

**Immunpathologie testikulärer Keimzelltumoren – Eine klinisch-experimentelle  
Analyse am Beispiel des Seminoms**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Heyer, Jannis  
aus Osterholz-Scharmbeck

Gießen, 2023

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Sektion Konservative Andrologie

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Christian Schuppe

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 09.01.2024

## **Inhalt**

1. Einleitung .....	- 1 -
1.1 Aufbau des humanen Hodens .....	- 1 -
1.1.1 Anatomie des Hodens .....	- 1 -
1.1.2 Blut-Hoden-Schranke .....	- 3 -
1.1.3 Immunprivileg im gesunden Hoden .....	- 4 -
1.1.3.1 Einfluss von residenten somatischen Zellen .....	- 5 -
1.1.3.2 Einfluss von Leukozyten .....	- 6 -
1.1.3.3 Einfluss von Androgenen .....	- 8 -
1.1.3.4 Pro- und antiinflammatorische Zytokine des Hodens .....	- 8 -
1.2 Pathoimmunologie und Inflammation des Hodens .....	- 11 -
1.2.1 Maligne Hodentumoren .....	- 11 -
1.2.2 Epidemiologie .....	- 12 -
1.2.3 Ätiologie der TGCT .....	- 13 -
1.2.4 Diagnostik .....	- 15 -
1.2.5 Therapie .....	- 16 -
1.3 Pathoimmunologie des Seminoms .....	- 17 -
1.4 Fragestellung .....	- 18 -
2. Materialien .....	- 19 -
2.1 Patientenkollektiv .....	- 19 -
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien .....	- 22 -
2.3 Datendokumentation und Datenschutz .....	- 23 -
3. Methoden .....	- 23 -
3.1 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom .....	- 23 -
3.1.1 Histologische Beurteilung der Hodenbiopsien .....	- 23 -
3.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen .....	- 24 -
3.1.3 Immunhistochemische Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom .....	- 25 -
3.2. Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom ..	- 30 -
3.2.1 Homogenisierung des Kryomaterials und RNA-Extraktion .....	- 30 -

3.2.2 DNase-Behandlung und reverse Transkription .....	- 31 -
3.2.3 RT-PCR zur Qualitätskontrolle und Gelelektrophorese .....	- 32 -
3.2.7 qRT-PCR mit Berechnung der relativen Genexpression .....	- 33 -
3.2.11 Datenauswertung und statistische Methoden .....	- 36 -
4. Ergebnisse .....	- 38 -
4.1 Deskriptive Statistik .....	- 38 -
4.1.1 Altersverteilung.....	- 38 -
4.1.2 Tumor-Staging.....	- 38 -
4.1.3 Risikofaktoren.....	- 40 -
4.1.4 Hodenvolumetrie und Spermogramm .....	- 41 -
4.1.5 Chemotherapie und Rezidive .....	- 43 -
4.1.6 Tumormarker und Hormonstatus .....	- 45 -
4.2 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom.....	- 49 -
4.2.1 Histopathologische Kategorisierung des Patientenkollektivs.....	- 49 -
4.2.2 CD3-positive Immunzellinfiltration (T-Zellen) .....	- 50 -
4.2.3 CD20cy-positive Immunzellinfiltration (B-Zellen).....	- 52 -
4.2.4 CD68-positive Immunzellinfiltration (Makrophagen).....	- 54 -
4.2.5 CD11c-positive Immunzellinfiltration (dendritische Zellen) .....	- 56 -
4.2.6 Immunhistochemische Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom - Zusammenfassung.....	- 58 -
4.2.7 Korrelationsanalyse der Tumormarker, Hormone und weiteren klinischen Parametern von Seminom-Patienten.....	- 60 -
4.2.8 Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltrationsdichte mit Tumormarker- und Hormonstatus von Seminom-Patienten .....	- 62 -
4.3 Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom... - 65 -	
4.3.1 Regulatorische T-Zellen (T <sub>reg</sub> ).....	- 65 -
4.3.2 T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen .....	- 66 -
4.3.3 B-Zellen.....	- 67 -
5. Diskussion.....	- 68 -

5.1 Deskriptive Statistik .....	- 68 -
5.1.1 Altersverteilung.....	- 68 -
5.1.2 Tumorstaging .....	- 68 -
5.1.3 Risikofaktoren.....	- 68 -
5.1.4 Hodenvolumetrie und Spermogramm .....	- 69 -
5.1.5 Chemotherapie und Rezidive .....	- 70 -
5.1.6 Tumormarker und Hormonstatus .....	- 71 -
5.2 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom.....	- 72 -
5.3 Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltrationsdichte mit Tumormarker- und Hormonstatus von Seminom-Patienten .....	- 74 -
5.4 Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom... -	75 -
5.5 Fazit und Forschungsausblick .....	- 76 -
6. Zusammenfassung.....	- 78 -
7. Summary.....	- 79 -
8. Abbildungsverzeichnis.....	- 80 -
9. Tabellenverzeichnis.....	- 81 -
10. Abkürzungsverzeichnis.....	- 83 -
11. Literaturverzeichnis .....	- 84 -
12. Anhang.....	- 101 -
12.1 Materialliste .....	- 101 -
12.1.1 HE-Färbung/Immunhistochemie: Chemikalien, Antikörper, Puffer und Lösungen- 101 -	
12.1.2 RNA-Extraktion.....	- 103 -
12.1.3 DNase-Behandlung und reverse Transkription: Chemikalien und Thermoprotokolle .....	- 103 -
12.1.4 RT-PCR zur Qualitätskontrolle und Gelelektrophorese: Chemikalien und Thermoprotokolle .....	- 106 -
12.1.5 qRT-PCR mit Berechnung der relativen Genexpression: Verbrauchsmaterial und Thermoprotokoll .....	- 107 -

12.1.6 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien .....	- 108 -
13. Publikationsverzeichnis .....	- 109 -
14. Ehrenwörtliche Erklärung.....	- 110 -
15. Danksagung.....	- 111 -

## **1. Einleitung**

### **1.1 Aufbau des humanen Hodens**

#### **1.1.1 Anatomie des Hodens**

Der Hoden (Testis) ist ein paarig angelegtes Organ, das neben seiner reproduktiven Funktion in Form der Spermatogenese, auch endokrine Aufgaben, wie z.B. die Testosteronbiosynthese erfüllt (Midzak et al. 2009). Die menschlichen Hoden werden (von außen nach innen) von der Skrotalhaut, der Tunica dartos, die Myofibroblasten und glatte Muskulatur enthält, der Fascia spermatica externa, dem Musculus cremaster, der Fascia spermatica interna und der Tunica vaginalis testis umhüllt. Letztere wiederum besteht aus zwei Blättern, dem Periorchium, das der Lamina parietalis entspricht und dem Epiorchium, das dem Hodengewebe unmittelbar aufliegt und der Lamina visceralis des Peritoneums entspricht. Peri- und Epiorchium sind durch einen Flüssigkeitsspalt (Cavitas serosa scroti) voneinander getrennt. Die arterielle Versorgung des linken und rechten Hodens erfolgt durch die Arteriae testiculares, die beide der Aorta abdominalis kaudal des Abgangs der Nierenarterien entspringen. Der venöse Abfluss beider Hoden erfolgt durch den Plexus pampiniformis der Venae testiculares, wobei die linke Vena testicularis nahezu rechtwinklig in die Arteria renalis sinistra, die rechte Vena testicularis direkt in die Vena cava inferior mündet. Innerviert werden die Hoden über den Plexus testicularis, der aus autonomen Nervenfasern des Plexus abdominalis entspringt. Die Vasa lymphatica der Hoden münden in die Nodi lymphoidei lumbales dextri et sinistri (Schünke et al. 2017, Abschnitt 5)

Das Hodenparenchym besteht aus Lobuli testis, die von bindegewebigen Zügen der Tunica albuginea abgegrenzt werden. Die Tunica albuginea liegt unterhalb des Epiorchiums und setzt sich bis zum Mediastinum testis fort. Die kleinste Einheit der Lobuli testis bilden die Tubuli seminiferi contorti, die aus einer basalen Lamina propria mit kontraktilen peritubulären Zellen und dem Keimepithel bestehen, das die Sertoli-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatischen enthält. Sie stellen circa 60-80% des Hodenvolumens dar (Fietz 2017). Zwischen den einzelnen Tubuli seminiferi contorti befindet sich das Interstitium, das die androgenproduzierenden Leydig-Zellen, residente Immunzellen, Blut- und Lymphgefäße enthält (siehe Abbildung 1). Die Tubuli seminiferi contorti setzen sich in die Tubuli seminiferi recti fort, die dann durch das Rete testis in die Ductuli efferentes münden, die die Samenkanälchen mit dem Epididymis verbinden (Schünke et al. 2017, Abschnitt 5). Die Übergangszone der Tubuli seminiferi recti zum Rete testis ist mit spezialisierten Sertoli-Zellen ausgestattet, die funktionell einem Ventil ähneln (Fijak und Meinhardt 2006).

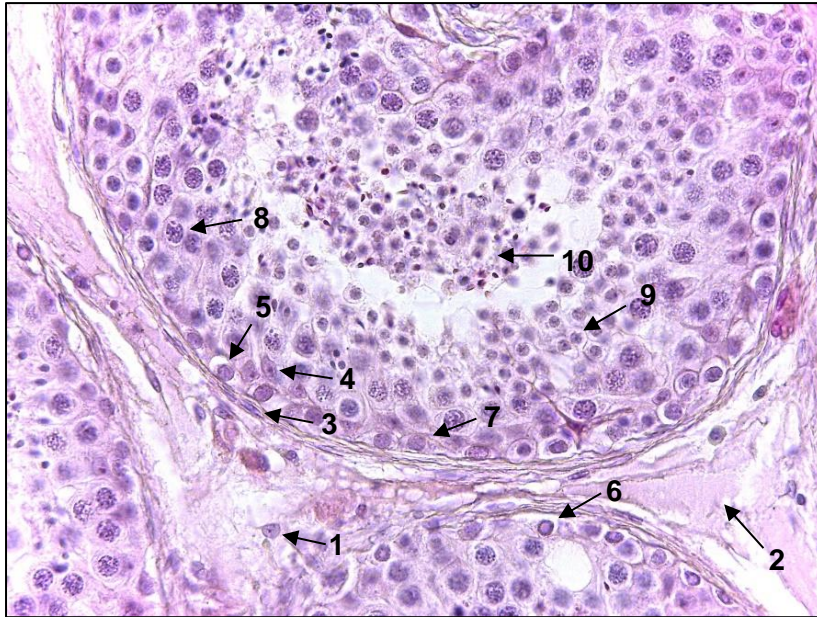


Abbildung 1: Keimepithel und Interstitium. 1 Leydig-Zelle; 2 Interstitium; 3 Lamina propria mit peritubulärer Myoidzelle; 4 Sertoli-Zellkern; 5 Spermatogonie (Typ A pale); 6 Spermatogonie (Typ A dark); 7 Spermatogonie (Typ B); 8 Spermatozyte 1. Ordnung; 9 runde Spermatide; 10 elongierte Spermatiden. HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Die Sertoli-Zellen übernehmen eine Nähr- und Stützfunktion für die sich in den Tubuli seminiferi befindenden Keimzellen. Durch Sekretion des Anti-Müller-Hormons verhindern sie die Entwicklung der Müller-Gänge zu einem weiblichen Phänotyp und spielen somit schon in der Embryonalphase des Organismus eine wichtige Rolle (Blanchard und Josso 1974). Im adulten Hoden bilden sie mithilfe von „tight-junctions“ die immunologisch wichtige Blut-Hoden-Schranke, die das Keimepithel in ein basales und ein apikales Kompartiment unterteilt und entscheidend für den physiologischen Ablauf der Spermatogenese ist, da autoimmune Prozesse, die sich gegen die Keimzellen richten, verhindert werden. Die Sertoli-Zellen erstrecken sich durch ihr Zytoskelett von der Basallamina bis zum Lumen der Tubuli seminiferi. Die Funktion der Sertoli-Zellen wird durch FSH aus der Adenohypophyse moduliert. Die eigene Activin-Produktion wirkt positiv-rückkoppelnd, die Inhibin-Produktion negativ-rückkoppelnd auf die FSH-Sekretion. Mit der Sekretion von Androgen-bindendem-Protein sorgen die Sertoli-Zellen für eine effektive Testosteron-Distribution in den Tubuli seminiferi (Welsch et al. 2014, Kapitel 13).

Im adulten Hoden sind innerhalb der Tubuli seminiferi Keimzellen unterschiedlicher Reifestadien der Spermato- und Spermiogenese vorhanden. Die Spermatogonien



lassen sich in Typ A und B unterteilen, wobei innerhalb der Typ A-Spermatogonien zwischen pale und dark, abhängig von der nukleären Chromatininformation und ihrer Lage im Keimepithel, unterschieden wird (Wistuba et al. 2021). Typ-B-Spermatogonien entstehen durch mitotische Teilungen aus den Typ-A-Spermatogonien. Im Spermatogonien-Stadium besitzen die Keimzellen einen diploiden Chromosomensatz ( $2n2C$ ). Aus den Typ-B-Spermatogonien gehen die Spermatozyten 1. Ordnung hervor, die einen verdoppelten Chromosomensatz ( $2n4C$ ) besitzen. Die nachfolgenden meiotischen Teilungen dienen der Reduktion dieses verdoppelten Chromosomensatzes. Durch die Meiose I gehen aus den Spermatozyten 1. Ordnung die haploiden Spermatozyten 2. Ordnung hervor ( $1n2C$ ). Durch die zweite meiotische Teilung entstehen aus den Spermatozyten 2. Ordnung haploide Spermatiden ( $1n1C$ ) (Fietz 2017).

In der darauffolgenden Spermiogenese finden keine Zellteilungen mehr statt. Durch Kondensation des Zellkerns und Modifikation des Golgi-Apparats, der zum Akrosom wird, entstehen aus den runden Spermatiden elongierte Spermatiden, die schließlich als Spermatozoen ins Lumen der Tubuli seminiferi entlassen werden (Spermiation).

Die Leydig-Zellen des Interstitiums erfüllen bereits während der Embryonalperiode ihre primäre Aufgabe der Steroidogenese, insbesondere der Testosteronproduktion, was von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der männlichen Genitalorgane ist. Im ausgewachsenen Organismus produzieren die Leydig-Zellen einen Großteil der Testosteron-Produktion, ein kleiner Anteil wird von den Nebennieren hergestellt. Die endokrine Funktion der Leydig-Zellen wird durch die Gonadotropin-Releasing-Hormon-Sekretion (GnRH) aus dem Hypothalamus und der dadurch beeinflussten LH- und Prolaktin-Sekretion aus der Adenohypophyse moduliert (Welsch et al. 2014, Kapitel 13; Fietz 2017).

### **1.1.2 Blut-Hoden-Schranke**

Die sogenannte Blut-Hoden-Schranke ist ein wichtiger Teilmechanismus des testikulären Immunprivilegs. Ihre Existenz wurde erstmalig angenommen, als histologische Färbungen das Keimepithel aussparten (Dym und Fawcett 1970; Bergmann und Dierichs 1983; Yule et al. 1988; Saari et al. 1996). Die Zonulae occludentes zwischen den Sertoli-Zellen sind für große hydrophile Moleküle schlecht passierbar und bilden die Grundlage für das Nährmilieu des Keimepithels (Evans und Setchell 1978). An der Blut-Hoden-Schranke sind Junctional Adhesion Molecules (JAMs), verschiedene Claudine und Occludin beteiligt (Mruk und Cheng 2004; Turksen und Troy 2004). Sie teilt das Keimepithel ab Pubertätsbeginn in ein basales

Kompartiment, das die Sertoli-Zellen, Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten 1. Ordnung enthält sowie ein adluminales Kompartiment, das die sich in der Prophase der Meiose I befindenden Spermatozyten 1. Ordnung, Spermatozyten 2. Ordnung, Spermatiden und Spermatozoen beinhaltet. Somit isoliert die Blut-Hoden-Schranke die meiotisch aktiven Zellen von residenten und zirkulierenden Immunzellen aus den interstitiellen Blutgefäßen (Schuppe und Meinhardt 2005; Fijak und Meinhardt 2006; Fietz et al. 2022). Die Ausprägung dieser isolierenden Barriere wird jedoch im Verlauf des Rete testis und der Ductuli efferentes geringer und ist daher leichter für Immunzellen passierbar (Schuppe und Meinhardt 2005). Eine Schädigung der Blut-Hoden-Schranke (z.B. durch Infektion, Inflammation oder Trauma) verursacht einen Verlust von Keimzellen und damit eine verminderte Fertilität (Johnson 1970; Lewis-Jones et al. 1987; Slavis et al. 1990; Comhaire und Mahmoud 1999). Mittlerweile wird vermutet, dass Sertoli-Zellen Antigene der sich differenzierenden Keimzellen phagozytieren. Durch intrazellulären Transport können sie diese basal ausschleusen, was unter der Regie von  $T_{reg}$ -Zellen eine Immuntoleranz etabliert (Tung et al. 2017; O'Donnell et al. 2021). Die Blut-Hoden-Schranke ist daher leichter für Antigene passierbar als früher angenommen und kann das testikuläre Immunprivileg nicht alleine aufrechterhalten.

### **1.1.3 Immunprivileg im gesunden Hoden**

Xeno- und Allograft-Transplantationsversuche im Tiermodell zeigten, dass der Hoden ein immunprivilegiertes Organ ist (Evans und Setchell 1978; Bobzien und Yasunami 1983; Head und Billingham 1985). Das ab Pubertätsbeginn meiotisch aktive Keimepithel kann nur mithilfe immunsuppressiver Mechanismen existieren, da autoantigene Oberflächenproteine der Keimzellen exprimiert werden, die eine Immunreaktion auslösen können (Schuppe und Meinhardt 2005). Nach derzeitigem Forschungsstand sind neben der Blut-Hoden-Schranke weitere Prozesse in die lokale Immunsuppression des Hodens involviert, die eine physiologische Differenzierung des Keimepithels ermöglichen. Nahezu alle ortsansässigen Zellen des gesunden Hodens (Sertoli-, Leydig-Zellen, peritubuläre Zellen, Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und  $T_{reg}$ -Zellen), sind in der Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Milieus im Hoden involviert (Hedger und Meinhardt 2003; Fijak et al. 2018). Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass im Hoden eine gezielte Immunantwort bei einer lokalen oder systemischen Infektion generiert wird. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen einem antiinflammatorischen Milieu, das eine physiologische Spermatogenese zulässt, und

einer kontrollierten Immunantwort, ist komplex und abhängig von zahlreichen interzellulären Wechselwirkungen, die noch nicht vollständig entschlüsselt sind.

#### **1.1.3.1 Einfluss von residenten somatischen Zellen**

Alle physiologisch ortsansässigen somatischen Zellen des Hodens sind an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt (Fijak et al. 2018). Sertoli-Zellen sind fähig, immunregulatorische Proteine zu sezernieren. Beispielsweise wird Activin A bei überschießenden Entzündungsprozessen zur immunsuppressiven Gegenregulation ausgeschüttet (Hedger und Winnall 2012). Außerdem sezernieren Sertoli-Zellen Fas-Ligand (FasL), der über den Fas-Rezeptor apoptotisch wirkt und somit auch auf einwandernde Immunzellen Auswirkung haben kann (Schuppe und Meinhardt 2005). Das proinflammatorische IL-1 $\alpha$  kann von Sertoli-Zellen bei Stimulation durch Lipopolysaccharide ausgeschüttet werden (Hedger und Meinhardt 2003). Peritubuläre Zellen sind ebenfalls zur Ausschüttung von Activin A fähig und scheinen eine Rolle in der Aufrechterhaltung des antiinflammatorischen Milieus zu spielen (de Winter et al. 1993; Schuppe und Meinhardt 2005). Außerdem sind peritubuläre Zellen durch ihre Zytokinsekretion (z.B. Beispiel von TGF $\beta$  und MCP-1) ebenso wie Leydig-Zellen an der Zusammensetzung der Leukozytenpopulation im Hoden beteiligt. Leydig-Zellen scheinen zudem für die Besiedlung des Hodens mit Makrophagen verantwortlich zu sein (Fijak und Meinhardt 2006). Peritubuläre Zellen sezernieren leukemia inhibiting factor (LIF), der über den LIF- Rezeptor auf primordialen Keimzellen antiapoptotisch wirkt und im adulten Hoden in Leydig-Zellen die Steroidsynthese hemmt (Hedger und Meinhardt 2003). Weitere Zelltypen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Häufigkeit von Immunzellen im Hoden des erwachsenen Mannes unter physiologischen Bedingungen (Hedger 2015; Fijak et al. 2018; Schuppe et al. 2023) ++: Häufiges Vorkommen; +: Weniger häufiges, aber regelmäßiges Vorkommen; (+): Seltenes Vorkommen; x: Intravaskuläres Vorkommen.

Immunzellen	Marker	Häufigkeit innerhalb des Hodengewebes
Makrophagen M1 (klassische Aktivierung) M2 (alternative Aktivierung)	CD68, CD11c, CD14 CD80, CD86, MHC II CD163, CD206	+++
Dendritische Zellen	CD1c, CD11c, CD209 (DC-SIGN), CD123, CD141, CD303 CD80, CD86, MHC II	(+)
T-Lymphozyten regulatorische T-Zellen	CD3, CD4, CD8 CD25, FOXP3	+
B-Lymphozyten	CD19, CD20, CD79a	(+)
NK-Zellen	CD56, CD94	(+)
Granulozyten	CD66	x
Mastzellen	Tryptase Fc epsilon RI alpha, CD117 (c-kit), CD23, CD203c	+

### 1.1.3.2 Einfluss von Leukozyten

Makrophagen sind physiologisch ansässige Immunzellen des Hodens. Sie befinden sich im gesunden testikulären Gewebe nur im Interstitium, seltener auch an den äußeren Rändern der Tubuli seminiferi contorti, allerdings nicht im Keimepithel (Pollanen und Niemi 1987; Frungieri et al. 2002). Makrophagen sind die am häufigsten vertretenen Immunzellen des Interstitiums und interagieren mit Leydig-Zellen, beeinflussen deren Entwicklung und übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation der Androgensynthese (Bhushan und Meinhardt 2017). Im Mausmodell hat eine experimentell hervorgerufene Reduktion von Makrophagen zu einer verringerten Testosteronverfügbarkeit und dadurch zu einer eingeschränkten Spermatogenese geführt (Cohen et al. 1999). Außerdem wurden im Rattenmodell unterschiedliche testikuläre Makrophagenpopulationen nachgewiesen, die zum Teil antiinflammatorische, zum Teil proinflammatorische Funktionen aufweisen (Meinhardt et al. 2022). Die

unterschiedlichen Populationen können sowohl zur Aufrechterhaltung als auch zur Auflösung des Immunprivilegs durch einen proinflammatorischen Zytokin-Shift beitragen. Es ist möglich, dass ein ähnliches Funktionsprinzip im menschlichen Hoden existiert. Im gesunden Hoden überwiegt der antiinflammatorische M2-Phänotyp der Makrophagen, der nur eingeschränkt fähig ist, proinflammatorische Botenstoffe wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zu produzieren. Der M2-Typ zeichnet sich durch die Sekretion des antiinflammatorischen Interleukins IL-10 aus (Wang et al. 2017). Unter pathologischen Bedingungen sind Makrophagen auch intratubulär zu beobachten und werden dann als Spermaphagen bezeichnet (Fijak und Meinhardt 2006).

Dendritische Zellen sind im gesunden menschlichen Hoden nur in geringer Anzahl anzutreffen. Aufgrund der Expression von spezifischen Oberflächenmarkern und ihres Chemokinprofils scheinen sie ebenfalls einen Beitrag zum testikulären Immunprivileg zu leisten. Sie sind über Antigen-Präsentation imstande T- und B-Zellen zu aktivieren, aber auch eine Immuntoleranz dieser gegenüber den präsentierten Antigenen auszulösen (Fijak und Meinhardt 2006).

Auch T- und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind in geringer Anzahl im gesunden Hoden präsent. Die CD3-positiven T-Zellen differenzieren sich dabei beeinflusst durch das lokale Mikromilieu in Effektor- oder regulatorische Linien (Schuppe et al. 2023). Sie entwickeln sich größtenteils in CD4-positiv T-Helfer- ( $T_H$ ), T-Gedächtniszellen, CD8-positiv zytotoxische T-Zellen ( $T_c$ ) und CD4-, CD25-, FOXP3-positiv  $T_{reg}$ -Zellen (Golubovskaya und Wu 2016; Mousset et al. 2019; Schuppe et al. 2023).  $T_{reg}$ -Zellen generieren durch ihre Aktivität eine antigen-spezifische Immunantwort oder eine Toleranz gegenüber dem Antigen und schütten dabei antiinflammatorische Zytokine wie IL10 und TGF- $\beta$  aus (Fijak et al. 2018; Bourque und Hawiger 2022; Schuppe et al. 2023).  $T_H$ -Zellen steuern durch ihre Zytokine die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (Lanzavecchia 1985; Schuppe et al. 2023).

Die Datenlage zur Häufigkeit von Lymphozyten im menschlichen Hodengewebe unter physiologischen Bedingungen ist begrenzt (el-Demiry et al. 1987; Jahnukainen et al. 1995; Hedger 1997; Hvarness et al. 2013; Klein et al. 2016; Ponte et al. 2018; Schuppe et al. 2023). CD4- und CD8-positiv T-Lymphozyten konnten im Bereich des Rete Testes immunhistochemisch nachgewiesen werden.  $T_{reg}$ -Zellen wurden im Interstitium detektiert (Duan et al. 2011; Hvarness et al. 2013). B-Zellen sind unter physiologischen Bedingungen in sehr geringer Anzahl im Interstitium anzutreffen (Schuppe und Meinhardt 2005; Fijak et al. 2018).

Mastzellen sind (ähnlich wie Makrophagen) im testikulären Interstitium anzutreffen, jedoch in geringerer Anzahl. Außerdem sind sie zusätzlich in der Lamina propria der Tubuli seminiferi und in der Tunica albuginea ansässig (Schuppe und Meinhardt 2005). Ihre Anzahl weist eine altersspezifische Varianz im menschlichen Organismus auf. Sie sind in der Lage Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine und Histamine freizusetzen (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 14.2.2). Mastzellen sind an der Modulation der Testosteron-Synthese in den Leydig-Zellen beteiligt. Sie können über Tryptase-Ausschüttung die Fibroblasten-Proliferation anregen und peritubuläre Zellen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie Macrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP1) und TGF- $\beta_2$ , stimulieren (Fijak und Meinhardt 2006).

### **1.1.3.3 Einfluss von Androgenen**

Testosteron erhöht die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10) aus Monozyten und Makrophagen. Gleichzeitig verringert es die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 (Fijak und Meinhardt 2006). Außerdem wurden Allograft-Abstoßungen durch Unterdrückung der Leydig-Zell-Funktion und einer damit einhergehenden Testosteron-Depletion im Tiermodell beobachtet (Head und Billingham 1985; Piquet-Pellorce und Dorval-Coiffec 2000; Muller und Meinhardt 2005). Sertoli- und peritubuläre Zellen exprimieren den Androgen-Rezeptor und werden funktionell von Testosteron moduliert (Fijak und Meinhardt 2006).

### **1.1.3.4 Pro- und antiinflammatorische Zytokine des Hodens**

Zytokine als inter- und intrazelluläre Botenstoffe sind an der physiologischen Funktion des Hodens beteiligt. Sie sind ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung und Aufhebung des testikulären Immunprivilegs und werden auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen im gesunden Hoden synthetisiert (Hedger und Meinhardt 2003). Zytokine können parakrin, autokrin und endokrin aktiv sein. Anhand zellulärer Herkunft und Funktion werden sie in die Hämatopoetinsuperfamilie, die Interferone, die IL-1- und die TNF- $\alpha$ -Familie unterteilt (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). Die Funktion vieler Zytokine im Hoden wurde bis jetzt nur *in vitro* oder im Tiermodell nachgewiesen. Ihre Rolle im menschlichen Hoden wurde nicht exakt entschlüsselt.

Im gesunden Hoden werden in den residenten Zellen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine produziert, deren Gleichgewicht durch wechselseitige Mechanismen aufrechterhalten wird. Neben Auswirkungen auf ansässige Immunzellpopulationen (Makrophagen, Mastzellen) und infiltrierende Lymphozyten

beeinflusst das testikuläre Zytokinmilieu auch die Spermatogenese (Loveland et al. 2017).

IL-1 $\alpha$  und - $\beta$  sind proinflammatorisch und können in großen Mengen von aktivierten Makrophagen und Monozyten ausgeschüttet werden. Trotz der generell proinflammatorischen Funktion stimuliert IL-1 $\alpha$  auch die Glukokortikoidsynthese in der Nebenniere. Diese ist entscheidend an einer späteren Inflammationseindämmung beteiligt. IL-1 $\beta$  regt zudem in Hepatozyten die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen an (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). IL-1 $\alpha$  wird im Hoden von Sertoli-Zellen synthetisiert und scheint neben der Differenzierung des Keimepithels auch die Sertolizellen selbst zu beeinflussen (Hedger und Meinhardt 2003). Im Rattenmodell zeigte sich *in vitro*, dass durch die Inkubation mit humanem, rekombinanten IL-1 $\alpha$ , die DNA-Synthese in Spermatogonien und Prä-Leptotän-Spermatozyten angeregt wurde (Parvinen et al. 1991). Die Steroidsynthese in den Leydig-Zellen scheint auf einem basalen Niveau durch IL-1 gefördert, die Androgensynthese (stimuliert durch LH) jedoch gehemmt zu werden (Svechnikov et al. 2001).

IL-6 ist wie IL-1 $\beta$  ein proinflammatorisches Zytokin mit zahlreichen systemischen Wirkungen innerhalb des Organismus. So regt es z.B. die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber an, ist beteiligt an der Hochregulierung der Körpertemperatur über den Hypothalamus und an der Aktivierung von Lymphozyten (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). Im Hoden wird IL-6 ebenfalls in den Sertoli-Zellen synthetisiert, was durch FSH, Neuropeptide, Testosteron und IL-1 $\alpha$  moduliert wird (Okuda et al. 1994). Im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  scheint IL-6 jedoch einer Differenzierung des Keimepithels entgegenzuwirken, da *in vitro* im Rattenmodell eine Hemmung der DNA-Synthese in Prä-Leptotän-Spermatozyten beobachtet wurde (Hakovirta et al. 1995).

Der leukaemia inhibiting factor (LIF) wird im Knochenmarkstroma von Fibroblasten synthetisiert und wirkt während der Embryonalperiode stammzellerhaltend. Im Hoden wird er von peritubulären Zellen produziert und vermittelt antiapoptotische Effekte auf die Urkeimzellen (Piquet-Pellorce und Dorval-Coiffec 2000; Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). LIF scheint außerdem die Steroidsynthese der Leydig-Zellen zu inhibieren (Mauduit et al. 1999).

Der macrophage migration inhibitory-factor (MIF) wird von T-Zellen und hypophysären Zellen synthetisiert. Er partizipiert an der Makrophagen-Aktivierung und hemmt deren Gewebemigration. Außerdem wirkt er einer Glukokortikoid-induzierten Immunsuppression entgegen (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). Er wird in

vielen unterschiedlichen Gewebstypen exprimiert und im Hoden von Leydig-Zellen synthetisiert (Meinhardt 1996; Bacher et al. 1997). Experimentell wurde gezeigt, dass die testikuläre MIF-Konzentration hormonunabhängig ist (Meinhardt 1996; Meinhardt et al. 1998). Auch scheint MIF die Inhibin-Sekretion von Sertoli-Zellen negativ zu beeinflussen und Effekte auf den Calcium-Haushalt von peritubulären Zellen zu haben (Meinhardt 1996; Wennemuth et al. 2000).

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin und wirkt im Hoden inhibierend auf die Steroidsynthese der Leydig-Zellen. Es wird von postmeiotischen Keimzellen exprimiert. Ein Einfluss auf die Spermiogenese ist daher nicht auszuschließen (Xiong und Hales 1993).

