertragen. Nach einer Trocknungszeit von ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte entweder mit Aceton-Methanol oder mit Formalin nach Lillie (neutral gepuffertes Formol) fixiert.

3.2.2.3 Erstellung von Paraffinschnitten und deren Fixation

Nach einem Aufenthalt von 24 Stunden in der Bouin'schen Fixationslösung wurde das Gewebe fünf Tage lang täglich in frischem 70%igen Alkohol gespült. Anschließend wurde jede einzelne Probe in ein kleines Plastikbiopsiekörbchen (3 x 2 x 2 cm) eingebettet und mit der Entwässerungsmaschine (Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1050) der Firma Leica, Bensheim, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol vermischt und Paraffin durchtränkt.

Diese Maschine entwässert und erhärtet das Gewebe schrittweise nach folgendem Schema:

- 2 h Ethanol 80%
- 2 h Ethanol 96%
- 3 h Ethanol 100%
- 3 h Ethanol 100%
- 3 h Ethanol 100%

- 1 h Xylol
- 45 Minuten Xylol
- 45 Minuten Xylol
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C

Die schneidbaren Gewebelöcke wurden anschließend zum Einbetten in Paraffin in das Einbettgerät Leica EG 1160 der Firma Leica, Bensheim, verbracht. In dieser Prozedur wurden die Proben in Stahlförmchen (3 x 2 x 2 cm) gelegt und mit 60°C warmen Paraffin übergossen. Die anschließende Härtung und Abkühlung erfolgte auf der Kühlplatte des Gerätes.

Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms (Leica SM 2000 R) der Firma Leica, Bensheim, wurden 5 µm dicke Serienschnitte erstellt, welche zur Streckung in ein 37°C warmes Wasserbad verbracht wurden. Das geschnittene Gewebe wurde auf einen beschichteten Objektträger überführt und zum Trocknen über Nacht in einen 37°C warmen Trockenschrank der Firma Memmert, Schwalbach, gestellt.

3.2.2.4 Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Eine HE-Färbung wurde bei allen Paraffinpräparaten vor der Immunhistochemie durchgeführt, um eine Übersicht über Histologie und die Erhaltung des jeweiligen Präparates zu erlangen. Mit dieser Färbung werden die Zellkerne durch das Haematoxylin blau, das restliche Gewebe durch das Eosin rot angefärbt.

Färbeprotokoll:

- 3 x 10 Minuten Xylol
- 2 x 5 Minuten Ethanol 100%
- 5 Minuten Ethanol 96%
- 5 Minuten Ethanol 80%
- 5 Minuten Ethanol 70%
- 5 Minuten Ethanol 50%
- 5 Minuten Aqua dest.

- 7 Minuten in Haematoxylin spülen
- mindestens 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen
- 7 Minuten Eosin 1%
- 1 Minute Leitungswasser
- 1 Minute Ethanol 70%
- 2 Minuten Ethanol 80%
- 2 x 2 Minuten Ethanol 96%
- 3 x 2 Minuten Ethanol 100%
- 3 x 10 Minuten Xylol

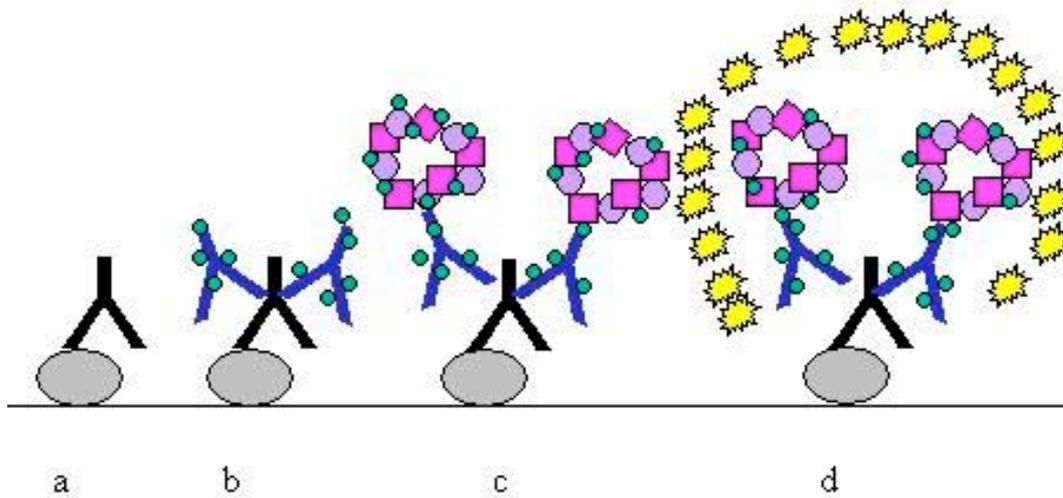
Die Schnitte wurden mit Vitro-Clud eingedeckelt.

3.2.3 Immunhistochemisches Nachweisverfahren

3.2.3.1 Allgemeine Vorbemerkung

Bei der Immunhistochemie färbt man mit spezifischen Antikörpern die entsprechenden antigenen Strukturen im Gewebe an, um sie zu lokalisieren. In dieser Studie fand hierbei die indirekte Methode des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) Anwendung (siehe Abb. 9). Die Methode wird deshalb als „indirekt“ bezeichnet, da ein biotinylierter Sekundär-Antikörper zwischen Primär-Antikörper und dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex geschoben wird, um die Reaktion zu verstärken. Das Antigen (graue Ellipse) wird zuerst durch einen unmarkierten Primär-Antikörper (schwarzes Ypsilon) gebunden (a). Dieser wird dann durch einen biotinylierten Sekundär-Antikörper (blaues Ypsilon, grüne Punkte: Biotin) nachgewiesen, welcher gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist (b). Danach folgt ein vorgeformter Avidin-Biotin-Enzymkomplex (lila Kreise: Enzym, pinkes Quadrat: Avidin, grüne Punkte: Biotin) (c). Mit der Substrat-Chromogenreaktion (gelbe Sterne) erfolgt die Sichtbarmachung (d).

Abb. 9: Die indirekte ABC-Technik. (Erklärung im Text)



3.2.3.2 Antikörper

3.2.3.2.1 Primär-Antikörper

Die monoklonalen Antikörper sind in der Tabelle 1 mit der jeweiligen optimalen Verdünnung aufgelistet. Zur Darstellung von CIS-Zellen fand ein Antikörper gegen die placentale alkalische Phosphatase (PIAP) Anwendung. Die Basalmembran des Tubulus seminiferus wurde mit Antikörpern gegen Integrin $\alpha 6$ und Laminin angefärbt. Da der Antikörper gegen Integrin $\alpha 6$ nicht paraffingängig ist, musste in diesem Fall mit Gefriermaterial gearbeitet werden. Die anderen Antikörper wurden an Paraffinschnitten angefärbt, da die Morphologie besser erhalten bleibt und somit die histologische Untersuchung erleichtert wird. Mit Antikörpern gegen Myosin und Actin wurden die Myofibroblasten der Lamina propria dargestellt. Um Sertolizellen aufzuzeigen wurden Antikörper gegen Cytokeratin 18 und Vimentin eingesetzt. Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, indem ein Schnitt mit Puffer an Stelle des Primär-Antikörpers inkubiert wurde.

Tabelle 1: Daten der Primär-Antikörper mit den angewandten Verdünnungen bei der Inkubation

Antikörper	Klon	Iso-Typ	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
PIAP	8A9	IgG	Maus	1:50	Dako
Integrin $\alpha 6$	BQ16	IgG	Maus	1:100	Dako
Laminin	LAM-89	IgG	Maus	1:250	Sigma
s-Myosin	HSM-V	IgG	Maus	1:250	Sigma
s-Actin	1A4	IgG	Maus	1:50	Dako
Cytokeratin 18	DC10	IgG	Maus	Ready to use	Immunotech
Vimentin	Vim 3B4	IgG2a	Maus	1:50	DAKO

3.2.3.2.2 Sekundär-Antikörper

Anwendung fand ein affinitätschromatographisch gereinigter, biotinylierter Sekundär-Antikörper Ziege-Anti-Maus (IgG, DAKO, Glostrup, Dänemark) mit der Verdünnung 1:50, der als Bindeglied zwischen Primär-Antikörper und ABC-Komplex die tierspezifische Ig-Kette des Primär-Antikörpers erkennen kann.

3.2.3.3 Färbeprotokolle

3.2.3.3.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Der Färbung voraus gingen das Entparaffinieren und Rehydrieren in folgenden Lösungen bei Raumtemperatur (RT):

- 10 Minuten Xylol I
- 10 Minuten Xylol II
- 10 Minuten Xylol III
- 5 Minuten Ethanol 100%
- 5 Minuten Ethanol 96%
- 5 Minuten Ethanol 80%
- 5 Minuten Ethanol 70%
- 5 Minuten Ethanol 50%
- 5 Minuten Aqua bidest.
- 5 Minuten Waschpuffer (TRIS)

Die Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen erfolgte

a) durch Mikrowellenbehandlung bei den Antikörpern gegen PLAP, Myosin und Vimentin.

- Objektträger (OT) in Plastikstandküvette
- 5 Minuten Citratpuffer (pH 6,0), RT
- OT für 3 x 5 Minuten mit Citratpuffer in Mikrowelle mit 1000 Watt kochen
- verdunsteten Puffer mit Aqua bidest. nachfüllen
- OT mindestens 20 Minuten abkühlen lassen
- OT in Waschpuffer in Standküvette auf einem Schüttler

b) Andauung mit Proteinase K bei den Antikörpern gegen Laminin und Cytokeratin.

- OT für 25 Minuten im Trockenschrank in feuchter Kammer, 37°C Grad
- Abstoppen der Reaktion in kaltem Waschpuffer in Standküvette auf einem Schüttler

3.2.3.3.2 PLAP-Färbung für Paraffinschnitte

Nach der morphologischen Beurteilung der HE-Schnitte wurde von jedem geeigneten Präparat der erste Folgeschnitt mit PLAP angefärbt, um die Diagnose CIS bzw. Hodentumor definitiv zu bestätigen.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- OT für 5 Minuten in TRIS-Puffer in Standküvette auf einem Schüttler
 - OT für 2 Minuten in Aqua dest. in Standküvette auf einem Schüttler
 - Schnitte mit dem Pap-Pen umranden, damit die Inkubationslösungen nicht ablaufen
- Um eine Hintergrundreaktion zu vermeiden, die bei jeder Entwicklung mit Peroxidase-Substraten auftritt, folgt die Blockierung der endogenen Peroxidase:
- 30 Minuten Inkubation der OT in H₂O₂ 3% in Standküvette auf einem Schüttler, RT
 - OT für 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer in Standküvette auf einem Schüttler
 - Trocknen der OT durch vorsichtiges Tupfen mit einem saugfähigem Tuch in der Umgebung der Schnitte

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen:

- 30 Minuten Inkubation der OT mit bovinem Serumalbumin (BSA) 3% in feuchter Kammer, RT
- Über Nacht Inkubation der OT mit Primär-Antikörper in BSA 3% in feuchter Kammer, 4°C im Kühlschrank
- OT für 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer in Standküvette auf einem Schüttler
- Trocknen der OT
- 30 Minuten Inkubation der OT mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper in BSA 3%, in feuchter Kammer, RT
- OT für 3 x 5 Minuten spülen in TRIS-Puffer in Standküvette auf einem Schüttler
- Trocknen der OT
- 30 Minuten Inkubation der OT mit ABC-Kit in feuchter Kammer, RT
- OT für 3 x 5 Minuten spülen mit TRIS-Puffer in Standküvette auf einem Schüttler

3.2.3.3.3 PIAP-Färbung für Gefrierschnitte

Abweichend zum Protokoll für Paraffinschnitte:

- 10 Minuten fixieren der Schnitte mit Formalin 10% nach Lillie in Standküvette auf einem Schüttler
- keine Mikrowellenvorbehandlung
- 20 Minuten Inkubation der OT mit H₂O₂ 3% in Standküvette auf einem Schüttler, RT
- 20 Minuten Inkubation der OT mit BSA 5 % in feuchter Kammer, RT
- 60 Minuten Inkubation der OT mit dem Primär-Antikörper in feuchter Kammer, RT

3.2.3.3.4 Actin, Myosin, Laminin, Cytokeratin 18 und Vimentin

Abweichend zum Protokoll von PIAP bei Paraffinschnitten:

- 60 Minuten Inkubation der OT mit Sekundär-Antikörper in feuchter Kammer, RT
- 60 Minuten Inkubation der OT mit ABC-Kit in feuchter Kammer, RT

3.2.3.3.5 Integrin $\alpha 6$

- 90 Sekunden Fixierung der Gefrierschnitte mit Aceton/Methanol (Verhältnis 70:30) in Standküvette auf einem Schüttler, RT
- OT für 10 Minuten in H₂O₂ 1% in Standküvette auf einem Schüttler, RT

- OT für 3 x 5 Minuten spülen in Waschpuffer (PBS) in Standkuvette auf einem Schüttler
- Trocknen der OT
- 20 Minuten Inkubation der OT mit BSA 2% in feuchter Kammer, RT
- Trocknen der OT
- 60 Minuten Inkubation der OT mit Primär-Antikörper in BSA 2% in feuchter Kammer, RT
- 3 x 5 Minuten in PBS spülen in Standkuvette auf einem Schüttler
- Trocknen der OT
- 20 Minuten Inkubation der OT mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper in BSA 3% in feuchter Kammer, RT
- OT für 3 x 5 Minuten spülen in PBS in Standkuvette auf einem Schüttler
- Trocknen der OT
- 45 Minuten Inkubation der OT mit ABC-Peroxidase-Komplex, RT
- OT für 3 x 5 Minuten spülen in PBS in Standkuvette auf einem Schüttler

3.2.3.3.6 Färbung der Schnitte und Eindecken

Ein Peroxidase-Substrat/Chromogengemisch diente zur Manifestation der immunhistochemischen Reaktion.

- Integrin $\alpha 6$: 8 Minuten Inkubation der OT mit AEC (3-amino-9-ethylcarbazol) bei völliger Dunkelheit in feuchter Kammer, RT
- die restlichen Antikörper: 3-5 Minuten Inkubation der OT unter lichtmikroskopischer Kontrolle mit Stable DAB (3,3'-Diaminobenzidin), RT. Stoppen der Reaktion mit TRIS-Puffer
- OT für 3 x 5 Minuten spülen beider Chromogene in Aqua dest.
- 15 Sekunden Kerngegenfärbung mit Haematoxylin, um einen besseren Farbkontrast zu erzielen
- 10 Minuten spülen der OT unter fließendem Leitungswasser

Die Objektträger wurden, nachdem sie sorgfältig um die Schnitte herum abgetrocknet worden waren, mit erwärmter Kaisers Glyceringelatine[®] eingedeckelt.

3.2.3.4 Auswertung der Immunreaktion und Fotografie

Die Auswertung der Schnitte wurde am Lichtmikroskop „Leica DM LB“ der Firma Leica, Wetzlar, mit integrierter 3-CCD Color Video Camera KY-F55B der Firma JVC, Friedberg, vorgenommen. Für die Abbildungen im Ergebnisteil wurden folgende Objektive der Firma Leica verwendet: N PLAN 40x/0,65 40x und N PLAN 20x/0,40 20x, N PLAN 10x/0,25 10x. Die Bildaufnahme, Archivierung und Dokumentation wurde mit der Software „DHS Bilddatenbank V5.00“ der Firma Dietermann & Heuser Solution GmbH, Greifenstein-Beilstein, durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Allgemeines zur Erfassung der immunhistochemisch gefärbten Paraffin- und Gefrierschnitte

Das Arbeiten mit Gefriermaterial brachte folgende Nachteile mit sich: Es musste eine relativ große Schneiddicke gewählt werden, da das tiefgefrorene Hodengewebe sehr brüchig war. Daraus ergab sich die Schwierigkeit, die Schnitte auf einer Ebene mikroskopisch scharf einzustellen, so dass die photographische Abbildung erschwert war. Gewebeerreißen, die unweigerlich durch das Schneiden mit dem Gefriermikrotom auftraten, beeinträchtigten zusätzlich die Beurteilung der Morphologie. In einigen Tubuli konnte die Basalmembran aus diesem Grund nicht beurteilt werden. Ferner war es nicht immer möglich, die einzelnen Zellen eindeutig ihrem Entwicklungsstadium zuzuordnen. Ein weiterer Nachteil war, dass keine Folgeschnitte mit den anderen Antikörpern angefertigt werden konnten, da hier zu Gunsten der besseren Morphologie mit Paraffinmaterial gearbeitet wurde. Nur die Färbungen mit PIAP wurden bei jedem Präparat durchgeführt, um die genaue Lokalisation der CIS-Zellen bestimmen zu können.

4.2 Einteilung der histologischen Schnitte in verschiedene Stadien

Anhand der HE-gefärbten Schnitte wurden die Präparate in verschiedene Stadien eingeteilt. Untersucht wurden Präparate, die neben Tubuli mit CIS-Zellen auch noch gesundes Gewebe zeigten. Die Tubuli mit Carcinoma in situ wurden in dieser Studie in zwei Stadien unterteilt. Einerseits in Tubuli mit einzelnen, auf der Basalmembran liegenden CIS-Zellen, die eine qualitativ normale Spermatogenese bis hin zum Spermatogonienarrest aufwiesen. Andererseits in Tubuli mit Spermatogenese-arrest, in denen die CIS-Zellen und Sertolizellen überwiegend einreihig der Basalmembran aufsaßen. Ferner gab es Areale mit intratubulären Neoplasien, die durch ihr tubuläres Arrangement charakterisiert waren. Diese intratubulären Neoplasien traten zusammen mit so genannten Zellclustern auf, die durch Tumorzellansammlungen umgeben von Septen charakterisiert waren. Begutachtet wurden ebenfalls klassische Seminome, welche an die beschriebenen Areale angrenzten.

4.3 Lokalisation und Verteilungsmuster der Reaktion im histologischen Schnitt

Tubuli mit einer qualitativ normalen Spermatogenese, die PIAP-negativ waren, zeigten eine deutliche Immunreaktion auf Actin und Myosin im Cytoplasma der Myofibroblasten in der Tubuluswand (Abbildungen 10, 11, 12, 13). Die Immunreaktion von Laminin war deutlich in der Basalmembran (BM) zu sehen (Abbildung 14). Die basalen Pole sowohl der Sertoli- als auch der Keimzellen waren Integrin- α 6-positiv und kennzeichneten somit die Basalmembran sehr deutlich (Abbildung 15). Bisweilen erschienen die Spermatogonien auch in den lateralen Bereichen angefärbt, allerdings weniger polarisiert und schwächer. Eine schwache Immunreaktion sowohl auf Laminin, als auch auf Integrin α 6 ließ sich in den Myofibroblasten ausmachen, wobei die Reaktion vor allem bei Integrin α 6 wesentlich schwächer als in der Basalmembran der Tubuluswand ausfiel. Die Sertolizellen waren Cytokeratin-negativ, jedoch Vimentin-positiv. Cytokeratin konnte gelegentlich in Spermatogonien als paranukleärer Punkt nachgewiesen werden (Abbildung 16). Die Myofibroblasten der Tubuluswand zeigten eine deutliche Immunantwort auf den Antikörper gegen Vimentin (Abbildung 17). Die Kapillaren ließen sich mit Actin, Myosin, Laminin, Integrin α 6 und Vimentin darstellen.