Fas-L als membrangebundenes Zytokin der TNF- $\alpha$ -Familie löst über Bindung an den Fas-Rezeptor die Apoptose-Kaskade aus (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 9). Im Hoden wird er von Sertoli-Zellen exprimiert, was als Schutzmechanismus vor infiltrierenden T-Lymphozyten zur Erhaltung des Immunprivilegs dienen könnte (Bellgrau et al. 1995).

Typ I- und Typ II-Interferone sind wichtige Werkzeuge des Organismus für die Bekämpfung von viralen Infektionen und werden testikulär von Sertoli- und Leydig-Zellen exprimiert (Dejucq et al. 1998).

TGF- $\beta$  ist ein antiinflammatorisches Zytokin und existiert in drei Isoformen. Es wird von Monozyten, Chondrozyten und T-Zellen, im Hoden zusätzlich von Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen produziert (Hedger und Meinhardt 2003; Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). TGF- $\beta$ 1 ist ein wichtiger Regulator der Immunantwort, da es T<sub>reg</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen anregt (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 17.3). Experimentelle Studien zeigten eine mit der Pubertät einsetzende Produktionsverminderung von TGF- $\beta$ 1 und 2 sowie ein mit Beginn der Spermatogenese korrelierendes Maximum der TGF- $\beta$ 3-Produktion (Mullaney und Skinner 1993). Ein Mitwirken von TGF- $\beta$  in der Interaktion zwischen peritubulären Zellen und Sertoli-Zellen und damit eine Rolle in der Entwicklung des Keimepithels wird angenommen (Konrad et al. 2000).

Activin ähnelt molekular der TGF- $\beta$ -Familie und hat eine immunsuppressive Funktion auf Lymphozyten. Im Hoden wird es von Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen produziert (Hedger und Meinhardt 2003). Es scheint die Aktivität von IL-1 und IL-6 zu modulieren und die Differenzierung des Keimepithels durch Stimulation von Spermatogonien und Spermatozyten zu regulieren (Mather et al. 1990; de Kretser et al. 1999; Meinhardt et al. 2000). Außerdem wurden Auswirkungen von Activin A auf das Immunmilieu des Hodens



durch einen Einfluss auf die Aktivierung und den Phänotyp testikulärer Makrophagen beschrieben (Indumathy et al. 2020).

## **1.2 Pathoimmunologie und Inflammation des Hodens**

Trotz des physiologisch antiinflammatorischen Milieus, können im Hoden angeborene und adaptive Immunantworten generiert werden (Fijak et al. 2018). Dabei können unterschiedliche Faktoren zur Ausschüttung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren (Zytokine, Prostaglandine, Adhäsionsmoleküle), die an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind, führen. Dazu gehören infektiöse Ursachen, Exposition gegenüber Chemikalien, physikalische Traumata, vorausgegangene testikuläre Erkrankungen und neoplastische Prozesse (Jahnukainen et al. 1995; Bols et al. 2000; Schuppe und Meinhardt 2005; Schuppe et al. 2008; Schuppe und Bergmann 2013). Auch eine Einschränkung der Spermatogenese, z.B. im Rahmen von Infertilität, kann von einwandernden Immunzellen begleitet sein (Schuppe et al. 2008). Die mit einer bakteriellen oder viralen Orchitis einhergehende Immunzellinvasion betrifft sowohl das testikuläre Interstitium, als auch die Tubuli seminiferi. Diese kann von einem interstitiellen Ödem, einem geschädigten Keimepithel und einer Hyalinisierung der Tubuli (tubuläre Schatten) begleitet sein (Schuppe und Bergmann 2013; Fijak et al. 2018).

### **1.2.1 Maligne Hodentumoren**

Hodentumorentitäten unterscheiden sich in ihrer Ätiologie, Histopathologie und Therapie. Die WHO-Klassifikation unterteilt Hodentumoren in solche, die sich von den Keimzellen (testicular germ cell tumors, TGCT) ableiten und in Tumoren, die den somatischen Zellen des Hodens (Leydig- und Sertoli-Zellen) entspringen. Das klassische Seminom gehört zu den Keimzelltumoren, die aus der sogenannten germ cell neoplasia in situ (GCNIS) entstehen (Rajpert-De Meyts et al. 2018; Moch et al. 2022). Für die genaue Unterteilung siehe Abbildung 2.

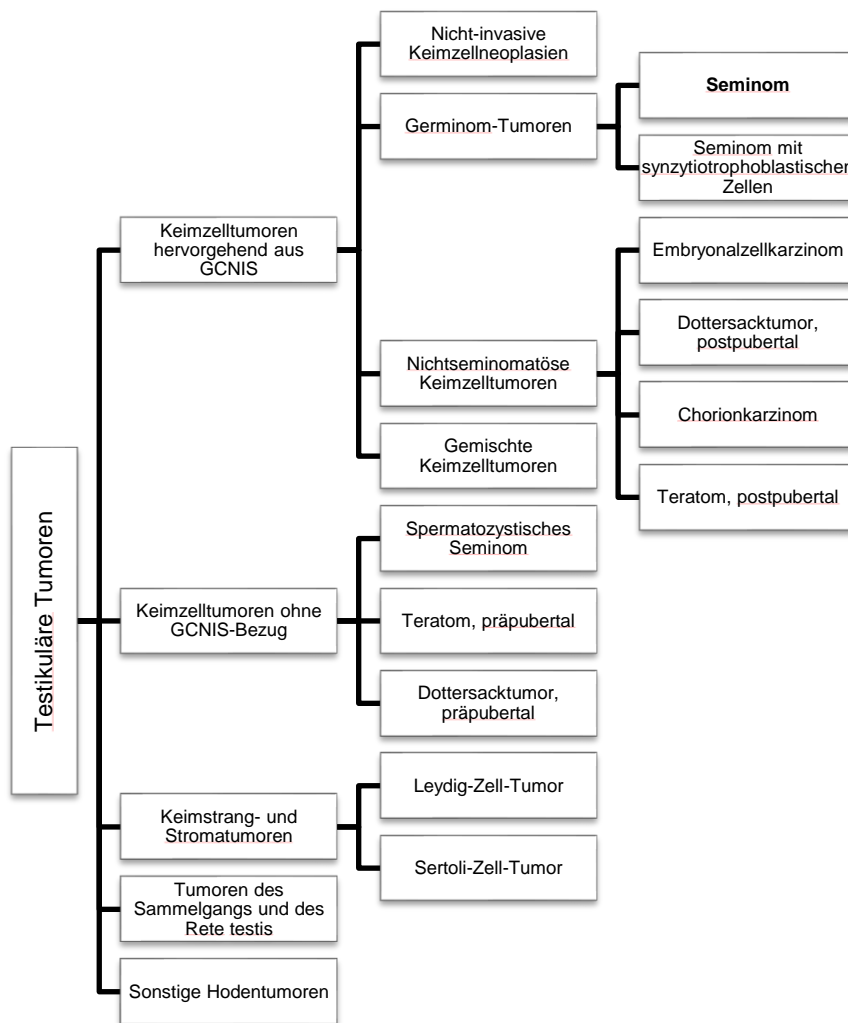


Abbildung 2: Testikuläre Tumoren (WHO-Klassifikation), vereinfacht. Adaptiert und modifiziert nach Moch et al. (Moch et al. 2022).

### 1.2.2 Epidemiologie

Hodentumoren gehören zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorerkrankungen junger Männer zwischen 14 und 44 Jahren (Ferlay et al. 2015). Die Inzidenz variiert global und ist in den skandinavischen Ländern am höchsten (Inzidenz Norwegen, Stand 2008: 9,9/100.000 Einwohner), in Afrika und Asien am geringsten (Inzidenz Thailand, Stand 2008: 0,5/100.000 Einwohner) (Znaor et al. 2014; Rajpert-De Meyts et al. 2016). Die TGCT, zu denen auch das klassische Seminom gehört, stellen circa 90-95% aller diagnostizierten Hodentumoren dar (Albers et al. 2016). In 1-2% der Fälle liegt ein beidseitiger Tumor bei Erstdiagnose vor (La Vecchia et al. 2010). 50% der TGCT sind klassische Seminome, 40% Nicht-Seminome und 10% heterogene Mischtumoren (Horwich et al. 2006; Turnbull et al. 2010). Die höchste Inzidenz für Nicht-Seminome

liegt im dritten Lebensjahrzehnt, die höchste Inzidenz für Seminome im vierten Lebensjahrzehnt (Albers et al. 2016).

Die exakten Ursachen, die zu einer Erhöhung der Inzidenz in den vergangenen Jahrzehnten geführt haben, sind bis heute nicht bekannt. Neben assoziierten urologischen Vorerkrankungen (z. B. Kryptorchismus, Hypospadie, eingeschränkte Spermatogenese, vorbeschriebener Hodenkrebs, positive Familienanamnese) erhöhen Umweltfaktoren die Wahrscheinlichkeit, an einem Hodentumor zu erkranken (Swerdlow et al. 1997; Møller und Skakkebaek 1999; Hemminki und Li 2004; Fosså et al. 2005; Cook et al. 2009; Trabert et al. 2013). Genetische Prädispositionen sind ebenfalls entscheidend an der Pathogenese beteiligt (siehe Abbildung 3) (Rajpert-De Meyts et al. 2018).

### **1.2.3 Ätiologie der TGCT**

Testikuläre Keimzelltumoren werden seit der WHO-Klassifikation 2016 in zwei Subkategorien unterteilt: Tumoren, die aus GCNIS-Zellen hervorgehen (z.B. das klassische Seminom, Histologie siehe Abbildung 4) und Tumoren, die nicht aus GCNIS-Zellen hervorgehen (z.B. das präpubertale Teratom) (Moch et al. 2016; Moch et al. 2022). GCNIS-Zellen entstehen aus Gonozyten des Embryos, die nicht zu Spermatogonien differenzieren können. In diesen häufen sich bis zur Pubertät und darüber hinaus Mutationen, bis invasive Tumorzellen entstehen. Diese überschreiten die Grenzen der Tubuli seminiferi (Rajpert-De Meyts 2006; Rajpert-De Meyts et al. 2016; Rajpert-De Meyts et al. 2018). GCNIS-Zellen ähneln aufgrund ihres pluripotenten Expressionsmusters von Proteinen (z.B. NANOG, Oct-3/4, PLAP und AP-2γ) den primordialen Keimzellen (PGC) und Gonozyten (Rajpert-De Meyts 2006; Moch et al. 2016; Fietz et al. 2022). Der Anteil der Keimzelltumoren, die nicht aus GCNIS hervorgehen, entsteht durch Differenzierungsfehler der PGC in der embryonalen Entwicklung und kann sich klinisch als präpubertales Teratom oder präpubertaler Dottersacktumor präsentieren (Rajpert-De Meyts 2006; Moch et al. 2016; Fietz et al. 2022; Moch et al. 2022).

Eine Hypothese zu der Entstehung von GCNIS-Zellen und testikulären Keimzelltumoren ist das „Testicular Dysgenesis Syndrome“ (TDS) (siehe Abbildung 3). Die Kombination aus Exposition gegenüber Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition führt zu einer verminderten Aktivität der Leydig- und zu einer gestörten Funktion der Sertoli-Zellen. Es resultiert eine Androgeninsuffizienz und eine damit verbundene eingeschränkte Entwicklung der Keimzellen. Je nach Schweregrad der Funktionsbeeinträchtigung von

Leydig- und Sertoli-Zellen sind unterschiedliche Krankheitsbilder möglich, die von leichten Störungen wie verringerter Spermatogenese/Infertilität bis zu manifesten Tumoren reichen (Skakkebaek et al. 2001; Skakkebaek et al. 2016; Rajpert-De Meyts et al. 2018).

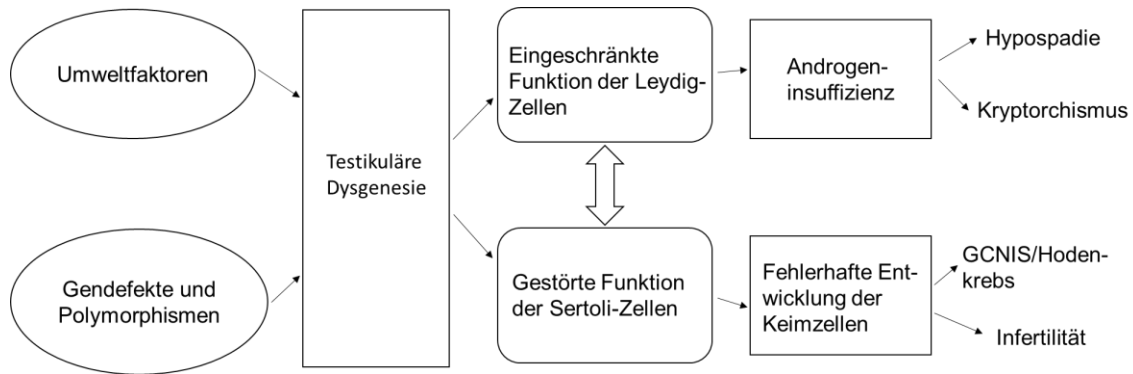


Abbildung 3: Testikuläre Dysgenese; adaptiert nach Rajpert-De Meyts et al. (Rajpert-De Meyts et al. 2018).

Prädisponierenden Faktoren, die zur Entstehung testikulärer Keimzelltumoren beitragen können, sind Frühgeburtlichkeit, geringes Geburtsgewicht, fetale Androgeninsuffizienz, Entwicklungsanomalien der Gonaden und Exposition gegenüber chemischen Noxen. Auch wurden genetische Aberrationen wie die Polyploidisierung und Amplifizierung des Chromosoms 12 beschrieben (Oosterhuis et al. 1989; Skakkebaek et al. 2001; Rajpert-De Meyts 2006; Cook et al. 2009; Pleskacova et al. 2010). Mutationen innerhalb der Gen-Familien von *KIT* und *Ras* sind mehrfach im Zusammenhang mit Keimzelltumoren benannt worden (Goddard et al. 2007; Martin et al. 2022). Unterschiedliche Verteilungsmuster von *KITLG*-Varianten scheinen die zum Teil starke ethnische Variabilität der weltweiten TGCT-Inzidenzen zu erklären (Kanetsky et al. 2009; Rapley et al. 2009). Polymorphismen des Transkriptionsfaktors *DMRT1* (involviert in Regulationsprozessen der Meiose) scheinen an der Tumorentstehung beteiligt zu sein, ebenso wie das *HPGDS*-Gen, das für die Prostaglandin-D-Synthase codiert, welche in der Gonadenentwicklung involviert ist (Turnbull et al. 2010; Kanetsky et al. 2011; Matson et al. 2011; Chung et al. 2013; Jørgensen et al. 2013; Ruark et al. 2013; Rajpert-De Meyts et al. 2016).

#### 1.2.4 Diagnostik

Die körperliche Untersuchung ist der erste diagnostische Schritt. Dabei sollte das Skrotum palpiert werden, um die Konsistenz und ungefähre Größe des vorliegenden Tumors zu bestimmen. Außerdem sollten Abdomen und die supraklavikulären Lymphknoten abgetastet werden, um eine Metastasierung festzustellen (Albers et al. 2016; Kliesch et al. 2021; Patrikidou et al. 2023). Die Patienten präsentieren sich in der Regel mit einer einseitigen, meist schmerzlosen Hodenvergrößerung. Bei circa 20% der Patienten ist Hodenschmerz das Erstsymptom, 11% leiden an Flanken- und Rückenschmerzen aufgrund von Fernmetastasen (Germà-Lluch 2002; Moul 2007). Gelegentlich ist bei den Betroffenen eine Gynäkomastie zu beobachten, meist im Falle eines Nicht-Seminoms (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Nach der körperlichen Untersuchung sollte eine Sonographie erfolgen, mit deren Hilfe ein Hodentumorverdacht bestätigt oder ausgeschlossen werden kann (Richie et al. 1982). Diese sollte auch bei erhöhten Tumormarkern, trotz negativem palpatorischen Befund oder bei ungeklärter Infertilität durchgeführt werden (Mancini et al. 2007; Angulo et al. 2009).

Im Falle eines vorliegenden Hodentumors müssen präoperativ neben einer CT-Untersuchung des Beckens, des Abdomens und des Thorax (Metastasensuche) die Tumormarker AFP,  $\beta$ -hCG und LDH bestimmt werden. Die Tumormarker ermöglichen eine Risikoeinschätzung des Patienten nach der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG). Außerdem hat ihr postoperativer Konzentrationsverlauf prognostische Relevanz (Klein 1993; Flechon et al. 2002; Germà-Lluch 2002; Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Sind die Tumormarker nach erfolgter Orchiektomie weiterhin erhöht, sollte ein weiteres Metastasierungs-Screening erfolgen. Abnehmende Konzentrationen der Tumormarker nach Orchiektomie schließen eine stattgefundene Metastasierung allerdings nicht aus (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Die Tumormarker-Konzentrationen können während der Chemotherapie Informationen zum Erfolg der Behandlung und zur Frage erforderlicher Dosisanpassungen liefern (Haugnes et al. 2012; Fizazi et al. 2014).

Das Staging des Tumors erfolgt nach den Kriterien der „TNM-classification for testicular cancer“ und bewertet die Lokalisation und Ausdehnung des Primarius (T), die klinisch-feststellbare Infiltration der pelvinen Lymphknoten (N), die pathologisch-evaluierte Lymphknoteninfiltration (Pn), das Auftreten von Fernmetastasen (M) und die Konzentration der Tumormarker (S) (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023).

### 1.2.5 Therapie

Die chirurgische Resektion der betroffenen Hoden ist Hauptbestandteil der Therapie. Bei jedem Patienten mit einer suspekten testikulären Raumforderung ist eine offenchirurgische Untersuchung über die Leiste mit anschließender Darstellung des Hodens indiziert. Sollte sich ein maligner Tumor bestätigen, erfolgt die Orchiektomie mit Durchtrennung des Funiculus spermaticus am inneren Leistenring. Es sollte eine Biopsie erfolgen und im pathologischen Schnellschnitt beurteilt werden. Eine präoperativ durchzuführende Chemotherapie kann in fortgeschrittenen, metastasierten Krankheitsstadien indiziert sein. Eine organerhaltende Operation sollte nur in Ausnahmefällen (z.B. bei einem beidseitigen Hodentumor oder einem Tumor bei bestehender Monorchie) durchgeführt werden, da in 20-30% der Patienten multifokale oder tumorangrenzende GCNIS-Herde existieren, die bei unvollständiger Resektion zu metachronen Tumoren progressieren können (Loy et al. 1990; Dieckmann und Skakkebaek 1999; Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Eine kontralaterale Routine-Biopsie zum Ausschluss von präinvasiven GCNIS-Zellen ist Gegenstand von Diskussionen und sollte insbesondere Patienten mit vorbekannten Risikofaktoren wie Kryptorchismus, Hypospermatogenese und geringem Hodenvolumen angeboten werden (Dieckmann und Loy 1996; Albers et al. 1999; Taberero et al. 2004; Patrikidou et al. 2023).

Der postoperative Chemo- und Radiotherapie-Zyklus richtet sich nach Tumorentität und TNM-Klassifikation. Generell ist das Seminom sensibel für Chemo- und Strahlentherapie, was sich in Heilungschancen von bis zu 95% bei rechtzeitiger Diagnose äußert (Raghavan 2003). Da bei Seminomen im Stadium I in 15-20% der Fälle bereits klinisch nicht-identifizierbare Metastasen vorliegen, ist die alleinige Orchiektomie therapeutisch nicht ausreichend (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Eine regelmäßige Überwachung, eine Bestrahlungstherapie mit 20 bis 24 Gy oder eine Carboplatin-basierte Chemotherapie sollte postoperativ risikostratifiziert durchgeführt werden (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Im Falle von regelmäßiger Überwachung haben sich Rezidivraten von 12-20% gezeigt. Bei Bestrahlungs- oder Chemotherapie liegen die Rezidivraten unter 5% (Fosså et al. 1999; Melchior et al. 2001; Aparicio et al. 2003; Groll et al. 2007).

Bei fortgeschrittenen Krankheitsfällen wird die Chemo- sowie Bestrahlungstherapie der TNM-Klassifikation angepasst.

### 1.3 Pathoimmunologie des Seminoms

Neoplastische Prozesse, wie z.B. die klinisch-manifesten Keimzelltumoren vorausgehende GCNIS und das klassische Seminom, gehen mit einer erhöhten Immunzellanzahl, größtenteils T-Zellen und Makrophagen, einher. Dabei wurde eine Progredienz der Immunzellinfiltration von Hypospermatogenese und GCNIS zum Seminom festgestellt (Klein et al. 2016). Neben den vorherig genannten Zelltypen werden neoplastische Prozesse des Hodens auch von dendritischen Zellen und B-Zellen begleitet, letztere sind zum Teil in follikelähnlichen Clustern („follicular like structures“, FLS) organisiert (Klein et al. 2016; Fietz et al. 2022). Die FLS in TGCT ähneln dabei den Keimzentren von tertiären lymphatischen Strukturen und unterscheiden sich in ihrer zellulären Zusammensetzung von testikulären Entzündungsinfiltraten, die häufig bei infertilen Männern zu finden sind (Nakanoma et al. 1992; Willis et al. 2009; Klein et al. 2016; Fietz et al. 2022). Ob die einwandernden Immunzellen als aktiver Abwehrmechanismus gegen die Tumorzellen oder als unkontrollierte Immunantwort zu werten sind, die in einer Gewebsschädigung, insbesondere der noch intakten Tubuli seminiferi, resultiert oder die Tumorprogression sogar fördert, ist nicht geklärt. Genexpressionsanalysen von Perforin und FasL in GCNIS- und Seminom-Proben zeigten eine geringe Aktivität von CD8-positiven, zytotoxischen T-Zellen. Da die Tumorzellen jedoch keine MHC I- und ICAM-1-Moleküle exprimieren, die für die Interaktion mit den zytotoxischen T-Zellen notwendig sind, ist die Funktion der zytotoxischen T-Zellen in TGCT, insbesondere dem Seminom nicht eindeutig (Bols et al. 2000; Hadrup et al. 2006). Ob eine tumorspezifische Zytotoxizität auf einem anderen Weg generiert werden kann oder ob die zytotoxischen T-Zellen immunoregulatorische Funktionen im Mikromilieu des Tumors übernehmen, bleibt daher ein aktuelles Forschungsthema (Hvarness et al. 2013). Untersuchungen von Keimzelltumoren deuteten hinsichtlich ihrer B-Zell-Infiltration, der Expression des assoziierten Antigen-Rezeptors und der Charakteristika der produzierten Immunglobuline eher darauf hin, dass eine humorale statt zelluläre Immunantwort generiert wird (Willis et al. 2009). Prognostisch wurden Hinweise gesammelt, dass eine niedrige Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) mit erhöhten Rezidivraten einhergeht (Bols et al. 2000). Die exakte Rolle und Interaktion der einzelnen Zelltypen bleibt allerdings ungeklärt. Es bedarf daher weiterer Experimente, um die teils widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären und die exakte Funktion der Tumor-infiltrierenden Leukozyten im Seminom zu entschlüsseln.

Spezifischen T-Zellen, wie den regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und den follikulären T-Helfer-Zellen ( $T_{fh}$ ), wird in einigen Krebserkrankungen prognostische Relevanz

zugewiesen (Wilke et al. 2010; Gu-Trantien et al. 2013). Im humanen Seminom wurde die potenzielle Rolle der T<sub>reg</sub>- und T<sub>fh</sub>-Zellen in Bezug auf Tumorbiologie und -progress jedoch noch nicht evaluiert (Islam et al. in Vorbereitung).

#### **1.4 Fragestellung**

Die Seminom- und GCNIS-begleitende Immunezellinfiltration wurde in der Vergangenheit, beginnend 1964, in vielen Publikationen thematisiert, jedoch ist die Einordnung dieses Phänomens in Bezug auf das testikuläre Immunprivileg, den Tumorprogress und den Einfluss auf klinische Parameter bis heute nicht abschließend bewertet (Marshall und Dayan 1964; Bols et al. 2000; Hvarness et al. 2013; Klein et al. 2016; Siska et al. 2017; Fietz et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit soll die experimentelle Analyse einer Tumorkohorte nähere Informationen liefern, die zum Verständnis der Immunologie des Seminoms beitragen. Ein breites Antikörperspektrum zur immunhistochemischen Detektion von T-, B-, dendritischen Zellen und Makrophagen dient der Quantifizierung der Immunezellinfiltration und wird mit klinischen Parametern der Patienten korreliert. Dabei werden Zusammenhänge zwischen präoperativen Tumormarker-Konzentrationen (AFP, LDH,  $\beta$ -hCG), dem Hormonstatus (LH, FSH, Testosteron), Vorerkrankungen, Immunezellinfiltration im Tumor-tragenden Hoden sowie ein potenzieller Einfluss der TIL auf das TNM-Staging untersucht. Außerdem wird in diesem Kontext eruiert, inwieweit immunpathologische Muster in unterschiedlichen Biopsie-Lokalisationen (Tumor-fern, Tumor-nah, Tumor) zu unterscheiden sind. Eine Genexpressionsanalyse einer Auswahl der von den infiltrierenden Immunezellen exprimierten Zellmarker und Zytokine oder diese Immunezellen anlockenden Chemokine per RT-qPCR beleuchtet das Mikromilieu des Seminoms. Die Ergebnisse könnten in Zukunft zur Entwicklung neuer prognostischer Biomarker und Optionen für eine individualisierte Immuntherapie von TGCT anstelle der konventionellen Radio- und Chemotherapie-Protokolle beitragen.



## 2. Materialien

### 2.1 Patientenkollektiv

Von März 2017 bis November 2020 wurden 59 Patienten mit klinisch begründetem Hodentumor-Verdacht in eine prospektive Tumorkohorte eingeschlossen. Dabei wurden zusätzlich zu Hoden- und Nebenhodenbiopsien zur Anlage einer Gewebeprobenbank zahlreiche anamnestische und laborchemische Parameter erhoben, die in einer verschlüsselten Excel-Tabelle gesichert wurden. Bei den Hodenbiopsien handelt es sich um Gewebealiquots, die nicht für die primäre pathologische Evaluation vonnöten waren. Die erhobenen Parameter sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Klinisch erhobene Parameter der Hodentumorkohorte. <sup>1</sup> berechnet nach Vermeulen (Vermeulen et al. 1999); <sup>2</sup> berechnet nach Bergmann und Kliesch (Bergmann und Kliesch 1998; Fietz und Kliesch 2022) ; <sup>3</sup> TNM-classification of malignant tumours, 8th edition (Brierley 2017); <sup>4</sup> nach WHO Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates (World Health Organization 2010); <sup>5</sup> PEB: Kombination Cisplatin, Etoposid, Bleomycin; <sup>6</sup> PEI: Kombination Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid.

Parameter	Einheit/Kategorien
Alter	Jahre
Positive Familienanamnese für Hodentumoren	Ja/Nein
Hodenhochstand in der Vorgeschichte	Ja/Nein
Operation des Hodenhochstands	Ja/Nein
Jahr der Operation des Hodenhochstands	Jahr
Weitere Vorerkrankungen	Ja/Nein
Regelmäßige Medikation	Ja/Nein
Hodenvolumen Tumorseite	ml
Hodenvolumen kontralaterale Seite	ml
Operation des Hodentumors	Ja/Nein
Operationsdatum	Datum
Operationsseite	Links/Rechts
AFP	ng/l
hCG	IU/l
LDH	U/l
LH	IU/l

Parameter	Einheit/Kategorien
FSH	IU/l
Testosteron gesamt	ng/dl
Testosteron frei (berechnet) <sup>1</sup>	ng/dl
Testosteron frei in Prozent	Prozent
SHBG	nmol/l
Histologie des Primärtumors	Seminom, mischteiliges Seminom ≥ 80%, mischteiliges Seminom < 80%, Nichtseminom, gutartiger Tumor, kein Tumor, Keimzelltumor ohne GCNIS-Bezug
Spermatogenese-Score Tumorseite/ kontralaterale Seite <sup>2</sup>	0-10
UICC-Stadium <sup>3</sup>	IA-IIIC
pT <sup>3</sup>	X, 0, Tis, 1, 2, 3, 4
cN <sup>3</sup>	X, 0, 1, 2, 3
cM <sup>3</sup>	X, 0, 1a, 1b
Metastasen Lunge	Ja/Nein
Metastasen Leber	Ja/Nein
Metastasen Knochen	Ja/Nein
Metastasen Gehirn	Ja/Nein
Lymphgefäß-Invasion <sup>3</sup>	Ja/Nein
Venen-Invasion <sup>3</sup>	0, 1, 2
Stattgefundene Chemotherapie?	Ja/Nein
Chemotherapie	Keine, Carboplatin, 1x PEB <sup>5</sup> , 3x PEB <sup>5</sup> , 4x PEB <sup>5</sup> , 3x PEI <sup>6</sup> , 4x PEI <sup>6</sup> , Carboplatin-Mono, Sonstiges
Post-Chemotherapie-Rezidiv	Ja/Nein
Spermienkryokonservierung	Ja/Nein
Ejakulat abgegeben	Ja/Nein
Ejakulatvolumen	ml
Spermienkonzentration	Spermienanzahl/ml
Progressive Motilität der Spermien (PR) <sup>4</sup>	%
Nicht-progressive Motilität der Spermien (NP) <sup>4</sup>	%
Immotile Spermien (IM) <sup>4</sup>	%
Morphologische Normalformen der Spermien <sup>4</sup>	%
Seit wann?	Jahr

Parameter	Einheit/Kategorien
Spermien-Kryokonservierung	Ja/Nein

Abbildung 4 dient als Übersicht der tumorhistologischen Aufteilung der Gießener Patientenkohorte.

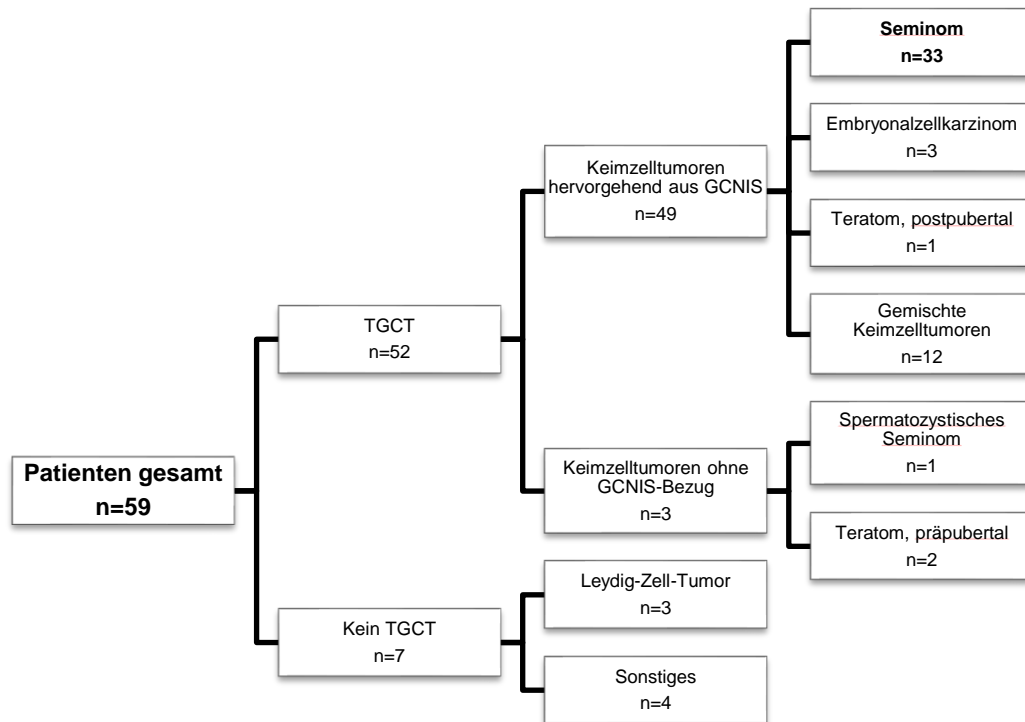


Abbildung 4: Vertretene Tumorentitäten der Gießener Patienten-Kohorte. Klassifikation modifiziert nach Moch et al. (Moch et al. 2022). TGCT: Testicular Germ Cell Tumour.

Biopsien, die den Kontrollgruppen der Immunhistochemie- und qPCR-Experimente dienten, stammten aus dem Hodenbiopsie-Register des Hessischen Zentrums für Reproduktionsmedizin (HZRM) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Einsender sind hier das Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Abteilung für klinische und operative Andrologie des Universitätsklinikums Münster und die Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen (genehmigt von der Ethik-Kommission des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen; Referenznummer 26/11: Erreger- und Entzündungsnachweis sowie vaskuläre Faktoren als möglicher Prognosefaktor für TESE/ICSI-Behandlungen bei nicht-obstruktiver Azoospermie). Paraffinierte Tonsillenbiopsien, die als Positivkontrolle für immunhistochemische Experimente verwendet wurden, stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und

Marburg, Standort Gießen. Alle Patienten der Tumorkohorte wurden in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen behandelt. Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Archivierung der Hodenbiopsien und Verwendung ihrer klinischen Daten zu Forschungszwecken vor (genehmigt von der Ethik-Kommission des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen; Referenznummer 152/16: Charakterisierung der Hoden- und Nebenhodenarchitektur und -Funktion in Hinblick auf physiologische Organfunktion und pathologische Krankheitsbilder (Tumor, Infektion, Infertilität)). In diesem Rahmen wurden Biopsien aus unterschiedlichen Lokalisationen des Hodens entnommen. Nach Studienprotokoll wurde auf der Tumorseite eine Biopsie jeweils aus dem Tumorgewebe, dem tumornahen und -fernen Gewebe entnommen. Dem kontralateralen Hoden wurden Biopsien vom oberen und unteren Pol entnommen.

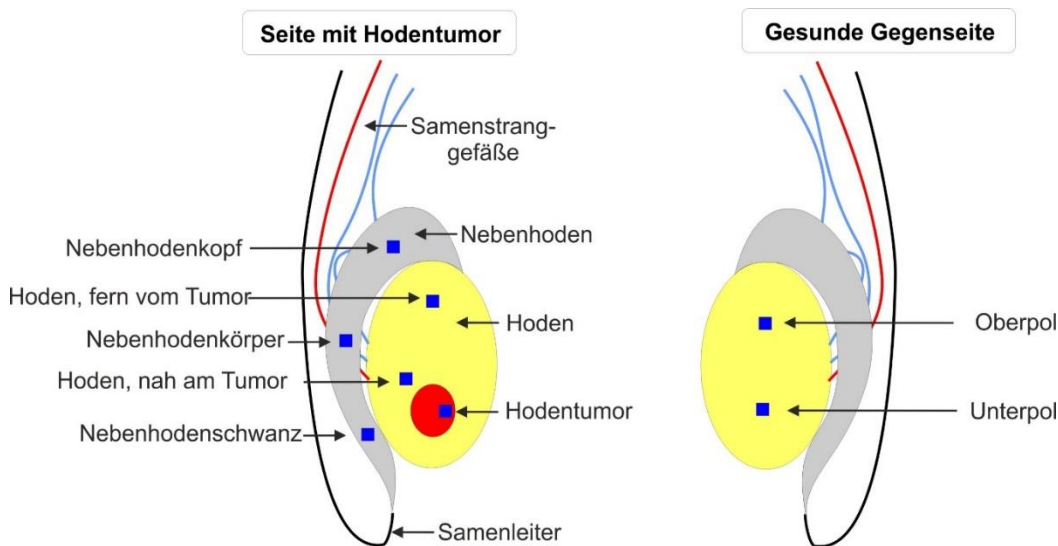


Abbildung 5: Biopsie-Entnahme-Schema. Hoden gelb; Nebenhoden grau; arterielle Gefäße rot; venöse Gefäße blau; Ductus deferens schwarz; Biopsielokalisationen blau.

## 2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Patienten im Alter von  $\geq 18$  Jahren mit klinisch-begründetem Verdacht auf einen Hodentumor wurden mit schriftlichem Einverständnis bei Vorstellung in der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, in die Kohorte eingeschlossen.

## 2.3 Datendokumentation und Datenschutz

Die erhobenen Patientendaten wurden auf einem geschützten Computer ohne Internetzugang zunächst in Microsoft Excel® (2010) gespeichert. Für Analysezwecke wurden die Daten anonymisiert in IBM SPSS 27® überführt und ausgewertet. Zugriff auf personenbezogene, der Schweigepflicht unterliegenden Daten hatten an der Studie beteiligte Mitarbeiter/-innen der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikum Gießen sowie des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fietz, Hodenbiopsie-Register des HZRM).

## 3. Methoden

### 3.1 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom

#### 3.1.1 Histologische Beurteilung der Hodenbiopsien

Unmittelbar nach der operativen Entnahme wurden die Hodenbiopsien in Bouin-Lösung über Nacht fixiert und anschließend paraffiniert. Für die histologische Routineuntersuchung und Beurteilung der Proben im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und-Embryologie wurden aus den Paraffin-eingebetteten Biopsien mithilfe eines Mikrotoms 5 µm-dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE). Zur Beurteilung des Schädigungsgrades der Spermatogenese wurde für jede Biopsie ein Spermatogenese-Score erhoben (Bergmann und Kliesch 1998; Fietz und Kliesch 2022). Außerdem wurden die HE-gefärbten Proben hinsichtlich ihrer histopathologischen Zusammensetzung insgesamt beurteilt (siehe Tabelle 3).

$$\text{Score} = \frac{\text{Anzahl an Tubuli mit elongierten Spermatozyten}^{\text{Spermatiden}}}{\text{Gesamtanzahl der Tubuli}} \times 10$$

Abbildung 6: Formel zur Berechnung des Scores zur Evaluation der Spermatogenese nach Bergmann-Kliesch. Die erhaltenen Werte variieren zwischen 0 (keine elongierten Spermatozyten in den betrachteten Tubuli) und 10 (elongierte Spermatozyten in allen betrachteten Tubuli) (Bergmann und Kliesch 1998; Fietz und Kliesch 2022).

### 3.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Aus den paraffinierten Biopsien wurden zur Kategorisierung und Evaluation des Immunzellinfiltrats sowie der vorliegenden Pathologien zusätzlich zu vorhandenen Belegschnitten vor Beginn der immunhistochemischen Untersuchungen neue Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbungen hergestellt.

Die Paraffinschnitte wurden auf beschichtete Objektträger adhärert und mindestens für 24 Stunden bei 37°C getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden zwei aufeinander folgende Xylobäder (jeweils 10 min) verwendet. Die anschließende Rehydrierung erfolgte mithilfe einer deszendierenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% Ethanol) und destilliertem Wasser (jeweils 5 min). Die Proben wurden für 30 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt und 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut, danach für 2 Minuten mit Eosin gefärbt und mit Leitungswasser abgespült. Zur Dehydrierung wurde eine aszendierende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% Ethanol, jeweils 2 min) und zwei aufeinander folgende Xylobäder (jeweils 10 min) verwendet. Danach wurden die Proben mit Eukitt® eingedeckelt.

Die HE-gefärbten Biopsieschnitte der Tumorkohorte wurden entsprechend der folgenden Tabelle 3 kategorisiert.

Tabelle 3: Histopathologische Kombinationsmöglichkeiten. SE: Seminom; Non-SE: Nicht-Seminom; GCNIS: Germ Cell Neoplasia in Situ; HYP/SCO: Hypospermatogenese/Sertoli- Cell-Only-Phänotyp.

Homogene Histopathologie	Heterogene Histopathologie			
SE	SE+Non-SE	SE+GCNIS	SE+HYP/SCO	SE+GCNIS+HYP/SCO
Non-SE		SE+Non-SE+GCNIS	SE+Non-SE+HYP/SCO	SE+Non-SE+GCNIS+HYP/SCO
		Non-SE+GCNIS	Non-SE+HYP/SCO	Non-SE+GCNIS+HYP/SCO
GCNIS				GCNIS+HYP/SCO
HYP/SCO				

### 3.1.3 Immunhistochemische Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom

Die Immunhistochemie ist ein 1941 von Coons et al. etabliertes molekularbiologisches Verfahren, um Antikörper-gestützt spezifische zelluläre Proteine nachzuweisen (Sharda et al. 2021). Die Interaktion von Antigen und Antikörper kann dabei visualisiert werden. Ein Primärantikörper (meist IgG, seltener IgM) bindet an das zu untersuchende Antigen. Sowohl polyklonale, als auch monoklonale Primärantikörper, die sich in Bindungsaffinität und -spezifität unterscheiden, können für die Immunhistochemie verwendet werden. In einem zweiten Schritt wird ein Substrat auf die Gewebeprobe gegeben, das von einem an den Primär-, Sekundär- oder Tertiärantikörper gebundenen Enzym oder einem anderen Reporter-molekül umgesetzt wird und die Bindung des Antikörper-Komplexes an das zu untersuchende Antigen durch eine chemische Reaktion anzeigt (Ramos-Vara 2005).

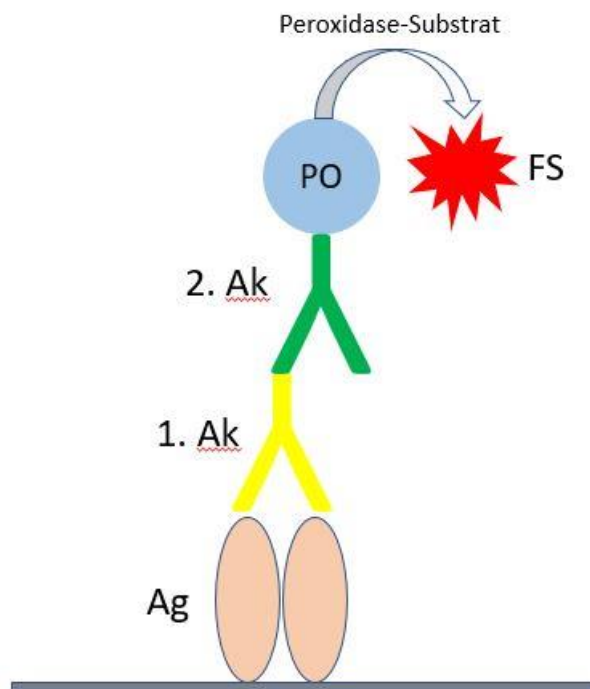


Abbildung 7: Funktionsweise der Immunhistochemie am Beispiel des eigenen Experimentaufbaus. Ag: Antigen; Ak: Antikörper; PO: am 2. Antikörper-gekoppelte Peroxidase; FS: Farbsignal.

Die 5 µm-dicken Paraffinschnitte wurden auf beschichtete Objektträger adhärirt und mindestens für 24 Stunden bei 37°C getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte analog zur HE-Färbung in Abschnitt 3.1.2. Zum Antigen-Retrieval, um die durch Fixierung geschädigte Protein-Tertiärstruktur zu regenerieren (Ramos-Vara 2005), wurden die Proben in tris-EDTA-Puffer-Lösung (pH 9) für 5 min bei 900 W und danach

für 15 min bei 522 W in einer Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden sie für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Zur Inhibierung der endogenen Peroxidase und Vermeidung von Kreuzreaktionen mit dem später zuzugebenden Peroxidasesubstrat wurden die Proben für 15 min in einer Wasserstoffperoxidlösung (3%) inkubiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde eine BSA-Lösung (1,5%) verwendet.

Anschließend wurden die Proben mit dem jeweiligen Primärantikörper betropft und über Nacht bei 4°C in einem Kühlschrank inkubiert. Statt des Primärantikörpers wurde für die Negativkontrollen tris-Waschpuffer verwendet. Alle verwendeten Antikörper wurden auf humanen Tonsillen- oder Lymphknotenschnitten etabliert.

Als Sekundärantikörper wurden aliquotierte Peroxidase-konjugierte Antikörper verwendet, für B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen Peroxidase-konjugierte Ziege anti-Maus IgG und für T-Zellen Peroxidase-konjugierte Ziege anti-Kaninchen IgG, die für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schnitt inkubiert wurden.

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper und Dilutionen

Primärantikörper	Detektierter Zelltyp	Listennummer	Hersteller	Verdünnung in tris-Waschpuffer
Polyclonal rabbit anti-human CD3 antibody	T-Zellen	A0452	Dako, Glostrup, Dänemark	1:100
Monoclonal mouse anti-human CD20cy antibody	B-Zellen	M0755	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50
Monoclonal mouse anti-human CD11c antibody	Dendritische Zellen/Makrophagen	NCL-L-CD11c-563	Novocastra, Nussloch, Deutschland	1:100
Monoclonal mouse anti-human CD68 antibody	Makrophagen	M0876	Dako, Glostrup, Dänemark	1:100



Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper und Dilutionen

Sekundärantikörper	Primärantikörper	Listennummer	Hersteller	Verdünnung in tris-Waschpuffer
Peroxidase-conjugated AffinePure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	CD20cy	115-035-003	Jackson ImmunoResearch Westgrove, USA	1:600
Peroxidase-conjugated AffinePure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	CD68	115-035-003	Jackson ImmunoResearch Westgrove, USA	1:800
Peroxidase-conjugated AffinePure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	CD11c	115-035-003	Jackson ImmunoResearch Westgrove, USA	1:400
AffinePure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	CD3	111-035-003	Jackson ImmunoResearch Westgrove, USA	1:400

Nach jedem separaten Behandlungsschritt wurden die Schnittpräparate in tris-Waschpufferlösung gewaschen. Als Peroxidasesubstrat wurde zur visuellen Detektion von T- und B-Zellen das kommerziell erhältliche AEC Peroxidase Substrate Kit<sup>®</sup> verwendet (Inkubationszeit maximal 20 min). Zur Detektion von dendritischen Zellen und Makrophagen wurde das kommerziell erhältliche Vector NovaRed Peroxidase Substrate Kit<sup>®</sup> mit einer Inkubationszeit von maximal 15 min verwendet.

Im Falle einer Visualisierung mit dem NovaRed<sup>®</sup>-Peroxidasesubstrat wurden die Proben anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) und zwei Xylobädern dehydriert. Alle Proben wurden nach der Inkubation mit dem jeweiligen Peroxidasesubstrat mit Hämatoxylin für einige Sekunden gegengefärbt.

Die Biopsieschnitte wurden bei Behandlung mit NovaRed<sup>®</sup>-Peroxidasesubstrat in Eukitt<sup>®</sup>, mit AEC<sup>®</sup>-Peroxidasesubstrat in Roti-Mount Aqua<sup>®</sup> eingedeckelt.

Die mikroskopische Begutachtung der Proben wurde mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica® bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt und Bilder mit einer integrierten Kamera akquiriert.

Die Analyse des Dichtegrads der Immunzellinfiltration sowie der Distribution innerhalb des Hodengewebes erfolgte mit einem nach Klein et al. modifizierten semiquantitativen Scoring von vier verblindeten, unabhängigen Untersuchern (Klein et al. 2016). Dabei wurden Ziffern von 0 bis 4 für den Dichtegrad des Infiltrats (0= keine positiv gefärbten Immunzellen/absent; 1= einzelne Immunzellen/single cells; 2= verstreute Zellen/scattered cells; 3= mäßige Immunzellinfiltration/intermediate; 4= dichte Immunzellinfiltration/dense) verteilt. Die Distributionskategorien der Immunzellinfiltration ergaben sich wie folgt: 1= fokal; 2= multifokal; 3= disseminiert. Sollten die Untersucher bei gleicher Distributionskategorie einen unterschiedlichen Infiltrations-Dichtegrad beschrieben haben, wurde der Mittelwert aus den Infiltrations-Dichtegraden gebildet. In ausgewählten Fällen erfolgte eine Re-Analyse der Proben, für die diskrepante Befunde vorlagen.

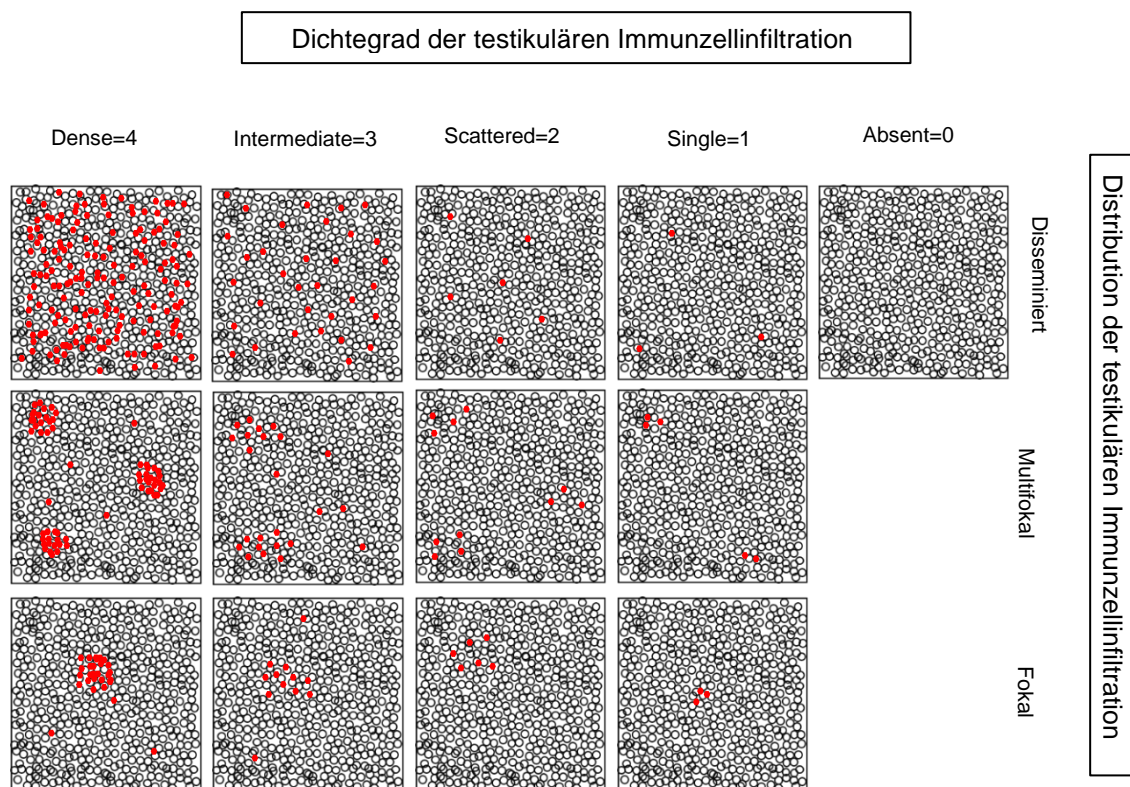


Abbildung 8: Darstellung des semiquantitativen Scoring-Systems zur Beschreibung einer testikulären Immunzellinfiltration. Es wurden sowohl die Dichte als auch das Verteilungsmuster der Immunzellinfiltration bewertet. Die x-Achse zeigt die Infiltrationsdichte von 0-4, die y-Achse die Distributionskategorien.

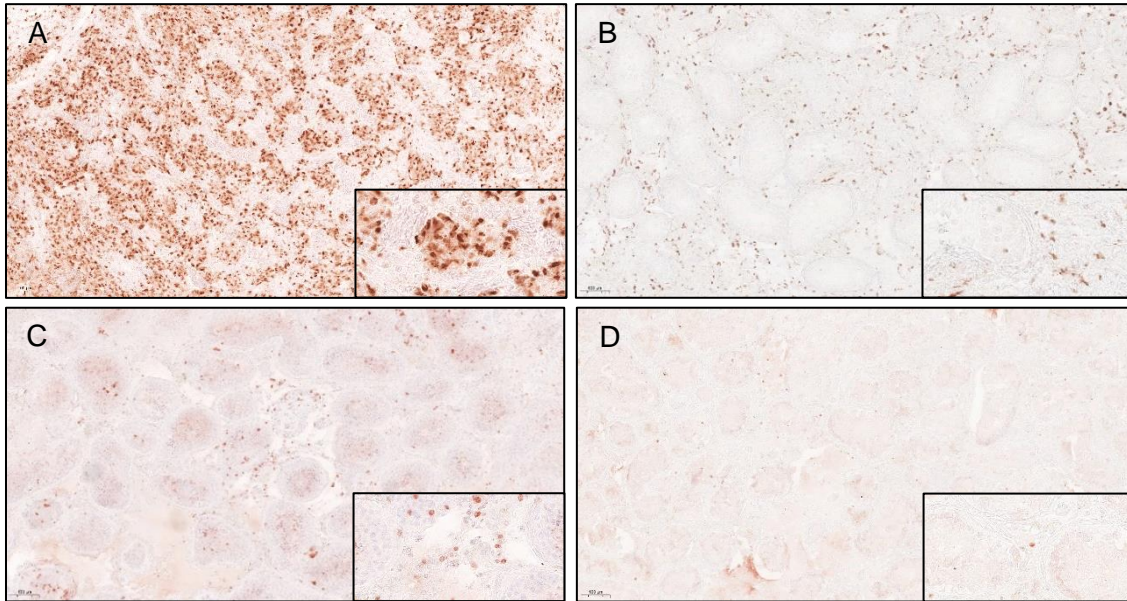


Abbildung 9: Infiltrationsgrade im semiquantitativen Scoring (Beispiele). A: Seminom, CD68+, Score 4 (dense). B: GCNIS, CD68+, Score 3 (intermediate). C: Hypospermatogenese, CD3+, Score 2 (scattered). D: GCNIS, CD3+, Score 1 (single cells). 10- und 63-fache Vergrößerung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

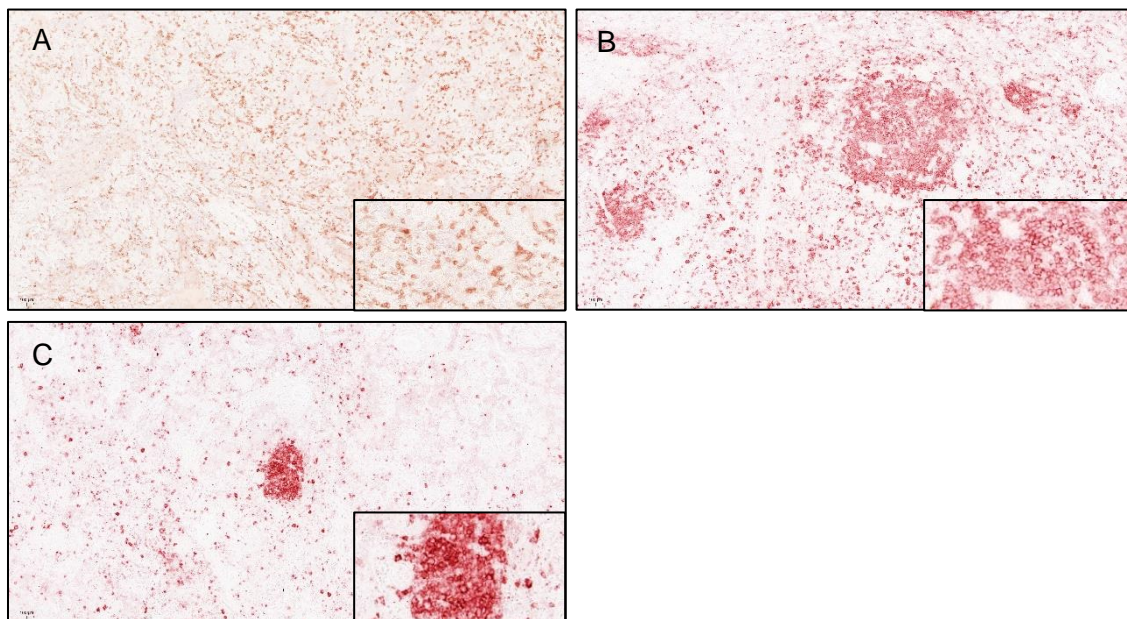


Abbildung 10 Distributionskategorien der Immunzellinfiltration im semiquantitativen Scoring (Beispiele). A: Seminom, CD3+, disseminiert. B: Seminom, CD20+, multifokal. C: Seminom, CD20+, fokal. 10 und 63-fache Vergrößerung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

### **3.2. Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom**

Schockgefrorene Hodengewebeproben wurden in der Kryobank der Sektion Andrologie der Urologie des Universitätsklinikums Gießen bis zur experimentellen Nutzung in flüssigem Stickstoff gelagert. Es wurden Seminom-Patienten ausgewählt, von denen histologisches Material aus drei Biopsie-Lokalisationen (Tumor, Tumor-nah, Tumor-fern) vorlag.

#### **3.2.1 Homogenisierung des Kryomaterials und RNA-Extraktion**

Die Kryoproben wurden bei Bedarf zugeschnitten, sodass maximal 120 mg Gewebe zur Isolation von RNA und Protein vorlag. Die zugeschnittenen Proben wurden anschließend in ein 2 ml Eppendorf<sup>®</sup>-Tube mit 1 ml Trizol-Reagent überführt und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax<sup>®</sup>) behandelt, bis keine makroskopisch sichtbaren Gewebsanteile mehr im Eppendorf<sup>®</sup>-Tube vorlagen. Zwischen jeder Probe wurde der Homogenisator in sterilem 2N NaOH, 70% Ethanol und DEPC-Wasser gereinigt. Nach der Homogenisierung wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend jeweils mit 200 µl Trichlormethan versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 12000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthielt die obere Phase die RNA, die mittlere Phase Protein und die untere Phase DNA. Die Proteinphase wurde perspektivisch für weiterführende Experimente bei -20°C gelagert.

Zur Fällung wurde die obere Phase in ein 1,7 ml-Schraubdeckelgefäß pipettiert und mit 500 µl Isopropanol (-20°C) versetzt. Danach erfolgte eine 30-minütige Ruhephase bei -20°C und eine anschließende Zentrifugation (10 min, 4°C, 12000 U/min).

Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, wurde das verbleibende Pellet zum Waschen mit 500 µl Ethanol (70%) in DEPC-Wasser versetzt, 10 min in einem Eisbad gekühlt und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 12000 U/min). Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal hintereinander durchgeführt.

Der Überstand wurde verworfen, die Pellets bei 37°C getrocknet und in je 50 µl sterilem, bidestilliertem Wasser gelöst. Die RNA-Proben wurden schließlich bei -80°C für weitere Experimente gelagert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Das Photometer wurde zur Bestimmung der probenspezifischen optischen Dichte bei 260 und 280 nm Wellenlänge verwendet. Die Absorption wurde durch das Gerät nach dem Lambert-Beer-Gesetz in

eine Konzentration umgerechnet. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 und 280 nm sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Wilfinger et al. 1997).

### 3.2.2 DNase-Behandlung und reverse Transkription

Vor Transkription der RNA in cDNA wurde die isolierte RNA mit dem Enzym DNase I (Roche®) vorbehandelt, um potenzielle DNA-Verunreinigungen zu beseitigen (siehe Tabelle 6).

Die RNA wurde auf 200 µg/ml mit sterilem, bidestilliertem Wasser verdünnt. Von der verdünnten RNA wurden jeweils 6,65 µl in ein Eppendorf®-Tube überführt.

Das verwendete Thermoprotokoll ist im Anhang in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendeter DNase-Mix

Komponente	Volumen pro Eppendorf-Tube (in µl)	Stammlösung	Gebrauchslösung
DNase I-Puffer	2	10x	10x
DNase I, RNase-frei	1	10 U/µl	1 U/µl
RNase-Inhibitor	0,25	40 U/µl	1 U/µl
RNA	6,65		

Um die aufgereinigte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das kommerzielle Gene Amp Gold RNA PCR Core Kit® der Firma PE Biosystems® verwendet. 9 µl der aufgereinigten RNA wurden pro Tube in 51 µl +RT-Ansatz pipettiert (siehe Tabelle 7).

Als Negativkontrolle wurden je 0,9 µl aufgereinigte RNA in 5,1 µl -RT-Mix, der keine reverse Transkriptase enthielt, hinzupipettiert. Die reverse Transkription erfolgte nach dem im Anhang in Tabelle 24 aufgeführten Thermoprotokoll.

Je 1 µl der synthetisierten cDNA und des -RT-Ansatzes wurden für eine Kontroll-PCR verwendet, um DNA-Verunreinigungen zu erkennen und somit die Qualität der Transkription zu validieren. Die restliche cDNA wurde für weitere Experimente bei -20°C gelagert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der RT-Ansätze

Komponenten	Stammlösung	+RT-Mix (in µl)	-RT-Mix (in µl)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	12	1,2
PCR Puffer	10x	6	0,6
Nucleotid-Mix	10 mM	6	0,6
Random Hexamers	50 mM	3	0,3
RNAse-Inhibitor	20 U/µl	3	0,3
Steriles, bidestilliertes H <sub>2</sub> O		18	2,1
RT-Multiskript		3	-

### 3.2.3 RT-PCR zur Qualitätskontrolle und Gelelektrophorese

Für die Kontroll-RT-PCR wurde erneut das kommerziell erhältlich GeneAmp Gold RNA PCR Core Kit® der Firma Biosystems® verwendet. Je 1 µl der cDNA/ des -RT-Ansatzes wurden zu dem unten aufgeführten Mastermix pipettiert (siehe Tabelle 8). Es wurde die Amplifikation von GAPDH, einem Enzym der Glykolyse, das in nahezu allen menschlichen Zellen existiert, überprüft (Barber et al. 2005). Als Negativkontrolle wurde statt des -RT-Ansatzes 1 µl steriles, bidestilliertes Wasser dem PCR-Mastermix hinzugefügt. Als Positivkontrolle fungierte die validierte cDNA eines Kontrollpatienten mit normaler Spermatogenese, ohne Zeichen einer testikulären Entzündung, bzw. Immunzellinfiltration.

Tabelle 8: Mastermix der Kontroll-RT-PCR

Komponente	Stammlösung	Volumen pro Eppendorf-Tube
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1
PCR Puffer Gold	10x	2
RNAse freies H <sub>2</sub> O		19,37
dNTP Mix	10 mmol	0,5
Primer Revers	10 pmol/µl	0,5
Primer Forward	10 pmol/µl	0,5
Gold Amplitaq	5 U/ml	0,13

Die GAPDH-Primer-Sequenz Forward/Revers lautet wie folgt:

for (5' => 3') CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT C

rev (5' => 3') GTG GTC GTT GAG GGC AAT G.

Der Primer wurde im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen mithilfe des Programms Oligo Explorer 1.1.0 entworfen und von der biomers.net GmbH hergestellt und ausgeliefert.

Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge von 81 bp.

Die RT-PCR erfolgte nach dem im Anhang in Tabelle 28 aufgeführten Thermoprotokoll.

Nach der RT-PCR wurden die PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt, um die spezifische Expression von GAPDH zu überprüfen.

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 1,8 g Agarose (1,5%) in 120 ml TAE-Puffer durch Aufkochen (Mikrowelle, 600 W) in einem Erlenmeyer-Kolben gelöst. Danach wurde das Gefäß auf einem Schüttler für circa 10 min abgekühlt. Pro 120 ml Agarose-Gel wurden 12 µl GelGreen® zur interkalierenden Färbung der DNA hinzugegeben. Das flüssige Gel wurde danach auf eine Elektrophorese-Platte mit einem passenden Kamm gegeben und für einige Minuten gefestigt. Die Elektrophoreseplatte wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt. In jedes Well wurden 5 µl Loading Buffer pipettiert. Als Referenzbanden wurden am Anfang und Ende jeder Reihe 5 µl 50bp-Marker hinzugegeben. In die obere Well-Reihe wurden je 18 µl des amplifizierten cDNA-Materials gegeben, in die untere Reihe je 18 µl des -RT-Ansatzes. Eine Spannung von 140 V wurde für 60 min angelegt. Nach abgeschlossener Laufzeit wurde die Gelplatte in einer UV-Kammer abgelichtet und das Ergebnis dokumentiert.