In Tubuli mit qualitativ normaler Spermatogenese oder Spermatogonienarrest und einzelnen CIS-Zellen zeigten sich dieselben Ergebnisse hinsichtlich Morphologie und der Immunreaktion auf Actin, Myosin, Integrin, Laminin und Vimentin in der Tubuluswand und den Blutgefäße (Abbildungen 12, 13, 14, 17). Die CIS-Zellen ließen sich mit dem Antikörper gegen PIAP darstellen (Abbildung 10). Die Reaktion war hauptsächlich in der Zellmembran der atypischen Keimzellen festzustellen, bisweilen aber auch diffus im Cytoplasma oder auch als paranukleärer Punkt. Integrin α 6 färbte das Cytoplasma diffus, vor allem aber auch die Zellmembran der CIS-Zellen an. In der Umgebung PIAP-positiver Zellen zeigte Cytokeratin 18 im gesamten Cytoplasma der Sertolizellen eine positive Immunantwort.

In den Tubuli, die hauptsächlich Sertoli- und CIS-Zellen aufwiesen, lagen die Zellen überwiegend einreihig der Basalmembran an (Abbildungen 10, 11, 15, 16). Die

Tubuluswand war im Bereich der peritubulären Zellen teilweise deutlich verdickt (Abbildungen 10, 16). Fokal fehlte die Immunantwort von Actin oder sie fiel schwächer aus. Insgesamt aber zeigte die Tubuluswand eine positive Actinfärbung. Myosin zeigte im Vergleich zu Actin eine geringere Ausprägung der Immunreaktion. An verdickten Abschnitten der Tubuluswand erschien die Immunreaktion von Actin und Myosin teilweise doppelspurig, da in der Mitte der Wand keine Farbreaktion zu sehen war (Abbildungen 18, 20). Die Integrität der Basalmembran ließ sich durch die Immunreaktion mit Laminin darstellen. Sie wies fokale Invaginationen auf. Integrin $\alpha 6$ zeigte eine starke Immunreaktion in den basalen Abschnitten der CIS-Zellen und kennzeichnete die Basalmembran sehr deutlich (Abbildung 15). In den Myofibroblasten trat keine Veränderung hinsichtlich der Integrin- und Lamininfärbung auf. Das Cytoplasma der meisten Sertolizellen zeigte eine diffuse, mitunter auch punktförmige Immunreaktion auf Cytokeratin und Vimentin (Abbildung 16). Hinsichtlich der Immunantwort der Blutgefäße auf die Antikörper gegen Actin, Myosin, Integrin $\alpha 6$, Laminin und Vimentin waren keine Veränderungen im Vergleich mit den gesunden Tubuli zu verzeichnen.

Angrenzend an Seminome oder Carcinoma in situ sind vergrößerte Tubuli, die mit Tumorzellen und Sertolizellen gefüllt sind, zu sehen (intratubuläre Neoplasie). Daran anschließend oder diese umgebend sieht man Areale, in denen sich große Ansammlungen atypischer Keimzellen befinden, die nesterförmig zusammenliegen und von bindegewebigen Septen umschlossen sowie von kleineren durchzogen werden (Zellcluster). Es entsteht der Eindruck von sehr großen Tubuli (Abbildungen 18-28). Actin lässt sich an den großen Septen fokale mit einer deutlichen Immunreaktion demonstrieren, aber weite Teile bleiben negativ (Abbildung 18). Die kleinen Septen sind positiv (Abbildung 19). Die großen Septen sind negativ für die Myosinfärbung, bis auf fokale Stellen, an denen eine schwache Reaktion festzustellen ist (Abbildung 20). Die kleineren Septen, die entweder von den großen Septen abzweigen oder zwischen den Zellcluster auftreten, zeigen jedoch eine deutliche Immunantwort. Vimentin zeigt in allen Septen eine deutliche Reaktion (Abbildungen 25, 28). Sowohl die meisten großen, als auch die kleineren Septen und Gefäße zeigen eine Immunreaktion auf Laminin und Integrin $\alpha 6$ im Bereich der Basalmembran (Abbildungen 21, 22). Eine Färbung im Bereich der peritubulären Schicht lässt sich nicht ausmachen. Der Großteil der

atypischen Keimzellen, die sich morphologisch nicht von CIS-Zellen unterscheiden lassen, ist sowohl PLAP- als auch Integrin- $\alpha 6$ -positiv (Abbildungen 22, 23).

In den intratubulären Neoplasien sowie in den Zellclustern befinden sich immer wieder einzelne Zellen, die eine Expression der Antikörper gegen Cytokeratin 18 und Vimentin zeigen und somit als Sertolizellen identifiziert werden können (Abbildungen 24-28). Auffallend sind zahlreiche kleinere Blutgefäßen, die vor allem in den Septen, aber auch gelegentlich in den Zellclustern zu finden sind. Sie zeigen eine deutliche Reaktion auf die Antikörper gegen Actin, Myosin, Integrin $\alpha 6$, Laminin und Vimentin.

In Seminomen ließen sich die Tumorzellen mit Antikörpern gegen PLAP und Integrin $\alpha 6$ darstellen (Abbildungen 33-34). Die Septen, die das Gewebe durchzogen, waren Actin- und Myosin-negativ, aber Vimentin-positiv (Abbildungen 29, 30). Die Basalmembran blieb weiterhin Laminin- und Integrin- $\alpha 6$ -positiv (Abbildungen 32-34). Die Blutgefäße zeigten eine positive Immunantwort auf die Antikörper gegen Actin, Myosin, Laminin, Integrin- $\alpha 6$ sowie Vimentin. Die Immunreaktion auf Cytokeratin und Vimentin in den Zellen war bis auf wenige Ausnahmen negativ (Abbildung 31).

4.4 Histologische Abbildungen

In den folgenden Abbildungen werden die immunhistochemischen Ergebnisse den verschiedenen Stadien entsprechend dargestellt.

Die Abbildungen 10-17 zeigen Tubuli mit intakter Spermatogenese (Stern) versus Tubuli mit Carcinoma in situ (schwarzer Stern). CIS-Zellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, Sertolizellen mit einem Dreieck.

Auf den Abbildungen 18-28 sieht man intratubuläre Neoplasien sowie in den Abbildungen 29-34 klassische Seminome.

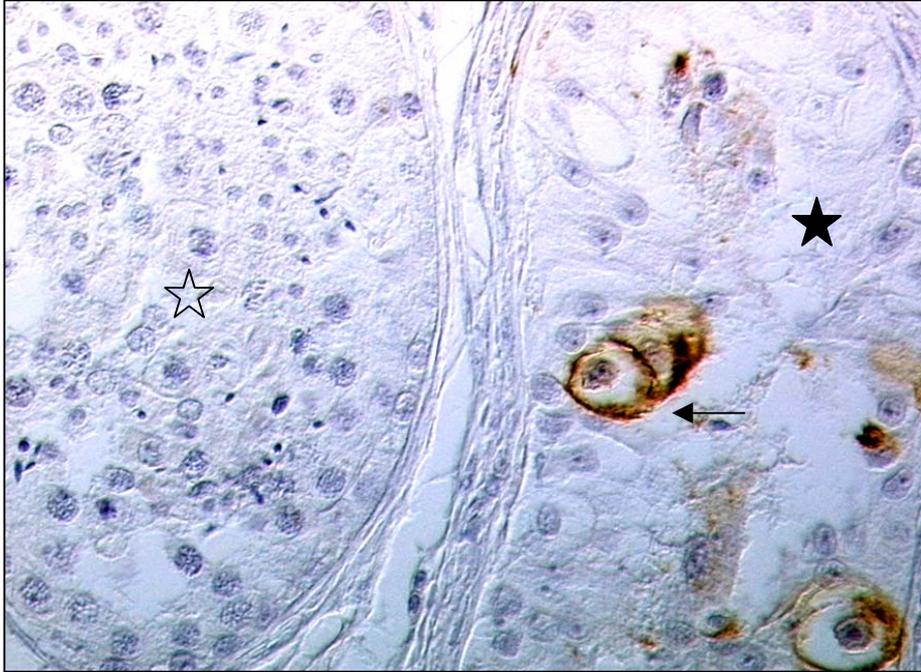


Abb. 10: PIAP, Primärvergrößerung x 40; positives Signal vorwiegend in der Basalmembran der CIS-Zellen (Pfeil). Die Tubuluswand des rechten Tubulus (schwarzer Stern) ist im Vergleich zum linken Tubulus mit intakter Spermatogenese (Stern) verdickt.

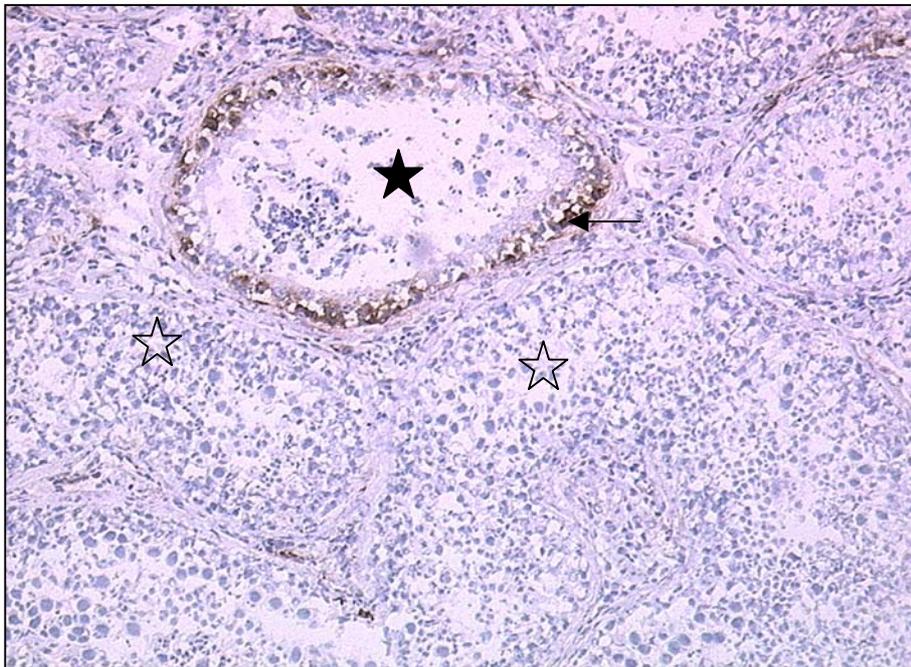


Abb. 11: PIAP, Primärvergrößerung x 10; im Gefrierschnitt markiert der Antikörper die CIS-Zellen eines typischen Carcinoma in situ (schwarzer Stern). Die Sertoli- und CIS-Zellen liegen der BM einschichtig an (Pfeil). Im Lumen sind abgelöste Spermatogenesestadien zu sehen. Tubuli mit intakter Spermatogenese (Sterne) sind PIAP-negativ.

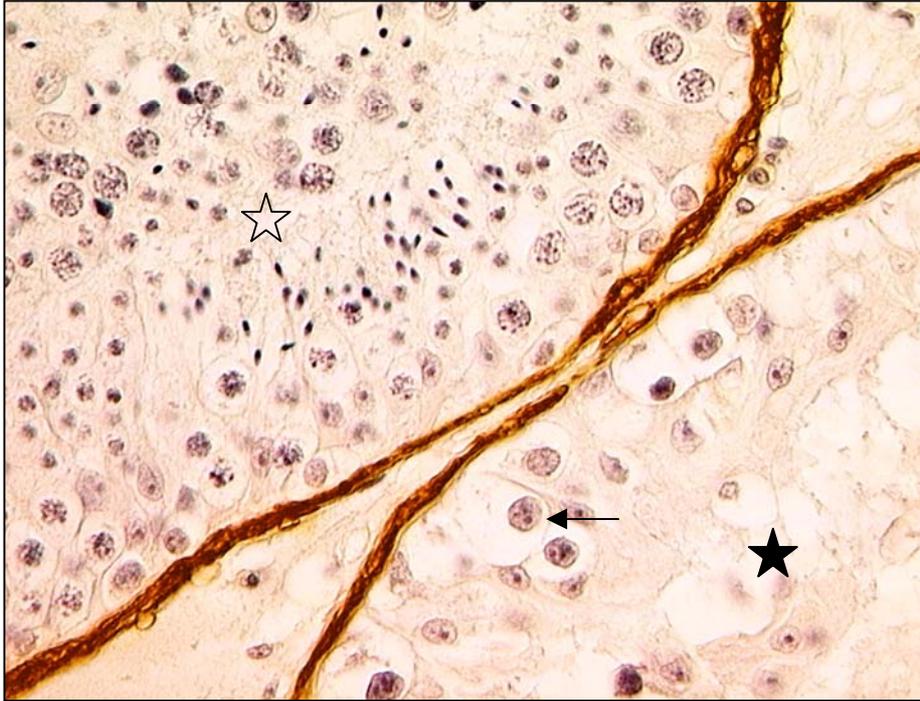


Abb. 12: Actin, Primärvergrößerung x 40; positives Signal in den Myofibroblasten der Lamina propria.

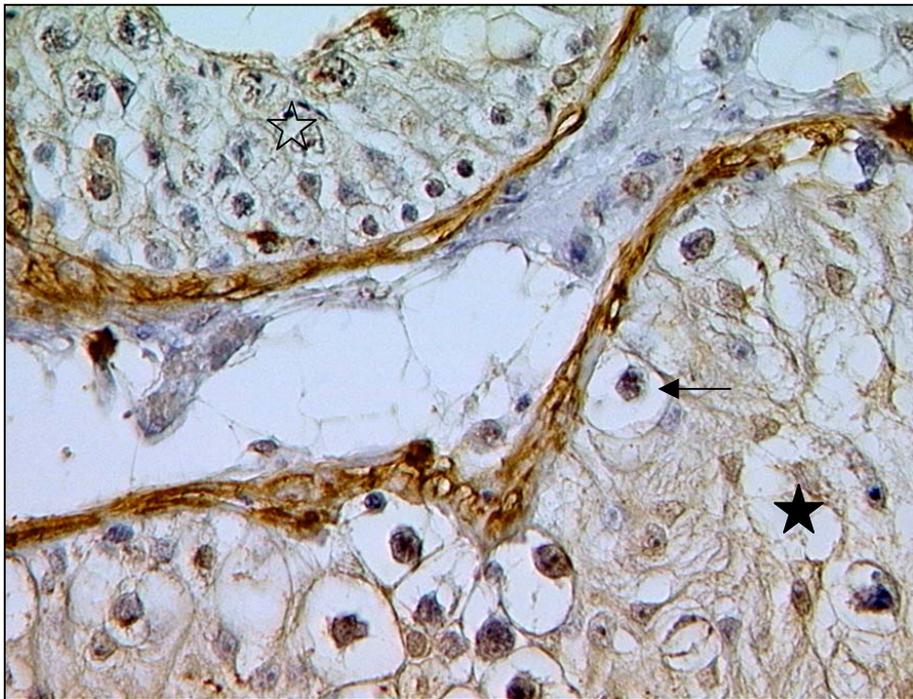


Abb. 13: Myosin, Primärvergrößerung x 40; positives Signal in den Myofibroblasten der Lamina propria

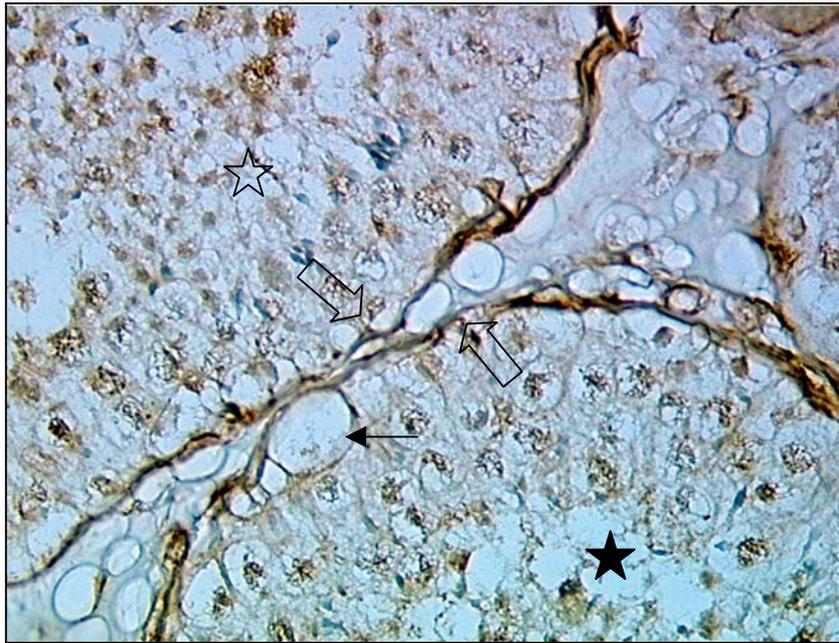


Abb. 14: Laminin, Primärvergrößerung x 40; positive Signale in der BM (Blockpfeil) beider Tubuli.

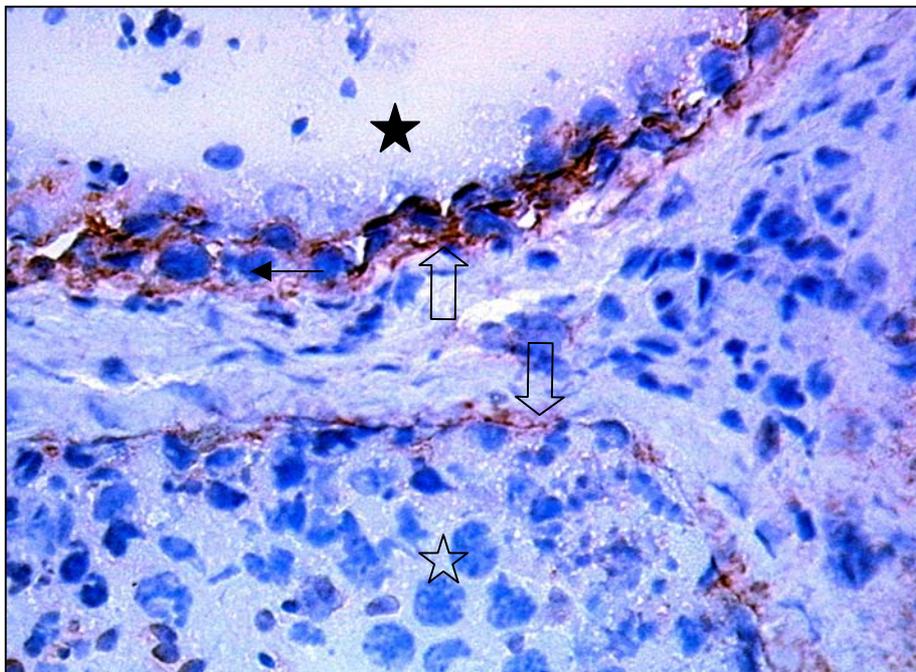


Abb. 15: Integrin $\alpha 6$, Primärvergrößerung x 40; im Gefrierschnitt sind in beiden Tubuli positive Signale im Bereich der BM (Blockpfeile) zu sehen. Die CIS-Zellen (Pfeil) sind ebenfalls Integrin-positiv.