### **3.2.7 qRT-PCR mit Berechnung der relativen Genexpression**

Die quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) ist ein Verfahren, um die absolute oder relative Genexpression quantitativ in der Ausgangs-cDNA zu bestimmen. In diesem Experiment wurde die Bestimmung der relativen Genexpression gewählt. Die Amplifizierung der cDNA, die prinzipiell wie eine herkömmliche RT-PCR abläuft, wird kontinuierlich über die Detektion eines Fluoreszenz-Signals gemessen. Der Mastermix enthält Oligonukleotide, Puffer und eine DNA-Polymerase. Zusätzlich werden gen-spezifische Primer-Sonden-Gemische (Taqman®-Assays) verwendet, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert sind. Nach dem Annealing beginnt die Taq-Polymerase mit der Synthese des komplementären Strangs, wobei sie an der genspezifischen Sequenz auf die Sonde stößt, die sie mit ihrer 5'-3'-Exonuklease-

Aktivität hydrolytisch spaltet, wodurch der Fluoreszenz-Farbstoff von seinem Quencher („Löcher“) getrennt wird und ein Lichtsignal emittiert. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zu der Menge des Amplifikats. Der sogenannte  $C_T$ - oder  $C_q$ -Wert (threshold cycle/quantification cycle) gibt die minimale Zyklusanzahl an, nach der eine Fluoreszenz detektiert werden kann, die sich vom Hintergrundsignal unterscheidet. Ein niedriger  $C_T$ -Wert spricht daher für eine hohe Ausgangskonzentration des Gens, da wenig Amplifikationszyklen benötigt werden, um ein messbares Fluoreszenz-Signal zu erzeugen. Damit eine Berechnung der relativen Genexpression möglich ist, wird ein Taqman<sup>®</sup>-Assay für ein Housekeeping- oder Referenzgen verwendet, das später als Referenzsignal für die Zielgene fungiert (Jahson 2008). In diesem Versuchsaufbau wurden die Referenzgene *RPL19* und *RPS27* verwendet, die für ribosomale Proteine codieren (siehe Tabelle 9).

Jeweils drei cDNA-Proben pro Patient (Tumor, Tumor-nah, Tumor-fern) wurden zusammen mit dem Taqman<sup>®</sup>-Mastermix, dem jeweiligen Taqman<sup>®</sup>-Assay und bidestilliertem, sterilem Wasser auf eine mit Eis gekühlte, dünnwandige 96-Well-Platte pipettiert, anschließend mit einer Folie bedeckt und in einem Thermocycler behandelt (Thermoprotokoll siehe Anhang, Tabelle 31). Die Liste der verwendeten Assays sowie des Mastermix sind unten aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete TaqMan<sup>®</sup> Single Tube Gene Expression Assays

Assay	Zugangsnummer
RPL19	hs02338565_gh
RPS27	hs04185005_g1
CD4	hs01058407_m1
ICOS	hs00359999_m1
CD8a	hs00233520_m1
FOXP3	hs01085834_m1
ISG20	hs00158122_m1
TGF- $\beta$ 1	hs00998133_m1
IL-10	hs00961622_m1
IL-6	hs00985639_m1
CXCL13	hs00757930_m1



Tabelle 10: Verwendeter Mastermix für die qRT-PCR

Komponente	Volumen pro well (in $\mu\text{l}$ )
2x TaqMan Gene Expression Mastermix	10
20x TaqMan Gene Expression Assay	1
Steriles, bidestilliertes $\text{H}_2\text{O}$	7
cDNA	2

Die Referenzgene (*RPS27*, *RPL19*) wurden gewählt, da eine kontinuierliche Expression in allen vorliegenden cDNA-Proben zu erwarten war, unabhängig von der Herkunft, bzw. Lokalisation der zugrundeliegenden Gewebeprobe. Mithilfe der  $C_t$ -Werte der Referenzgene und den Zielgenen in den jeweiligen cDNA-Proben der Patienten, ist eine Berechnung der relativen Genexpression möglich (Livak und Schmittgen 2001). Zuerst wurden die jeweiligen  $\Delta C_t$ -Werte der zu untersuchenden Gene in den Biopsien mithilfe der Referenzgene bestimmt:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen})$$

Im nächsten Schritt wurden dann die  $\Delta\Delta C_t$ -Werte mithilfe des  $\Delta C_t$ -Mittelwerts einer Kontrollgruppe von Patienten mit normaler Spermatogenese, ohne Zeichen einer testikulären Entzündung, bzw. Immunzellinfiltration berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Zielgen}) - \Delta C_t(\text{NSP} - \text{Kontrolle})$$

Die relative Genexpression wurde dann wie folgt berechnet:

$$\text{Genexpression (relativ)} = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

Die Ergebnisse wurden im Anschluss dokumentiert und graphisch visualisiert (näheres siehe nächster Abschnitt).

### 3.2.11 Datenauswertung und statistische Methoden

Für die klinisch-deskriptive Analyse und Korrelationsanalyse der Tumorkohorte wurde die Statistik-Software SPSS 27<sup>®</sup> von IBM<sup>®</sup> für Microsoft Windows verwendet. Verglichen wurden Patienten mit reinem Seminom (rSE) und Patienten mit anderen testikulären Keimzelltumoren und Mischtumoren, die aus GCNIS entstehen (aKZT+MT).

Die deskriptiven Daten wurden mit absoluter und relativer Häufigkeit, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und/oder Median mit Interquartilsabstand dargestellt. Zum Mittelwertvergleich der Gruppen wurde im Falle einer Normalverteilung, metrischen Skalierung und Varianzhomogenität des jeweiligen Parameters in den Gruppen ein ungepaarter t-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Bei Varianzheterogenität, geprüfter Normalverteilung und metrischen Skalierung wurde die Welch-Abwandlung des ungepaarten t-Tests durchgeführt. Sollte ein Parameter nicht normalverteilt oder statt metrisch ordinalskaliert gewesen sein, wurde ein Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben zum Vergleich der mittleren Ränge durchgeführt. War ein Parameter nominalskaliert, wurde zur Zusammenhangsüberprüfung bei einer 2\*2-Tabelle die Kontinuitätskorrektur nach Yates verwendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt und signifikante Gruppenunterschiede tabellarisch vermerkt.

Die Häufigkeit der einzelnen Parameter wurde zunächst in Balkendiagrammen visualisiert. Metrische Daten, wie z.B. zu Tumormarkern und Hormonen, wurden mit Median, 25.- und 75.-Perzentile in Boxplots zusammengetragen.

Zur bivariaten Korrelationsanalyse der klinischen Parameter untereinander wurden die einzelnen Parameter zunächst sowohl mit dem Kolmogorov-Smirnov-, als auch mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Außerdem wurde der Zusammenhang der Variablen in einem Streudiagramm dargestellt. Sofern die Variablen metrisch skaliert, normalverteilt und in einem linearen Zusammenhang miteinander standen, wurde zur Korrelationsanalyse der Pearson-Test verwendet. Sollte mindestens eine Variable ordinal skaliert, nicht normalverteilt oder in einem nicht-linearen Verhältnis zur anderen Variable gestanden haben, wurden ein Kendall-tau-b- und ein Spearman-rho-Test durchgeführt. Für die Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Zur bivariaten Korrelationsanalyse der klinischen Parameter mit dem immunhistochemischen Scoring wurden ein Kendall-tau-b- und ein Spearman-rho-Test durchgeführt und der Zusammenhang in einem gestapelten Streudiagramm dargestellt. Für die Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Für die immunhistochemischen Ergebnisse und die qPCR-Auswertung wurde GraphPad Prism 9<sup>®</sup> von GraphPad, Inc. für Microsoft Windows<sup>®</sup> verwendet. Ob signifikante Unterschiede in den Gruppen der immunhistochemischen Ergebnisse vorlagen, wurde mithilfe eines nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-H-Test sowie mit einem Dunn's-multiple-comparisons-Test überprüft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Deskriptive Statistik

#### 4.1.1 Altersverteilung

Das mediane Alter der Gruppe „rSE“ betrug 37 Jahre bei einer Spannweite von 23 bis 69 Jahren. Die Gruppe „aKZT+MT“ wies einen Median von 33,5 Jahren bei einer Spannweite von 21-48 Jahren auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht.

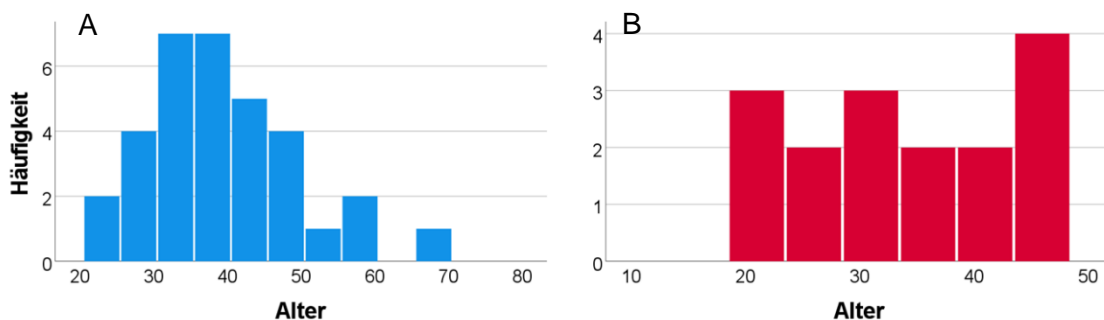


Abbildung 11: Altersverteilung der Patientengruppen „rSE“ (A), n=33 und „AKZT+MT“ (B), n=16.

#### 4.1.2 Tumor-Staging

Das Tumor-Staging wurde nach der UICC-Klassifikation durchgeführt (Brierley 2017). In der Patientengruppe „rSE“ (n=33) wiesen 72,2 % ein Tumorstadium von IA, 12,1 % von IB, 3% von IS, 6,1% von IIA, 6,1% von IIB auf. Tumorstadien höher als IIB lagen nicht vor. In der Patientengruppe „aKZT+MT“ (n=16) wiesen 43,8% ein Stadium von IA, 6,3 % von IB, 6,3 % von IS, 6,3 % von IIA, 12,5 % von IIB, 6,3 % von IIC und 18,8 % von IIIA auf. Es lagen signifikante Unterschiede der beiden Gruppen hinsichtlich Lymphknoten- und Fernmetastasierungsstatus vor, wobei die Patienten der Gruppe „aKZT+MT“ einen fortgeschritteneren Status aufwiesen.

Details zum pT-, pN-, cM-, Venen- und Lymphgefäßstatus sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Tumor-Staging der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16).  
 \*:  $p \leq 0,05$ . <sup>a</sup> t-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>b</sup> Welch-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>d</sup> Kontinuitätskorrektur nach Yates.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumoren und Mischtumoren mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16	Signifikanz (zweiseitig)
Alter bei Diagnose (Mittelwert, SD)	37,69 ± 10,03	39,36 ±10,11	34,25 ± 9,23	0,095 <sup>a</sup>
<i>pT</i> , % (n)				0,290 <sup>c</sup>
1	71,4 (35)	75,8 (25)	62,5 (10)	
2	26,5 (13)	24,2 (8)	31,3 (5)	
3	2 (1)	0 (0)	6,3 (1)	
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>Veneninvasion</i> , % (n)				0,768 <sup>c</sup>
0	77,6 (38)	78,8 (26)	75 (12)	
1	22,4 (11)	21,2 (7)	25 (4)	
<i>Lymphgefäßinvasion</i> , % (n)				0,724 <sup>d</sup>
0	85,7 (42)	84,8 (28)	93,8 (15)	
1	12,2 (6)	15,2 (5)	6,3 (1)	
<i>cN</i> , % (n)				0,029 <sup>*c</sup>
0	79,6 (39)	87,9 (29)	62,5 (10)	
1	6,1 (3)	6,1 (2)	6,3 (1)	
2	12,2 (6)	6,1 (2)	25 (4)	
3	2 (1)	0 (0)	6,3 (1)	
<i>cM</i> , % (n)				
0	93,9 (46)	100 (33)	81,3 (13)	0,011 <sup>*c</sup>
1	6,1 (3)	0 (0)	18,8 (3)	
<i>UICC-Stadium</i> , % (n)				0,013 <sup>*c</sup>
IA	63,3 (31)	72,2 (24)	43,8 (7)	
IB	10,2 (5)	12,1 (4)	6,3 (1)	
IC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
IS	4,1 (2)	3,0 (1)	6,3 (1)	
IIA	6,1 (3)	6,1 (2)	6,3 (1)	
IIB	8,2 (4)	6,1 (2)	12,5 (2)	
IIC	2,0 (1)	0 (0)	6,3 (1)	
IIIA	6,1 (3)	0 (0)	18,8 (3)	

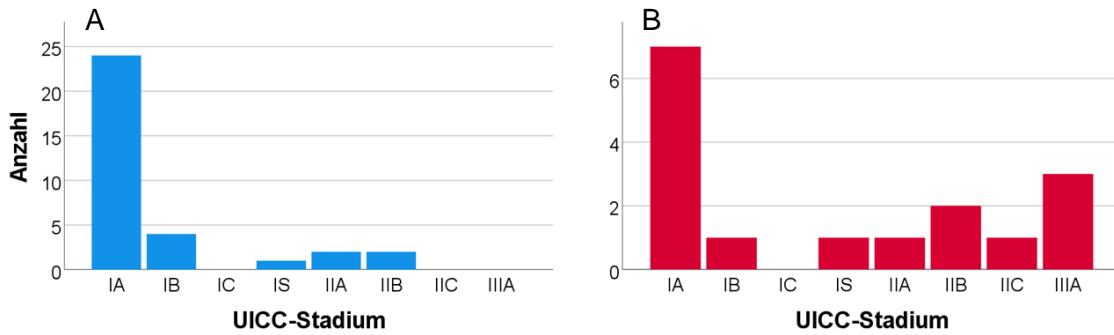


Abbildung 12: Häufigkeit der UICC-Tumorstadien der Patientengruppen „rSE“ (A) und „aKZT+MT“ (B).

#### 4.1.3 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren wurden in der Tumorkohorte eine positive Familienanamnese für Hodentumoren sowie ein vorbekannter Maldescensus testis in der Eigenanamnese erfasst.

In der Patientengruppe „rSE“ (n=33) wiesen 3,03 % eine positive Familienanamnese und 18,18 % einen Maldescensus testis in der Vorgeschichte auf. In der Patientengruppe „aKZT+MT“ (n=16) wiesen 6,25 % eine positive Familienanamnese auf. Eine positive Eigenanamnese für einen Hodenhochstand fand sich in dieser Gruppe nicht. Signifikante Gruppenunterschiede lagen nicht vor.

Tabelle 12: Risikofaktoren der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16).

<sup>d</sup> Kontinuitätskorrektur nach Yates. Angaben in Prozent und Anzahl betroffener Patienten.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumoren und Mischtumoren mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16	Signifikanz (zweiseitig)
Positive Familienanamnese für Hodentumoren	4,08 (2)	3,03 (1)	6,25 (1)	1,000 <sup>d</sup>
Maldescensus testis in der Eigenanamnese	12,24 (6)	18,18 (6)	0 (0)	0,175 <sup>d</sup>

#### **4.1.4 Hodenvolumetrie und Spermiogramm**

Bei Verdacht auf einen Hodentumor wurden die Hodenvolumina der Tumorseite und kontralateralen Seite der Patienten nach einer initialen körperlichen Untersuchung sonographisch erfasst. Die Ejakulatdiagnostik wurde nach den 2010 veröffentlichten Richtlinien der WHO durchgeführt und ausgewertet (World Health Organization 2010) . Zu den erfassten Parametern gehören Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie. Außerdem wurden Spermatogenese-Scores in den Tumorgewebsproben und Biopsien der kontralateralen Seite erhoben.

Hinsichtlich des Hodenvolumens und des Ejakulatvolumens lagen keine signifikanten Gruppenunterschiede vor. Auch die Spermatogenese-Scores für die unterschiedlichen Biopsielokalisationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“.

Die Gruppe „rSE“ wies mit  $29,52 \cdot 10^6$  Spermien/ml eine signifikant höhere Spermienkonzentration als die Patientengruppe „aKZT+MT“ auf.

Circa 50 % beider Patientengruppen entschieden sich vor der chirurgischen Therapie für eine Spermien-Kryokonservierung.

Weitere Parameter sind in Tabellen 13 und 14 gegenübergestellt.

Tabelle 13: Hodenvolumetrie und andrologische Parameter der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16). \*: p≤0,05. <sup>a</sup> t-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>b</sup> Welch-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>d</sup> Kontinuitätskorrektur nach Yates. <sup>1</sup> Angabe in Prozent; <sup>2</sup> Angabe in Prozent und Anzahl betroffener Patienten. Weitere Medianangaben siehe Tabelle 14.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumoren und Mischtumoren mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16	Signifikanz (zweiseitig)
<i>Ultraschall</i>				
Volumen Tumorseite (Mittelwert, SD)	30,11 ± 44,88	23,32 ± 22,12	55,31 ± 88,12	0,199 <sup>c</sup>
Volumen kontralaterale Seite (Mittelwert, SD)	15,13 ± 5,90	15,33 ± 6,04	14,40 ± 5,76	0,719 <sup>a</sup>
<i>Ejakulat</i>				
Ejakulatvolumen (Mittelwert, SD)	2,66 ± 1,50	2,79 ± 1,49	2,36 ± 1,58	0,588 <sup>c</sup>
Spermienkonzentration (Mittelwert, SD)	22,46 ± 31,26	29,52 ± 35,72	7,45 ± 7,47	0,013 <sup>*c</sup>
Progressive Spermien (Mittelwert, SD) <sup>1</sup>	43,44 ± 21,63	46,41 ± 17,58	37,13 ± 28,82	0,549 <sup>c</sup>
Nicht-progressive Spermien (Mittelwert, SD) <sup>1</sup>	10,52 ± 6,71	11,94 ± 6,78	7,5 ± 5,83	0,125 <sup>a</sup>
Immotile Spermien (Mittelwert, SD) <sup>1</sup>	38,04 ± 18,59	41,65 ± 15,04	30,38 ± 24,12	0,164 <sup>a</sup>
Morphologische Normalformen (Mittelwert, SD) <sup>1</sup>	8,64 ± 5,52	9,59 ± 5,22	6,63 ± 5,95	0,218 <sup>a</sup>
Unerfüllter Kinderwunsch <sup>2</sup>	10,2 (5)	12,12 (4)	6,25 (1)	0,894 <sup>d</sup>
Spermien-Kryokonservierung <sup>2</sup>	51 (25)	51,5 (17)	50 (8)	1,000 <sup>d</sup>
Spermatogenese-Score Tumor (Median, IQR)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,434 <sup>c</sup>
Spermatogenese-Score Tumor nah (Median, IQR)	0 (3)	0 (2,4)	1,05 (6,8)	0,204 <sup>c</sup>
Spermatogenese-Score Tumor fern (Median, IQR)	1 (8,5)	2 (7,3)	1 (9)	0,982 <sup>c</sup>
Spermatogenese-Score kontralateraler Hoden (Median, IQR)	9 (3,8)	9 (1,5)	9 (8,3)	0,483 <sup>c</sup>



Tabelle 14: Hodenvolumetrie und andrologische Parameter der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16). Angaben als Median mit Interquartilsabstand.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumoren und Mischtumoren mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16
<i>Ultraschall</i>			
Volumen Tumorseite	17,8 (23,45)	16,3 (20,09)	22 (25,9)
Volumen kontralaterale Seite	13,6 (6,8)	14,2 (8,15)	13,6 (5,5)
<i>Ejakulat</i>			
Ejakulatvolumen	2,1 (2,1)	2,3 (3,1)	2,05 (1,68)
Spermienkonzentration	14,7 (26)	19,4 (32,55)	5,95 (13,34)
Progressive Spermien (%)	52 (30)	48 (32)	54 (57)
Nicht-progressive Spermien (%)	10 (11)	11 (12)	7,5 (11)
Immotile Spermien (%)	34 (19)	37 (19)	31 (32)
Morphologische Normalformen (%)	9 (10)	11 (8)	6 (11)

#### 4.1.5 Chemotherapie und Rezidive

Die Patienten erhielten als Chemotherapie entweder Carboplatin als Monotherapie oder kombinierte Chemotherapien aus Cisplatin, Etoposid, Bleomycin (PEB-Schema) und Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid (PEI-Schema) in unterschiedlicher Zyklusanzahl. Bestrahlungen wurden nicht durchgeführt.

30,3 % der Patienten der Gruppe „rSE“ und 75 % der Gruppe „aKZT+MT“ erhielten eine Chemotherapie. Es bestand eine signifikante Abhängigkeit zwischen einer durchgeführten Chemotherapie und der Patientengruppe.

18,2 % der Patienten der Gruppe „rSE“ erhielten eine Monotherapie mit Carboplatin, 12,1 % eine dreifache Therapie nach dem PEB-Schema. 37,5 % der Patienten der Gruppe „aKZT+MT“ erhielten eine einfache, 6,3 % eine dreifache und 25 % eine vierfache Chemotherapie nach dem PEB-Schema. 6,3 % erhielten eine vierfache Therapie nach dem PEI-Schema.

Ein Tumorrezidiv nach Abschluss der Chemotherapie erlitten 6,1 % der Patienten der Gruppe „rSE“ und 18,8 % in der Gruppe „aKZT+MT“. Es lag keine signifikante Abhängigkeit zwischen Rezidivstatus und Patientengruppe vor.

Tabelle 15: Chemotherapie-Kontingente und Tumorrezidive nach abgeschlossener Chemotherapie bei den Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16). \*\*:  $p \leq 0,01$ . <sup>d</sup> Kontinuitätskorrektur nach Yates. Angaben in Prozent.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumoren und Mischtumoren mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16	Signifikanz (zweiseitig)
Chemotherapie erhalten	44,9	30,3	75	0,008 <sup>**d</sup>
Carboplatin mono	12,2	18,2	0	
PEB 1x	12,2	0	37,5	
PEB 3x	10,2	12,1	6,3	
PEB 4x	8,2	0	25	
PEI 3x	0	0	0	
PEI 4x	2	0	6,3	
Post- Chemotherapie- Rezidiv	10,2	6,1	18,8	0,383 <sup>d</sup>

#### 4.1.6 Tumormarker und Hormonstatus

In der Laborroutine wurden Marker für maligne Hodentumoren (AFP, hCG) und LDH als Zellzerfalls-Marker bestimmt. Der abgenommene Hormonstatus der Patienten umfasste die Hypophysenhormone LH, FSH und das Sexualhormon Testosteron mit seinem Transportprotein SHBG.

AFP und hCG waren in der Gruppe „aKZT+MT“ signifikant höher. LH und FSH waren in der Gruppe „rSE“ signifikant höher. Für LDH, Testosteron und SHBG ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 16: Hormonstatus und Tumormarker der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16). \*:  $p \leq 0,05$ . <sup>a</sup> t-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>b</sup> Welch-Test bei unabhängigen Stichproben; <sup>c</sup> Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben. Angaben als Mittelwert mit Standardabweichung.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumore und Mischtumore mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16	Signifikanz (zweiseitig)
AFP (ng/l)	86,47 ± 180,88	4,29 ± 9,58	255,96 ± 242,89	0,000 <sup>*c</sup>
hCG (IU/l)	358,38 ± 1316,31	2,63 ± 2,10	1069,89 ± 2149,20	0,004 <sup>*c</sup>
LDH (U/l)	326,58 ± 234,58	293,84 ± 207,04	392,06 ± 277,45	0,137 <sup>c</sup>
LH (IU/l)	3,38 ± 3,13	4,46 ± 3,17	1,1 ± 1,33	0,001 <sup>*c</sup>
FSH (IU/l)	7,09 ± 6,13	9,14 ± 5,94	2,79 ± 4,07	0,002 <sup>*c</sup>
Testosteron (gesamt) (ng/dl)	421,48 ± 210,81	380,46 ± 148,70	503,52 ± 290,98	0,396 <sup>c</sup>
Testosteron frei (berechnet) (ng/dl)	8,52 ± 5,23	7,12 ± 2,65	11,02 ± 7,62	0,171 <sup>b</sup>
Testosteron frei (%)	2,05 ± 0,50	1,92 ± 0,46	2,25 ± 0,53	0,117 <sup>a</sup>
SHBG (nmol/l)	35,20 ± 16,05	38,59 ± 17,00	28,44 ± 12,19	0,148 <sup>a</sup>

Tabelle 17 : Hormonstatus und Tumormarker der Patientengruppen „rSE“ (n=33) und „aKZT+MT“ (n=16). Angaben als Median mit Interquartilsabstand.

	Alle Patienten N=49	Reines Seminom (rSE) N=33	Andere testikuläre Keimzelltumore und Mischtumore mit GCNIS-Bezug (aKZT+MT) N=16
AFP (ng/l)	3,2 (31,9)	2,1 (2,4)	199,5 (505)
hCG (IU/l)	1,9 (3,28)	1,9 (0,1)	5,8 (1316,45)
LDH (IU/l)	237 (157,5)	233,5 (104)	256 (295,75)
LH (IU/l)	2,5 (5,2)	4,4 (4,75)	0,5 (2,32)
FSH (IU/l)	6,3 (9,4)	9,5 (8,3)	0,55 (5,8)
Testosteron (gesamt) (ng/dl)	385,6 (230,95)	385,3 (240,17)	422,2 (381,8)
Testosteron frei (berechnet) (ng/dl)	7,82 (4,37)	7,7 (3,47)	9,51 (9,91)
Testosteron frei (%)	2,03 (0,68)	1,8 (0,77)	2,27 (0,81)
SHBG (nmol/l)	33,65 (19,88)	37,15 (22,2)	30,35 (20,92)

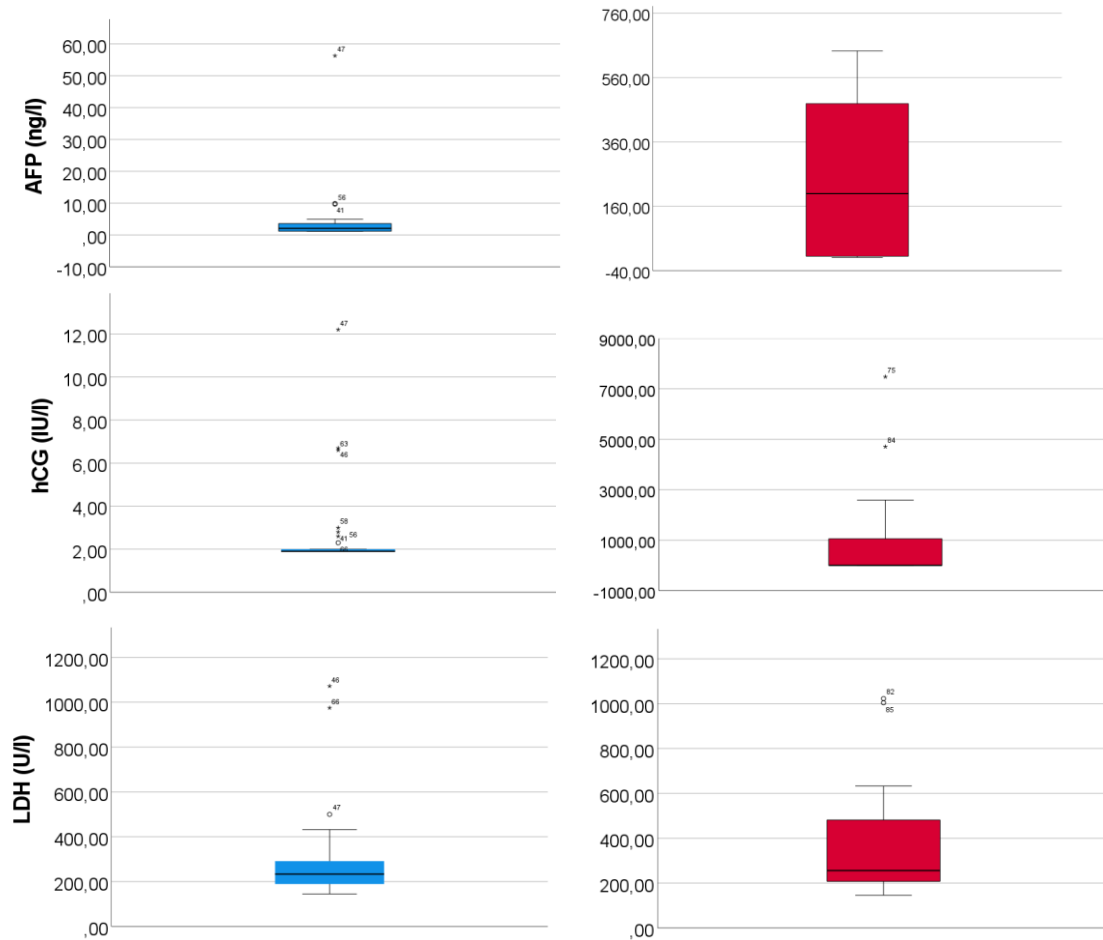


Abbildung 13: Boxplots der Tumormarker AFP, hCG, LDH der Patientengruppen „rSE“ (blau; n=33) und „aKZT+MT“ (rot; n=16).

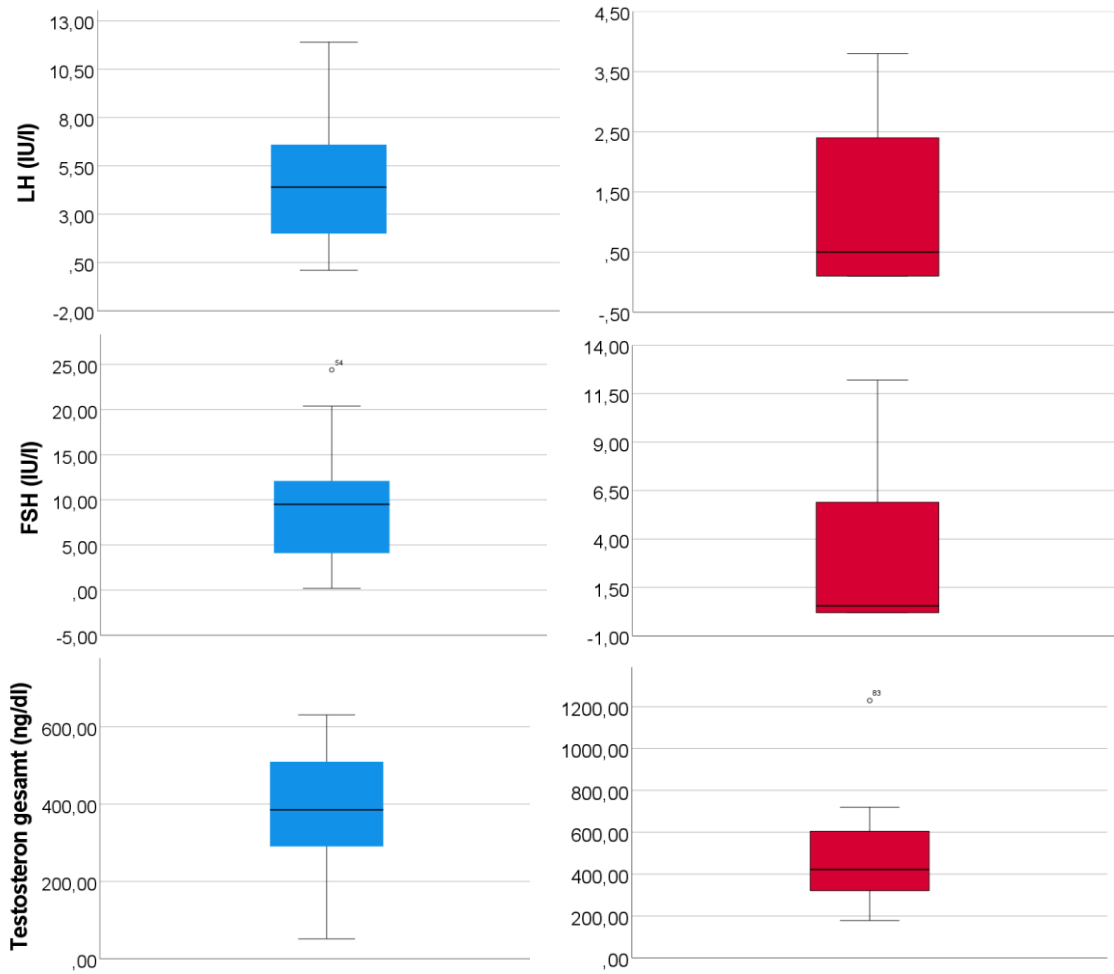


Abbildung 14: Boxplots der Hormonparameter (LH, FSH, Testosteron (gesamt)) der Patientengruppen „rSE“ (blau; n=33) und „aKZT+MT“ (rot; n=16).

## 4.2 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom

### 4.2.1 Histopathologische Kategorisierung des Patientenkollektivs

Neben den zu erwartenden Kategorien wie Seminom, GCNIS und Hypospermatogenese/Sertoli-Cell-Only-Phänotyp fanden sich auch heterogene Kombinationen aus den solchen. Auffällig waren einige Biopsien mit überwiegend fibrosiert-nekrotischen und atrophischen Veränderungen, die kein oder nur wenig Tumorgewebe enthielten. Abgesehen von diesen Ausnahmen präsentierte sich ein homogenes Muster, das im Tumorgewebe größtenteils ein reines Seminom, gegebenenfalls mit GCNIS-durchsetzten Arealen zeigte. Im tumornahen Gewebe präsentierte sich größtenteils eine Kombination aus GCNIS- und Hypospermatogenese-enthaltenden Arealen sowie eine Hypospermatogenese. Im tumorfernen Gewebe bildeten GCNIS mit Hypospermatogenese oder eine Hypospermatogenese, bzw. ein Sertoli-Cell-Only-Phänotyp die am häufigsten auftretenden histopathologischen Kategorien. Die von den n=30 abweichenden Biopsie-Anzahlen ergaben sich durch den variablen intraoperativen Befund und der daraus resultierenden Primärtumormasse, die für die klinisch-pathologische Diagnostik vonnöten war und nicht für die Forschung zur Verfügung stand. Die exakten Daten finden sich in Tabelle 18.

Tabelle 18: Kombinationen histopathologischer Befunde innerhalb des Seminom-Patientenkollektivs (n=30), das für die immunhistochemische Analyse verwendet wurde. SE: Seminom; GCNIS: Germ Cell Neoplasia in Situ; HYP/SCO: Hypospermatogenese/Sertoli-Cell-Only-Phänotyp; Fib/TS: Fibrose/Tubulus Schatten.

Histopathologie	Tu (n=23)	Tu-nah (n=25)	Tu-fern (n=20)
SE	9	0	0
SE+GCNIS	7	2	1
SE+HYP/SCO	0	0	0
SE+GCNIS+HYP/SCO	0	2	0
GCNIS+HYP/SCO	0	8	7
GCNIS	0	4	3
HYP/SCO	0	5	7
Fib/TS	7	4	2

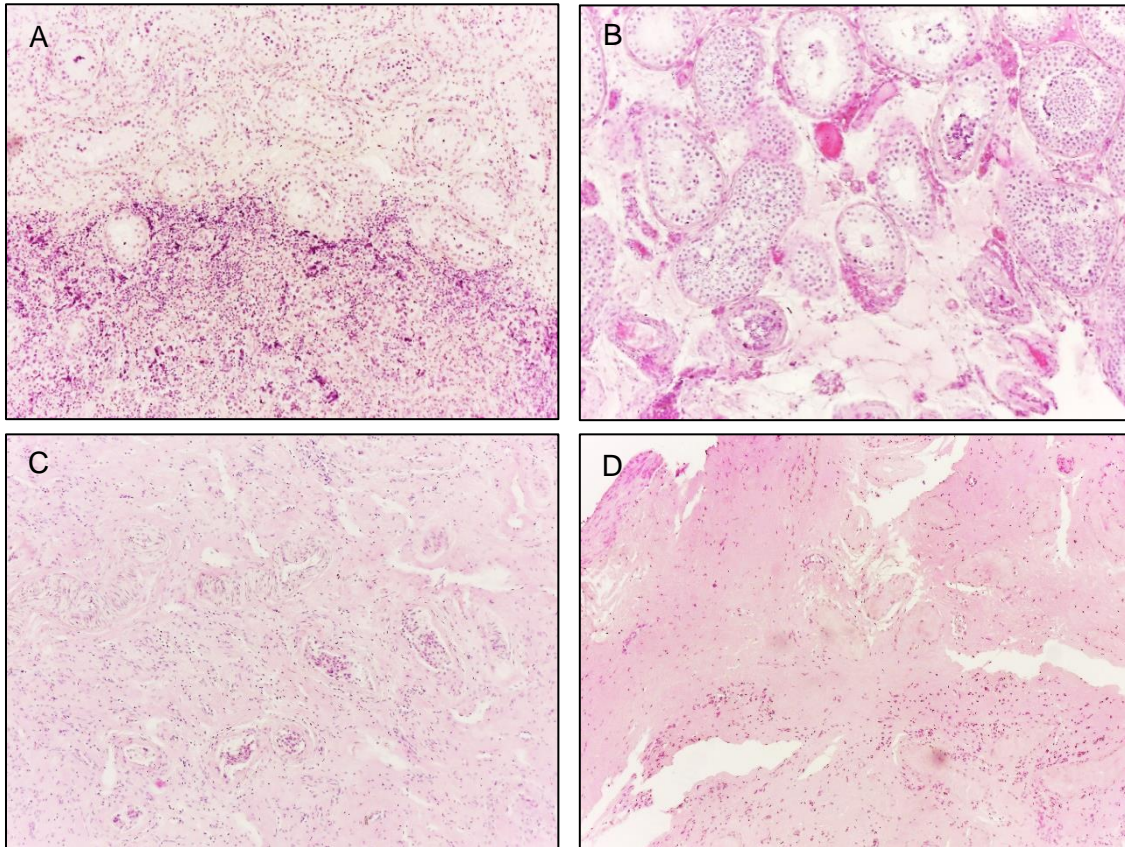


Abbildung 15: Häufigste Kombinationen histopathologischer Befunde innerhalb des Seminom-Patientenkollektivs (n=30), das für die immunhistochemische Analyse verwendet wurde. A: SE+GCNIS; B: GCNIS+HYP/SCO; C: HYP/SCO; D: Fib/TS. HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung.

#### 4.2.2 CD3-positive Immunzellinfiltration (T-Zellen)

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien zeigte einen abnehmenden Trend CD3-positiver Zellen vom Tumorgewebe zum tumorfernen Gewebe. Dabei lagen signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen disseminiert-vorliegender positiver Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 3,75), im tumorfernen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 1,5) und in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 1,5) vor. Neben der hauptsächlich disseminierten Infiltration waren häufig multifokale und vereinzelt fokale Infiltrate zu beobachten.



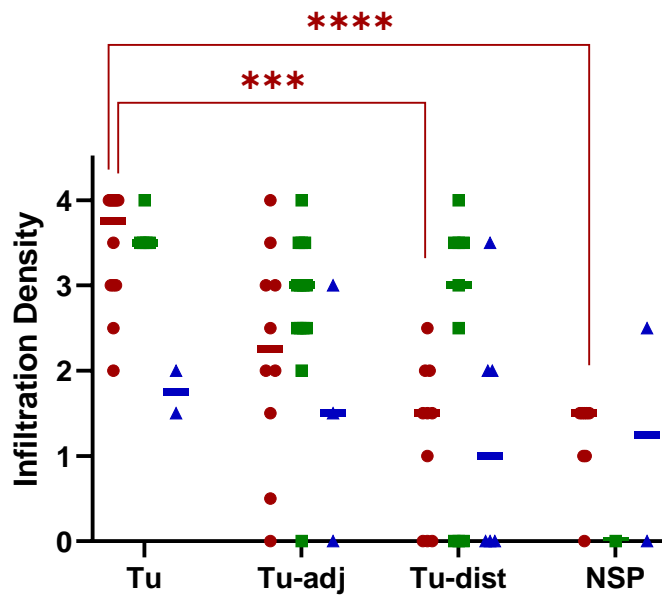


Abbildung 16: CD3-positive Immunezellinfiltration in Tumor-(Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten. NSP: Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (siehe Material und Methoden). Rot: Disseminierte Distribution, grün: Multifokale Distribution, Blau: Fokale Distribution. Zur statistischen Analyse wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis- und zum Gruppenvergleich ein Dunn's-multiple-comparisons-Test verwendet. Signifikante Unterschiede wurden mit Asterisken markiert. P ( $\leq 0,0001$ ): \*\*\*\*; P ( $\leq 0,001$ ): \*\*\*

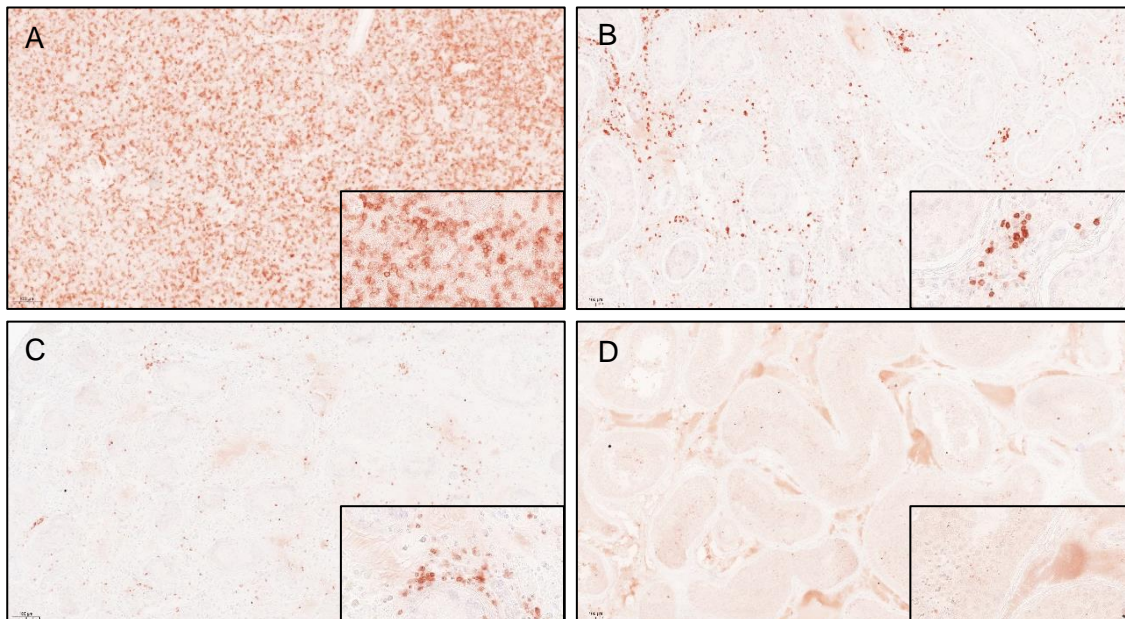


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD3-Antikörper. Zu erkennen ist das charakteristische, dichte, disseminierte Verteilungsmuster CD3-positiver Zellen im Tumorgewebe (A). Spärliche, disseminierte Infiltration im tumornahen Gewebe (B) und vereinzelte, CD3-positive Zellen im tumorfernen Gewebe (C). In Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (D) sind in der Regel interstitiell keine CD3-positiven Zellen anzutreffen. 10- und 63-fache Vergrößerung.

#### 4.2.3 CD20cy-positive Immunezellinfiltration (B-Zellen)

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien zeigte einen abnehmenden Trend CD20cy-positiver Zellen vom Tumorgewebe zum tumorfernen Gewebe. Dabei lagen signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen disseminiert-positiver Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 2), im tumorfernen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 0) und in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 0) vor. Neben der disseminierten Infiltration waren in Tumorproben nahezu gleichhäufig multifokale Infiltrationen zu beobachten. Auch in dieser Kategorie lagen signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen positiver Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 2,75), im tumorfernen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 0) und in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 0) vor. Fokale Infiltrate waren nur vereinzelt zu beobachten.

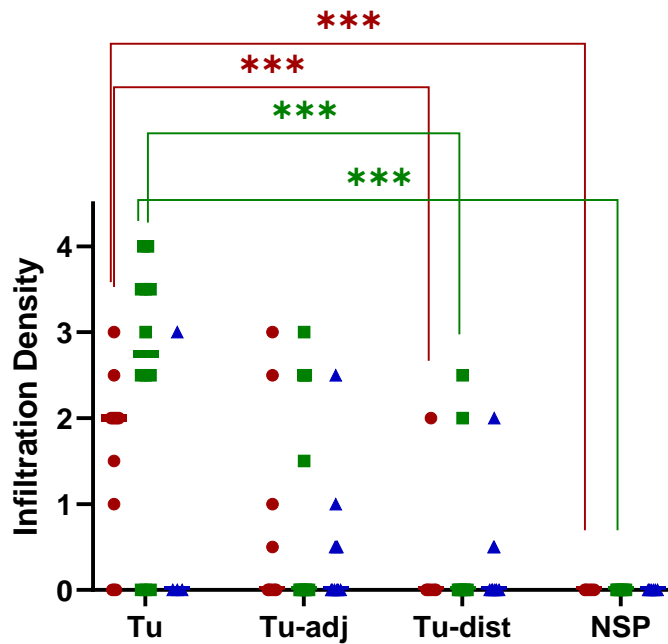


Abbildung 18: CD20cy-positive Immunzellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten. NSP: Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (siehe Material und Methoden). Rot: Disseminierte Distribution, grün: Multifokale Distribution, Blau: Fokale Distribution. Zur statistischen Analyse wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis- und zum Gruppenvergleich ein Dunn's-multiple-comparisons-Test verwendet. Signifikante Unterschiede wurden mit Asterisken markiert. P ( $\leq 0,001$ ): \*\*\*

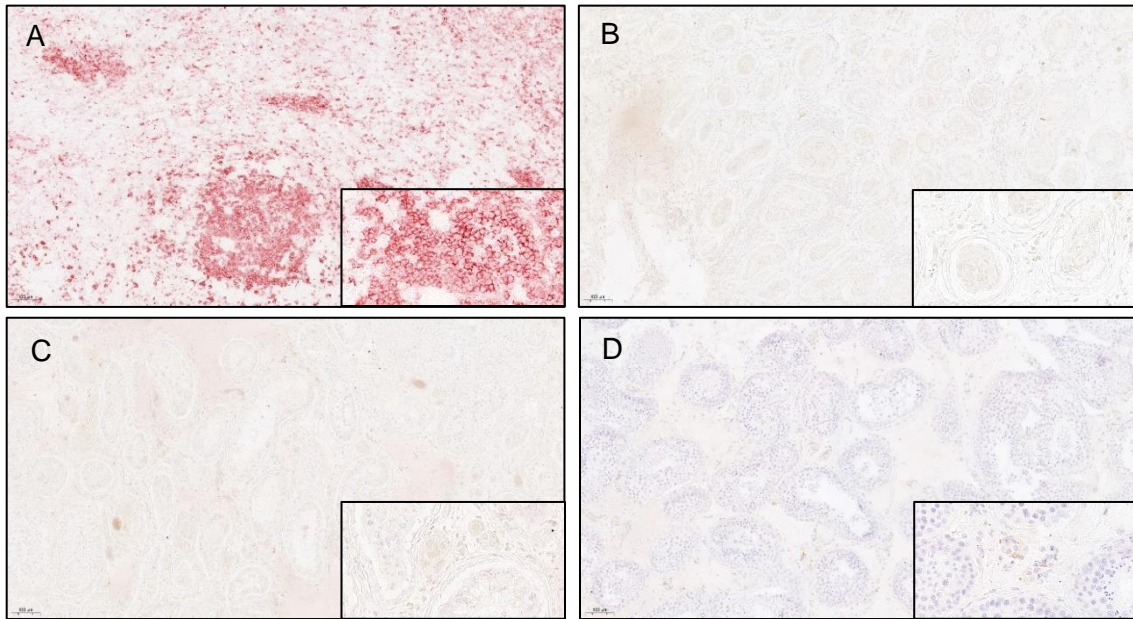


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD20cy-Antikörper. Zu erkennen ist das charakteristische multifokale, dichte Verteilungsmuster CD20cy-positiver Zellen in follikelähnlichen Strukturen im Tumorgewebe (A). Im tumornahen (B) und -fernen Gewebe (C) sowie im Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (D) sind keine CD20cy-positiven Immunzellinfiltrate zu beobachten. 10- und 63-fache Vergrößerung.

#### 4.2.4 CD68-positive Immunzellinfiltration (Makrophagen)

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien zeigte einen abnehmenden Trend CD68-positiver Zellen vom Tumorgewebe zum tumorfernen Gewebe. Dabei lagen signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen der disseminiert-vorliegenden positiven Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 3), im tumornahen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 2,5) und im tumorfernen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 2) vor. Neben der disseminierten Infiltration waren vereinzelt multifokale und fokale Infiltrationsmuster zu beobachten. Bemerkenswert ist die ausschließlich disseminiert vorliegende CD68-positive Infiltration in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 2,75), welche über der medianen Infiltrationsdichte des tumorfernen Gewebes liegt.

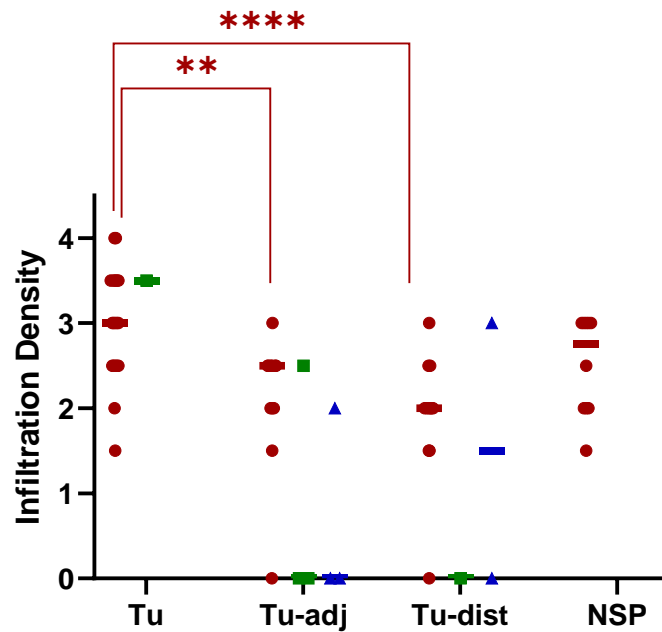


Abbildung 20: CD68-positive Immunzellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten. NSP: Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (siehe Material und Methoden). Rot: Disseminierte Distribution, grün: Multifokale Distribution, Blau: Fokale Distribution. Zur statistischen Analyse wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis- und zum Gruppenvergleich ein Dunn's-multiple-comparisons-Test verwendet. Signifikante Unterschiede wurden mit Asterisken markiert.  $P (\leq 0,0001)$ : \*\*\*\*;  $P (\leq 0,01)$ : \*\*

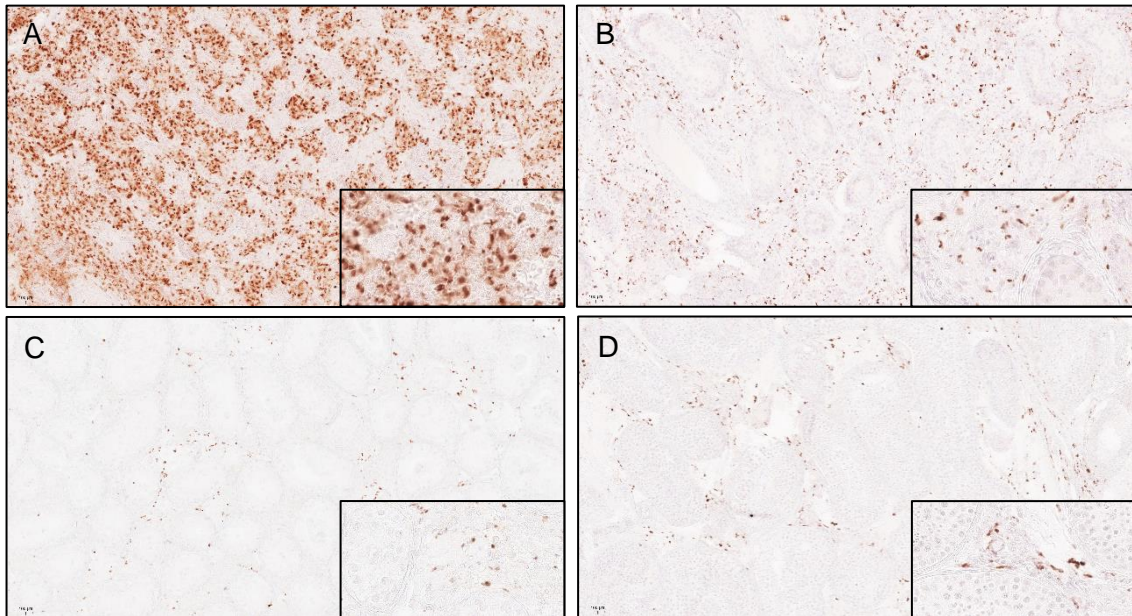


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD68-Antikörper. Zu erkennen ist das charakteristische disseminierte Verteilungsmuster CD68-positiver Zellen mit abnehmender Infiltrationsdichte vom Tumor (A)-, tumornahen (B), bis ins tumorferne (C) Gewebe. Auch im Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (D) sind physiologisch residente CD68-positive Zellen anzutreffen. 10- und 63-fache Vergrößerung.

#### 4.2.5 CD11c-positive Immuzellinfiltration (dendritische Zellen)

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien zeigte einen abnehmenden Trend CD11c-positiver Zellen vom Tumorgewebe zum tumorfernen Gewebe. Dabei lagen signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen der disseminiert-vorliegenden positiven Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 3), im tumorfernen Gewebe (mediane Infiltrationsdichte 1) und in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 0) vor. Neben der disseminierten Infiltration waren häufig auch multifokale Infiltrationsmuster zu beobachten. Hierbei gab es signifikante Unterschiede zwischen dem Vorkommen der positiven Zellen im Tumorgewebe (mediane Infiltrationsdichte 3,5), im tumorfernen Gewebe (mediane infiltrationsdichte 2) und in Biopsien der Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (mediane Infiltrationsdichte 0). Fokale Infiltrationen waren vereinzelt zu beobachten.

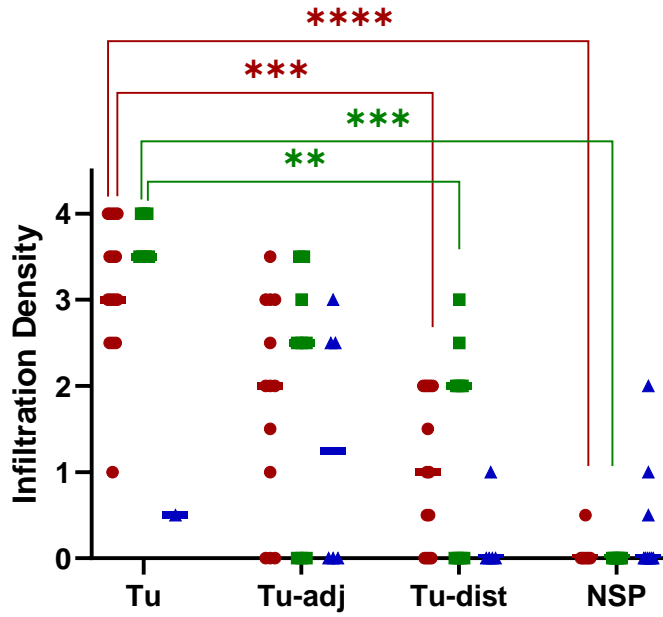


Abbildung 22: CD11c-positive Immunezellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten. NSP: Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (siehe Material und Methoden). Rot: Disseminierte Distribution, Grün: Multifokale Distribution, Blau: Fokale Distribution. Zur statistischen Analyse wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis- und zum Gruppenvergleich ein Dunn's-multiple-comparisons-Test verwendet. Signifikante Unterschiede wurden mit Asterisken markiert. P ( $\leq 0,0001$ ):\*\*\*\*; P ( $\leq 0,001$ ):\*\*\*; P ( $\leq 0,01$ ):\*\*

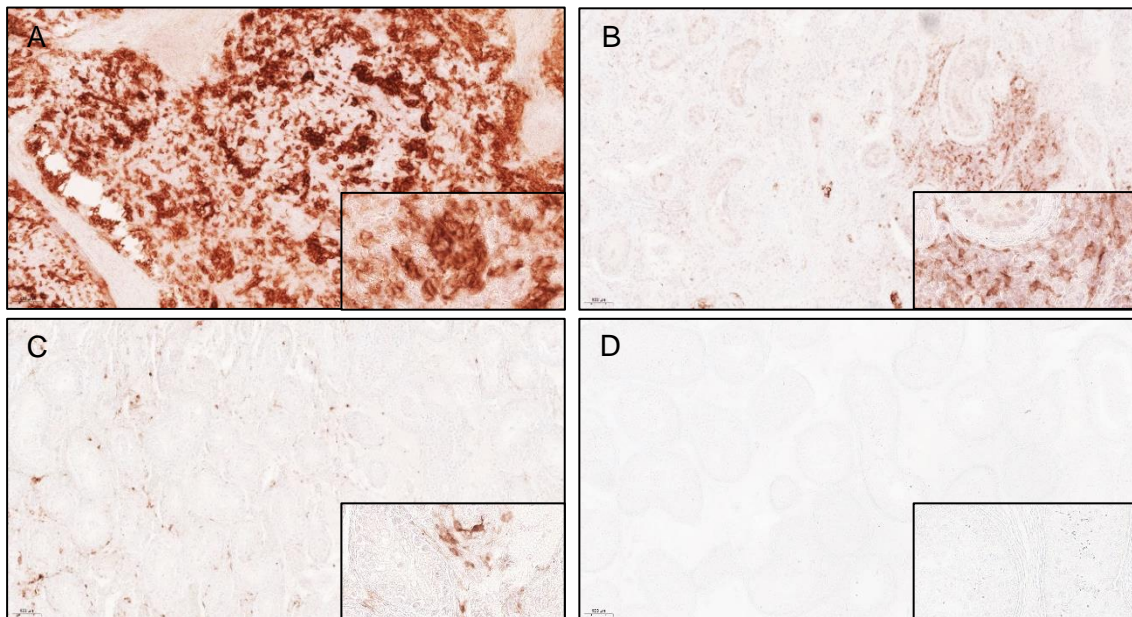


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD11c-Antikörper. Zu erkennen ist die größtenteils dichte, disseminierte Infiltration des Tumorgewebes (A), die häufig multifokale, spärliche Infiltration des tumornahen Gewebes (B), die vereinzelt, CD11c-positiven Zellen im tumorfernen Gewebe (C) und die nicht vorhandene Infiltration im Hodengewebe mit normaler Spermatogenese (D). 10- und 63-fache Vergrößerung.

#### **4.2.6 Immunhistochemische Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom - Zusammenfassung**

Die zusammenfassende Heatmap der CD3-, CD20cy-, CD68- und CD11c-positiven Zellen zeigte kohärent zu der graphischen Einzelauswertung ein homogenes Verteilungsmuster innerhalb der Seminom-Kohorte mit einem abnehmenden Infiltrationstrend vom Tumor- ins tumorferne Gewebe. Auffällig im Vergleich zu den übrigen hier verwendeten immunhistochemischen Markern war die geringe Infiltrationsdichte CD20cy-positiver Zellen im tumornahen und -fernen Gewebe. Dichte Infiltration war ausschließlich im Tumorgewebe zu erkennen.



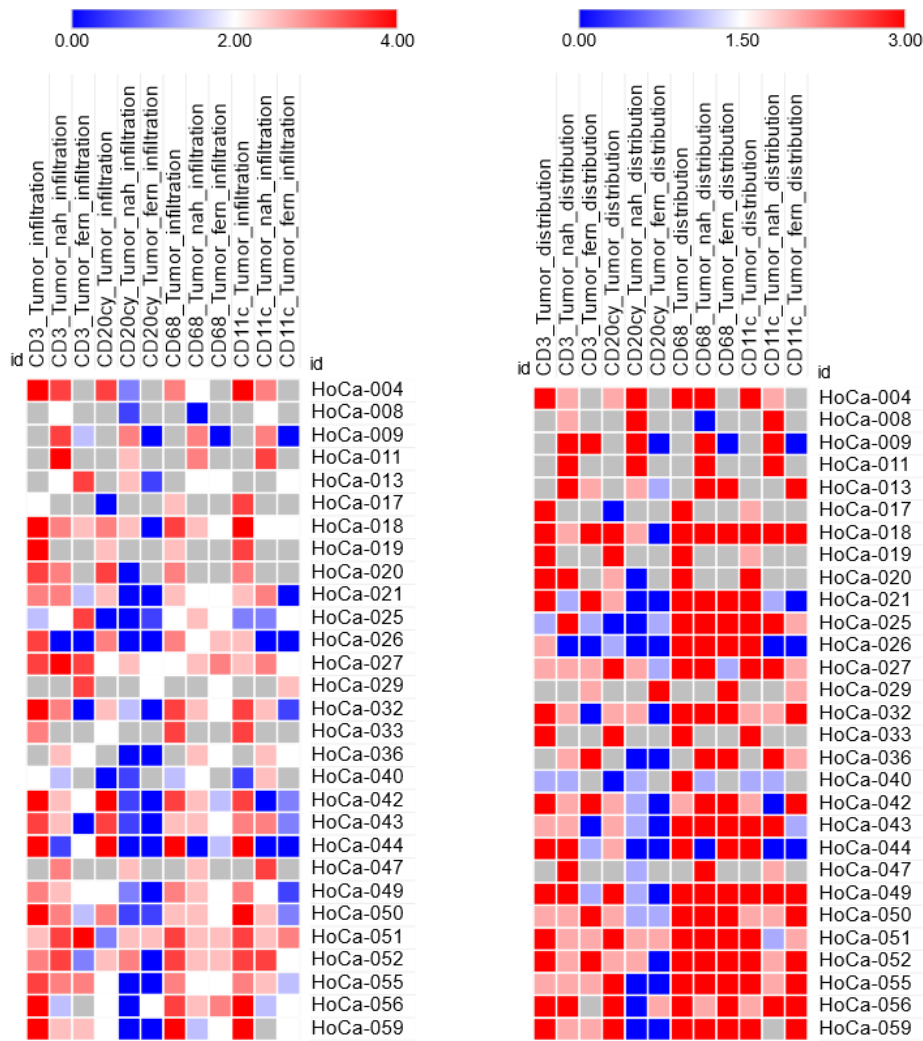


Abbildung 24: Heatmap CD3-, CD20cy-, CD68- und CD11c-positiver Zellen bezogen auf Infiltrationsdichte (A) und -distribution (B) in Seminom-Patienten (n=30). Die x-Achse zeigt farbcodiert in A) die Infiltrationsdichte und in B) die Infiltrationsdistribution in den Biopsielokalisationen Tumor, Tumor-nah und Tumor-fern. Die semiquantitativ-bestimmte Infiltrationsdichte von 0 bis 4 ist dabei von blau bis rot codiert. Die Distributionskategorien in B) wie folgt: Keine (dunkelblau), fokale (hellblau), multifokale (hellrot) und disseminierte (dunkelrot) Infiltration. Nicht vorhandene Biopsielokalisationen sind grau markiert. Entlang der y-Achse sind die einzelnen Patienten aufgelistet.

#### 4.2.7 Korrelationsanalyse der Tumormarker, Hormone und weiteren klinischen Parametern von Seminom-Patienten

Die Analyse zeigte Korrelationen mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  bei der Konzentration von LH/FSH, der Konzentration von Testosteron/freiem Testosteron und der Konzentration von AFP/hCG. Details und Korrelationen mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  siehe Tabelle 19 und Abbildung 25.