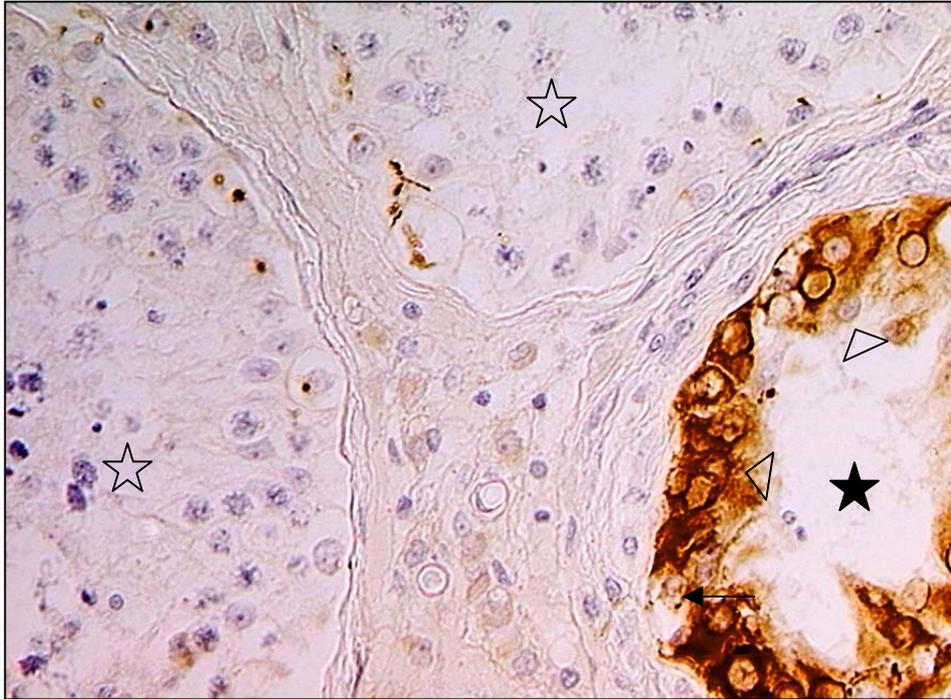


Abb. 16: Cytokeratin, Primärvergrößerung x 40; das Cytoplasma der Sertolizellen (Dreieck) zeigt im Tubulus mit CIS-Zellen ein deutliches, braunes Signal. Der CIS-Tubulus hat eine verbreiterte Wand.

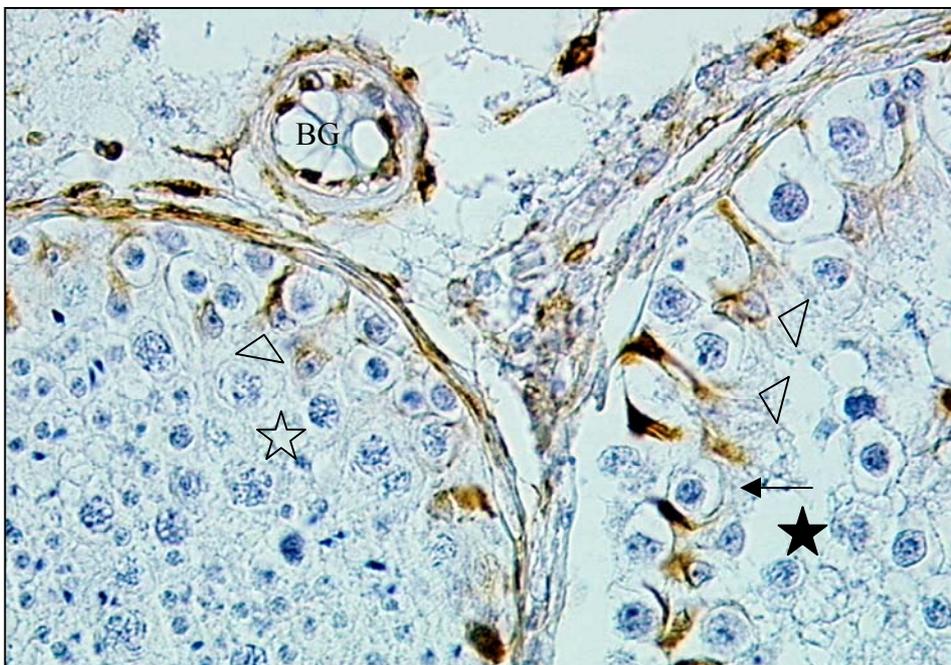


Abb. 17: Vimentin, Primärvergrößerung x 40; das Cytoplasma der Sertolizellen (Dreieck), das Blutgefäß (BG) sowie die Lamina propria sind in Tubuli mit intakter Spermatogenese und in Tubuli mit CIS positiv.

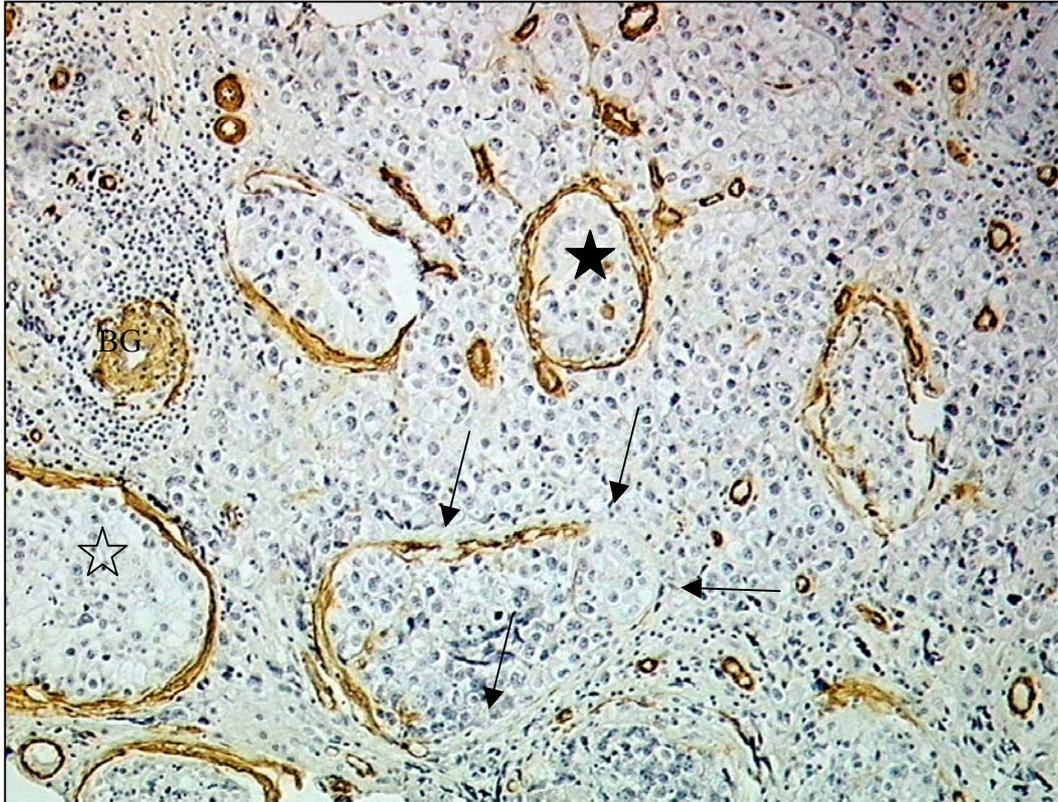


Abb. 18: Actin, Primärvergrößerung x 10; die Immunreaktion ist in Tubuli mit intakter Spermatogenese (Stern) und in Tubuli mit CIS (schwarzer Stern) präsent, teilweise noch in der intratubulären Neoplasie (Pfeile), aber nicht mehr in den Tumorzellclustern. Um das Blutgefäß (BG) sieht man lymphocytäre Infiltrate.

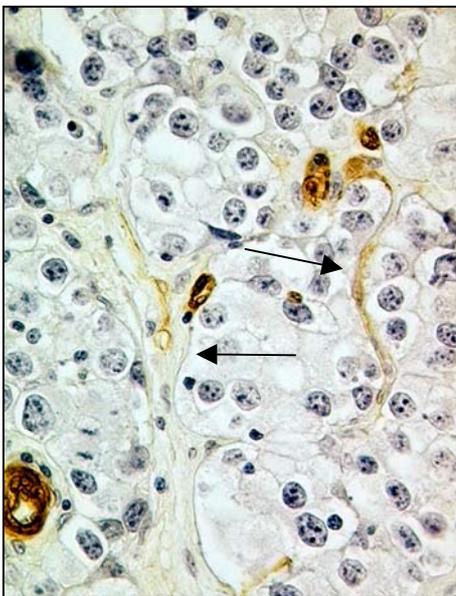


Abb. 19: Actin, Primärvergrößerung x 40; die kleinen Septen (Pfeile) zeigen fokale oder keine positive Reaktion. Die Myocyten in den Blutgefäßen sind deutlich positiv.

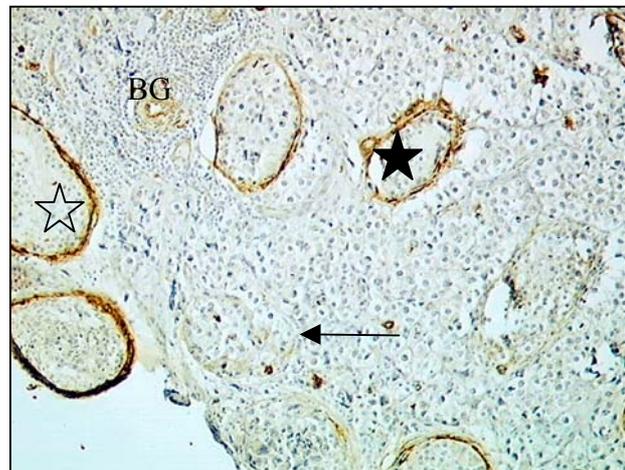


Abb. 20: Myosin, Primärvergrößerung x 10; Serienschnitt von demselben Präparat wie in Abb. 18. Immunreaktion ist in der intratubulären Neoplasie (Pfeil) und in den Zellclustern nicht mehr vorhanden. Die Blutgefäße (BG), die Tubuli mit intakter Spermatogenese (Stern) sowie die Tubuli mit CIS (schwarzer Stern) zeigen in den Myofibroblasten eine deutliche Immunreaktion.

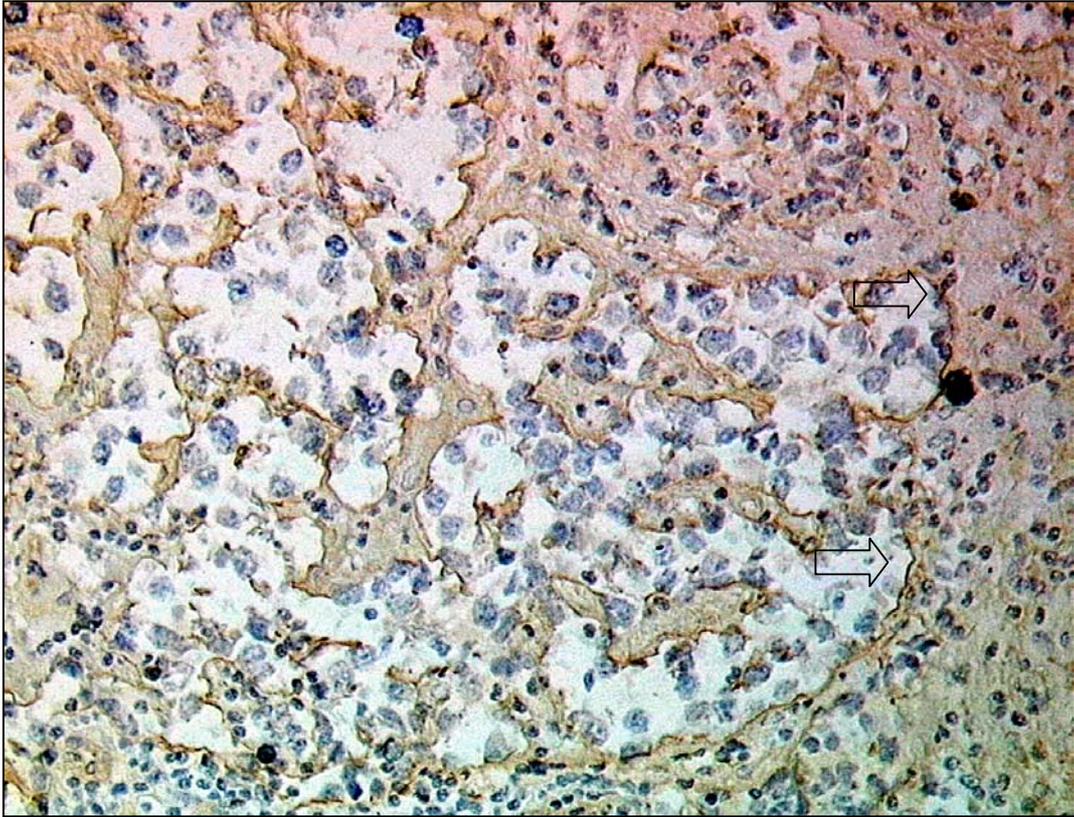


Abb. 21: Laminin, Primärvergrößerung x 20; in den Tumorzellcluster zeigt die BM (Blockpfeil) eine positive Immunantwort.

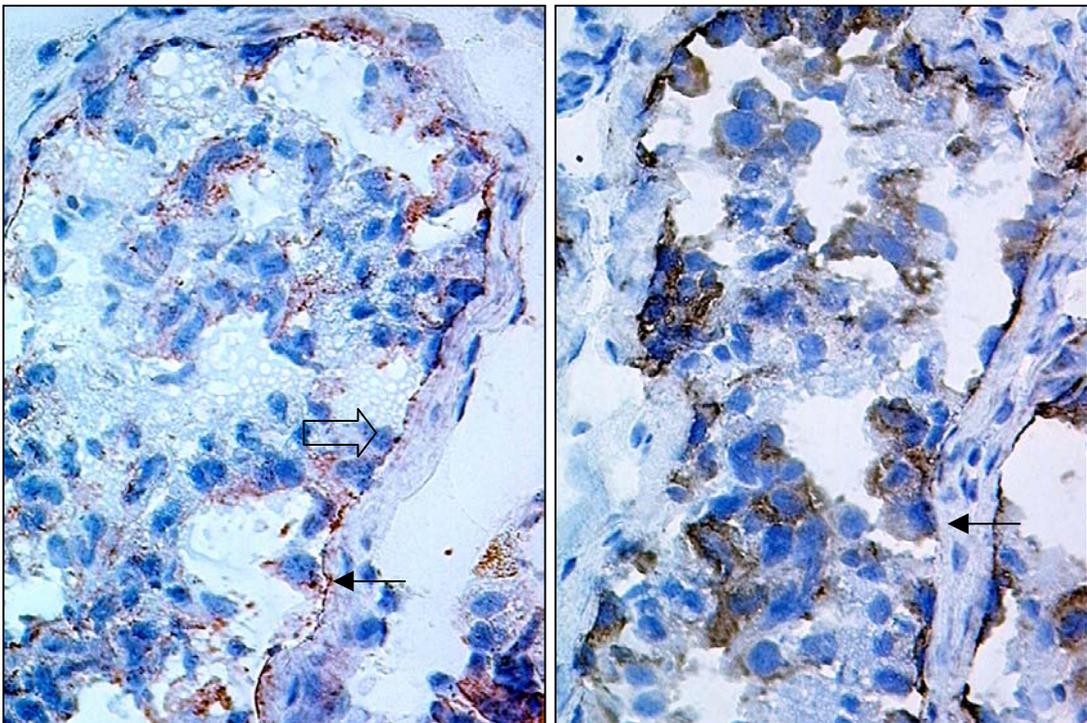


Abb. 22, 23: Integrin $\alpha 6$ (Abb. 22), PIAP (Abb. 23), Primärvergrößerung x 40; positive Signale in den CIS-Zellen (Pfeil) der intratubulären Neoplasie. Integrin $\alpha 6$ zeigt positive Signale in der BM (Blockpfeil).

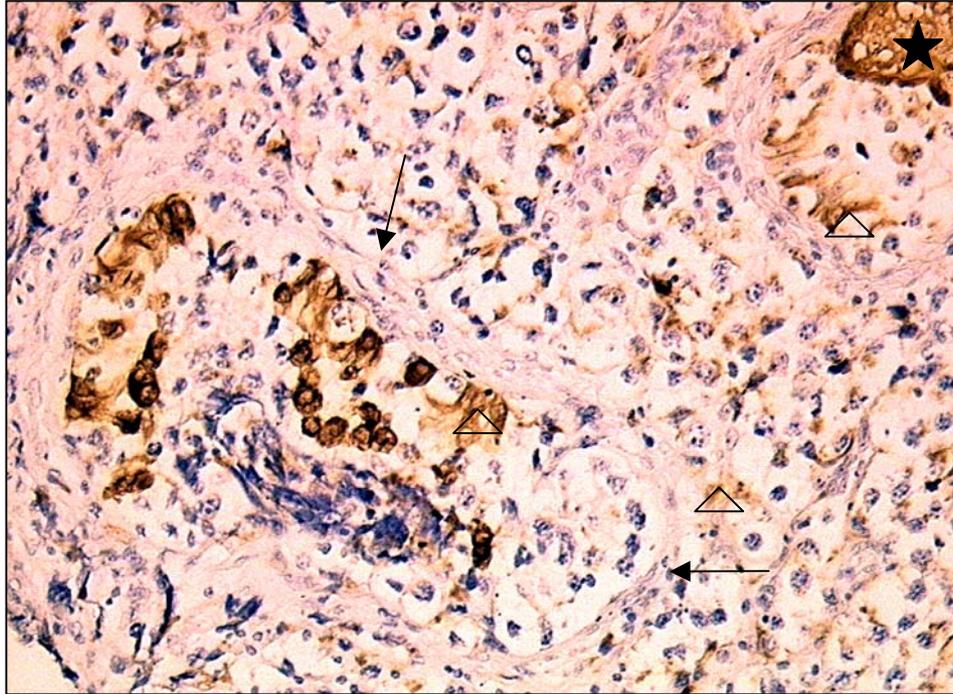
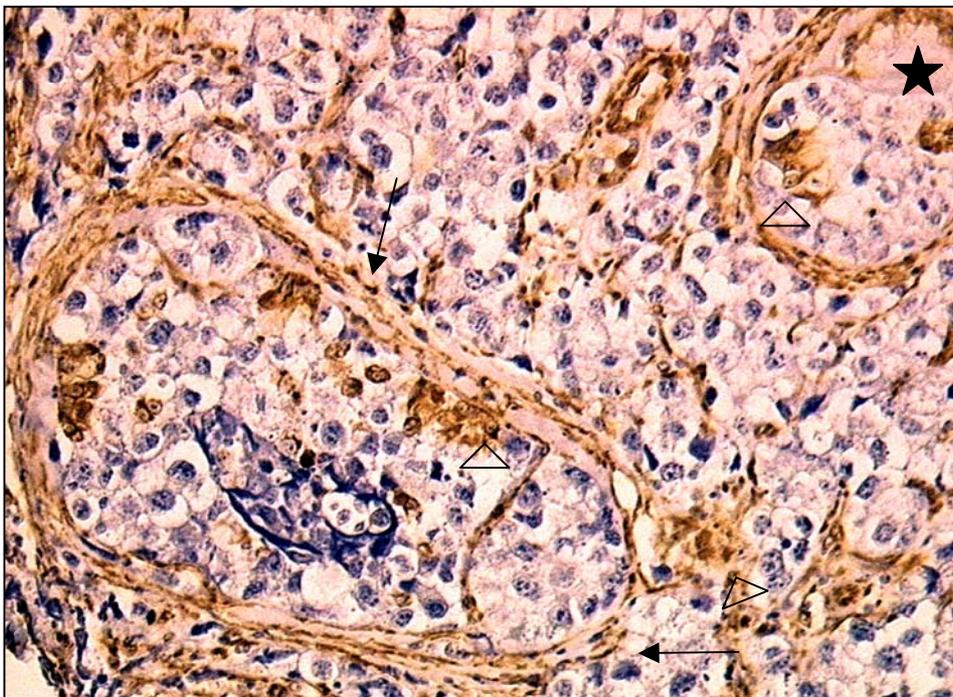


Abb. 24 (oben), 25: Cytokeratin (Abb. 24), Vimentin (Abb. 25), Primärvergrößerung x 20; Serienschchnitt aus Abb. 19 (Areal mit der intratubulären Neoplasie) zeigt Expression der Antigene in den gleichen Sertolizellen (Dreieck) des Tubulus mit CIS (schwarzer Stern) und der intratubulären Neoplasie (Pfeil). Vimentin zeigt in der verdickten Lamina propria deutliche Immunantwort. In den Tumorzellclustern sind vereinzelt positive Sertolizellen zu sehen.