Tabelle 19: Signifikante Korrelationen der erhobenen Daten zu Hormonen, Tumormarkern und weiteren klinischen Parametern der Patientengruppe „reines Seminom“. Kategorien, die nicht metrisch skaliert, normalverteilt oder in einem linearen Zusammenhang miteinander standen, wurden sowohl mit dem Kendall-Tau-b-, als auch mit dem Spearman-Rho-Test analysiert. \*\*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant. \*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Korrelationspaar	Test	Korrelationskoeffizient	Signifikanzlevel (2-seitig)	Anzahl (N)
LH + FSH	Pearson	0,784**	0,000	21
Testosteron (gesamt) + Testosteron (frei)	Kendall-Tau-b	0,550**	0,003	16
	Spearman-Rho	0,679**	0,004	16
AFP + hCG	Kendall-Tau-b	0,427**	0,003	32
	Spearman-Rho	0,512**	0,003	32
Hodenvolumen (kontralaterale Seite) + Testosteron (gesamt)	Kendall-Tau-b	0,407*	0,019	18
	Spearman-Rho	0,504*	0,033	18
Hodenvolumen (Tumorseite) + SHBG	Spearman-Rho	0,555*	0,049	13
Testosteron (frei) + Ejakulatvolumen	Kendall-Tau-b	0,551*	0,004	9
Testosteron (gesamt) + SHBG	Spearman-Rho	0,517*	0,040	16
FSH +SHBG	Spearman-Rho	0,518*	0,048	15

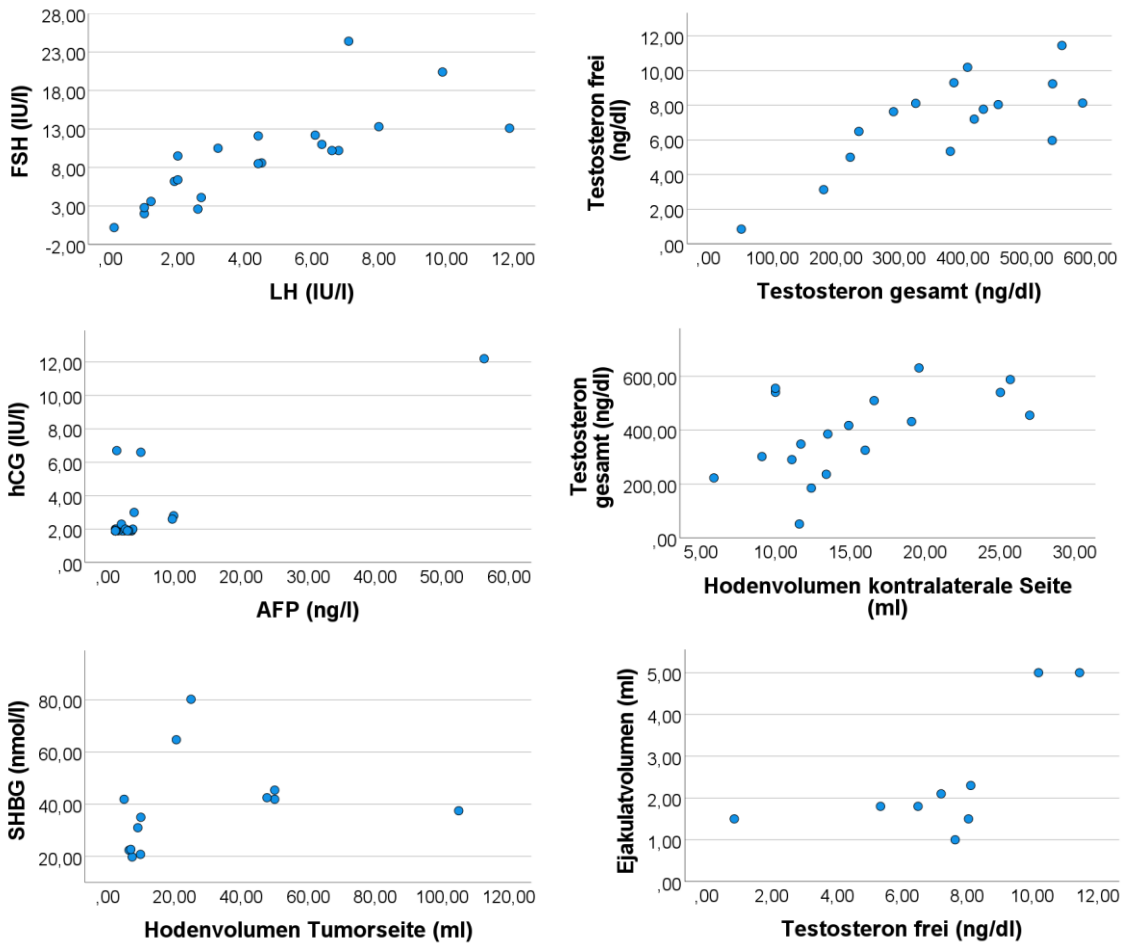


Abbildung 25: Streudiagramme der signifikanten Korrelationspaare von klinischen Parametern, Hormonen und Tumormarkern der Patientengruppe „reines Seminom“.

#### 4.2.8 Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltrationsdichte mit Tumormarker- und Hormonstatus von Seminom-Patienten

Die Analyse zeigte Korrelationen mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  bei der Infiltrationsdichte von CD3/CD20cy, CD3/CD11c und CD68/CD11c. Korrelationen mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  lagen für die Infiltrationsdichte bei den Variablenpaaren CD3/hCG, CD3/Spermienkonzentration, CD3/Hodenvolumen (gesunde Seite) und CD20cy/hCG vor. Details siehe Tabelle 18 und Abbildungen 25 und 26.

Tabelle 20: Signifikante Korrelationen der erhobenen Daten zu Immunzellinfiltration, Hormonen, Tumormarkern und weiteren klinischen Parametern der Patientengruppe „reines Seminom“. Kategorien, die nicht metrisch skaliert, normalverteilt oder in einem linearen Zusammenhang miteinander standen, wurden sowohl mit dem Kendall-Tau-b-, als auch mit dem Spearman-Rho-Test analysiert. \*\*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant. \*: Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Korrelationspaar	Test	Korrelationskoeffizient	Signifikanzlevel (2-seitig)	Anzahl (N)
CD3+CD20cy	Kendall-Tau-b	0,604**	0,000	21
	Spearman-Rho	0,694**	0,000	21
CD3 + CD11c	Kendall-Tau-b	0,493**	0,005	23
	Spearman-Rho	0,603**	0,002	23
CD68 + CD11c	Kendall-Tau-b	0,612**	0,000	23
	Spearman-Rho	0,683**	0,000	23
CD3 + hCG	Kendall-Tau-b	-0,469*	0,011	21
	Spearman-Rho	-0,543**	0,007	21
CD3 + Spermienkonzentration	Kendall-Tau-b	0,460*	0,043	13
CD3 + Hodenvolumen (gesunde Seite)	Kendall-Tau-b	0,397*	0,021	21
	Spearman-Rho	0,512*	0,018	21
CD20cy + hCG	Kendall-Tau-b	-0,366*	0,039	23
	Spearman-Rho	-0,443*	0,034	23

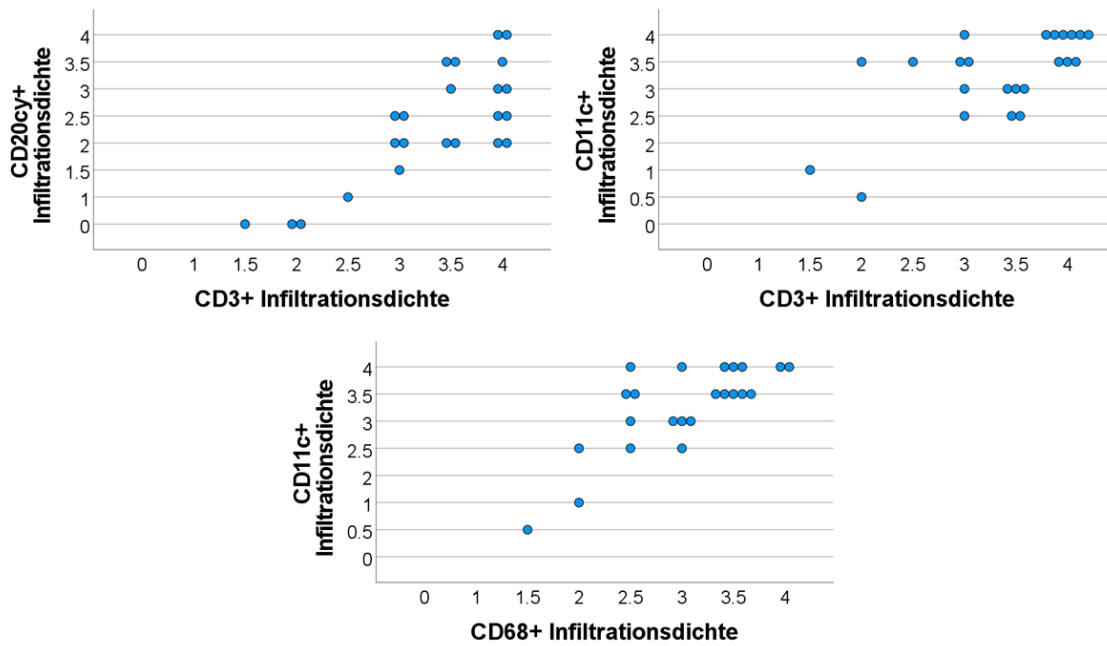


Abbildung 26: Gestapelte Streudiagramme für signifikante Korrelationspaare der Immunzellinfiltrationsdichte in Tumorbiopsien (CD3+, CD20cy+, CD68+, CD11c+) der Patientengruppe „reines Seminom“. Die x- und y-Achse zeigt die jeweilige Infiltrationsdichte (0=absent; 1=single; 2=scattered; 3=intermediate; 4=dense).

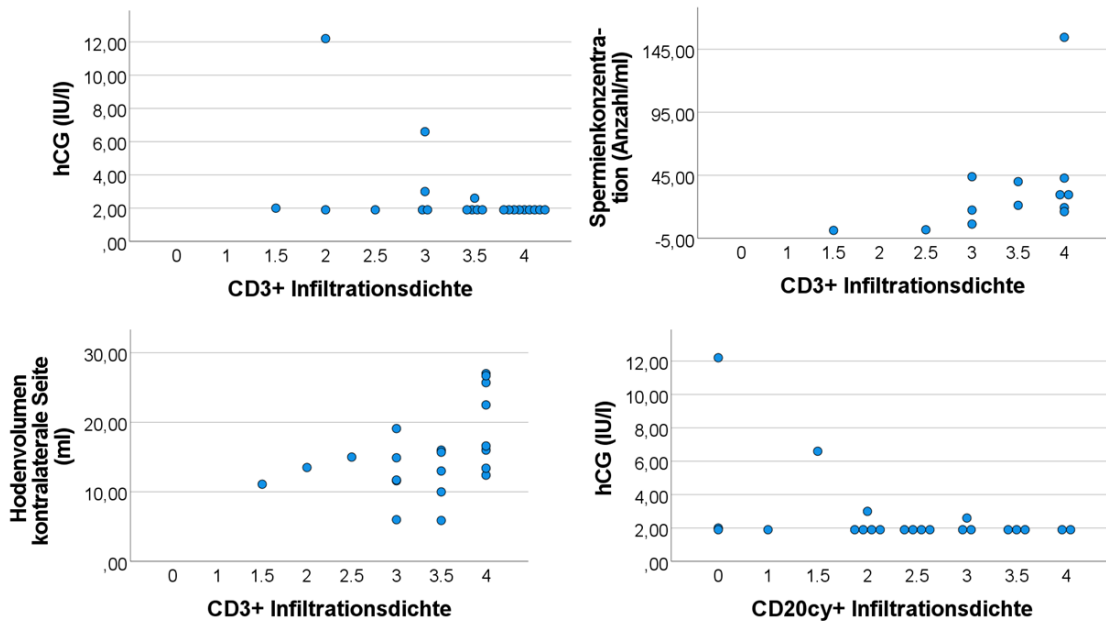


Abbildung 27: Gestapelte Streudiagramme für signifikante Korrelationspaare der Immunzellinfiltrationsdichte in Tumorbiopsien der Patientengruppe „reines Seminom“ (CD3+, CD20cy+, CD68+, CD11c+) mit klinischen Parametern, Tumormarkern und Hormonstatus der Patienten. Die x- Achse zeigt die jeweilige Infiltrationsdichte (0=absent; 1=single; 2=scattered; 3=intermediate; 4=dense).

### 4.3 Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom

#### 4.3.1 Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ )

Die relative Genexpression von *ISG20* (auch bekannt als CD25, ein Membranprotein regulatorischer T-Zellen) und *FOXP3* (ein spezifischer Transkriptionsfaktor regulatorischer T-Zellen) in Hodenbiopsien von Seminompatienten (n=3) zeigte eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Patienten, tendenziell mit einer Abnahme von Tumor (Tu) nach Tumor-fern (Tu-dist). Die niedrigste relative Genexpression war in Kontrollproben vorzufinden.

Das Transkript-Level des von  $T_{reg}$ -Zellen sezernierten Zytokins *IL-10* zeigte ebenfalls eine vom Tumor- ins tumorferne Gewebe abnehmende Tendenz. *TGF- $\beta$ 1* wurde im Vergleich zu den übrigen Markern für  $T_{reg}$ -Zellen am höchsten im tumornahen Gewebe exprimiert. Auch hier war die niedrigste Expression in Kontrollproben vorzufinden.

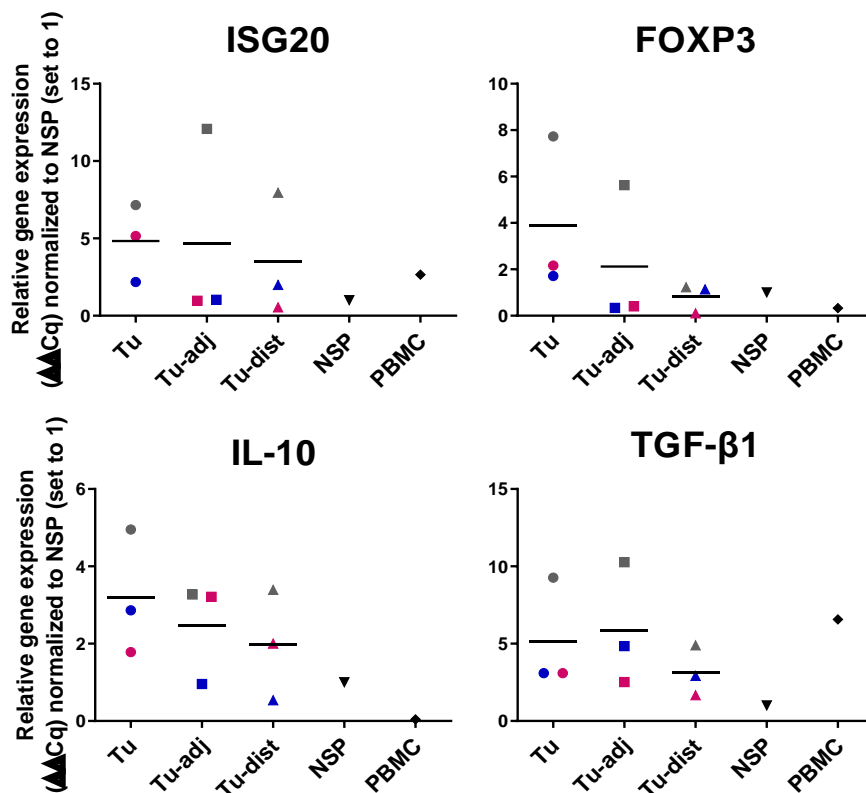


Abbildung 28: Expressionsprofil von Zellmarkern und Zytokinen regulatorischer T-Zellen (*ISG20*, *FOXP3*, *IL-10*, *TGF- $\beta$ 1*) im Seminom (n=3). Die Gen-Expression wurde durch die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode mithilfe der Referenzgene *RPL19* und *RPS27* berechnet und auf eine Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (n=3) normalisiert. Tu: Tumor; Tu-adj: Tumornah; Tu-dist: Tumorfern; NSP: Normale Spermatogenese; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells.

### 4.3.2 T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen

Die qRT-PCR-Analyse zeigte in Hodenbiopsien von Seminom-Patienten (n=3) die höchste relative Genexpression von *CD4* im tumornahen Gewebe, mit einer hohen Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Die niedrigste relative Genexpression von *CD4* war in der Kontrollgruppe vorzufinden. *ICOS* zeigte eine abnehmende Tendenz des Transkript-Levels vom Tumor- ins tumorferne Gewebe mit einer hohen Patientenvariabilität. Auch hier war die niedrigste Expression in der Kontrollgruppe vorzufinden. *CD8a* zeigte eine abnehmende Tendenz des Transkript-Levels vom Tumor- ins tumorferne Gewebe mit einer hohen Patientenvariabilität. Die niedrigste Expression war in der Kontrollgruppe vorzufinden.

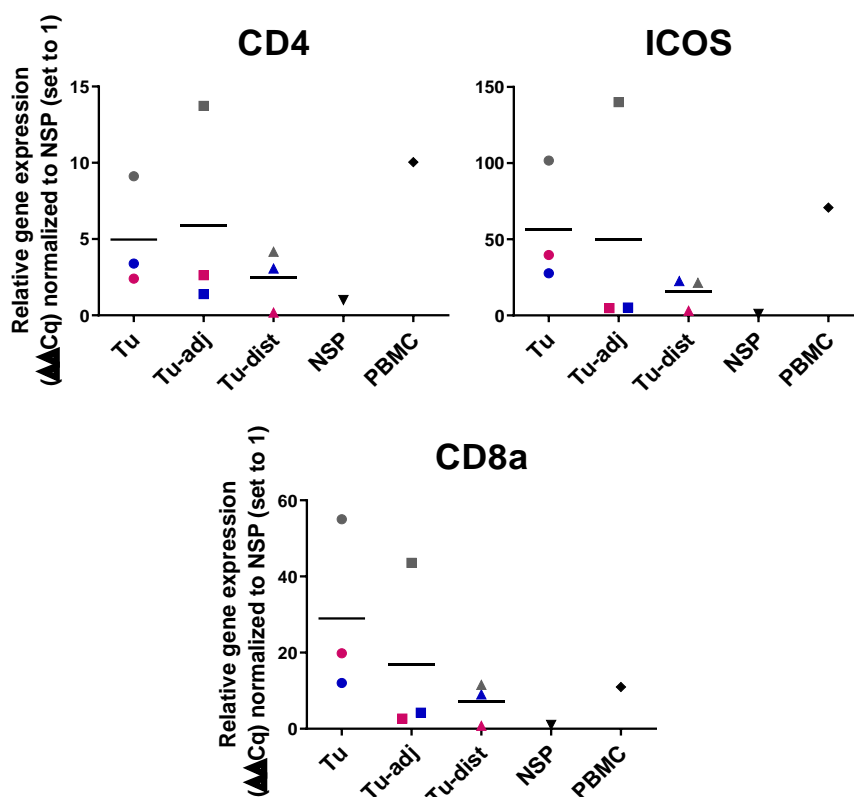


Abbildung 29: Expressionsprofil von Zellmarkern für T-Helfer-Zellen (*CD4*, *ICOS*) und zytotoxische T-Zellen (*CD8a*) im Seminom (n=3). Die Gen-Expression wurde durch die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode mithilfe der Referenzgene *RPL19* und *RPS27* berechnet und auf eine Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (n=3) normalisiert. Tu: Tumor; Tu-adj: Tumornah; Tu-dist: Tumorfern; NSP: Normale Spermatogenese; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells.



### 4.3.3 B-Zellen

Die relative Expression des für *IL-6*-codierenden Gens zeigte eine vom Tumor- ins tumorferne Gewebe abnehmende Tendenz mit einer hohen Patientenvariabilität. Die niedrigste Expression war in Kontrollproben vorzufinden. Die relative Expression des *CXCL-13*-Gens, das für ein B-Zellen rekrutierendes Chemokin codiert, war in tumornahen Proben am höchsten, mit einer hohen Patientenvariabilität. In den Kontrollproben war die Expression am geringsten.

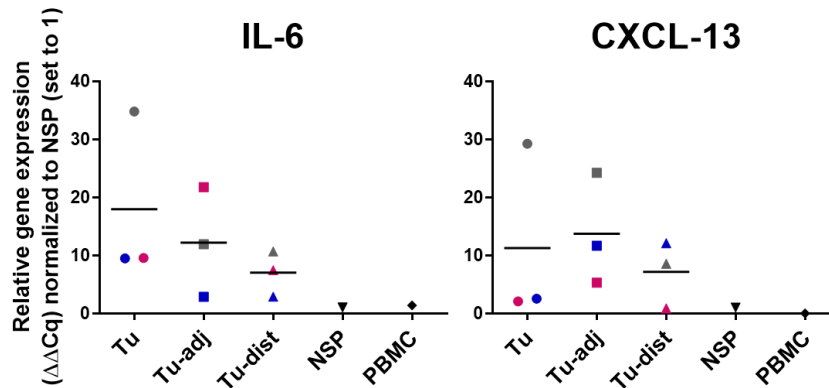


Abbildung 30: Expressionsprofil von Zytokinen (*IL-6*) und Chemokinen (*CXCL-13*) für B-Zellen im Seminom (n=3). Die Gen-Expression wurde durch die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode mithilfe der Referenzgene *RPL19* und *RPS27* berechnet und auf eine Kontrollgruppe mit normaler Spermatogenese (n=3) normalisiert. Tu: Tumor; Tu-adj: Tumornah; Tu-dist: Tumorfern; NSP: Normale Spermatogenese; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Deskriptive Statistik**

#### **5.1.1 Altersverteilung**

Die Daten aus der Tumorkohorte decken sich mit den bisherigen epidemiologischen Erkenntnissen, die beim Seminom einen Altersgipfel in der 4. Lebensdekade und bei Nichtseminomen, von denen die Patientengruppe „aKZT+MT“ eine Teilmenge ist, einen niedrigeren Altersgipfel in der 3. Lebensdekade zeigt (Albers et al. 2016).

#### **5.1.2 Tumorstaging**

Die Ergebnisse aus der Analyse der Tumorkohorte decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen über das Metastasierungsverhalten von Seminomen und Nicht-Seminomen, die einen langsameren Tumorprogress von Seminomen annehmen (Oldenburg et al. 2022). Die Gruppe „aKZT+MT“ wies häufiger Fernmetastasen und somit auch fortgeschrittenere Tumorstadien auf.

#### **5.1.3 Risikofaktoren**

In der Patientenkohorte wurden als Risikofaktoren für testikuläre Keimzelltumoren eine positive Familienanamnese und ein früherer Maldescensus testis erfasst. Eine positive Familienanamnese für Hodentumoren erhöht die Wahrscheinlichkeit, selbst an einem testikulären Keimzelltumor zu erkranken, um das 8-fache, sofern bereits ein Bruder in der Vergangenheit erkrankt ist (Richiardi et al. 2007). Ein Maldescensus testis erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit ebenfalls. Entscheidend hierbei ist eine leitliniengerechte, frühzeitige operative Korrektur. Falls diese nicht durchgeführt wird, steigt das Risiko im Lebensverlauf, an einem testikulären Keimzelltumor zu erkranken, um das 32-fache (Mathers et al. 2009).

Die Analyse der Tumorkohorte zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sowohl hinsichtlich der Häufigkeit eines Maldescensus testis in der Eigenanamnese, als auch einer positiven Familienanamnese für Hodentumoren. Eine Keyword-Recherche der Begriffe „Maldescensus testis“, „Seminoma“ und „Non-Seminoma“ auf der Internetseite [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) zeigte keine bisherigen komparativen Studien, die die Erkrankungswahrscheinlichkeit von Seminomen und Nicht-Seminomen nach einem Maldescensus testis miteinander verglichen.

Neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Risikofaktoren existieren weitere, die perspektivisch für die Datenerhebung in Betracht gezogen werden sollten. Näheres dazu

siehe Abschnitt 1.2.3 „Ätiologie der TGCT“. Beispielsweise hätten die Faktoren „Frühgeburtlichkeit“ und „geringes Geburtsgewicht“ erfasst werden können.

Molekularbiologische Prädispositionen wurden bis dato in der vorliegenden Tumorkohorte nicht erfasst. Dies könnte perspektivisch aufgrund des vorliegenden kryokonservierten Gewebematerials erfolgen. Da bei der Entstehung von testikulären Keimzelltumoren multiple Genloci z.B. aus den Pathways der Geschlechtsdeterminierung, der Keimzellproliferation und der DNA-Reparatur (*CHEK2*) involviert sind, bestünden in unserer Kohorte diesbezüglich zahlreiche Untersuchungsoptionen (Almstrup et al. 2020; Oldenburg et al. 2022).

Für die Untersuchung der Polyploidisierung und Amplifizierung des Chromosoms 12, die in der Literatur vielfach in testikulären Keimzelltumoren beschrieben wurde, hätten zusätzliche Methoden, wie zum Beispiel die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, etabliert werden müssen (Winter und Albers 2011).

#### **5.1.4 Hodenvolumetrie und Spermiogramm**

Die sonographische Hodenvolumetrie wurde von erfahrenen Ärzten und Ärztinnen in der Ambulanz der urologischen Abteilung des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Die Sonographie ist als Messinstrument untersucherabhängig und hängt vom Erfahrungslevel der untersuchenden Ärzte und Ärztinnen ab. In vergangenen Studien wurde auf eine signifikante Varianz der gemessenen Hodenvolumina sowohl zwischen unterschiedlichen urologischen Abteilungen als auch zwischen den angehörigen Ärztinnen und Ärzten derselben urologischen Abteilung hingewiesen (Sorokin et al. 2015). Andererseits konnten Standards und Referenzwerte für die urologisch-andrologische Diagnostik etabliert werden (Pilatz et al. 2013; Lotti und Maggi 2015). Auf eine gleichmäßige Verteilung der Patienten auf die Untersucher/-innen wurde verzichtet, da es sich bei der Hodenvolumetrie um eine vergleichsweise unaufwändige und einfache sonographische Messung handelt.

Hinsichtlich der Hodenvolumina auf der Tumorseite zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen, wobei die Patienten der Gruppe „aKZT+MT“ im Trend ein größeres Volumen aufwiesen. Dies könnte mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium und einem schnelleren Tumorprogress bei klinischer Erstpräsentation von Nicht-Seminomen im Vergleich zu Seminomen zusammenhängen (Oldenburg et al. 2022).

Die Spermiogramme wurden nach den im Zeitraum der vorliegenden Studie gültigen WHO-Richtlinien im andrologischen Labor der urologischen Klinik des

Universitätsklinikums Gießen durchgeführt (World Health Organization 2010). Es zeigte sich eine signifikant höhere Spermienkonzentration in der Patientengruppe „rSE“ im Vergleich zur Gruppe „aKZT+MT“. Die höhere Spermienkonzentration von Seminom-Patienten im Vergleich zu Nicht-Seminom-Patienten wurde bereits in Studien beobachtet (Botchan et al. 1997; Xavier et al. 2021). Die Tumorentität scheint daher eine Rolle im Ausmaß der Spermatogenese-Einschränkung zu spielen. Eine Hypothese, die dieses Phänomen zu erklären versucht, ist, dass die Tumorzellen des Seminoms den physiologischen Keimzellen ähnlicher sind als die Zellen anderer nicht-seminomatöser Keimzelltumore (z.B. Embryonalzellkarzinom, prä-/postpubertaler Dottersacktumor, Chorionkarzinom und prä/postpubertales Teratom) und die Spermatogenese deshalb weniger stark einschränken (Botchan et al. 1997). Da die Vergleichsgruppe „aKZT+MT“ allerdings nur Keimzelltumore beinhaltet, die ebenfalls aus GCNIS hervorgehen, ist diese Hypothese in unserer Studienpopulation anzuzweifeln. Die Entschlüsselung weiterer Pathomechanismen ist vonnöten.

### **5.1.5 Chemotherapie und Rezidive**

Analog zum Abschnitt „Tumorstaging“ lagen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen vor, wobei die Patientengruppe „aKZT+MT“ signifikant häufiger Chemotherapien aufgrund des durchschnittlich fortgeschrittenen Tumorstadiums erhielt.

Außerdem zeigte sich in der Gruppe „aKZT+MT“ eine höhere Rezidivrate, wenn auch nicht signifikant.

Beide Aspekte decken sich mit bisherigen Studienergebnissen, die von einem schnelleren Tumorprogress und höheren Rezidivraten der Nicht-Seminome ausgehen (Albers et al. 2016; Oldenburg et al. 2022). Dabei zu beachten ist, dass die höhere Rezidivrate von Nicht-Seminomen in anderen prädiktiven Faktoren als die der Seminome begründet zu sein scheint. Seminome des UICC-Stadiums 1 neigen häufiger zu Rezidiven bei einer Tumor-Infiltration des Rete testis und einer Tumorgroße von > 4 cm (Aparicio et al. 2014; Boormans et al. 2018). Nicht-Seminome des UICC-Stadiums 1 neigen hingegen bei einer Tumordinfiltration von Lymph- und Blutgefäßen häufiger zu Rezidiven, was insbesondere bei Embryonalzellkarzinomen beobachtet wird (Yilmaz et al. 2013; Oldenburg et al. 2022).

### 5.1.6 Tumormarker und Hormonstatus

In der Patientenkohorte wurden die Tumormarker LDH, AFP und hCG erhoben. Die aktuelle europäische Leitlinie empfiehlt eine Bestimmung der Tumormarker vor und frühestens fünf bis sieben Tage nach Orchiektomie aufgrund der Serum-Halbwertszeiten von AFP und hCG (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023).

LDH ist ein Enzym, das in nahezu allen menschlichen Zellen exprimiert wird. Es ist unspezifisch und wird als laborchemisches Korrelat der Tumormasse und als prognostisch-relevanter Marker im Verlauf der Tumorthherapie bestimmt (Jurisic et al. 2015).

AFP ist ein Protein, das als Verlaufspareter für hepatozelluläre Karzinome, Dottersacktumore, Embryonalzell- und Chorionkarzinome bestimmt wird. In reinen Seminomen ist es nicht erhöht. Außerdem findet es Verwendung in der Pränataldiagnostik, in der es z.B. bei klinischer Fragestellung von Neuralrohrdefekten und Trisomie-21 analysiert wird (Canick et al. 2003; Passek et al. 2018; Chen et al. 2020).

hCG ist ein Hormon, das insbesondere während der Schwangerschaft von Synzytiotrophoblasten gebildet wird (Panwar et al. 2019). Es kann von ebenfalls von Seminomen, Embryonalzell- und Chorionkarzinomen ausgeschüttet werden und dient als Verlaufspareter (Albers et al. 2016; Patrikidou et al. 2023). Im Seminom korrelieren hohe LDH- und hCG-Werte mit einer schlechten Prognose (Seidel et al. 2020).

AFP war signifikant in der Gruppe „aKZT+MT“ erhöht. Dies war zu erwarten, da AFP von Seminomen nicht exprimiert wird. Die Gruppe „aKZT+MT“ enthält reine Embryonalzellkarzinome und Mischtumore mit Embryonalzellkarzinom-Komponente, die für die erhöhten AFP-Werte verantwortlich sind. Chorionkarzinome und Dottersacktumoren, die ebenfalls AFP sezernieren können, sind in der Tumorkohorte als Misch tumor-Komponente präsent.

HCG war ebenfalls signifikant in der Gruppe „aKZT+MT“ erhöht, was in den reinen Embryonalzellkarzinomen und Misch tumoren mit Embryonalzellkarzinom-Komponente und/oder Seminom-Komponente zu begründen ist. Bei Einsicht der einzelnen Laborwerte der Patienten war zu vermerken, dass die höchsten hCG-Werte der Gruppe „aKZT+MT“ stets mit einer Embryonalzellkarzinom-Komponente einhergingen. Studien zeigten, dass eine hCG-Erhöhung in reinen Seminomen nicht obligat ist und mit einer größeren Tumormasse des Primarius und/oder der Metastasen einhergeht (Weissbach et al. 1999). In einer Studienpopulation von Javadpour et al. zeigten nur 7,6 % der 130

Patienten mit reinem Seminom ein erhöhtes hCG im Serum (Javadpour et al. 1978). 72,2 % der in die Gießener Hodentumor-Kohorte aufgenommenen Patienten mit reinem Seminom erhielten die Diagnose im UICC-Stadium IA, das mit einer exzellenten Prognose einhergeht, da weder Lymphknoten betroffen, noch Fernmetastasen vorhanden sind. Es ist daher nicht verwunderlich, dass nur 9,09 % der Patienten mit reinem Seminom (n=33) erhöhte hCG-Werte aufwiesen.

LH und FSH sind hypophysäre Hormone, deren Ausschüttung über das GnRH des Hypothalamus pulsatil gesteuert wird (Ramaswamy und Weinbauer 2014). LH und FSH bestehen unter anderem aus der  $\alpha$ -Untereinheit des hCG (Nwabuobi et al. 2017). HCG-produzierende Tumore können daher über einen negativen Feedback-Mechanismus eine Verminderung der hypophysären LH- und FSH-Freisetzung bewirken. In der Gruppe „aKZT+MT“ waren sowohl LH, als auch FSH im Vergleich zur Gruppe „reines Seminom“ signifikant niedriger. Dies lässt sich durch die hCG-produzierenden Tumorkomponenten der Gruppe „aKZT+MT“ erklären. Die signifikant höhere FSH-Konzentration in der „rSE“-Gruppe könnte anteilig die ebenfalls signifikant höhere Spermienkonzentration erklären, da FSH im Tiermodell eine Wirkung auf die Quantität der Spermatogenese zeigte (Ramaswamy und Weinbauer 2014).

In der Tumorkohorte wurden leitliniengerecht die etablierten Tumormarker für testikuläre Keimzelltumoren bestimmt. Mittlerweile sind weitere Tumormarker ermittelt worden. So z.B. die miRNA-371a-3p, der im Kontrast zu AFP, hCG und LDH neben einer Überwachungsfunktion des Therapieerfolgs auch eine diagnostische Relevanz und prognostische Bedeutung in testikulären Keimzelltumoren zugeschrieben wird (Almstrup et al. 2020; Dieckmann et al. 2023). Mithilfe kryokonservierter Blutproben (Serum) könnte dies in der Gießener Kohorte auch in Zukunft noch durchgeführt werden.

## **5.2 Analyse der Immunzellinfiltration im Seminom**

Die Immunhistochemie ist ein seit 1941 etabliertes Verfahren, das seither große Verwendung in der Forschung und klinisch-pathologischen Diagnostik findet (Ramos-Vara 2005; Taylor und Levenson 2006). Als rein visuelle Methode ist sie untersucherabhängig. Daher stellt sich zunächst die Frage einer geeigneten Quantifizierung, um die Untersuchungssubjektivität zu minimieren. Eine gängige Methode zur immunhistochemischen Quantifizierung ist die Verwendung einer Software wie z.B. ImageJ<sup>®</sup>. Problematisch an diesem Vorgehen ist, dass der Intensitäts-Threshold und die Frequenz der positiven Zellen manuell eingestellt werden muss, bevor das

Programm Berechnungen durchführen kann (Varghese et al. 2014). Diese Einstellungen unterliegen ebenfalls der visuellen Subjektivität.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein semiquantitatives Scoring gewählt, das bereits früher in der Arbeitsgruppe etabliert wurde (Klein et al. 2016). Eine computerassistierte Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien stellte sich aufgrund von Größenvariabilität und unterschiedlichen Farbintensitäten der humanen Proben trotz identischem Laborprotokoll als nicht geeignet dar. Dies war teilweise von der variablen Tumorphistologie mit teils großflächig fibrotisch-nekrotischen Arealen und der operationstechnisch-bedingten Variabilität der erhaltenen Gewebeproben abhängig. Auch lagen unspezifische Interaktionen, z.B. des CD3-Antikörpers mit Strukturen des Keimepithels vor, welche nicht ohne Weiteres durch ein Computerprogramm wie ImageJ<sup>®</sup> hätten gefiltert werden können. Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurde das immunhistochemische Scoring von 4 Untersuchern unabhängig durchgeführt und Mittelwerte gebildet.

Ein Vorteil des hier gewählten Scoring-Systems lag in der gleichzeitigen Betrachtung der Infiltrationsdichte und des Infiltrationsmusters im Sinne einer „Pattern“-Analyse.

Darüber hinaus erlaubt dieser Ansatz Untersuchungen zur immunologischen Bedeutung von „follicular like structures“ (FLS) in testikulären Keimzelltumoren, die durch andere Methoden wie Western-Blot oder qPCR nicht möglich wären.

Die beobachtete Abnahme der Immunzellinfiltration vom Tumor- bis in das tumorferne Gewebe war zu erwarten, insbesondere weil in der Peripherie der Seminome oftmals GCNIS-Tubuli oder erhaltene Spermatogenese zu beobachten waren. Beides stellen Zustände dar, die im Hoden mit einer geringeren Immunzellinfiltration assoziiert sind als im Tumor selbst (Klein et al. 2016). Die Antikörper-markierten Immunzellen zeigten ein homogenes Infiltrations- und Distributionsmuster unter den Patienten (siehe Heatmap-Analyse im Abschnitt 4.2.6). Für CD68- und CD11c-positive Zellen ergaben sich vorwiegend disseminierte Infiltrationsmuster, wohingegen CD3- und CD20cy-positive Zellen auch multifokale Cluster bildeten. Multifokale Cluster der CD20cy-positiven Zellen waren vereinzelt als FLS organisiert.

FLS im Seminom bestehen größtenteils aus CD20-positiven B-Zellen (Willis et al. 2009; Sakai et al. 2014). Auch in Mammakarzinomen wurden FLS beobachtet und es wurde eine Assoziation mit einem höheren Tumor-Grading festgestellt (Figenschau et al. 2015). Willis et al. wiesen in einer Studie nach, dass die CD20-positiven B-Zellen der FLS im Seminom antigenvermittelt reifen (Willis et al. 2009). Auch eine Studie von Nakanoma et al. stellte eine immunphänotypische Reife der FLS in Seminomen fest, vergleichbar

mit Lymphfollikeln der sekundären lymphatischen Organe (Nakanoma et al. 1992). Ob die immunphänotypische Reife für eine Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen den Tumor ausreicht oder seinen Progress sogar fördert bleibt unklar (Willis et al. 2009). Unter den in der Gießener Tumorkohorte vereinzelt auftretenden Seminom-Patienten mit FLS bestand keine Assoziation zu fortgeschritteneren Tumorstadien.

### **5.3 Korrelationsanalyse der Immunzellinfiltrationsdichte mit Tumormarker- und Hormonstatus von Seminom-Patienten**

Zweiseitige Korrelationen auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  lagen für die Infiltrationsdichten der Paare CD3/CD20cy, CD3/CD11c und CD68/CD11c vor.

Die Korrelation zwischen der Infiltrationsdichte CD3- und CD20cy-positiver Zellen ist plausibel, da T-Zell- und B-Zell-Antwort einen engen wechselseitigen Prozess darstellen. Den „follicular like structures“ im Seminom sind analog zu den Keimzentren in Lymphfollikeln, CD3-positiv T-Zellen angelagert (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 10.1.6; Fietz et al. 2022).

Die Korrelation zwischen der Infiltrationsdichte CD3- und CD11c-positiver Zellen war ebenfalls zu erwarten, da sowohl dendritische Zellen, als auch Makrophagen eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort übernehmen, durch Phagozytose Antigenfragmente an ihre Oberfläche schleusen und diese T-Zellen gegenüber präsentieren (Murphy und Weaver 2018, Abschnitt 3.1.1; Fietz et al. 2022).

Da CD11c nicht ausschließlich von dendritischen Zellen exprimiert wird, sondern auch von Makrophagen, war eine positive Korrelation zwischen den Infiltrationsdichten CD11c- und CD68-positiver Zellen zu erwarten. Sowohl Makrophagen, die bereits im physiologischen Hodengewebe den am häufigsten vorliegenden Immunzelltyp darstellen, als auch dendritische Zellen, nehmen in ihrer Infiltrationsdichte von tumorfern bis ins Tumorgewebe zu. Eine höhere Infiltrationsdichte beider Zelltypen im Seminom wurde bereits mehrfach beschrieben (Hvarness et al. 2013; Klein et al. 2016).

Eine negative Korrelation auf einem zweiseitigen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde zwischen der CD3-/CD20cy-Infiltrationsdichte und der hCG-Konzentration der Seminom-Patienten festgestellt. Da unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung beider Parameter verwendet wurden, sollte das Ergebnis mit Vorsicht betrachtet werden. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses sollte die Stichprobe vergrößert werden und eine immunhistochemische Detektion von hCG in den Biopsien erfolgen. Eine Keyword-Recherche der Begriffe „CD3-positive cells“, „CD20cy-positive cells“, „hCG-concentration“ und „seminoma“ auf [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) zeigte keine bisherigen



Studien, die den Zusammenhang zwischen der Infiltration CD3-positiver T-Zellen oder CD20cy-positiver B-Zellen und der hCG-Konzentration bei Patienten mit TGCT analysierten.

#### **5.4 Quantitative RT-PCR zur Analyse spezifischer T- und B-Zellmarker im Seminom**

Die quantitative RT-PCR wurde im Sinne einer Pilotstudie an Gewebeproben von Patienten der Gießener Hodentumor-Kohorte angewandt, um ergänzend zum immunhistochemischen Antikörper-Panel Informationen zu Immunzell-Subgruppen und ihrer möglichen Funktion im Seminom zu erhalten. So wurden Transkript-Level von Genen untersucht, die mit der Infiltration von T<sub>reg</sub>-Zellen (*ISG20*, *FOXP3*, *IL-10*, *TGF-β1*), T-Helfer-Zellen (*CD4*, *ICOS*), zytotoxischen T-Zellen (*CD8a*) und B-Zellen (*IL-6*, *CXCL-13*) korrelieren. Da die Rolle der Seminom- und andere TGCT-begleitenden Immunzellinfiltration auf den Tumorprogress bis heute nicht eindeutig bewertet ist, war insbesondere die Analyse von T<sub>reg</sub>-Zellen, die durch ihre Aktivität beeinflussen können, ob es zu einer Antigen-spezifischen Immunantwort oder Toleranz gegenüber einem Antigen kommt, interessant (Fietz et al. 2022; Schuppe et al. 2023). Zudem weisen T<sub>reg</sub>-Zellen eine variable positive oder negative prognostische Relevanz in Tumoren, z.B. Kolon- und Mammakarzinomen sowie Melanomen auf (Wilke et al. 2010; Xu et al. 2013; Jacobs et al. 2012). Auch die Frage, ob CD8-positiv zytotoxische T-Zellen im Seminom eine gegen den Tumor gerichtete, effektive Immunantwort durch Expression von FasL und Perforin auslösen können, bleibt kontrovers (Bols et al. 2000; Hadrup et al. 2006).

Klein et al. untersuchten ein breites Zytokin- und Chemokinspektrum in Hodenbiopsien mit Hypospermatogenese, GCNIS und Seminom-Anteilen (Klein et al. 2016). Mithilfe der hier vorgestellten Untersuchungen wurde über die vergleichende Betrachtung unterschiedlicher pathologischer Zustände im Hoden hinaus ein Blick in den lokalen Progress und das Mikromilieu des Tumors von Seminom-Patienten ermöglicht.

Nestler et al. untersuchten 2021 die tumorassoziierte Expression von 760 Genen in der Tumorrandzone und dem Tumorzentrum von metastasierten im Vergleich zu nicht-metastasierten Seminom-Patienten. Dabei stach insbesondere eine Hochregulation des IL6-Signalwegs in metastasierten Seminompatienten hervor (Nestler et al. 2022). Zu beteiligten Immunzellsubtypen, insbesondere zu T<sub>reg</sub>-Zellen lieferte die Arbeit jedoch keine Ergebnisse.

Im Vergleich zu unseren immunhistochemischen Ergebnissen unterlag die qRT-PCR nicht der subjektiven Einschätzung des Untersuchers. Gleichzeitig war eine Analyse des Distributionsmusters der Immunzellen mit ihrer Hilfe nicht möglich. Außerdem zu

beachten ist, dass mit einer erhöhten relativen Genexpression nicht zwangsläufig eine größere Anzahl der Zellen einhergeht, die das untersuchte Gen exprimieren oder vom Genprodukt chemotaktisch rekrutiert werden. Auch zu erwähnen ist, dass durch die Homogenisierung der Biopsien die darauffolgende RNA- und cDNA-Gewinnung nicht ausschließlich aus testikulären Immunzellen, sondern zwangsläufig aus allen ortsansässigen Zellen des Hodens, inklusive der Zellen des Keimepithels und gegebenenfalls Tumorzellen erfolgte (Klein et al. 2016; Fietz et al. 2022). Dies kann ebenso zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben.

Eine Limitation in der Interpretation unserer qRT-PCR-Ergebnisse liegt in der kleinen Stichprobengröße (n=3) pro Biopsielokalisation (Tumor, tumornah, tumorfern) sowie der subjektiven Patientenauswahl für die Bereitstellung geeigneter Biopsien. Hierbei wurden insbesondere Patienten mit hoher Immunzellinfiltrationsdichte im Tumor, inklusive „follicular like structures“ ausgewählt. Trotz der gezielten Patienten-Auswahl bestand eine hohe Variabilität der Transkript-Level der untersuchten Gene. Die Ergebnisse sollten daher als vorläufig betrachtet werden und die Stichprobengröße erweitert werden. Eine weitaus spezifischere Methode, die für unsere Fragestellung nach der pathoimmunologischen Rolle von T-Zell-Subgruppen in testikulären Keimzelltumoren geeigneter ist und in unserem Labor bereits etabliert wurde, ist die Durchflusszytometrie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine höhere relative Expression der untersuchten Gene für T<sub>reg</sub>-Zellen (*ISG20*, *FOXP3*, *IL-10*, *TGF-β1*), T-Helfer-Zellen (*CD4*, *ICOS*), zytotoxische T-Zellen (*CD8a*) und B-Zellen (*IL-6*, *CXCL-13*) im Tumor- oder tumornahen Gewebe im Vergleich zu Kontrollproben mit normaler Spermatogenese (Details siehe Abschnitt 4.3). Dies deckt sich mit den immunhistochemischen Ergebnissen.

## **5.5 Fazit und Forschungsausblick**

Seit 2017 wurden zahlreiche klinische Parameter zur Vorgeschichte, dem Verlauf und Therapieerfolg von Patienten mit testikulären Keimzelltumoren im Universitätsklinikum Gießen gesammelt. Zwischen den Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich Tumorstadium, Ejakulatkonzentration, Tumormarker (AFP, β-hCG) und hypophysärer Hormone (LH, FSH).

Experimentell wurde die Immunzellinfiltration am Beispiel des Seminoms untersucht und überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen T- und B-Zell-Populationen sowie Makrophagen und dendritischen Zellen mit klinischen Parametern der Patienten besteht. Die Immunzelldichte und -distribution im Seminom zeigte ein weitgehend homogenes Infiltrationsmuster zwischen den Patienten. Auffällig waren CD20cy-positive Zellen, die

im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelltypen seltener im tumornahen und-fernen Gewebe auftraten und häufiger Immunzellcluster (follikelähnliche Strukturen) bildeten. Die Korrelationsanalyse zeigte einen positiven Zusammenhang zwischen der Infiltrationsdichte von CD3-/CD20cy-positiven, CD3-/CD11c-positiven sowie CD68-/CD11c-positiven Zellen. Es zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der CD3-/CD20cy-positiven Infiltrationsdichte im Tumorgewebe und der  $\beta$ -hCG-Konzentration im Blut.

Die vorliegende Arbeit stellt eine Ausgangsbasis für weiterführende immunpathologische und molekularbiologische Untersuchungen sowie klinisch-statistische Erhebungen dar, insbesondere durch die Anlage einer prospektiven, weiterhin wachsenden Patientenkohorte. Auch in Zukunft wird diese Kohorte für klinisch-statistische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen. Von Besonderem Interesse dabei sind die Untersuchung weiterer Keimzelltumoren im Hinblick auf Immunzellinfiltration, wie z.B. das Embryonalzellkarzinom und die Untersuchung spezifischer Immunzellsubtypen, wie die T<sub>reg</sub>- und T<sub>fh</sub>-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS). Zusammen mit der Einsicht in RNA-Sequenzierungsdatensätze könnte die Weiterführung und Analyse der Kohorte wichtige Einblicke in die Rolle der Immunzellantwort bei der Entwicklung und dem Progress von testikulären Keimzelltumoren liefern und in Zukunft als Grundlage für die Entwicklung prognostischer Biomarker oder individualisierter Immuntherapien statt der gängigen Radio- und Chemotherapie-Protokolle von TGCT dienen.

## 6. Zusammenfassung

Trotz komplexer immunsuppressiver Mechanismen, die zum Immunprivileg des Hodens beitragen, wird bei Infektionen des Hodens und bei testikulären Keimzelltumoren (TGCT) die Infiltration proinflammatorischer Immunzellen beobachtet. Obwohl das Seminom (SE) und die präinvasive Keimzellneoplasie in situ (GCNIS) mit Immunzellinfiltraten assoziiert sind, ist die pathophysiologische Bedeutung der Infiltrate, insbesondere wie sie die TGCT-Progression und Prognose beeinflussen, nicht ausreichend erforscht.

Als Bestandteil einer laufenden prospektiven Studie wurden seit 2017 umfassende Daten zu klinischen Parametern, Blutproben und testikuläres Gewebe von 59 Patienten, die sich einer Orchiektomie aufgrund eines testikulären Keimzelltumors unterzogen, gesammelt (Alter 18-69 Jahre; Mittelwert 25,7 Jahre; Seminom n=33; Nicht-Seminom TGCT n=7; Mischtumoren n=12; Leydig-Zell-Tumoren n=3; andere Pathologien n=4). Eine Vergleichsanalyse von SE-Patienten (n=30) umfasste Bouin-fixiertes und kryokonserviertes Gewebe vom zentralen Tumor, dem tumornahen und -fernen Gewebe. Immunhistochemisch wurden CD68-, CD11c-, CD3- und CD20cy-positive Zellen identifiziert. Eine quantitative RT-PCR ausgewählter Zellmarker, Zytokine und Chemokine, die mit der Infiltration von T<sub>reg</sub>- (*ISG20*, *FOXP3*, *IL-10*, *TGF-β1*), T<sub>H</sub>- (*CD4*, *ICOS*), T<sub>c</sub>- (*CD8a*) und B-Zellen (*IL-6*, *CXCL-13*) korrelieren, wurde in SE-Patienten (n=3) durchgeführt.

Die Histopathologie zeigte eine große Heterogenität im tumor-zentralen, -nahen und -fernen Gewebe und beinhaltete SE (n=9), GCNIS (n=7), Hypospermatogenese/Sertoli-Cell-Only-Phänotyp (HYP/SCO) (n=12) oder Kombinationen dieser Kategorien (SE+GCNIS n=10, SE+GCNIS+HYP/SCO n=2, SE+HYP/SCO n=0, GCNIS+HYP/SCO n=15). Immunhistochemisch wurden CD68-, CD11c-, CD3- und CD20cy-positive Zellen hauptsächlich in GCNIS- und SE-Biopsien detektiert. Ein semiquantitatives Bewertungssystem zeigte die höchste Anzahl an Immunzellen, vor allem CD3-positiven Zellen, im Tumorzentrum. Eine Analyse der Infiltrationsdichte und der klinischen Parameter der Patienten zeigte negative Korrelationen zwischen CD3-positiven Zellen/hCG-Konzentration, CD20cy-positiven Zellen/hCG-Konzentration und eine positive Korrelation zwischen CD3-positiven Zellen/Spermienkonzentration.

Die quantitative RT-PCR bestätigte das proinflammatorische Milieu testikulärer Keimzelltumoren.

## 7. Summary

Despite the presence of complex immunosuppressive mechanisms contributing to immune privilege in the testis, recruitment of immune cells with pro-inflammatory properties is observed in testicular infections or testicular germ cell tumors (TGCT). Although seminoma (SE) and pre-invasive germ cell neoplasia in situ (GCNIS) are associated with immune cell infiltrates, the pathophysiological relevance of these infiltrates and how they affect TGCT progression and prognosis, are poorly understood. Since 2017 as part of an ongoing prospective study, a comprehensive clinical data base was established, blood samples were collected and testicular tissue was obtained from patients undergoing orchidectomy for TGCT (age 18–69 years, mean 25.7; seminoma n=33; non-seminoma TGCT n=7; mixed tumors n=12; Leydig cell tumors n=3; other pathologies n=4). A comparative analysis of SE patients (n=30) included Bouin-fixed and cryopreserved tissue from tumor-central, -adjacent and -distant sites. Using immunohistochemistry, cells positive for CD68, CD11c, CD3, and CD20cy were identified. Quantitative RT-PCR of selected cellular markers, cytokines and chemokines correlating with the infiltration of T<sub>reg</sub>- (*ISG20*, *FOXP3*, *IL-10*, *TGF-β1*), T<sub>H</sub>- (*CD4*, *ICOS*), T<sub>c</sub>- (*CD8a*) und B-cells (*IL-6*, *CXCL-13*) in SE patients (n=3) was performed.

Histopathology showed considerable heterogeneity in tumor-central, -adjacent and distant sites, displaying SE (n=9), GCNIS (n=7), hypospermatogenesis/Sertoli-cell-only-syndrome (HYP/SCO) (n=12), or combinations thereof (SE+GCNIS n=10, SE+GCNIS+HYP/SCO n=2, SE+HYP/SCO n=0, GCNIS+HYP/SCO n=15). Using immunohistochemistry, cells positive for CD68, CD11c, CD3 and CD20cy were mainly identified in GCNIS and SE. Semiquantitative scoring revealed the highest numbers of immune cells, especially CD3+ T-cells, in tumor-central areas. Analysis of infiltration density and clinical parameters showed negative correlations between CD3+ cells/hCG-concentration, CD20cy+ cells/hCG-concentration and a positive correlation between CD3+ cells/sperm concentration.

Quantitative RT-PCR of selected proteins, cytokines and chemokines confirmed that TGCT is associated with a pro-inflammatory milieu.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Keimepithel und Interstitium.....	- 2 -
Abbildung 2: Testikuläre Tumoren (WHO-Klassifikation). .....	- 12 -
Abbildung 3: Testikuläre Dysgenese.....	- 14 -
Abbildung 4: Vertretene Tumorentitäten der Gießener Patienten-Kohorte.....	- 21 -
Abbildung 5: Biopsie-Entnahme-Schema .....	- 22 -
Abbildung 6: Formel zur Berechnung des Scores zur Evaluation der Spermatogenese nach Bergmann-Kliesch. ....	- 23 -
Abbildung 7: Funktionsweise der Immunhistochemie am Beispiel des eigenen Experimentaufbaus .....	- 25 -
Abbildung 8: Darstellung des semiquantitativen Scoring-Systems zur Beschreibung einer testikulären Immunzellinfiltration.....	- 28 -
Abbildung 9: Infiltrationsgrade im semiquantitativen Scoring (Beispiele). ....	- 29 -
Abbildung 10 Distributionskategorien der Immunzellinfiltration im semiquantitativen Scoring (Beispiele). ....	- 29 -
Abbildung 11: Altersverteilung der Patientengruppen „rSE“ (A), n=33 und „AKZT+MT“ (B), n=16. ....	- 38 -
Abbildung 12: Häufigkeit der UICC-Tumorstadien der Patientengruppen „rSE“ (A) und „aKZT+MT“ (B). ....	- 40 -
Abbildung 13: Boxplots der Tumormarker AFP, hCG, LDH der Patientengruppen „rSE“ (blau; n=33) und „aKZT+MT“ (rot; n=16).....	- 47 -
Abbildung 14: Boxplots der Hormonparameter (LH, FSH, Testosteron (gesamt)) der Patientengruppen „rSE“ (blau; n=33) und „aKZT+MT“ (rot; n=16).....	- 48 -
Abbildung 15: Häufigste Kombinationen histopathologischer Befunde innerhalb des Seminom-Patientenkollektivs (n=30) .....	- 50 -
Abbildung 16: CD3-positive Immunzellinfiltration in Tumor-(Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten .....	- 51 -
Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD3-Antikörper. ....	- 52 -
Abbildung 18: CD20cy-positive Immunzellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten .....	- 53 -
Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD20cy-Antikörper.....	- 54 -
Abbildung 20: CD68-positive Immunzellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten .....	- 55 -
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsielokalisationen mit einem CD68-Antikörper .....	- 56 -

Abbildung 22: CD11c-positive Immunzellinfiltration in Tumor- (Tu), tumornahem (Tu-adj) und tumorfernem (Tu-dist) Gewebe von Seminom-Patienten .....	- 57 -
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung unterschiedlicher Seminom-Biopsie-lokalisierungen mit einem CD11c-Antikörper .....	- 58 -
Abbildung 24: Heatmap CD3-, CD20cy-, CD68- und CD11c-positiver Zellen bezogen auf Infiltrationsdichte (A) und -distribution (B) in Seminom-Patienten (n=30) .....	- 59 -
Abbildung 25: Streudiagramme der signifikanten Korrelationspaare von klinischen Parametern, Hormonen und Tumormarkern der Patientengruppe „reines Seminom“ . . .	- 61 -
Abbildung 26: Gestapelte Streudiagramme für signifikante Korrelationspaare der Immunzellinfiltrationsdichte in Tumorbiopsien (CD3+, CD20cy+, CD68+, CD11c+) der Patientengruppe „reines Seminom“ .....	- 63 -
Abbildung 27: Gestapelte Streudiagramme für signifikante Korrelationspaare der Immunzellinfiltrationsdichte in Tumorbiopsien der Patientengruppe „reines Seminom“ (CD3+, CD20cy+, CD68+, CD11c+) mit klinischen Parametern, Tumormarkern und Hormonstatus der Patienten.....	- 64 -
Abbildung 28: Expressionsprofil von Zellmarkern und Zytokinen regulatorischer T-Zellen ( <i>ISG20</i> , <i>FOXP3</i> , <i>IL-10</i> , <i>TGF-β1</i> ) im Seminom (n=3).....	- 65 -
Abbildung 29: Expressionsprofil von Zellmarkern für T-Helfer-Zellen ( <i>CD4</i> , <i>ICOS</i> ) und zytotoxische T-Zellen ( <i>CD8a</i> ) im Seminom (n=3). .....	- 66 -
Abbildung 30: Expressionsprofil von Zytokinen ( <i>IL-6</i> ) und Chemokinen ( <i>CXCL-13</i> ) für B-Zellen im Seminom (n=3) .....	- 67 -

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit von Immunzellen im Hoden des erwachsenen Mannes unter physiologischen Bedingungen.....	- 6 -
Tabelle 2: Klinisch erhobene Parameter der Hodentumorkohorte.....	- 19 -
Tabelle 3: Histopathologische Kombinationsmöglichkeiten.....	- 24 -
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper und Dilutionen .....	- 26 -
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper und Dilutionen .....	- 27 -
Tabelle 6: Verwendeter DNase-Mix.....	- 31 -
Tabelle 7: Zusammensetzung der RT-Ansätze.....	- 32 -
Tabelle 8: Mastermix der Kontroll-RT-PCR.....	- 32 -
Tabelle 9: Verwendete TaqMan® Single Tube Gene Expression Assays.....	- 34 -
Tabelle 10: Verwendeter Mastermix für die qRT-PCR .....	- 35 -
Tabelle 11: Tumor-Staging der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 39 -

Tabelle 12: Risikofaktoren der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 40 -
Tabelle 13: Hodenvolumetrie und andrologische Parameter der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 42 -
Tabelle 14: Hodenvolumetrie und andrologische Parameter der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 43 -
Tabelle 15: Chemotherapie-Kontingente und Tumorrezidive nach abgeschlossener Chemotherapie bei den Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 44 -
Tabelle 16: Hormonstatus und Tumormarker der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 45 -
Tabelle 17 : Hormonstatus und Tumormarker der Patientengruppen „rSE“ und „aKZT+MT“ .....	- 46 -
Tabelle 18: Kombinationen histopathologischer Befunde innerhalb des Seminom- Patientenkollektivs (n=30) .....	- 49 -
Tabelle 19: Signifikante Korrelationen der erhobenen Daten zu Hormonen, Tumormarkern und weiteren klinischen Parametern der Patientengruppe „reines Seminom“ .....	- 60 -
Tabelle 20: Signifikante Korrelationen der erhobenen Daten zu Immunzellinfiltration, Hormonen, Tumormarkern und weiteren klinischen Parametern der Patientengruppe „reines Seminom“ .....	- 62 -
Tabelle 21: Verwendete Chemikalien für die HE-Färbung und Immunhistochemie-	101 -
Tabelle 22: Verwendete Chemikalien zur RNA-Extraktion .....	- 103 -
Tabelle 23: Chemikalien der DNase-Behandlung .....	- 103 -
Tabelle 24: Thermoprotokoll der DNase-Behandlung .....	- 104 -
Tabelle 25: Chemikalien der reversen Transkription .....	- 104 -
Tabelle 26: Thermoprotokoll der reversen Transkription .....	- 105 -
Tabelle 27: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der RT-PCR .....	- 106 -
Tabelle 28: Thermoprotokoll der Kontroll-RT-PCR .....	- 106 -
Tabelle 29: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der Gelelektrophorese .....	- 107 -
Tabelle 30: Verbrauchsmaterial der qRT-PCR .....	- 107 -
Tabelle 31: Thermoprotokoll der qRT-PCR .....	- 107 -
Tabelle 32: Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien (Übersicht) .....	- 108 -



## 10. Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-fetoprotein	LDH	Laktatdehydrogenase
aKZT+MT	andere Keimzelltumore und Mischtumore	LH	Luteinisierendes Hormon
BSA	Bovines Serumalbumin	LIF	Leukaemia inhibiting factor
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol	MCP1	Macrophage Chemoattractant Protein-1
DNA	Deoxyribonucleic Acid	MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	MIF	Macrophage migration inhibitory-factor
Fas-L	Fas-Ligand	Oct-3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
Fib/TS	Fibrotic/Tubular Shadows	PGC	Primordial germ cells
FLS	Follicular Like Structures	PLAP	Placenta-like alkaline phosphatase
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon	rSE	reines Seminom
GCNIS	Germ cell neoplasia in situ	SE	Seminom
HCG	Humanes Choriongonadotropin	TDS	Testicular dysgenesis syndrome
HE	Hämatoxylin und Eosin	T <sub>fh</sub>	Follikuläre T-Helferzellen
HYP/SCO	Hypospermatogenese/Sertoli-Cell-Only-Phänotyp	TGCT	Testicular germ cell tumor
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaborative Group	TGF-β	Transforming growth factor
IL-1	Interleukin 1	TIL	tumor infiltrating lymphocytes
IL-10	Interleukin 10	TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
IL-6	Interleukin 6	T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
JAM	Junctional Adhesion Molecule	WHO	World Health Organization, World Health Organization
KITLG	KIT-Ligand	z.B.	Zum Beispiel

## 11. Literaturverzeichnis

Albers, P.; Albrecht, W.; Algaba, F.; Bokemeyer, C.; Cohn-Cedermark, G.; Fizazi, K. et al. (2016): EAU Guidelines on Testicular Cancer. In: *European Association of Urology*. Online verfügbar unter [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org).

Albers, P.; Göll, A.; Bierhoff, E.; Schoeneich, G.; Müller, S. C. (1999): Clinical course and histopathologic risk factor assessment in patients with bilateral testicular germ cell tumors. In: *Urology* 54 (4), S. 714–718. DOI: 10.1016/S0090-4295(99)00285-X.

Almstrup, K.; Lobo, J.; Mørup, N.; Belge, G.; Rajpert-De Meyts, E.; Looijenga, L. H. J.; Dieckmann, K.-P. (2020): Application of miRNAs in the diagnosis and monitoring of testicular germ cell tumours. In: *Nat Rev Urol* 17 (4), S. 201–213. DOI: 10.1038/s41585-020-0296-x.