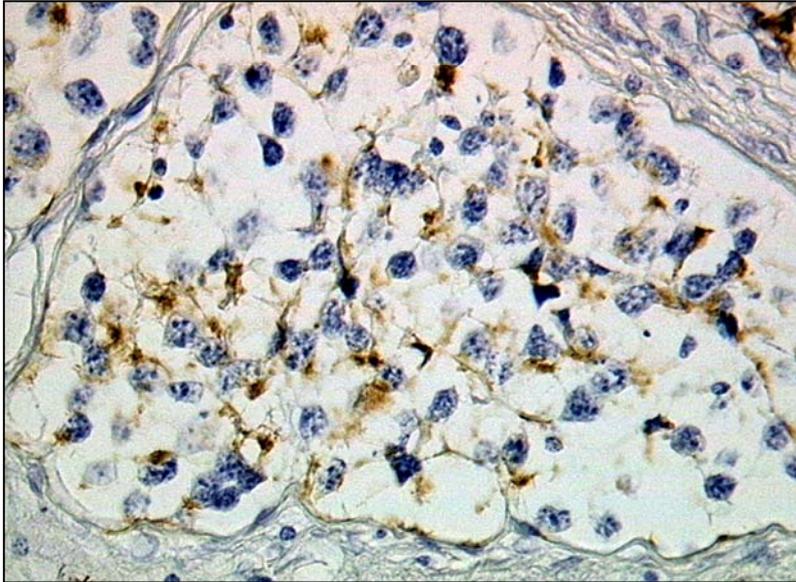


Abb. 26: Cytokeratin, Primärvergrößerung x 20; positive Reaktion in den cytoplasmatischen Fortsätzen der Sertolizellen in einem Zellcluster.

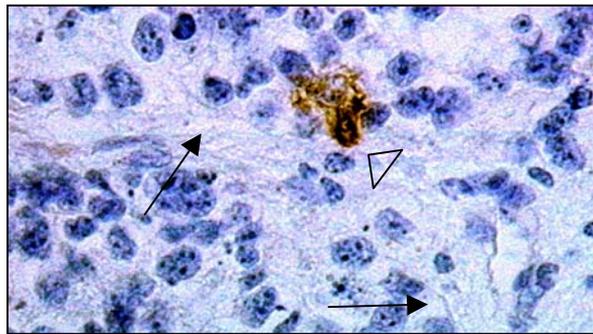


Abb. 27: Cytokeratin, Primärvergrößerung x 40; singuläre Sertolizelle im Tumorzellcluster, angrenzend an eine Septe (Pfeil).

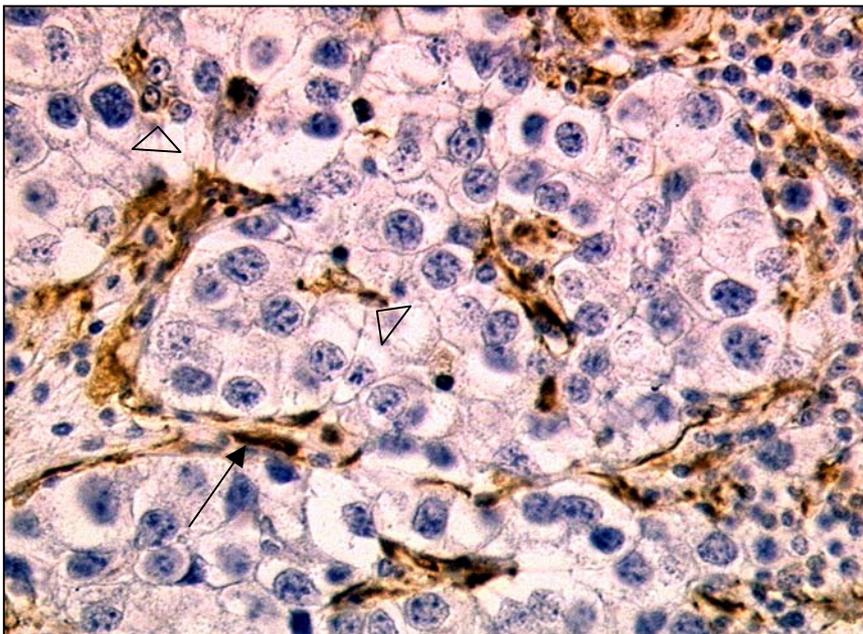


Abb. 28: Vimentin, Primärvergrößerung x 40; sowohl singuläre Sertolizellen (Dreieck) inmitten eines Zellclusters, als auch die Septen (Pfeil) sind Vimentin-positiv.

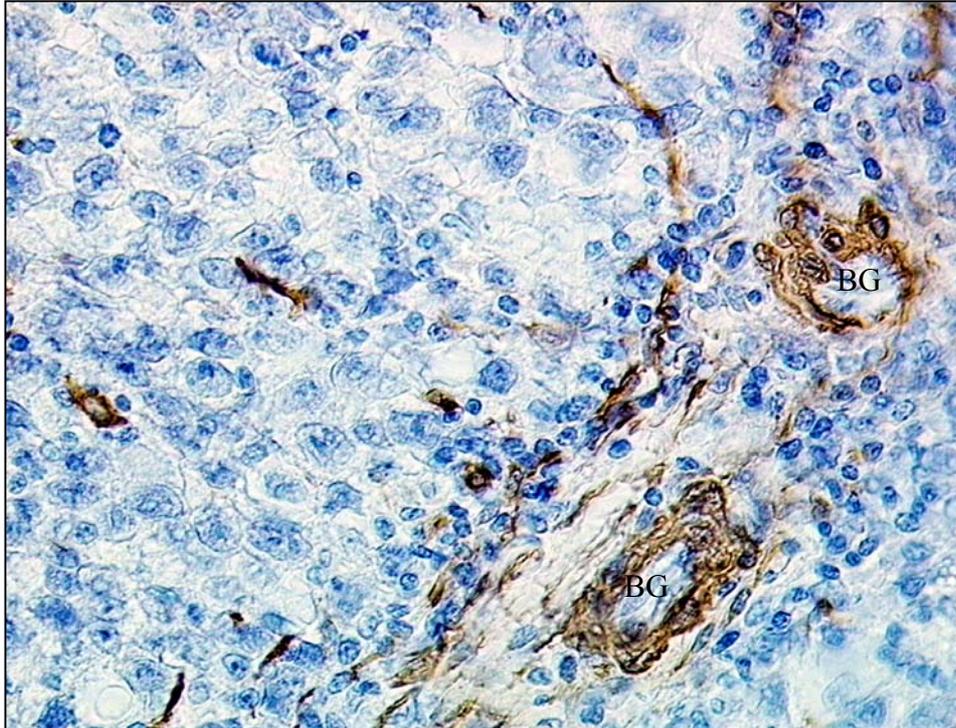


Abb. 29: Actin, Primärvergrößerung x 40; Serienschnitt vergl. Abb. 30, 31; positive Signale sind hauptsächlich in der Wand von Blutgefäßen (BG) zu sehen. In den Septen findet sich fokale eine schwache Reaktion. Zu beachten ist außerdem die lymphocytäre Infiltration in der Umgebung der Blutgefäße.

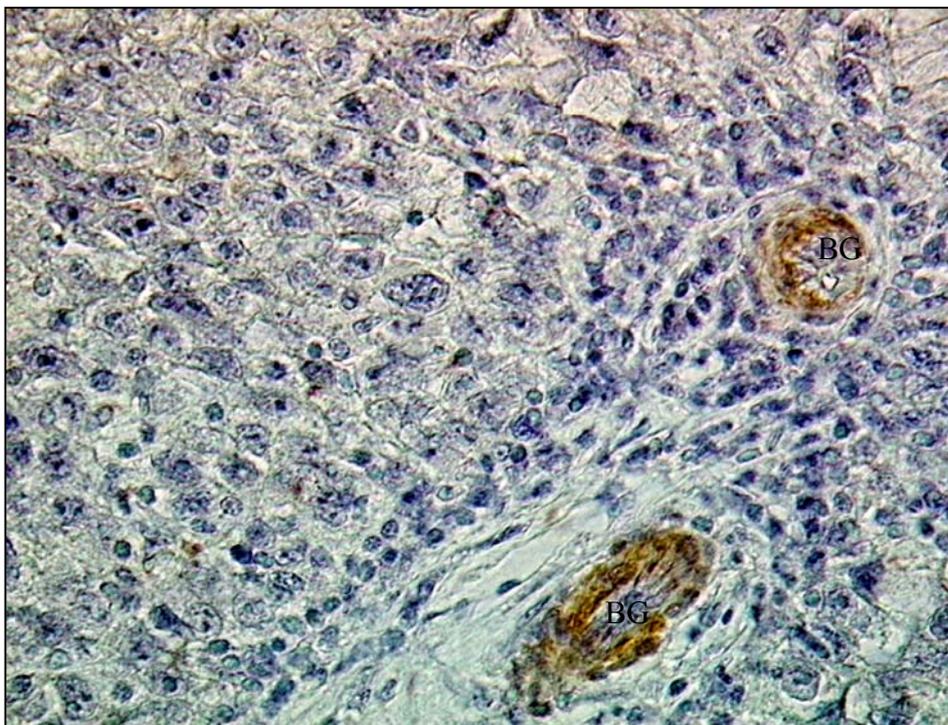


Abb. 30: Myosin, Primärvergrößerung x 40; Serienschnitt vergl. Abb 29, 31; positive Signale sind ausschließlich in den Blutgefäßen (BG) zu sehen.

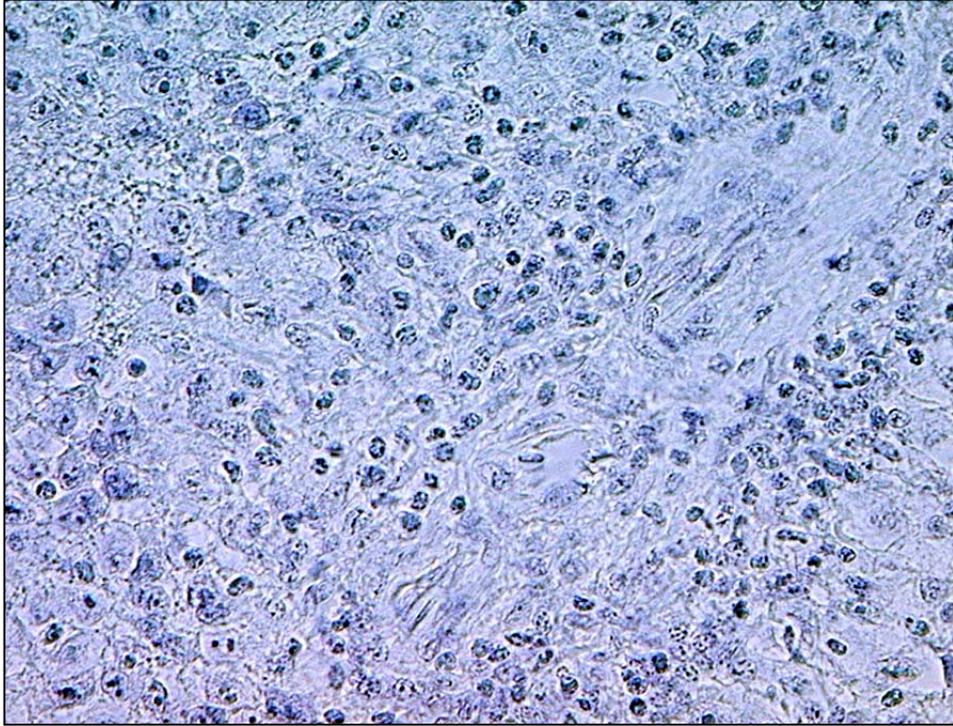


Abb. 31: Cytokeratin, Primärvergrößerung x 40; Serienschritt, vergl. Abb. 29, 30; im Seminom bleibt die Immunantwort aus.

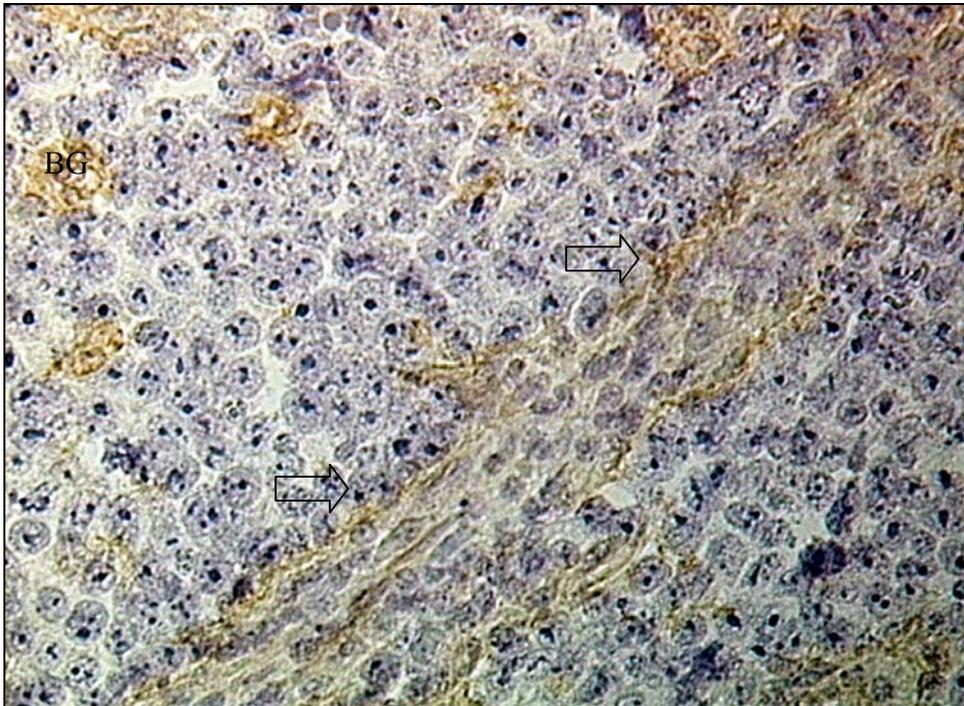


Abb. 32: Laminin, Primärvergrößerung x 40; sowohl die BM (Blockpfeil) als auch die Blutgefäße (BG) sind Laminin-positiv.

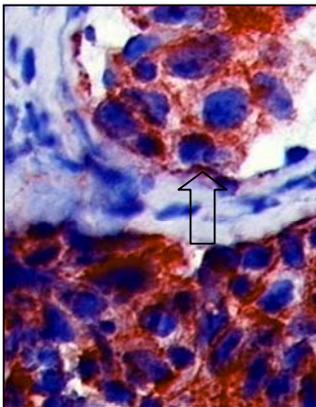
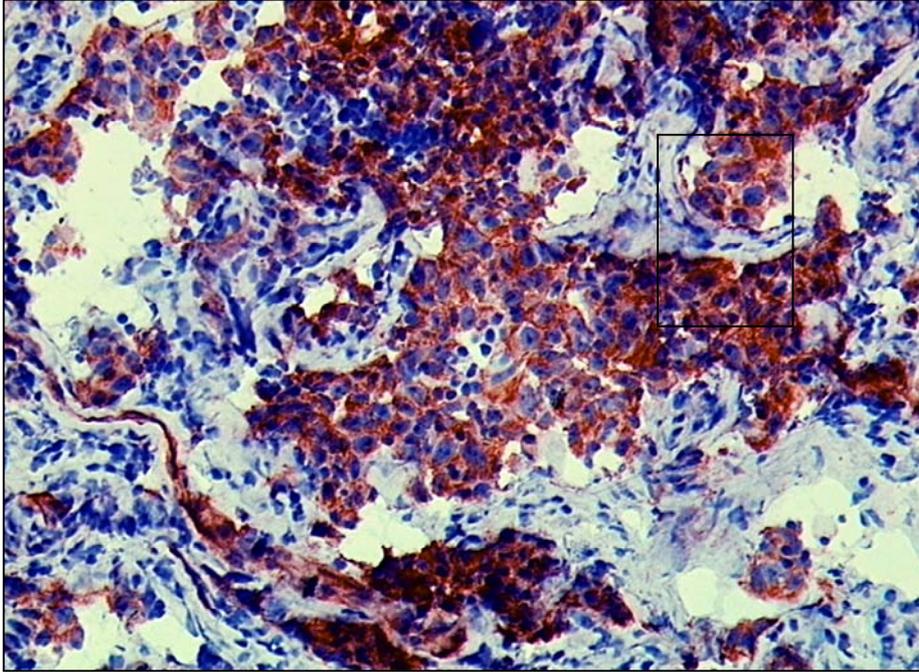


Abb. 33 (oben): Integrin α_6 , Primärvergrößerung x 20; die Tumorzellen sowie die BM zeigen eine positive Immunantwort.

Abb. 34 (links): Primärvergrößerung x 40; Vergrößerung der markierten Stelle (Rechteck) vom gleichen Präparat der Abb. 33. Integrin- α_6 -positive Tumorzelle (Blockpfeil).

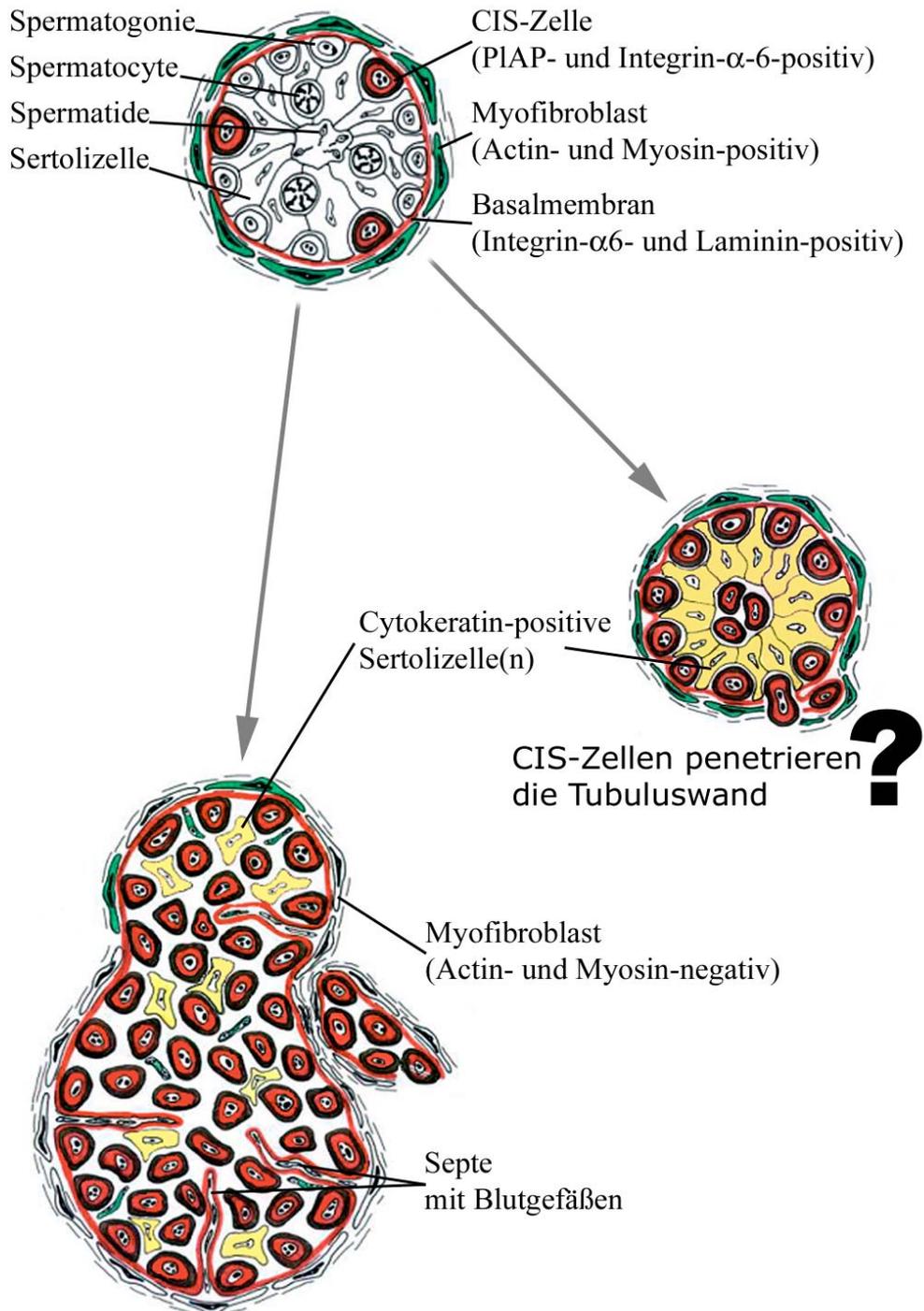
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse

Gewebe	Loka- lisation	PIAP	Actin	Myosin	Ln	Int α 6	Ck 18	Vim
n. SPG	MF		+++	+++	++	+		+++*
	BM				+++	+++		
	SZ						-	+++
	KZ							
	BG		+++	+++	+++	+++		+++
n. SPG+ CIS	MF		+++	+++	++	+		+++*
	BM				+++	+++		
	SZ						+++/-	+++
	KZ	+++				+++		
	BG		+++	+++	+++	+++		+++
CIS+ SZ	MF		+++/-	++/-	++	+		+++*
	BM				+++	+++		
	SZ						+++	+++
	KZ	+++				+++		
	BG		+++	+++	+++	+++		+++
Intratubuläre Neoplasie	MF		+/-	+/-	-	-		+++*
	BM				+++	+++		
	SZ						++/-	++/-
	KZ	+++				+++		
	BG		+++	+++	+++	+++		+++
Seminom	MF		+/-	-	-	-		+++ *
	BM				++/-	++/-		
	SZ						+/-	+/-
	KZ	++/-				++/-		
	BG		+++	+++	+++	+++		+++

Abkürzungen: **n. SPG:** normale Spermatogenese; **MF:** Myofibroblasten; **BM:** Basalmembran; **SZ:** Sertolizelle; **KZ:** Keimzelle, bzw. CIS-Zelle; **BG:** Blutgefäße;

(+++) starke Immunreaktion (IR); (++) durchschnittliche IR; (+) schwache IR; (-) keine IR; (+++/-) falls IR, dann stark; (++/-) falls IR, dann durchschnittlich; (+/-) falls IR, dann schwach. (*) Myofibroblasten und Fibroblasten.

Abb. 35: Theorien der Tumorprogression: der rechte Tubulus mit Fragezeichen symbolisiert die Theorie nach Schulze u. Holstein (1977), während der linke Weg die in dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse darstellt. Der Sertolizellmarker Vimentin wurde zugunsten der besseren Übersichtlichkeit nicht mit eingezeichnet.



Intratubuläre Proliferation der CIS-Zellen führt zur Ausdehnung der Tubuluswand bis zum Kontraktilitätsverlust.

5. DISKUSSION

5.1 Laminin

Mit diesem Antikörper lässt sich die Basalmembran des Tubulus seminiferus darstellen. Der in dieser Studie verwendete monoklonale Antikörper färbt nicht einzelne Ketten, sondern das gesamte Lamininmolekül an. Weil im Datenblatt des Antikörpers lediglich die Molekulargewichte der einzelnen Ketten angegeben werden, und diese nach der alten Nomenklatur bezeichnet sind, kann man nur durch den Vergleich mit den Molekulargewichten anderer Lamininketten darauf schließen, dass die dort angegebenen Größeneinheiten (A-Kette: 400 kDa, B1-Kette: 215 kDa, B2-Kette: 205 kDa) denen des Laminin-1 (A: 400 kDa, B1: 210 kDa, B2: 200 kDa) entsprechen (Burgeson et al. 1994, Dym 1994). Aus diesem Grund können in dieser Studie das Vorkommen und die Distribution der einzelnen Lamininketten nicht nachgewiesen werden. Das Hauptaugenmerk liegt in der morphologischen Darstellung der Basalmembran.

Die beschriebenen Invaginationen der Basalmembran, die in Tubuli mit CIS-Zellen und Sertolizellen auftreten, sind in unterschiedlichem Ausmaß sowohl in gesunden als auch in pathologisch veränderten Tubuli beschrieben worden. Das gelegentliche Auftreten kleinerer Einfaltungen in normalem Hodengewebe ist seit einigen Jahren bekannt (Bustos-Obregón und Holstein 1973). In postpubertalen kryptorchiden Hoden, welche mit Spermatogonienarrest einhergehen, zeigt die Lamina propria eine starke Zunahme und ist breiter im Vergleich zu den Kontrollen. Mit einer Lamininfärbung lässt sich eine durchgehende Basallamina darstellen, die starke Invaginationen aufweist (Santamaria et al. 1990).

Ähnliches zeigt sich auch bei Varikozelen. Dieses durch venösen Rückstau ausgelöstes Krankheitsbild kann mit fortschreitendem Alter des Patienten in tubulärer Atrophie enden (Lipshultz und Corriere 1977). In adoleszenten Hoden mit Varikozelen ist die Basalmembran invaginiert, dabei zeigt sie teilweise eine schwache Immunantwort auf Laminin, und die Lamina propria ist infolge erhöhter Kollagenablagerungen verdickt (Santoro et al. 2000). In adulten Hoden mit Varikozelen hingegen sind die Tubuli in der Regel stark sklerotisiert und weisen einen verkleinerten Tubulusdiameter auf. Dies geht

einher mit einer erhöhten Ablagerung an Kollagen- und Retikulinfasern in der Lamina propria. Die Basalmembran ist ebenfalls deutlich verdickt, zum Teil invaginiert und zeigt lokale Unterbrechungen (Santamaria et al. 1992).

Der venöse Rückstau bedingt folgende Faktoren, welche sich negativ auswirken können: eine hohe Temperatur im Hoden, erhöhte Konzentration an renalen und adrenalen Substanzen sowie an Testosteron und eine metabolische Entgleisung. Man geht davon aus, dass die morphologischen Veränderungen, die bei Varikozelen auftreten, zumindest teilweise davon abhängen, dass das Verhältnis zwischen der Lamina propria, der ECM und des Keimepithels gestört ist. Die Veränderungen der Lamina propria fangen in den innersten Schichten an und ziehen sich nach außen (Santoro und Romeo 2001). Daher könnte eine Schädigung der Basalmembran die Ursache für diese Veränderungen sein (Santoro et al. 2000). Es ist zwar nicht auszuschließen, aber dennoch unwahrscheinlich, dass es sich bei den Invaginationen der Basalmembran beim Carcinoma in situ um denselben Mechanismus handelt, da die Problemursache eine andere ist.

Invaginationen kommen ebenfalls physiologischerweise bei saisonal aktiven Tieren vor. Während der inaktiven Phase reduzieren sich beispielsweise beim Goldhamster das testikuläre Gesamtvolumen, der Tubulus seminiferus, das Interstitium, die Anzahl an Leydigzellen, Spermatozyten und Spermatoziden sowie die Kerngröße, aber nicht die absolute Zahl der Sertolizellen (Sinha Hikim et al. 1988). Drastisch reduziert sich die Zelloberfläche, insbesondere die adluminale Seite. Daraus ergibt sich die Frage, ob dies sekundär aufgrund des Keimzellverlustes entsteht, da der größte Rückgang gerade in diesem Kompartiment festzustellen ist. Das tubuläre Lumen verringert sich stark, bei manchen Spezies verschwindet es ganz. Dafür werden die Sertolizellen verantwortlich gemacht, die aufhören, intratubuläre Flüssigkeit zu sezernieren, obwohl die Sertolizell-Junctions –und somit die Blut-Hodenschranke- noch intakt sind (Bartke et al. 1993).

Die passive Immunisierung des Tubulus seminiferus mit dem Anti-Laminin Immunglobulin G geht beim Meerschweinchen mit einer Verdickung der Lamina propria, Einfaltungen der Basalmembran und dem verfrühten Ablösen von Spermatoziden oder pachytänen Spermatozyten einher. Die Blut-Hodenschranke behält dabei ihre Kompetenz (Lustig et al. 2000). Dieses in vivo Experiment und die oben genannten

Beobachtungen zeigen deutlich den Einfluß, den die Basalmembran auf die Spermatogenese und die Integrität des Tubulus seminiferus ausübt.

In einer Untersuchung an atrophierten, CIS-Zellen enthaltenden Tubuli sowie an Seminomen hat die Arbeitsgruppe von Timmer et al. entsprechend den hier vorliegenden Ergebnissen eine Verdickung der Lamina propria und Invaginationen der Basalmembran festgestellt. Zusätzlich beschreibt die Gruppe tubuläre Strukturen in Tumorknoten angrenzend an Tubuli, die neben anderen extrazellulären Matrixkomponenten auch aus Laminin aufgebaut sind. Die Seminome sind mit fibrovaskulären Septen durchzogen, die eine diffuse Färbung von Laminin, Collagen Typ I und IV, Fibronectin und Vitronectin aufweisen (Timmer et al. 1994). Den Beschreibungen und Bildern zufolge handelt es sich hierbei um die gleichen morphologischen Befunde, welche in dieser Studie beschrieben werden. Allerdings ist das Vorkommen von lokalen Unterbrechungen der Basalmembran in den Tubuli nicht im Einklang mit den hier vorgelegten Ergebnissen.

Bereits 1977 versuchten Schulze und Holstein den Vorgang zu ergründen, der von der intraepithelialen Tumorzelle zum Seminom führt. In Geweben mit Carcinoma in situ bemerkten sie eine teilweise verdickte Basalmembran, welche an einigen Stellen durch Tumorzellen in das peritubuläre Gewebe evaginiert war. Trotz sorgfältiger licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnten sie keine Lücke in der Basalmembran finden (Schulze und Holstein 1977). Evaginationen der Basalmembran sind in der hier vorgelegten Studie nicht festzustellen. Aber eine Übereinstimmung findet sich in den beschriebenen Ansammlungen von Tumorzellen im Interstitium, die von einer Basalmembran vollständig umschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass eine Verbreiterung der Lamina propria einhergehend mit Invaginationen der Basalmembran ein unspezifischer Ausdruck für ein pathologisches Geschehen im Hoden darstellt. Der Zusammenhang zwischen einer ungestörten Spermatogenese und einer intakten Wand ist offensichtlich. Allerdings ist bis heute nicht geklärt, ob die Ursache der gestörten Spermatogenese in den Veränderungen der Lamina propria zu suchen ist oder ob eine gestörte Spermatogenese die Verantwortung für die Veränderungen der Lamina propria trägt.

Die pathophysiologische Rolle, welche die einzelnen Lamininmoleküle beim Carcinoma in situ oder Seminom spielen, ist bis heute noch nicht vollständig bekannt.

Die Distribution der einzelnen Lamininketten in der Basalmembran des Tubulus seminiferus sind bereits untersucht worden. Der fetale Hoden exprimiert folgende Ketten des Lamininmoleküls: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\gamma 1$, während der adulte Hoden nur noch $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 2$ - und $\gamma 1$ -Ketten aufweist (Virtanen et al. 1997, 2000). Da die $\beta 1$ -Kette fehlt, spricht dies für die Präsenz von Laminin-3, welches aus den Ketten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 1$ besteht (Virtanen et al. 2000). Im Tubulus seminiferus des atrophierten Hodens werden die fetalen Lamininketten $\alpha 5$ und $\beta 1$ reexprimiert (Virtanen et al. 1997, 2000).

Es besteht demnach die Möglichkeit, dass Laminin-10 ($\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$), das in Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomzellen steht, zumindest in Basalmembranen atrophiischer Hoden existiert (Tani et al. 1999). Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass diese Reexprimierung der Lamininketten zeitgleich mit der kompositionellen Veränderung des Cytokeratin in den Sertolizellen zusammentrifft.

Ob allerdings die Basalmembran in den Zellclustern Laminin-10 exprimiert und welche mögliche Bedeutung dies für die weitere Entwicklung hat, bleibt offen und ist nur mit einem Antikörper festzustellen, der gegen die Untereinheiten $\alpha 5$ und /oder $\beta 1$ gerichtet ist. Die atypischen Keimzellen der in dieser Studie untersuchten Gewebe zeigen in den Tubuli mit Carcinoma in situ keine positive Lamininexpression. Allerdings liegen die kleinen Septen sehr dicht an den atypischen Keimzellen in den Tumorzellclustern und im Seminom, so dass es nicht auszuschließen ist, dass Tumorzellen die extrazelluläre Matrix der Septen synthetisieren.

Wie schon erwähnt kann man bei einigen Karzinomen den Verlust der Basalmembran und somit des Laminins beobachten (Barsky et al. 1983, Liotta et al. 1983). Diesem Verlust liegt ein enzymatischer Abbau zugrunde (Barsky et al. 1983). Zu den Enzymen, welche hauptsächlich für den Abbau der extrazellulären Matrix und zellassozierten Proteine verantwortlich sind, zählen unter anderem die Matrixmetalloproteinasen und die Gewebeserinproteinasen. Die meisten Enzyme werden von den Wirtszellen beigesteuert (Liotta und Kohn 2001). Beispielsweise regulieren Makrophagen, nachdem sie sich an Laminin-1 gebunden haben, die Expression von einer Matrixmetalloproteinase

(MMP-9) und des Urokinase-type Plasminogenaktivators hoch (Khan und Falcone 1997). Diese Proteinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumordinvasion, Metastasierung und Angiogenese.

Als Gegenspieler ist die Familie der TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) bekannt, welche die Tumorzellinvasion inhibieren. FSH (Follikel stimulierendes Hormon) induziert zusammen mit lokalen parakrinen Faktoren die Expression und Sekretion von TIMP-1 aus Sertolizellen. Im Hoden werden verschiedene Matrixmetalloproteinasen produziert, insbesondere MMP-2, MMP-9 und MMP-23 (Grønning et al. 2000).

Proteolyse ist in normalem Gewebe physiologisch, aber streng reguliert und zeitlich begrenzt. So findet enzymatischer Abbau beispielsweise bei Trophoblastenimplantation, Embryomorphogenese, Gewebeumbau und Angiogenese statt. Der entscheidende Unterschied ist, dass die Tumorzellen Proteolyse mit Motilität verbinden, um an Zeiten und Orten aus der Basalmembran auszutreten, die für normale Zellen nicht möglich wären (Liotta et al. 1991). Als generelle Eigenschaft aller Karzinomtypen gilt, dass Invasion immer mit Defekten in der Basalmembran einhergeht (Barsky et al. 1983).

Dadurch, dass solche Defekte aber in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnten, erscheint ein enzymatischer Abbau der Basalmembran bei einem durch proliferierende CIS-Zellen erweiterten Keimtubulus unwahrscheinlich.

5.2 Integrin

Die Färberesultate der Basalmembran mit Integrin $\alpha 6$ untermauern die Ergebnisse, die mit Laminin erzielt wurden. In allen untersuchten Stadien, mit Ausnahme des Seminoms, zeigt sich eine durchgehende Basalmembran. Im fetalen Hoden wird Integrin $\alpha 6$ von sämtlichen Zellen des sich entwickelnden Epithels exprimiert, während es sich im gesunden adulten Hoden in Übereinstimmung mit anderen Studien an den basalen Polen der Sertoli- und Keimzellen und ganz schwach in den Myofibroblasten darstellen lässt (Schaller et al. 1993, Virtanen et al. 1997, Magnanti et al. 2001). Wie auch bereits beschrieben, zeigt das Integrin in den Tubuli mit CIS-Zellen und auch in den fortgeschritteneren Stadien eine stärkere Immunantwort und wird zusätzlich im Cytoplasma atypi-

scher Keimzellen exprimiert (Timmer et al. 1994). In atrophierten Tubuli seniler Männer oder Männer mit Kryptorchismus zeigt sich ebenfalls eine stärkere Integrin- $\alpha 6$ -Expression in der Basalmembran und überdies eine weitere nach luminal gerichtete Färbung der epithelialen Zellen (Virtanen et al. 1997).

Bei der Ratte und dem gemeinen Seidenäffchen (*Callithrix jacchus*), welches ein geeignetes Primatenmodell für den human Hoden darstellt, ist nachgewiesen, dass Integrin $\alpha 6$ von Sertolizellen synthetisiert wird (Salanova et al. 1995, Husen et al. 1999). Shinohara et al. (1999) zeigen, dass murine Spermatogonien ebenfalls dieses Integrin exprimieren. Da beim Menschen diese Expression in den Keim- und Sertolizellen des Epithels zu finden ist, kann man davon ausgehen, dass dieses Integrin von beiden Zelltypen synthetisiert wird.

Auf Grund der Tatsache, dass sich Integrine zu einem Heterodimer zusammenlagern, um einen funktionsfähigen Rezeptor, beispielsweise für Laminin, zu bilden, stellt sich die Frage nach dem potentiellen Partner des Integrin $\alpha 6$. Diese Integrinuntereinheit lagert sich entweder mit $\beta 1$ oder $\beta 4$ zusammen, um einen Lamininrezeptor zu bilden (Quaranta und Plopper 1997). Die Integrinuntereinheit $\beta 1$ wird sowohl in den Basalzellen des Tubulus seminiferus als auch in den Myofibroblasten exprimiert, während $\beta 4$ vorwiegend in den Myofibroblasten und nur zu einem geringen Grad in den Basalzellen auf der Basalmembran zu finden ist (Virtanen et al. 1997). Untersuchungen haben ergeben, dass Integrin $\beta 1$ in Tubuli mit CIS-Zellen eine schwache Immunreaktion zeigt, aber in Seminomzellen wieder hochreguliert wird (Timmer et al. 1994). Deswegen kann man davon ausgehen, dass der Hauptrezeptor für Laminin-1 aus den Integrinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ gebildet wird (Virtanen et al. 1997).

Allerdings korreliert die Expression mehrerer Integrine auf einem Zelltyp nicht immer mit deren Fähigkeit, als Rezeptor für spezielle Liganden zu dienen. Das Vorkommen muss nicht unbedingt die Funktion eines Lamininrezeptors implementieren, da sich gerade die Integrinuntereinheit $\beta 1$ mit vielen α -Untereinheiten zusammenlagern kann (Bosman 1993, Mercurio 1995).

Da Integrine eine große Rolle bei der Organisation und Funktion der Epithelien spielen, wird vermutet, dass sie durch veränderte Exprimierung und Funktion zu der Karzinomprogression beitragen (Rabinovitz und Mercurio 1996).

Juliano und Varner haben eine Reihe von Integrinen untersucht und festgestellt, dass bei epithelialen Tumoren wie die der Lunge, der Brust, des Colons und der Niere ein Verlust der räumlichen Anordnung auftritt (Juliano und Varner 1993, Juliano 1994). Dies gilt insbesondere für die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, welche im gesunden Epithel polarisiert, basolateral auftreten und im entarteten Gewebe eine diffuse, intrazelluläre Färbung zeigen. Das Verhalten des Integrin $\alpha 6$ in der vorliegenden Studie im Hodengewebe entspricht diesen Ergebnissen. Juliano (1994) konstatiert, dass diese Veränderungen auch mit strukturellen Veränderungen in der Basalmembran korrelieren. Ausgehend von den hier vorgelegten Ergebnissen können keine Veränderungen hinsichtlich der Basalmembran festgestellt werden.

Die oben aufgeführten Untersuchungen über Integrine und deren Funktion sind Hinweise auf eine Beteiligung bei der Tumorprogression, lassen aber noch keine endgültige Schlussfolgerung zu. Dies gilt insbesondere für das in dieser Studie untersuchte testikuläre Carcinoma in situ und dessen weitere Entwicklung. Mit der immunhistochemischen Untersuchungsmethode kann man die funktionelle Bedeutung der Integrine nicht erschließen, sondern lediglich die Exprimierung und die möglichen Veränderungen in verschiedenen Stadien. Die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse zeigen demnach das Vorhandensein und die Unversehrtheit der Basalmembran beim Carcinoma in situ und der intratubulären Neoplasie an und sprechen dafür, dass die Basalmembran nicht von CIS-Zellen durchbrochen wird. Dies geht konform mit der Feststellung von Albelda et al. (1993), dass invasive Tumore keine Basalmembran mehr aufweisen und Integrin $\alpha 6$ nicht oder nur noch schwach exprimieren. Die Bedeutung der hochregulierten Exprimierung von Integrin $\alpha 6$ im Cytoplasma der CIS-Zellen bedarf weiterer Aufklärung. Der Verlust an Polarität ist, wie oben schon erwähnt, vielen Integrinen gemein, wenn sie in Neoplasien exprimiert werden (Rabinovitz und Mercurio 1996). Eine Theorie besagt, dass das Fehlen der entsprechenden Untereinheit eine Fehlregulierung verursachen könnte. Eine andere Alternative wäre, dass entartete Zellen keine entsprechenden Signale enthalten, welche die Migration auf die Zelloberfläche regulieren (Bosman 1993). Allerdings liegen hierfür noch keine Beweise vor.

5.3 Blutgefäße

In den Arealen mit der intratubulären Neoplasie und den Zellclustern sind zahlreiche Blutgefäße zu vermerken, die sich hauptsächlich in den kleineren Septen befinden. Die Immunreaktion ändert sich nicht. Es ist bereits bekannt, dass die Lamina propria des Menschen im Unterschied zu der von Maus und Ratte Kapillaren enthält (Davidoff et al. 1990, Ergün et al. 1994). Ein Grund dieser Differenz mag in der Mehrschichtigkeit der humanen Tubuluswand und in der geringeren Permeabilitätsrate liegen. Die Mikrovaskularisation im Hoden wird in drei Kompartimente unterteilt: in den afferenten Teil, der die Leydigzellen mit dem Tubulus seminiferus verbindet, den intramuralen Teil, der in der Wand der Lamina propria verläuft, und den efferenten Teil, der von dort aus wieder zu den Leydigzellen führt. Somit ist für den Transport von Hormonen und Nährstoffen gesorgt, und die Spermatogenese wird aufrechterhalten. Die Kapillaren innerhalb der Lamina propria sind von Fortsätzen der Myofibroblasten umgeben (Ergün et al. 1994, 1996).

Auch unter anderen pathologischen Umständen, beispielsweise bei der tubulären Hyalinisierung, sind Blutgefäße in der Tubuluswand beschrieben worden (Haider et al. 1999). Um den erhöhten Ansprüchen an Ernährung und Sauerstoff für ihr Wachstum nachzukommen, induzieren Tumore die Bildung neuer Blutversorgung. Somit ist Angiogenese ein wichtiger Faktor in der Tumorbiologie (Jones und Harris 1998, Jones et al. 2000). Überdies wird das Metastasieren erleichtert, da neue Gefäße dazu tendieren, hyperpermeabel zu sein (Dvorak et al. 1995).

Um die Angiogenese zu untersuchen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Mit der MVD (microvascular density) kann der Grad der Angiogenese gemessen werden, indem man die Anzahl der Gefäße innerhalb der vaskulären „hot spots“ direkt zählt. Der vascular endothelial growth factor (VEGF) und die Thymidin Phosphorylase (TP) zählen zu den angiogenetischen Faktoren. Während VEGF-C und sein Rezeptor (VEGFR-3) lymphangiogenetisch und somit auf das lymphatische Endothel wirken, agiert der VEGF mit den Endothelzellen der Blutgefäße. In der Studie von Jones et al. (2000), in der Seminome, Teratome und gesundes Gewebe untersucht worden sind, zeigt sich zwar, dass die MVD in Teratomen mit Abstand am höchsten ist, sich die Verteilung aber in allen Geweben

sehr heterogen zeigt. Für VEGF-C und VEGFR-3 lassen sich keine prognostische Bedeutung für die Metastasierung ableiten. Allerdings deutet die Tatsache ihrer Anwesenheit auf eine wichtige Rolle bei der lymphogenen Metastasierung hin, wie es beispielsweise beim Seminom der Fall ist. Im Falle des hier beschriebenen Übergangsstadiums sind die Blutgefäße weitgehend in den Septen und nicht im Stroma zu finden. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich noch um tubuläre Strukturen handelt.

5.4 Actin und Myosin

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Immunreaktion von Actin und Myosin mit fortschreitender Proliferation der CIS-Zellen in den Tubuli abnimmt, während die von Vimentin stärker wird. Die Färbung der Blutgefäße hingegen bleibt unverändert. Myosin zeigt die stärkste Reaktion in den Arterien und Arteriolen, während es in den Myofibroblasten einen geringeren Anteil als Actin innehat (Holstein et al. 1996). Auffallend ist, dass Myosin in Tubuli mit CIS- und Sertolizellen, in denen Actin noch weitgehend starke Immunreaktion aufweist, eine schwächere Immunreaktion zeigt. Dies lässt die Vermutung zu, dass Myosin in einem früheren Stadium als Actin zugrunde geht.

Massive Ablagerungen von Kollagenen, elastischen Fasern und einer amorphen Grundsubstanz führen zur Verdickung der Lamina propria. Die mit Antikörpern markierte Tubuluswand stellt sich doppelspurig oder aufgefaset dar, weil die Myofibroblasten durch die Zunahme an Bindegewebe auseinander gedrängt werden. Dies ist ein morphologisches Charakteristikum bei gestörter Spermatogenese, Sklerose und Atrophie. Sie kann bei zahlreichen pathologischen Veränderungen des Hodens zum Beispiel Kryptorchismus, Klinefelter's Syndrom, Carcinoma in situ, Varikozele sowie physiologischerweise im Alter auftreten (De Kretzer et al. 1975, Arenas et al. 1997, Haider et al. 1999).

Zahlreiche Untersuchungen sind bereits in diesem Zusammenhang über die peritubulären Zellen durchgeführt worden. So ist das Phänomen einer verdickten Lamina propria in Tubuli mit CIS-Zellen schon lange bekannt (Schulze und Holstein 1977, Timmer et al. 1994). In der Lamina propria älterer Patienten mit gestörter Spermatogenese ändert

sich der Gehalt an Actin, Myosin und Vimentin nicht, aber die Desmin-reaktiven Zellen nehmen deutlich an Zahl und Intensität ab (Davidoff et al. 1990). Andere Studien beweisen, dass die Zahl an Vimentin-reaktiven, peritubulären Zellen mit fortschreitender Sklerotisierung ansteigt, während die Actin- und Desmin-reaktiven Zellen abnehmen (Santamaria et al. 1992, Arenas et al. 1997). Myofibroblasten tragen nicht nur zur Kontraktilität des Tubulus seminiferus bei, sondern synthetisieren und deponieren die Komponenten der extrazellulären Matrix in Kooperation mit den Sertolizellen (Skinner et al. 1985, Santamaria et al. 1995). Aus der reduzierten Immunantwort des muskeltypischen Desmins lässt sich schließen, dass die Myofibroblasten ihre kontraktile Funktion verlieren, sich zu reinen Fibroblasten entwickeln und vermehrt Komponenten der extrazellulären Matrix produzieren (Davidoff et al. 1990). Die Fibroblasten bleiben erhalten, weil sich der Gehalt am fibroblastentypischen Vimentin entweder erhöht oder gleich bleibt. Dies bedeutet eine Abnahme der myoiden Zellen bei gleichzeitiger Fibroblastenzunahme, so dass die absolute Zahl der peritubulären Zellen unverändert bleibt (Arenas et al. 1997).

Dieses Phänomen des Wechsels ist bereits während der fetalen Entwicklung des menschlichen Hodens festzustellen, allerdings in umgekehrter Reihenfolge. So nimmt die Zahl der peritubulären Fibroblasten von der 14. bis zur 39. Woche der Gestation bei gleichzeitiger Zunahme der Myofibroblasten ab (Arenas et al. 1997).

Aus dem graduellen Immunreaktionsverlust der Mikrofilamente in den Tubuli mit Carcinoma in situ bis hin zu den Zellclustern lässt sich schließen, dass die Myofibroblasten ihre kontraktile Qualität verlieren. Allerdings lassen sich selbst im Übergangsstadium immer noch Myofibroblasten in den kleinen Septen nachweisen, die positiv auf die Antikörper reagieren. Die Folgen des Kontraktilitätsverlust sind abzusehen: die Formation der Sertolizellen sowie der intratubuläre Druck können nicht mehr aufrecht erhalten werden und die Blut-Hodenschranke kann ihre Aufgabe ebenfalls nicht mehr ordnungsgemäß wahrnehmen.

Bis heute ist der Mechanismus, der die Kontraktilität moduliert, noch nicht vollständig geklärt. Da die morphologischen, funktionellen und biochemischen Charakteristika beider Zellpopulationen stark voneinander beeinflusst werden, postuliert man, dass diese parakrine Substanzen produzieren, um die Aktivitäten der benachbarten Zellpopulation

zu modulieren. So nimmt beispielsweise das P-MOD-S, ein von den peritubulären Zellen produziertes Protein, Einfluss auf die Sertolizellaktivität, während die von Sertolizellen produzierten Heparinoide im Gegenzug die Proliferation der peritubulären Zellen modulieren (Skinner et al. 1988, Tung und Fritz 1991). Auch die Beteiligung folgender Substanzen, welche die Kontraktilität betreffen, werden diskutiert: Prostaglandin, transforming growth factor β , Endothelin und das NO/cGMP-System. Außer den parakrinen Faktoren spielt das Integrin $\beta 1$ vermutlich noch eine Rolle bei der Kontraktilität, während eine direkte Innervation bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Maekawa et al. 1996, Magnanti et al. 2001).

5.5 Cytokeratin

In vitro Versuche haben bereits gezeigt, dass Myofibroblasten die Interaktion mit den Sertolizellen benötigen, um sich zu entwickeln und um deren myoide Charakteristika zu behalten. In Abwesenheit der Sertolizellen verliert sich der kontraktile Histotypus und es entwickeln sich Zellen des Fibroblastentypus (Tung und Fritz 1986). Auf der anderen Seite könnten die peritubulären Zellen ihrerseits die Sertolizellen in ihrer Funktion beeinträchtigen, weil durch die verdickte Lamina propria der metabolische Stoffaustausch zwischen den beiden Zellpopulationen behindert wäre (Arenas et al. 1997).

Die Alteration der Sertolizellen tritt vor der Myofibroblastenalteration auf, da Cytokeratin 18 zu einem Zeitpunkt exprimiert wird, an dem man noch keine Veränderung von Actin, Myosin oder Vimentin feststellen kann. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Kontraktilitätsverlust durch Sertolizellen verursacht wird.

Cytokeratin 18 lässt sich vereinzelt in Tubuli mit CIS-Zellen und primären Spermatozyten darstellen, aber es ist in Tubuli mit reiferen Keimzellstadien trotz der Anwesenheit einzelner CIS-Zellen nicht nachzuweisen. In Tubuli mit Spermatogonienarrest hingegen sowie in Tubuli mit Sertoli- und CIS-Zellen ist das Intermediärfilament regelmäßig in den Sertolizellen darzustellen (Soosay et al. 1991, Kliesch et al. 1998). Ähnliche Resultate zeigt die Cytokeratinexpression in Hoden mit gemischter Atrophie, die sich aus normalen Tubuli, atrophischen oder SCO-Tubuli zusammensetzt und ebenfalls keimzellstadienabhängig ist. Die Tatsache, dass Sertolizellen in SCO-Tubuli

entweder Cytokeratin-positiv oder -negativ sind, deutet auf eine heterogene Population dieser Zellen hin (Bergmann und Kliesch 1994). Dies würde auch erklären, dass trotz der Anwesenheit von CIS-Zellen die Spermatogenese bis zu einem gewissen Grade noch ungestört ablaufen kann.

Desmin, das physiologischerweise nur im fetalen Hoden zu finden ist, wird ebenfalls bei Kryptorchismus und in tumornahen Gebieten, in denen Carcinoma in situ oder SCO-Tubuli zu finden sind, reexprimiert (Rogatsch et al. 1996). Vimentin ist in allen bisher beschriebenen Stadien, sowohl im fetalen bis zum murenen Zustand als auch bei den oben erwähnten Krankheiten, in der Sertolizelle zu finden (Stosiek et al. 1990, Bergmann und Kliesch 1994, Rogatsch et al. 1996). Diese Beobachtungen zeigen, dass Sertolizellen unter bestimmten Bedingungen mit Veränderungen des Cytoskeletts reagieren. Die auslösenden Momente dafür sind aber noch nicht bekannt. Im Fall des Carcinoma in situ liegt die Vermutung nahe, dass die Proliferation der CIS-Zellen zu einem graduellen Funktionsverlust der Sertolizellen führt, den man an den Veränderungen des Cytoskeletts demonstrieren kann.

Die in dieser Studie besprochenen Zellcluster zeigen neben PLAP-positiven, atypischen Keimzellen auch Cytokeratin-18- und Vimentin-positive Zellen, welche vorwiegend angrenzend an Septen zu finden sind. Diese Zellen zeigen mit ihren cytoplasmatischen Fortsätzen morphologische Ähnlichkeit mit Sertolizellen und werden aus diesem Grunde auch als solche bewertet. Ein weiterer Hinweis auf die Identität dieser Cytokeratin-positiven Zellen ist die Tatsache, dass dieser Antikörper epitheliale Zellen anfärbt und Sertolizellen zumindest im Fall der Maus aus dem Coelomepithel entstammen, während Keimzellen nicht epithelialer Herkunft sind (Karl und Capel 1998). Es ist unwahrscheinlich, wenn auch nicht auszuschließen, dass entartete Keimzellen, die in CIS-infiltrierten Tubuli Cytokeratin-negativ sind, im späteren Stadium epitheliale Anteile aufweisen.

Hinsichtlich der Cytokeratinexpression im tubulären Seminom zeigen sich bei den Veröffentlichungen Differenzen. Bei Al Nazer und Al Dayel (2001) sowie bei Zavala-Pompa et al. (1994) werden keine Cytokeratin-positiven Zellen nachgewiesen. Bei Al Nazer und Al Dayel wird der verwendete Antikörper nicht angegeben, während Zavala-Pompa et al. mit einem Antikörper arbeiten, der Cytokeratin 18 markiert. In den

anderen beiden Studien hingegen wird das fokale Vorkommen von Cytokeratin-positiven Zellen beschrieben, die mit den Antikörpern AE1/AE3 gegen die Cytokeratine Typ I (10, 15, 16, 19) und Typ II (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8) nachgewiesen werden (Young et al. 1989, Takeshima et al. 1999). Cytokeratin 18 wird hier nicht angefärbt. Aber aufgrund der Tatsache, dass dieses Cytokeratin mit dem Cytokeratin 8 in der Regel ein Paar bildet, lässt sich schließen, dass dennoch dieselben Strukturen angefärbt werden (Chu und Weiss 2002). Die dargestellten Cytokeratin-positiven Zellen werden von den Autoren als Tumorzellen interpretiert. Aber man sollte die Möglichkeit, dass es sich hierbei um Sertolizellen handeln könnte, zumindest in Betracht ziehen.

Aufgrund eigener Beobachtungen und der Tatsache, dass Cytokeratin als Dedifferenzierungsmarker für Sertolizellen gilt und CIS-Zellen für den epithelialen Marker negativ sind, ist davon auszugehen, dass es sich bei den in dieser Studie untersuchten immunreaktiven Zellen in den intratubulären Neoplasien bzw. Zellclustern um dedifferenzierte Sertolizellen handelt (Rørth et al. 2000).

Da Vimentin als das zellspezifische Intermediärfilament für Sertolizellen gilt, wurde es in der hier vorliegenden Studie zur Untermauerung der Ergebnisse mit Cytokeratin 18 eingesetzt (Rogatsch et al. 1996). In der Literatur finden sich - ähnlich wie beim Cytokeratin - unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Expression in Seminomen. So stellten beispielsweise Soosay et al. (1991) beim klassischen Seminom keine positiven Zellen fest, während Fogel et al. (1990), sowie Al Nazer und Al Dayel (2001) von positiven Zellen berichten. Ob es sich in diesen Fällen, wie postuliert, um Tumorzellen handelt oder um Sertolizellen, kann man anhand der in diesen Studien veröffentlichten Abbildungen nicht feststellen. Takeshima et al. (1999) berichten von Vimentin-positiven Zellen im tubulären Seminom. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, allerdings divergieren die Meinungen über die Herkunft der Zellen.

Die These, dass es sich bei den immunreaktiven Zellen nicht um Tumorzellen, sondern um Sertolizellen handelt, wird ferner durch einen weiteren Sertolizellmarker unterstützt. Das Gap Junction Protein Connexin 26 ist Bestandteil des „Junctional Complex“ der Sertolizellen untereinander, wahrscheinlich auch zwischen Sertolizellen und den basalen Keimzellen (McGinley et al. 1979, Pelletier und Byers 1992, Batias et al. 2000). Während es in normalen Tubuli eine schwache Immunreaktion zeigt, wird es sowohl in

Tubuli mit Spermatogonienarrest als auch in CIS-infiltrierten Tubuli im Cytoplasma der Sertolizellen hochreguliert (Brehm et al. 2002). In der intratubulären Neoplasie zeigt sich die gleiche, fokale Immunreaktion in den Zellen, die auch mit Cytokeratin 18 und Vimentin dargestellt werden.

Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Studie beschriebene intratubuläre Neoplasie als tubuläres Seminom zu bezeichnen ist. Da sich die Zellen der hier beschriebenen Zellcluster noch innerhalb des Tubulus befinden, könnte man sie weiterhin als CIS-Zellen ansprechen. Auch anhand des Proliferationsverhalten von CIS-Zellen im Gegensatz zu Seminomzellen kann man in dieser Fragestellung keine Antwort finden (Bergmann et al. 2003). Ausgehend davon, dass die Vimentin- und Cytokeratin-positiven Zellen im tubulären Seminom ebenfalls Sertolizellen sind, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um dieselbe Struktur handelt. Dies würde allerdings nichts an der Fragestellung zur Tumorentwicklung ändern.

Differentialdiagnostisch ist beim tubulären Seminom unter anderem der Sertolizell-tumor in Betracht zu ziehen, da er eine ähnliche Anordnung zeigt. Allerdings weist dieser keine atypischen Keimzellen auf, sondern elongierte Zellen mit klarem oder vakuoliertem Cytoplasma und ovalen Kernen. Überdies zeigt er eine deutliche Cytokeratin-Positivität (Al Nazer und Al Dayel 2001).

Wie auch beim tubulären Seminom existieren zahlreiche Veröffentlichungen über die Cytokeratinexpression im klassischen Seminom mit kontroversen Ergebnissen. So beschreiben einige Autoren das Vorkommen Cytokeratin-positiver Seminomzellen (Miettinen et al. 1985, Fogel et al. 1990, Soosay et al. 1991). Die in dieser Studie untersuchten Seminome weisen bis auf wenige Ausnahmen keine Cytokeratin-positiven Zellen auf. Diese Ergebnisse gehen konform mit Studien anderer Autoren, in denen sich reine Seminome in der Regel nicht mit dem Antikörper gegen Cytokeratin anfärben lassen (Battifora et al. 1984, Al Nazer und Al Dayel 2001, Chu und Weiss 2002).

In einer Studie von Cheville et al. 2000 zeigt sich, dass 18 von 64 Seminomen positive Cytokeratin 18 Immunreaktion aufweisen, allerdings sind hierbei Anzahl und Distribution sehr unterschiedlich. Die in der gleichen Studie untersuchten Nichtseminome, insbesondere das embryonale Karzinom, sind überwiegend Cytokeratin-positiv (Cheville

et al. 2000). Offensichtlich haben in diesem Fall die Neoplasien epitheliale Anteile. Auch andere Autoren haben die Möglichkeit in Betracht gezogen, Seminome von Nichtseminomen unter anderem mit diesem immunhistochemischen Marker zu differenzieren (Battifora et al. 1984, Miettinen et al. 1985, Takeshima et al. 1999, Cheville et al. 2000). Eine Differenzierung ist von prognostischer und therapeutischer Wichtigkeit.

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang vor allem die Entwicklungstheorie der Keimzelltumore. Es ist bis heute noch nicht geklärt, ob sich die Nichtseminome direkt aus den CIS-Zellen entwickeln, oder ob das Seminom ein Zwischenstadium ist, aus dem die verschiedenen Nichtseminome ihren Ursprung nehmen. Die CIS-Zellen beider Keimzelltumore sind morphologisch identisch, bilden insgesamt aber eine phänotypisch heterogene Gruppe (Rajpert-De Meyts et al. 1996). Das zeigt sich beispielsweise an der unterschiedlichen Expression immunhistochemischer Marker. Hierbei sind vor allem folgende zu nennen: PLAP, c-kit, M2A, 43-9F, TRA-1-60 (Rørth et al. 2000). TRA-1-60 wird normalerweise von CIS-Zellen in der Gegenwart von embryonalen Karzinomen stark exprimiert, aber selten bei reinen Seminomen, welche diesen Antikörper aber dennoch exprimieren (Rajpert-De Meyts et al. 1996). Das c-kit Protein ist im Gegensatz zu Nichtseminomen in Seminomen hochreguliert (Rajpert-De Meyts und Skakkebak 1994).

Aufgrund der Tatsache, dass es verschiedene CIS-Zellen gibt, kann man aber davon ausgehen, dass Seminome nicht in jedem Fall einen intermediären Status einnehmen (Rørth et al. 2000). In diesem Zusammenhang lässt sich eventuell auch die kontroverse Cytokeratinexpression in Seminomen erklären, falls die Seminomzellen tatsächlich Cytokeratin-positiv sind. Möglicherweise ist dies im Falle der positiven Expression als Anzeichen einer Differenzierung der Seminomzellen in Richtung des Nichtseminoms zu werten.

Dass sich Sertolizellen in den Tumorzellclustern befinden, ist ein Hinweis dafür, dass es sich hierbei um ursprüngliche Tubuli handelt. Aus der Beobachtung, dass sich im Seminom fast keine Cytokeratin- oder Vimentin-positiven Zellen mehr befinden, lässt sich schließen, dass die Sertolizellen in diesem Stadium zugrunde gegangen sind.

5.6 Carcinoma in situ bei Tieren

Ein Problem bei der Ergründung der Entwicklung vom Carcinoma in situ zum soliden Tumor besteht auch darin, ein geeignetes Tiermodell zu finden. Ein Grund mag dafür sein, dass klinische Untersuchungen nicht mit derselben Konsequenz wie in der Humanmedizin durchgeführt werden, so dass die Chance einer frühzeitigen Entdeckung von Carcinoma in situ relativ klein ist. In der Regel fallen Tumore erst auf, wenn sie eine palpierbare Größe haben (Veeramachaneni und Sawyer 1998).

Hunde entwickeln relativ häufig Keimzelltumore. Obwohl diese als Seminom bezeichnet werden, handelt es sich hierbei um ein spermatocytisches Seminom. Dies ist durch DNA-Ploidie, Histologie, PLAP-Negativität und Epidemiologie bestätigt worden. Außerdem weisen sie kein CIS auf (Looijenga et al. 1994).

Beim Pferd und Kaninchen existieren Fallberichte über das Auftreten von Seminomen, welche daran angrenzend CIS aufweisen (Veeramachaneni und Sawyer 1998, Veeramachaneni und Vandewoude 1999). Das Kaninchen wäre ein denkbare Tiermodell, wenn gesichert ist, dass es sich tatsächlich um ein Seminom inklusive CIS handelt. Die histologischen Abbildungen sind vielversprechend. Aber es müssten zusätzlich entsprechende, immunhistochemische Nachweise erbracht werden. Hierzu liegen allerdings noch keine aktuelle Berichte vor.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bis zum heutigen Tag ist es unbekannt, wie sich aus dem Carcinoma in situ ein solider Keimzelltumor entwickelt. In Biopsien von Patienten mit CIS oder Seminomen fielen Bereiche auf, die Ansammlungen von Tumorzellen zeigten, welche von fibrösen Septen umschlossen waren (Zellcluster). Diese Strukturen erinnerten an vergrößerte Tubuli in einem Übergangsstadium zum Seminom. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Vorgang mit immunhistochemischen Methoden zu erleuchten. An 37 Biopsien von 25 Patienten (Durchschnittsalter 31,72 Jahre), die entweder CIS und/oder Seminome aufwiesen, wurde die testikuläre Tubuluswand auf Integrität und Funktionalität untersucht. Die Basalmembran wurde mit Laminin und Integrin $\alpha 6$ angefärbt, während man die Myofibroblasten mit Actin und Myosin darstellte. Um die CIS-Zellen zu lokalisieren, fand ein Antikörper gegen PLAP Anwendung. Die Sertolizellen wurden mit einem Antikörper gegen Cytokeratin 18 angefärbt, das im Zusammenhang mit CIS reexprimiert wird. Als zusätzlicher Sertolizellmarker wurde Vimentin benutzt, das sowohl im normalen als auch im CIS-Tubulus exprimiert wird.

Anhand der Antikörper gegen Actin und Myosin wurde demonstriert, dass die Zahl an Myofibroblasten in der Tubuluswand mit zunehmender Anzahl atypischer Keimzellen abnahm und in dem Übergangsstadium bis auf die Ausnahme kleinerer Septen ganz verschwand. Als Positivkontrolle dienten in diesen Schnitten Kapillaren, welche in den Tumorzellclustern zahlreich vorhanden waren.

Die Basalmembran konnte in allen untersuchten Stadien dargestellt werden. In den intratubulären Neoplasien gab es eine durchgehende Immunreaktion auf Laminin und Integrin $\alpha 6$. Das Seminom wies nur noch große Septen auf, die mit Hilfe der Antikörper ebenfalls eine Basalmembran zeigten. Ein zusätzlicher Befund war die Integrin- $\alpha 6$ -Expressierung in den atypischen Keimzellen, die auch im Seminom insbesondere an den Septen zu demonstrieren war.

In den Zellclustern konnte in einzelnen Zellen die Sertolizellmarker Cytokeratin 18 und Vimentin dargestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei diesen Zellen um Sertolizellen handelte. In Seminomen ließen sich die Cytokeratin- bzw. Vimentin-positiven Zellen bis auf wenige Ausnahmen nicht mehr darstellen.

Diese Ergebnisse deuten auf einen anderen Entstehungsmechanismus des Seminoms hin. Die Abnahme der Myofibroblasten bedeutet den Kontraktilitätsverlust in der Tubuluswand. Dass Sertolizellen im tubulären Gewebe vorhanden sind sowie die intakte Basalmembran unterstützen die Vermutung, dass es sich hierbei um Tubuli handelt, die aufgrund der massiven Zunahme atypischer Keimzellen stark vergrößert sind. Somit wäre es denkbar, dass die Proliferation der CIS-Zellen intratubulär stattfindet. Diese Zunahme an intratubulären Zellen führt zu einer Ausdehnung der Tubuluswand, bis diese ihre Kontraktilität verliert, reißt und zu bindegewebigen Septen umstrukturiert wird. Dass sich Sertolizellen im Seminom nicht oder nur in Ausnahmen darstellen lassen, zeigt, dass diese im Zusammenhang mit der Tubuluswand zugrunde gehen.

7. SUMMARY

The carcinoma in situ (CIS) of the testis is the non-invasive precursor of testicular germ cell tumours. The mechanisms of invasive tumour development from pre-invasive CIS are not known. The current theory is that pre-invasive CIS cells penetrate the tubular wall and invade the interstitium. However, although carefully histological evaluation of testicular tissue with CIS and/or seminoma have been made, up to now there is no published report showing CIS cells passing the tubular wall.

In testicular specimen adjacent to germ cell tumours or from patients with carcinoma in situ areas could be identified with tumour cells surrounded by fibrous sheet resembling enlarged seminiferous tubules in a state in between. Thus the question was raised, if CIS cells actually penetrate the tubular wall to turn into seminoma or if they proliferate intratubular until the seminiferous tubules get destroyed.

With immunohistochemical methods using monoclonal antibodies the functional integrity of the basement membrane was examined in respect to integrin $\alpha 6$ and laminin expression and possible functional changes of myofibroblasts in the peritubular wall with anti-actin and anti-myosin. In order to clarify the fate of somatic Sertoli cells the expression of vimentin as a Sertoli cell marker in the normal epithelium and cytokeratin 18 being known to be associated with CIS was investigated. The CIS cells were detected with an antibody against PLAP. 37 specimen of 25 patients (average age: 31,72 years) with carcinoma in situ or seminoma were investigated.

Areas showing clusters of CIS cells surrounded by a fibrous sheet could be identified as enlarged tubules, because of Sertoli cell specific cytokeratin 18 and vimentin immunoreaction. These "tubules" exhibit an intact basement membrane shown by persistent laminin and integrin $\alpha 6$ immunoreactivity, but myocytes have lost their contractility indicated by the loss of myosin and actin immunoreactivity. They often show septa originating from the fibrous sheet containing numerous capillaries. In classical seminoma sections fibrous septa show laminin and integrin immunoreactivity, but cytokeratin, vimentin, actin and myosin immunoreactivity has almost vanished. Integrin $\alpha 6$ was found not only within the basement membrane, but also in CIS as well as in seminoma cells especially adjacent to fibrous septa.

These data give evidence for a different theory concerning the mechanism of development from carcinoma in situ to malignant germ cell tumour. The enlarged tubules contain not only numerous tumour cells, but also Sertoli cells, which are still present, although in a state of dedifferentiation. The tubular wall turns into connective tissue exhibiting an intact basement membrane with the functional loss of contractility.

Thus it is supposed that the switch from CIS cells to invasive testicular tumour takes place intratubular by an enlargement of the tubule due to carcinoma in situ cell proliferation.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Al Nazer M, Al Dayel F. Tubular seminoma: case report and literature review. *Ann Saudi Med.* 2001;21:334-336.
- Albelda SM. Biology of Disease. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 1993; 68:4-17.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molekularbiologie der Zelle.* 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 1995.
- Albrechtsen R, Wewer UM, Liotta LA. Basement membrane in human cancer. *Pathol Ann.* 1986;11:251-276.
- Arenas MI, Bethencourt FR, De Miguel MP, Fraile B, Romo E, Paniagua R. Immunocytochemical and quantitative study of actin, desmin and vimentin in the peritubular cells of the testes from elderly men. *J Reprod Fertil.* 1997;110:183-193.
- Aumüller G, Schulze C, Viebahn C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech.* 1992;20:50-72.
- Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.* 1983;49:140-147.
- Bartke A, Sinha Hikim AP, Russell LD. Sertoli cell structure and function in seasonally breeding mammals. In: *The Sertoli cell.* Russell LD, Grisworld MD (eds.); Cache River Press, Clearwater. 1993;p349-365.
- Batias C, Siffroi JP, Fénichel P, Pointis G, Segretain D. Connexin 43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem.* 2000;48:793-805.
- Battifora H, Sheibani K, Tubbs RR, Kopinski MI, Sun T-T. Antikeratin antibodies in tumor diagnosis. Distinction between seminoma and embryonal carcinoma. *Cancer.* 1984;54:843-848.
- Ben-Ze'ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:99-108.
- Bergmann M, Kliesch S. The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular biopsies of infertile men. *Anat Embryol.* 1994;190:515-520.
- Bergmann M. Spermatogenese. In: *Andrologie.* Krause W, Weidner W (Hrsg.). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 1998;9-14.

- Bergmann M, Deschler B, Hertle L, Kliesch S. Proliferation in pre-invasive and invasive germ cell tumours. *Histopathology*, in press.
- Bershadsky AD, Vasiliev JM. *Cytoskeleton*. Plenum Publishing Corporation, New York. 1988.
- Bosman FT. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J*. 1993;25:469-477.
- Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K. Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. *J Pathol* 2002; 197: 647–653.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 1996;85:683-693.
- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinmann H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y, Yurchenco PD. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol*. 1994;14:209-211.
- Bustos-Obregón E, Holstein AF. On structural patterns of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Z Zellforsch*. 1973;141:413-425.
- Chao C, Lotz MM, Clarke AC, Mercurio AM. A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1996;56:4811-4819.
- Cheville JC, Rao S, Iczkowski KA, Lohse CM, Pankratz VS. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:583-588.
- Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40:403-439.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res*. 1990;262:253-261.
- De Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biol Reprod*. 1975;12:317-324.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146:1029-1039.

- Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev.* 1994;15:102-115.
- Ergün S, Stingl J, Holstein AF. Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia.* 1994;26:255-262.
- Ergün S, Davidoff M, Holstein AF. Capillaries in the lamina propria of the human seminiferous tubules are partly fenestrated. *Cell Tissue Res.* 1996;286:93-102.
- Eyden B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol.* 2001;25:39-50.
- Fogel M, Lifschitz-Mercer B, Moll R, Kushnir I, Jacob N, Waldherr R, Livoff A, Franke WW, Czernobilsky B. Heterogeneity of intermediate filament expression in human testicular seminomas. *Differentiation.* 1990;45:242-249.
- Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.* 1995;55:901-906.
- Grønning LM, Wang JE, Ree AH, Haugen TB, Taskén K, Taskén KA. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rat Sertoli cells: induction by germ cell residual bodies, interleukin-1 α , and second messengers. *Biol Reprod.* 2000;62:1040-1046.
- Hadley MA, Dym M. Immunocytochemistry of the extracellular matrix in the lamina propria of the rat testis: electron microscopic localization. *Biol Reprod.* 1987;37:1283-1289.
- Haider SG, Talati J, Servos G. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue Cell.* 1999;31:90-98.
- Hao J, Yang Y, McDaniel KM, Dalkin BL, Cress AE, Nagle RB. Differential expression of laminin 5 (alpha 3 beta 3 gamma 2) by human malignant and normal prostate. *Am J Pathol.* 1996;149:1341-1349.
- Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H. Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesions of the breast. *Histopathology.* 1999;34:305-309.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS. Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype. *Arch Histol Cytol.* 1996;59:109-125.

- Holstein AF, Lauke H. Histologic diagnostics of early testicular germ-cell tumor. *Int J Urol.* 1996;3:165-172.
- Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Cell Biol.* 1998;8:359-364.
- Husen B, Giebel J, Rune G. Expression of the integrin subunits $\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\beta 1$ in the testes of the common marmoset. *Int J Androl.* 1999;22:374-384.
- Hustin J, Collette J, Franchimont P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *Int J Androl.* 1987;10:29-35.
- Jacobsen GK, Nørgaard-Pedersen B. Placental alkaline phosphatase in testicular germ cell tumours and in carcinoma-in-situ of the testis. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A.* 1984;92:323-329.
- Jacobsen GK, Talermann A. Atlas of germ cell tumours. Munksgaard, Copenhagen, 1989
- Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumour growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am.* 1998;4:209-217.
- Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Turley H, Valtola R, Bicknell R, Harris AL. Angiogenesis and lymphangiogenesis in stage 1 germ cell tumours of the testis. *BJU Int.* 2000;86:80-86.
- Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Græm N, Müller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest.* 1995;72:223-231.
- Juliano RL, Varner JA. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:812-818.
- Juliano R. Signal transduction by integrins and its role in the regulation of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 1994;13:25-30.
- Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 1998;203:323-333.
- Khan KMF, Falcone DJ. Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J Biol Chem.* 1997;272:8270-8275.
- Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K. Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *J Cell Sci.* 2000;113:869-876.

- Kliesch S, Behre HM, Hertle L, Bergmann M. Alteration of Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma in situ in human testes. *J Urol.* 1998;160:1894-1898.
- Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, Nagle RB. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol.* 1994;145:167-174.
- Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF. Characterization and expression of the laminin $\gamma 3$ chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol.* 1999;145:605-617.
- Kohnen G, Castellucci M, Hsi BL, Yeh CJG, Kaufmann P. The monoclonal antibody GB 42 – a useful marker for the differentiation of myofibroblasts. *Cell Tiss Res.* 1995;281:231-242.
- Konrad L, Weber MA, Groos S, Albrecht M, Aumüller G. Paracrine interaction in testicular somatic cells. *It J Anat Embryol.* 1998;103:139-152.
- Kuratomi Y, Nomizu M, Nielsen PK, Tanaka K, Song S-Y, Kleinman HK, Yamada Y. Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin $\alpha 1$ Chain. *Exp Cell Res.* 1999;249:386–395.
- Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 1980;283:249-256.
- Libby RT, Champlaud M-F, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, Burgeson RE, Hunter DD, Brunken WJ. Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neuroscience.* 2000;20:6517–6528.
- Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* 1983;49:636-649.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991;64:327-336.
- Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001;411:375-379.
- Lipshultz LI, Corriere JN Jr. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol.* 1977;117:175-176.

- Looijenga LH, Olie RA, van der Gaag I, van Sluijs FJ, Matoska J, Ploem-Zaaijer J, Knepfle C, Oosterhuis JW. Seminomas of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men? *Lab Invest.* 1994.;71:490-496.
- Longhurst CM, Jennings LK. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:514-526.
- Lustig L, Denduchis B, Ponzio R, Lauzon M, Pelletier R-M. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biol Reprod.* 2000;62:1505-1514.
- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 1996;59:1-13.
- Magnanti M, Gismondi A, Gandini O, Rossi FM, Michetti PM, Santiemma V, Morrone S. Integrin pattern and effects on contraction in cultured testicular peritubular myoid cells. *AJRI.* 2001;45:21-27.
- McGinley DM, Posalaky Z, Porvaznik M, Russell L. Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell.* 1979;11:741-754.
- Mercurio AM. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol.* 1995;5:419-423.
- Miettinen M, Virtanen I, Talerman A. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *Am J Pathol.* 1985;120:402-410.
- Mikuz G. Männliche Geschlechtsorgane. In: *Pathologie.* Böcker W, Denk H, Heitz PHU (Hrsg.). 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Jena. 2001; 818-840.
- Miosge N. The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol Histopathol.* 2001;16:1239-1248.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cyto-keratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982;31:11-24.
- Parkinson MC, Harland SJ, Harnden P, Sandison A. The role of the histopathologist in the management of testicular germ cell tumour in adults. *Histopathology.* 2001;38:183-194.
- Pelletier RM, Byers SW. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Techn.* 1992;20:3-33.

- Quaranta V, Jones JCR. The internal affairs of an integrin. *Trends Cell Biol.* 1991;1:2-4.
- Quaranta V, Plopper GE. Integrins and laminins in tissue remodeling. *Kidney Int.* 1997;51:1441-1446.
- Rabinovitz I, Mercurio AM. The integrin $\alpha\beta 4$ and the biology of carcinoma. *Biochem Cell Biol.* 1996;74:811-821.
- Rajpert-De Meyts E, Skakkebak NE. Expression of c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive germ cell tumours. *Int J Androl.* 1994;17:85-92.
- Rajpert-De Meyts E, Kvist M, Skakkebak NE. Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch.* 1996;428:133-139.
- Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Brøndum-Nielsen K, Müller J, Skakkebak NE. Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS.* 1998;106:198-204.
- Ramaekers F, Huysmans A, Moesker O, Kant A, Jap P, Herman C, Vooijs P. Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. *Lab Invest.* 1983;49:353-361.
- Raychoudhury SS, Blackshaw AW, Irving MG. Hormonal modulation of the interactions of cultured rat testicular Sertoli and peritubular myoid cells. Effects on glycosaminoglycan synthesis. *J Androl.* 1993;14:9-16.
- Roelofs H, Manes T, Janszen T, Millán JL, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Heterogeneity in alkaline phosphatase isozyme expression in human testicular germ cell tumours: an enzyme-/immunohistochemical and molecular analysis. *J Pathol.* 1999;189:236-244.
- Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch.* 1996;427:497-502.
- Rørth M, Rajpert-De Meyts E, Andersson L, Dieckmann K-P, Fossa SD, Grigor KM, Hendry WF, Herr HW, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW, Skakkebak NE. Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2000;205:166-186.
- Ruiz P, Dunon D, Sonnenberg A, Imhof BA. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for $\alpha 6$ integrins. *Cell Adhes Commun.* 1993;1:67-81.

- Ruoslathi E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-497.
- Sager R, Anisowicz A, Neveu M, Liang P, Sotiropoulou G. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J*. 1993;7:964-970.
- Salanova M, Stefanini M, De Curtis I, Palombi F. Integrin receptor $\alpha 6\beta 1$ is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 1995;52:79-87.
- Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M. Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl*. 1990;13:135-146.
- Santamaria L, Martin R, Nistal M, Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathology*. 1992;21:423-433.
- Santamaria L, Martin R, Codesal J, Ramirez R, Paniagua R. Immunohistochemical quantitative study of the peritubular lamina propria after induction of testicular atrophy induced by epinephrine. *Int J Androl*. 1995;18:295-306.
- Santoro G, Romeo C, Impellizzeri P, Gentile C, Anastasi G, Santoro A. Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril*. 2000;73:699-705.
- Santoro G, Romeo C. Normal and varicocele testis in adolescents. *Asian J Androl*. 2001;3:259-262.
- Schaller J, Glander HJ, Dethloff J. Evidence of $\beta 1$ integrins and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. *Hum Reprod*. 1993;8:1873-1878.
- Schulze C, Holstein AF. On the histology of human seminoma. *Cancer*. 1977;39:1090-1100.
- Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:141-147.
- Serini G, Trusolino L, Saggiorato E, Cremona O, De Rossi M, Angeli A, Orlandi F, Marchisio PC. Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:442-449.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. $\beta 1$ - and $\alpha 6$ -integrins are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1999;96:5504-5509.

- Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol Reprod.* 1988;39:1225-1237.
- Sinowatz F. Gametogenese. In: *Embryologie des Menschen*. Sinowatz F, Seitz J, Bergmann M, Petzoldt U, Fanghänel J (Hrsg.). Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln. 1999;31-49.
- Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet.* 1972;2:516-517.
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Müller J. Carcinoma-in-situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am.* 1982;9:377-385.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Müller J. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS.* 1998;106:3-12.
- Skinner MK, Tung PS, Fritz IB. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol.* 1985;100:1941-1947.
- Skinner MK, Fetterolf PM, Anthony CT. Purification of a paracrine factor, P-MOD-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J Biol Chem.* 1988;263:2884-2890.
- Soosay GN, Bobrow L, Happerfield L, Parkinson MC. Morphology and immunohistochemistry of carcinoma in situ adjacent to testicular germ cell tumours in adults and children: implications for histogenesis. *Histopathology.* 1991;19:537-544.
- Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl.* 1996;19:122-128.
- Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratin 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation.* 1990;43:66-70.
- Tagliabue E, Ghirelli C, Squicciarini P, Aiello P, Colnaghi MI, Ménard S. Prognostic value of $\alpha 6\beta 4$ integrin expression in breast carcinomas is affected by laminin production from tumor cells. *Clin Cancer Res.* 1998;4:407-410.
- Takeshima Y, Sanda N, Yoneda K, Inai K. Tubular seminoma of the testis. *Pathol Int.* 1999;49:676-679.

- Tani T, Lehto V-P, Virtanen I. Expression of laminins 1 and 10 in carcinoma cells and comparison of their roles in cell adhesion. *Exp Cell Res.* 1999;248:115–121.
- Thompson EW, Blackshaw AW, Raychoudhury SS. Secreted products and extracellular matrix from testicular peritubular myoid cells influence androgen-binding protein secretion by Sertoli cells in culture. *J Androl.* 1995;16:28-35.
- Timmer A, Oosterhuis JW, Koops HS, Sleijfer DT, Szabo BG, Timens W. The tumor microenvironment: possible role of integrins and the extracellular matrix in tumor biological behavior of the intratubular germ cell neoplasia and testicular seminomas. *Am J Pathol.* 1994;144:1035-1044.
- Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:618-624.
- Tryggvason K. The laminin family. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:877-882.
- Tung PS, Fritz IB. Cell-substratum and cell-cell interactions promote testicular peritubular myoid cell histotypic expression in vitro. *Dev Biol.* 1986;115:155-170.
- Tung PS, Fritz IB. Sertoli cells in culture secrete paracrine factor(s) that inhibit peritubular myoid cell proliferation: identification of heparinoids as likely candidates. *J Cell Physiol.* 1991;147:470-478.
- Tung PS, Fritz IB. Interactions of Sertoli cells with laminin are essential to maintain integrity of the cytoskeleton and barrier functions of cells in culture in the two-chambered assembly. *J Cell Physiol.* 1993;156:1-11.
- Van Waes C, Kozarsky KF, Warren AB, Kidd L, Paugh D, Liebert M, Carey TE. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin $\alpha 6\beta 4$. *Cancer Res.* 1991;51:2395-2402.
- Veeramachaneni DNR, Sawyer HR. Carcinoma in situ and seminoma in equine testis. *APMIS.* 1998;106:183-186.
- Veeramachaneni DNR, Vandewoude S. Interstitial cell tumour and germ cell tumour with carcinoma in situ in rabbit testes. *Int J Androl.* 1999;22:97-101.
- Virtanen I, Kallajoki M, Närvänen O, Paranko J, Thornell LE, Miettinen M, Lehto VP. Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filament. *Anat Rec.* 1986;215:10-20.

- Virtanen I, Lohi J, Tani T, Korhonen M, Burgeson RE, Lehto V-P, Leivo I. Distinct changes in the laminin composition of basement membrane in human seminiferous tubules during development and degeneration. *Am J Pathol* 1997;150:1421-1431.
- Virtanen I, Gullberg D, Rissanen J, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Laitinen LA, Lehto VP, Ekblom P. Laminin α 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res*. 2000;257:298-309.
- Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie*. Nieschlag E, Behre HM (Hrsg.). Springer-Verlag, Heidelberg. 1996; 29-61.
- Wolf GT, Carey TE, Schmaltz SP, McClatchey KD, Poore J, Glaser L, Hayashida DJ, Hsu S. Altered antigen expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1566-1572.
- Young RH, Finlayson N, Scully RE. Tubular seminoma. Report of a case. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:414-416.
- Zavala-Pompa A, Ro JY, El-Naggar AK, Amin MB, Ordonez NG, Sella A, Ayala AG. Tubular seminoma. An immunohistochemical and DNA flow-cytometric study of four cases. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:397-401.

9. ANHANG

9.1 Firmenverzeichnis der verwendeten Materialien

AEC plus	(Firma Dako, Carpinteria, CA 93013, USA)
3-Aminopropyl-triethoxysilan	(APTEX, Firma Sigma, Steinheim)
Avidin-Biotin-Komplex; Elite	(Firma CAMON, Wiesbaden)
PK-6100 Standard Vectastain	
ABC-Kits;	
Bovines Serumalbumin	(Firma Sigma, Steinheim)
Chrom-Alaun	(Firma Merck, Darmstadt)
DAB	(Firma Research Genetics, Groningen, Netherlands)
Glasobjektträger	(SuperFrost-Objektträger, Firma Langenbrinck, Emmendingen)
Kaisers Glyceringelatine	(Firma Merck, Darmstadt)
Pap-Pen	(Firma Daido, Sangyo Co, LTD, Japan)
Proteinase K	(Firma SIGMA, Steinheim)
Tissue-Tek [®] -Gewebekleber	(OCT Compound, Firma Sakura, USA)
Triton-X-100	(Firma FERAK GmbH, Deutschland)
Vitro-Clud	(Firma Langenbrinck, Emmendingen)

9.2 Beschichtung von Objektträgern

9.2.1 Herstellung von Chromgelatine-Objektträgern für Gefrierschnitte

Zur Reinigung und Entfettung wurden die Objektträger (OT) für 10 Minuten in ein 80%iges Alkoholbad getaucht und anschließend zum Trocknen gestellt.

Protokoll für die Beschichtung:

- 5 g Gelatine in 1000 ml Aqua dest. auf 35°C erwärmen
- 0,5 g Chromalaun ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) zugeben und auf 40°C erwärmen
- Lösung auf 20°C abkühlen lassen
- Mit Faltenfilter filtrieren

- OT 10 Minuten in die Lösung eintauchen
- Über Nacht im Trockenschrank (Firma Memmert, Schwabach) bei 37°C trocknen lassen

9.2.2 Beschichtung der Objektträger für Paraffinschnitte

Die für die Paraffinschnitte verwendeten Objektträger wurden mit APTEX (3-Aminopropyltriethoxysilan) beschichtet.

Protokoll für die Beschichtung:

- OT in Aqua bidest. spülen in Standküvette auf einem Schüttler
- OT abtropfen lassen
- OT in Aceton spülen
- OT unter dem Abzug abdampfen lassen
- OT für 5 Minuten in Glasbecken mit APTEX 2% (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton) überführen
- OT für 2 Minuten in Glasbecken mit frischem Leitungswasser spülen
- OT für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- OT für 2 Minuten in Aqua bidest. stellen
- OT über Nacht bei 37°C im Trockenschrank (Firma Memmert, Schwabach) trocknen

9.3 Verwendete Lösungen

9.3.1 Bouin`sche Fixationslösung

- 15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung mit
- 5 ml Formalin 35% mischen
- 1 ml Eisessig zusetzen.

9.3.2 Formalin nach Lillie

- 500 ml Formol 40%
- 20 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- 32,5 g Na_2HPO_4
- ad 4500 ml Aqua dest.
- auf pH 7,0 einstellen

9.3.3 PBS (phosphate buffered saline)

Stammlösung:

- 82 g NaCl
- 22 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 5,5 g KH_2PO_4
- ad 2000 ml Aqua bidest.
- mit 4n NaOH auf pH 7,2 einstellen.

Gebrauchslösung:

- 1 Teil PBS-Stammlösung
- 4 Teile Aqua bidest.

9.3.4 TRIS-Puffer

Stammlösung:

- 121,14 g Tris
- 800 ml Aqua bidest. mit 1n HCl auf pH 7,6 einstellen
- ad 1000 ml Aqua bidest.
- Gebrauchslösung (0,1 M):
- 100 ml Stammlösung (=Tris-HCl-Puffer)
- 8,5 g NaCl 0,85%
- 1 ml Triton-X-100 0,1%
- ad 1000 ml Aqua bidest.

9.3.5 H_2O_2

Für Paraffinschnitte H_2O_2 3%:

- 7 ml H_2O_2 30% + 63 ml Methanol

Für Gefrierschnitte H_2O_2 1%:

- 2 ml H_2O_2 30% + 58 ml PBS

9.3.6 BSA-Stammlösung (Bovines Serumalbumin)

Für Paraffinschnitte BSA 3%:

- 0,3 g kristallines BSA
- ad 10 ml TRIS-Puffer

Für Gefrierschnitte (PIAP) BSA 5%:

- 0,5 g kristallines BSA
- ad 10 ml TRIS-Puffer

Für Gefrierschnitte (Integrine) BSA 2%:

- 0,2 g kristallines BSA
- ad 10 ml PBS-Puffer

9.3.7 Citratpuffer

Stammlösung A:

- 21,01 g $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$
- ad 1000 ml Aqua bidest.

Stammlösung B:

- 29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$
- ad 1000 ml Aqua bidest.

Gebrauchslösung:

- 1,8 ml Stammlösung A
- 8,2 ml Stammlösung B
- ad 90 ml Aqua dest.

9.3.8 Proteinase

- 100 μ l 0,5M EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraacetat)
- 900 μ l Tris-HCl-Puffer mischen
- 10 mg Proteinase K hinzugeben und lösen

Herstellung von Aliquots à 20 μ l (Lagerung der restlichen Aliquots bei -20°C).

Gebrauchslösung:

Aliquot (20 μ l) in 10 ml Tris-HCl-Puffer.

9.3.9 ELITE-ABC-Peroxidase-Gebrauchslösung

Mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch ansetzen

- 1 Tropfen Stammlösung A (Avidin-Dehydrogenase)
- 1 Tropfen Stammlösung B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)
- ad 2,5 ml Puffer

Danksagung

Allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein besonderer Dank geht vor allem an Frau J. Dern-Wieloch, Frau G. Erhardt, Frau A. Hax und Frau A. Hild, die mich in die Laborarbeit eingewiesen und auch weiterhin bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben. Mein herzlicher Dank gilt auch Frau E. Angermüller für die exzellente Zeichenarbeit und Herrn R. Brehm, der sich jederzeit für meine Fragen Zeit nahm.

Patrick danke ich für seine technische Unterstützung und seine Geduld.

Für die Bereitstellung des Probenmaterials möchte ich mich bei Frau Dr. S. Kliesch und Herrn Prof. Dr. L. Hertle von der Klinik und Poliklinik für Urologie der Wilhelms-Universität Münster bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, meinem Doktorvater, für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.