Angulo, J. C.; González, J.; Rodríguez, N.; Hernández, E.; Núñez, C.; Rodríguez-Barbero, J. M. et al. (2009): Clinicopathological study of regressed testicular tumors (apparent extragonadal germ cell neoplasms). In: *The Journal of urology* 182 (5), S. 2303–2310. DOI: 10.1016/j.juro.2009.07.045.

Aparicio, J.; Del García Muro, X.; Maroto, P.; Paz-Ares, L.; Alba, E.; Sáenz, A. et al. (2003): Multicenter study evaluating a dual policy of postorchietomy surveillance and selective adjuvant single-agent carboplatin for patients with clinical stage I seminoma. In: *Annals of Oncology* 14 (6), S. 867–872. DOI: 10.1093/annonc/mdg241.

Aparicio, J.; Maroto, P.; Del García Muro, X.; Sánchez-Muñoz, A.; Gumà, J.; Margelí, M. et al. (2014): Prognostic factors for relapse in stage I seminoma: a new nomogram derived from three consecutive, risk-adapted studies from the Spanish Germ Cell Cancer Group (SGCCG). In: *Annals of Oncology* 25 (11), S. 2173–2178. DOI: 10.1093/annonc/mdu437.

Bacher, M.; Meinhardt, A.; Lan, H. Y.; Mu, W.; Metz, C. N.; Chesney, J. A. et al. (1997): Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. In: *The American Journal of Pathology* 150 (1), S. 235–246.

Barber, R. D.; Harmer, D. W.; Coleman, R. A.; Clark, B. J. (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. In: *Physiological genomics* 21 (3), S. 389–395. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00025.2005.

- Bellgrau, D.; Gold, D.; Selawry, H.; Moore, J.; Franzusoff, A.; Duke, R. C. (1995): A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. In: *Nature* 377 (6550), S. 630–632. DOI: 10.1038/377630a0.
- Bergmann, M.; Dierichs, R. (1983): Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. In: *Anat Embryol* 168 (2), S. 269–275. DOI: 10.1007/BF00315821.
- Bergmann, M.; Kliesch, S. (1998): Hodenbiopsie In: Krause W, Weidner W (eds) *Andrologie*. Stuttgart: Enke.
- Bhushan, S.; Meinhardt, A. (2017): The macrophages in testis function. In: *Journal of Reproductive Immunology* (119), S. 107–112.
- Blanchard, M. G.; Josso, N. (1974): Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. In: *Pediatr Res* 8 (12), S. 968–971. DOI: 10.1203/00006450-197412000-00011.
- Bobzien, B.; Yasunami, Y. (1983): Intratesticular transplants of islet xenografts (rat to mouse). In: *Diabetes* (32), S. 213–216.
- Bols, B.; Jensen, L.; Jensen, A.; Braendstrup, O. (2000): Immunopathology of in situ seminoma. In: *International Journal of Experimental Pathology* 81 (3), S. 211–217. DOI: 10.1046/j.1365-2613.2000.00151.x.
- Boormans, J. L.; Mayor de Castro, J.; Marconi, L.; Yuan, Y.; Laguna Pes, M. Pilar; Bokemeyer, C. et al. (2018): Testicular Tumour Size and Rete Testis Invasion as Prognostic Factors for the Risk of Relapse of Clinical Stage I Seminoma Testis Patients Under Surveillance: a Systematic Review by the Testicular Cancer Guidelines Panel. In: *European urology* 73 (3), S. 394–405. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.09.025.
- Botchan, A.; Hauser, R.; Yogev, L.; Gamzu, R.; Paz, G.; Lessing, J. B.; Yavetz, H. (1997): Testicular cancer and spermatogenesis. In: *Hum Reprod* 12 (4), S. 755–758. DOI: 10.1093/humrep/12.4.755.
- Bourque, J.; Hawiger, D. (2022): Variegated Outcomes of T Cell Activation by Dendritic Cells in the Steady State. In: *The Journal of Immunology* 208 (3), S. 539–547. DOI: 10.4049/jimmunol.2100932.
- Brierley, James D. (2017): *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Chicester: John Wiley & Sons Incorporated (Uicc). Online verfügbar unter <https://livivo.idm.oclc.org/login?url=https://ebookcentral.proquest.com/lib/zbmed-ebooks/detail.action?docID=4792667>.

Canick, J. A.; Kellner, L. H.; Bombard, A. T. (2003): Prenatal screening for open neural tube defects. In: *Clinics in Laboratory Medicine* 23 (2), 385-94, ix. DOI: 10.1016/S0272-2712(03)00032-5.

Chen, Y.; Wang, X.; Lu, S.; Huang, J.; Zhang, L.; Hu, W. (2020): The diagnostic accuracy of maternal serum alpha-fetoprotein variants (AFP-L2 and AFP-L3) in predicting fetal open neural tube defects and abdominal wall defects. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 507, S. 125–131. DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.044.

Chung, C. C.; Kanetsky, P. A.; Wang, Z.; Hildebrandt, M. A. T.; Koster, R.; Skotheim, R. I. et al. (2013): Meta-analysis identifies four new loci associated with testicular germ cell tumor. In: *Nat Genet* 45 (6), S. 680–685. DOI: 10.1038/ng.2634.

Cohen, P. E.; Nishimura, K.; Zhu, L.; Pollard, J. W. (1999): Macrophages: Important accessory cells for reproductive function. In: *J Leukoc Biol* (66), S. 765–772.

Comhaire, F. H.; Mahmoud, A. M. (1999): Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. In: *Hum Reprod* (5), S. 393–398.

Cook, M. B.; Akre, O.; Forman, D.; Madigan, M. Patricia; Richiardi, L.; McGlynn, K. A. (2009): A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer--experiences of the mother. In: *Int J Epidemiol* 38 (6), S. 1532–1542. DOI: 10.1093/ije/dyp287.

de Kretser, D. M.; Hedger, M. P.; Phillips, D. J. (1999): Activin A and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation. In: *J. Endocrinol.* (161), S. 195–198.

de Winter, J. P.; Vanderstichele, H. M.; Timmerman, M. A.; Blok, L. J. (1993): Activin is produced by rat Sertoli cells in vitro and can act as an autocrine regulator of Sertoli cell function. In: *Endocrinology* (132), S. 975–982.

Dejucq, N.; Lienard, M. O.; Guillaume, E.; Dorval, I.; Jégou, B. (1998): Expression of interferons-alpha and -gamma in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat. In: *Endocrinology* 139 (7), S. 3081–3087. DOI: 10.1210/endo.139.7.6083.

Dieckmann, K. P.; Loy, V. (1996): Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14 (12), S. 3126–3132. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.12.3126.

Dieckmann, K.-P.; Dumlupinar, C.; Grobelny, F.; Utschig, J.; Klemke, M.; Ahmed Saad, E. Moeiz et al. (2023): Testicular neoplasms: the interrelationships of serum levels of

microRNA-371a-3p (M371) and classical tumor markers with histology, clinical staging, and age-a statistical analysis. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 149 (10), S. 7079–7090. DOI: 10.1007/s00432-023-04664-8.

Dieckmann, K.-P.; Skakkebaek, N. E. (1999): Carcinoma in situ of the testis: Review of biological and clinical features. In: *Int. J. Cancer* 83 (6), S. 815–822. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19991210)83:6<815::AID-IJC21>3.0.CO;2-Z.

Duan, Y.-G.; Yu, C.-F.; Novak, N.; Bieber, T.; Zhu, C.-H.; Schuppe, H.-C. et al. (2011): Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. In: *International Journal of Andrology* 34 (6 Pt 2), e536-45. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2010.01137.x.

Dym, M.; Fawcett, D. W. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. In: *Biol Reprod* 3 (3), S. 308–326. DOI: 10.1093/biolreprod/3.3.308.

el-Demiry, M. I.; Hargreave, T. B.; Busuttill, A.; Elton, R.; James, K.; Chisholm, G. D. (1987): Immunocompetent cells in human testis in health and disease. In: *Fertility and Sterility* 48 (3), S. 470–479. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)59421-7.

Evans, R. W.; Setchell, B. P. (1978): The effect of rete testis The effect of rete testis fluid on the metabolism of testicular spermatozoa. In: *J Reprod Fertil* (52), S. 15–20.

Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M. et al. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. In: *International Journal of Cancer* 136 (5), E359-86. DOI: 10.1002/ijc.29210.

Fietz, D. (2017): Functional Anatomy and Histology of the Testis. In: *Endocrinology of the testis and male reproduction, Endocrinology I*.

Fietz, D.; Kliesch, S. (2022): Biopsie und Histologie des Hodens. In: Nieschlag, Behre et al. (Hg.) – *Andrologie*, S. 1–16.

Fietz, D.; Kliesch, S. (2022): Biopsie und Histologie des Hodens. In: *Andrologie*: Springer, Berlin, Heidelberg, S. 1–16. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-61904-9\\_11-1](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-61904-9_11-1).

Fietz, Daniela; Schuppe, Hans-Christian; Loveland, Katherine L. (2022): *Immunobiology of Testicular Cancer*: Springer, Cham. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/chapter/10.1007/16833\\_2022\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007/16833_2022_7).

Figenschau, S. L.; Fismen, S.; Fenton, K. A.; Fenton, C.; Mortensen, E. S. (2015): Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. In: *BMC Cancer* 15 (1), S. 101. DOI: 10.1186/s12885-015-1116-1.

Fijak, M.; Meinhardt, A. (2006): The testis in immune privilege. In: *Immunological Reviews* 213 (1), S. 66–81. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x.

Fijak, M.; Pilatz, A.; Hedger, M. P.; Nicolas, N.; Bhushan, S.; Michel, V. et al. (2018): Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? In: *Hum Reprod Update* 24 (4), S. 416–441. DOI: 10.1093/humupd/dmy009.

Fizazi, K.; Pagliaro, L.; Laplanche, A.; Fléchon, A.; Mardiak, J.; Geoffrois, L. et al. (2014): Personalised chemotherapy based on tumour marker decline in poor prognosis germ-cell tumours (GETUG 13): a phase 3, multicentre, randomised trial. In: *The Lancet Oncology* 15 (13), S. 1442–1450. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70490-5.

Flechon, A.; Bompas, E.; Biron, P.; Droz, J.-P. (2002): Management of post-chemotherapy residual masses in advanced seminoma. In: *The Journal of urology* 168 (5), S. 1975–1979. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)64275-9.

Fosså, S. D.; Chen, J.; Schonfeld, S. J.; McGlynn, K. A.; McMaster, M. L.; Gail, M. H.; Travis, L. B. (2005): Risk of contralateral testicular cancer: a population-based study of 29,515 U.S. men. In: *J Natl Cancer Inst* 97 (14), S. 1056–1066. DOI: 10.1093/jnci/dji185.

Fosså, S. D.; Horwich, A.; Russell, J. M.; Roberts, J. T.; Cullen, M. H.; Hodson, N. J. et al. (1999): Optimal planning target volume for stage I testicular seminoma: A Medical Research Council randomized trial. Medical Research Council Testicular Tumor Working Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (4), S. 1146. DOI: 10.1200/jco.1999.17.4.1146.

Frungieri, M. B.; Calandra, R. S.; Lustig, L.; Meineke, V.; Köhn, F. M.; Vogt, H. Josef; Mayerhofer, A. (2002): Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. In: *Fertility and Sterility* 78 (2), S. 298–306. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)03206-5.

Germà-Lluch, J. (2002): Clinical Pattern and Therapeutic Results Achieved in 1490 Patients with Germ-Cell Tumours of the Testis: the Experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). In: *European urology* 42 (6), S. 553–563. DOI: 10.1016/S0302-2838(02)00439-6.

- Goddard, N. C.; McIntyre, A.; Summersgill, B.; Gilbert, D.; Kitazawa, S.; Shipley, J. (2007): KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. In: *Int J Androl* 30 (4), 337-48; discussion 349. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00769.x.
- Golubovskaya, V.; Wu, L. (2016): Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. In: *Cancers* 8 (3), S. 36. DOI: 10.3390/cancers8030036.
- Groll, R. J.; Warde, P.; Jewett, M. A. S. (2007): A comprehensive systematic review of testicular germ cell tumor surveillance. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 64 (3), S. 182–197. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.04.014.
- Gu-Trantien, C.; Loi, S.; Garaud, S.; Equeter, C.; Libin, M.; Wind, A. de et al. (2013): CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. In: *J Clin Invest* 123 (7), S. 2873–2892. DOI: 10.1172/JCI67428.
- Hadrup, S. Reker; Braendstrup, O.; Jacobsen, G. Krag; Mortensen, S.; Pedersen, L. Østergaard; Seremet, T. et al. (2006): Tumor infiltrating lymphocytes in seminoma lesions comprise clonally expanded cytotoxic T cells. In: *Int. J. Cancer* 119 (4), S. 831–838. DOI: 10.1002/ijc.21894.
- Hakovirta, H.; Syed, V.; Jégou, B.; Parvinen, M. (1995): Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. In: *Molecular and cellular endocrinology* 108 (1-2), S. 193–198. DOI: 10.1016/0303-7207(95)03475-M.
- Haugnes, H. S.; Laurell, A.; Stierner, U.; Bremnes, R. M.; Dahl, O.; Cavallin-Ståhl, E.; Cohn-Cedermark, G. (2012): High-dose chemotherapy with autologous stem cell support in patients with metastatic non-seminomatous testicular cancer - a report from the Swedish Norwegian Testicular Cancer Group (SWENOTECA). In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 51 (2), S. 168–176. DOI: 10.3109/0284186X.2011.641507.
- Head, J. R.; Billingham, R. E. (1985): Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. In: *Transplantation* (40), S. 269–275.
- Hedger, M. (1997): Testicular leukocytes: what are they doing? In: *Reviews of Reproduction* 2 (1), S. 38–47. DOI: 10.1530/revreprod/2.1.38.
- Hedger, M. P. (2015): The Immunophysiology of Male Reproduction. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, S. 805–892. DOI: 10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3.

- Hedger, M. P.; Meinhardt, A. (2003): Cytokines and the immune-testicular axis. In: *Journal of Reproductive Immunology* 58 (1), S. 1–26. DOI: 10.1016/S0165-0378(02)00060-8.
- Hedger, M. P.; Winnall, W. R. (2012): Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. In: *Cell Endocrinology* (359), S. 30–42.
- Hemminki, K.; Li, X. (2004): Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. In: *Br J Cancer* 90 (9), S. 1765–1770. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601714.
- Horwich, A.; Shipley, J.; Huddart, R. (2006): Testicular germ-cell cancer. In: *The Lancet* 367 (9512), S. 754–765. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68305-0.
- Hvarness, T.; Skakkebaek, N. E.; Rajpert-De Meyts, E. (2013): Phenotypic characterisation of immune cell infiltrates in testicular germ cell neoplasia. In: *Journal of Reproductive Immunology*.
- Indumathy, S.; Pueschl, D.; Klein, B.; Fietz, D.; Bergmann, M.; Schuppe, H.-C. et al. (2020): Testicular immune cell populations and macrophage polarisation in adult male mice and the influence of altered activin A levels. In: *Journal of Reproductive Immunology* 142, S. 103204. DOI: 10.1016/j.jri.2020.103204.
- Jacobs, J. F. M.; Nierkens, S.; Figdor, C. G.; Vries, I. Jolanda M. de; Adema, G. J. (2012): Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? In: *The Lancet Oncology* 13 (1), e32-42. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70155-3.
- Jahson, M. (Hg.) (2008): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 4. Aufl. 1 Band: Spektrum.
- Jahnukainen, K.; Jørgensen, N.; Pöllänen, P.; Giwercman, A.; Skakkebaek, N. E. (1995): Incidence of testicular mononuclear cell infiltrates in normal human males and in patients with germ cell neoplasia. In: *Int J Androl* 18 (6), S. 313–320. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1995.tb00568.x.
- Javadpour, N.; McIntire, K. R.; Waldmann, T. A. (1978): Human chorionic gonadotropin (HCG) and alpha-fetoprotein (AFP) in sera and tumor cells of patients with testicular seminoma. A prospective study. In: *Cancer* 42 (6), S. 2768–2772. DOI: 10.1002/1097-0142(197812)42:6<2768::AID-CNCR2820420636>3.0.CO;2-Z.



Johnson, M. H. (1970): Changes in the blood-testis barrier of the guinea-pig in relation to histological damage following iso-immunization with testis. In: *Reproduction* (22), S. 119–127.

Jørgensen, A.; Nielsen, J. E.; Almstrup, K.; Toft, B. Grønkær; Petersen, B. Laub; Rajpert-De Meyts, E. (2013): Dysregulation of the mitosis-meiosis switch in testicular carcinoma in situ. In: *The Journal of Pathology* 229 (4), S. 588–598. DOI: 10.1002/path.4154.

Juriscic, V.; Radenkovic, S.; Konjevic, G. (2015): The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. In: *Advances in Cancer Biomarkers: Springer, Dordrecht*, S. 115–124. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7215-0\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7215-0_8).

Kanetsky, P. A.; Mitra, N.; Vardhanabhuti, S.; Li, M.; Vaughn, D. J.; Letrero, R. et al. (2009): Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. In: *Nat Genet* 41 (7), S. 811–815. DOI: 10.1038/ng.393.

Kanetsky, P. A.; Mitra, N.; Vardhanabhuti, S.; Vaughn, D. J.; Li, M.; Ciosek, S. L. et al. (2011): A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility. In: *Human molecular genetics* 20 (15), S. 3109–3117. DOI: 10.1093/hmg/ddr207.

Klein, B.; Hagganey, T.; Fietz, D.; Indumathy, S.; Loveland, K. L.; Hedger, M. et al. (2016): Specific immune cell and cytokine characteristics of human testicular germ cell neoplasia. In: *Human Reproduction* 31 (10), S. 2192–2202.

Klein, E. A. (1993): Tumor markers in testis cancer. In: *The Urologic clinics of North America* 20 (1), S. 67–73. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7679533/>.

Kliesch, S.; Schmidt, S.; Wilborn, D.; Aigner, C.; Albrecht, W.; Bedke, J. et al. (2021): Management of Germ Cell Tumours of the Testis in Adult Patients. German Clinical Practice Guideline Part I: Epidemiology, Classification, Diagnosis, Prognosis, Fertility Preservation, and Treatment Recommendations for Localized Stages. In: *Urol Int* 105 (3-4), S. 169–180. DOI: 10.1159/000510407.

Konrad, L.; Albrecht, M.; Renneberg, H.; Aumüller, G. (2000): Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. In: *Endocrinology* 141 (10), S. 3679–3686. DOI: 10.1210/endo.141.10.7728.

La Vecchia, C.; Bosetti, C.; Lucchini, F.; Bertuccio, P.; Negri, E.; Boyle, P.; Levi, F. (2010): Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975.

In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 21 (6), S. 1323–1360. DOI: 10.1093/annonc/mdp530.

Lanzavecchia, A. (1985): Antigen-specific interaction between T and B cells. In: *Nature* 314 (6011), S. 537–539. DOI: 10.1038/314537a0.

Lewis-Jones, D. I.; Richards R. C.; Lynch, R. V. (1987): Immunocytochemical localisation of the antibody which breaches the blood-testis barrier in sympathetic orchioepithelia. In: *Br J Urol* (59), S. 452–457.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. In: *METHODS* (25), S. 402–408.

Lotti, F.; Maggi, M. (2015): Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. In: *Hum Reprod Update* 21 (1), S. 56–83. DOI: 10.1093/humupd/dmu042.

Loveland, K. L.; Klein, B.; Poeschl, D.; Indumathy, S.; Bergmann, M.; Loveland, B. E. et al. (2017): Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. In: *Front. Endocrinol.* 8, S. 307. DOI: 10.3389/fendo.2017.00307.

Loy, V.; Wigand, I.; Dieckmann, K. P. (1990): Incidence and distribution of carcinoma in situ in testes removed for germ cell tumour: possible inadequacy of random testicular biopsy in detecting the condition. In: *Histopathology* 16 (2), S. 198–200. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1990.tb01093.x.

Mancini, M.; Carmignani, L.; Gazzano, G.; Sagone, P.; Gadda, F.; Bosari, S. et al. (2007): High prevalence of testicular cancer in azoospermic men without spermatogenesis. In: *Hum Reprod* 22 (4), S. 1042–1046. DOI: 10.1093/humrep/del500.

Marshall, A.; Dayan, A. (1964): AN IMMUNE REACTION IN MAN AGAINST SEMINOMAS, DYSGERMINOMAS, PINEALOMAS, AND THE MEDIASTINAL TUMOURS OF SIMILAR HISTOLOGICAL APPEARANCE? In: *Lancet (London, England)* 284 (7369), S. 1102–1104. DOI: 10.1016/s0140-6736(64)92618-2.

Martin, F. C.; Conduit, C.; Loveland, K. L.; Thomas, B.; Lewin, J.; Tran, B. (2022): Genetics of testicular cancer: a review. In: *Current opinion in urology* 32 (5), S. 481–487. DOI: 10.1097/MOU.0000000000001017.

Mather, J. P.; Attie, K. M.; Woodruff, T. K.; Rice, G. C.; Phillips, D. M. (1990): Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. In: *Endocrinology* 127 (6), S. 3206–3214. DOI: 10.1210/endo-127-6-3206.

Mathers, M. J.; Sperling, H.; Rübber, H.; Roth, S. (2009): The undescended testis: diagnosis, treatment and long-term consequences. In: *Deutsches Arzteblatt international* 106 (33), S. 527–532. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0527.

Matson, C. K.; Murphy, M. W.; Sarver, A. L.; Griswold, M. D.; Bardwell, V. J.; Zarkower, D. (2011): DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. In: *Nature* 476 (7358), S. 101–104. DOI: 10.1038/nature10239.

Mauduit, C.; Hamamah, S.; Benahmed, M. (1999): Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. In: *Human Reproduction Update* (5), S. 535–545.

Meinhardt, A. (1996): Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. In: *Endocrinology* 137 (11), S. 5090–5095. DOI: 10.1210/en.137.11.5090.

Meinhardt, A.; Bacher, M.; Metz, C.; Bucala, R.; Wreford, N.; Lan, H. et al. (1998): Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. In: *Biol Reprod* 59 (2), S. 371–378. DOI: 10.1095/biolreprod59.2.371.

Meinhardt, A.; Dejucq-Rainsford, N.; Bhushan, S. (2022): Testicular macrophages: development and function in health and disease. In: *Trends in Immunology* 43 (1), S. 51–62. DOI: 10.1016/j.it.2021.11.003.

Meinhardt, A.; McFarlane, J. R.; Seitz, J.; Kretser, D. M. de (2000): Activin maintains the condensed type of mitochondria in germ cells. In: *Molecular and cellular endocrinology* 168 (1-2), S. 111–117. DOI: 10.1016/S0303-7207(00)00308-7.

Melchior, D.; Hammer, P.; Fimmers, R.; Schüller, H.; Albers, P. (2001): Long term results and morbidity of paraaortic compared with paraaortic and iliac adjuvant radiation in clinical stage I seminoma. In: *Anticancer research* 21 (4B), S. 2989–2993. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11712799/>.

Midzak, A. S.; Chen, H.; Papadopoulos, V.; Zirkin, B. R. (2009): Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. In: *Molecular and cellular endocrinology* 299 (1), S. 23–31. DOI: 10.1016/j.mce.2008.07.016.

Moch, H.; Amin, M. B.; Berney, D. M.; Compérat, E. M.; Gill, A. J.; Hartmann, A. et al. (2022): The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. In: *EUR* 82 (5), S. 458–468. DOI: 10.1016/j.eururo.2022.06.016.

Moch, H.; Cubilla, A. L.; Humphrey, P. A.; Reuter, V. E.; Ulbright, T. M. (2016): The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital

Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. In: *European urology* (70), S. 93–105.

Møller, H.; Skakkebaek, N. E. (1999): Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. In: *BMJ* 318 (7183), S. 559–562. DOI: 10.1136/bmj.318.7183.559.

Moul, J. W. (2007): Timely diagnosis of testicular cancer. In: *Urologic Clinics of North America* 34 (2), 109-17; abstract vii. DOI: 10.1016/j.ucl.2007.02.003.

Mousset, C. M.; Hobo, W.; Woestenenk, R.; Preijers, F.; Dolstra, H.; van der Waart, A. B. (2019): Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. In: *Cytometry Part A* 95 (6), S. 647–654. DOI: 10.1002/cyto.a.23724.

Mruk, D. D.; Cheng, C. Y. (2004): Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. In: *Endocr Rev* (25), S. 747–806.

Mullaney, B. P.; Skinner, M. K. (1993): Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. In: *Mol Endocrinol* 7 (1), S. 67–76. DOI: 10.1210/mend.7.1.8446109.

Muller, R.; Meinhardt, A. (2005): Macrophage migration inhibitory factor suppresses transforming growth factor-beta2 secretion in cultured rat testicular peritubular cells. In: *Reprod Fertil Dev* (17), S. 435–438.

Murphy, K.; Weaver, C. (2018): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl. Berlin: Springer Spektrum.

Nakanoma, T.; Nakamura, K.; Deguchi, N.; Fujimoto, J.; Tazaki, H.; Hata, J. (1992): Immunohistological analysis of tumour infiltrating lymphocytes in seminoma using monoclonal antibodies. In: *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology* 421 (5), S. 409–413. DOI: 10.1007/BF01606913.

Nestler, T.; Dalvi, P.; Haidl, F.; Wittersheim, M.; Brandenstein, M. von; Paffenholz, P. et al. (2022): Transcriptome analysis reveals upregulation of immune response pathways at the invasive tumour front of metastatic seminoma germ cell tumours. In: *Br J Cancer* 126 (6), S. 937–947. DOI: 10.1038/s41416-021-01621-5.

Nwabuobi, C.; Arlier, S.; Schatz, F.; Guzeloglu-Kayisli, O.; Lockwood, C. Joseph; Kayisli, U. Ali (2017): hCG: Biological Functions and Clinical Applications. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10), S. 2037. DOI: 10.3390/ijms18102037.

O'Donnell, L.; Rebourcet, D.; Dagley, L. F.; Sgaier, R.; Infusini, G.; O'Shaughnessy, P. J. et al. (2021): Sperm proteins and cancer-testis antigens are released by the seminiferous tubules in mice and men. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (3), e21397. DOI: 10.1096/fj.202002484R.

Okuda, Y.; Sun, X. R.; Morris, P. L. (1994): Interleukin-6 (IL-6) mRNAs expressed in Leydig and Sertoli cells are regulated by cytokines, gonadotropins and neuropeptides. In: *Endocrine J* (2), S. 617–624.

Oldenburg, J.; Berney, D. M.; Bokemeyer, C.; Climent, M. A.; Daugaard, G.; Gietema, J. A. et al. (2022): Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of Oncology* 33 (4), S. 362–375. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.01.002.

Oosterhuis, J. W.; Castedo, S. M.; Jong, B. de; Cornelisse, C. J.; Dam, A.; Sleijfer, D. T.; Schraffordt Koops, H. (1989): Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 60 (1), S. 14–21.

Panwar, M.; Kumari, A.; Hp, A.; Arora, R.; Singh, V.; Bansawal, R. (2019): Raised neutrophil lymphocyte ratio and serum beta hCG level in early second trimester of pregnancy as predictors for development and severity of preeclampsia. In: *DD&T* 13 (1), S. 34–37. DOI: 10.5582/ddt.2019.01006.

Parvinen, M.; Söder, O.; Mali, P.; Fröysa, B.; Ritzén, E. M. (1991): In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. In: *Endocrinology* 129 (3), S. 1614–1620. DOI: 10.1210/endo-129-3-1614.

Passek, K.; Ohlendorf, D.; Bundschuh, M.; Bendels, M. H. K.; Oremek, G. M.; Quarcoo, D. (2018): Der Tumormarker AFP. In: *Zbl Arbeitsmed* 68 (3), S. 157–160. DOI: 10.1007/s40664-017-0260-7.

Patrikidou, A.; Cazzaniga, W.; Berney, D.; Boormans, J.; Angst, I. de; Di Nardo, D. et al. (2023): European Association of Urology Guidelines on Testicular Cancer: 2023 Update. In: *EUR*. DOI: 10.1016/j.eururo.2023.04.010.

Pilatz, A.; Wagenlehner, F.; Bschleipfer, T.; Schuppe, H.-C.; Diemer, T.; Linn, T. et al. (2013): Acute epididymitis in ultrasound: results of a prospective study with baseline and follow-up investigations in 134 patients. In: *European Journal of Radiology* 82 (12), e762-8. DOI: 10.1016/j.ejrad.2013.08.050.

Piquet-Pellorce, C.; Dorval-Coiffec, I. (2000): Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis. In: *Endocrinology* (141), S. 1136–1141.

Pleskacova, J.; Hersmus, R.; Oosterhuis, J. W.; Setyawati, B. A.; Faradz, S. M.; Cools, M. et al. (2010): Tumor risk in disorders of sex development. In: *SXD* 4 (4-5), S. 259–269. DOI: 10.1159/000314536.

Pollanen, P.; Niemi, M. (1987): Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. In: *Int J Androl* (10), S. 37–42.

Ponte, R.; Dupuy, F. P.; Brimo, F.; Mehraj, V.; Brassard, P.; Belanger, M. et al. (2018): Characterization of myeloid cell populations in human testes collected after sex reassignment surgery. In: *J Reprod Immunol* 125, S. 16–24. DOI: 10.1016/j.jri.2017.10.043.

Raghavan, D. (2003): Testicular cancer: maintaining the high cure rate. In: *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 17 (2), 218-28; discussion 228-9, 234-5, passim. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12632864/>.

Rajpert-De Meyts, E. (2006): Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. In: *Hum Reprod Update* 12 (3), S. 303–323. DOI: 10.1093/humupd/dmk006.

Rajpert-De Meyts, E.; McGlynn, K. A.; Okamoto, K.; Jewett, M. A. S.; Bokemeyer, C. (2016): Testicular germ cell tumours. In: *The Lancet* 387 (10029), S. 1762–1774. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00991-5.

Rajpert-De Meyts, E.; Skakkebaek, N. E.; Toppari, J. (2018): Testicular Cancer Pathogenesis, Diagnosis and Endocrine Aspects. In: *NCBI Bookshelf*.

Ramaswamy, S.; Weinbauer, G. F. (2014): Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. In: *Spermatogenesis* 4 (2), e996025. DOI: 10.1080/21565562.2014.996025.

Ramos-Vara, J. A. (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. In: *Veterinary pathology* 42 (4), S. 405–426. DOI: 10.1354/vp.42-4-405.

Rapley, E. A.; Turnbull, C.; Al-Olama, A. A.; Dermitzakis, E. T.; Linger, R.; Huddart, R. A. et al. (2009): A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. In: *Nature Genetics* 41 (7), S. 807–810.

Richiardi, L.; Pettersson, A.; Akre, O. (2007): Genetic and environmental risk factors for testicular cancer. In: *Int J Androl* 30 (4), 230-40; discussion 240-1. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00760.x.

- Richie, J. P.; Birnholz, J.; Garnick, M. B. (1982): Ultrasonography as a diagnostic adjunct for the evaluation of masses in the scrotum. In: *Surgery, gynecology & obstetrics* 154 (5), S. 695–698. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7071705/>.
- Ruark, E.; Seal, S.; McDonald, H.; Zhang, F.; Elliot, A.; Lau, K. et al. (2013): Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. In: *Nat Genet* 45 (6), S. 686–689. DOI: 10.1038/ng.2635.
- Saari, T.; Jahnukainen, K.; Pöllänen, P. (1996): Autoantigenicity Autoantigenicity of the basal compartment of seminiferous tubules in the rat. In: *J Reprod Immunol* (31), S. 65–79.
- Sakai, Y.; Hoshino, H.; Kitazawa, R.; Kobayashi, M. (2014): High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma. In: *Andrology* 2 (2), S. 282–289. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00192.x.
- Schünke et al. (2017): Prometheus: Innere Organe. 4. Aufl.: Thieme.
- Schuppe, H.-C.; Bergmann, M. (2013): Inflammatory Conditions of the Testis. In: Atlas on the Human Testis: Springer, London, S. 113–121. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4471-2763-5\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4471-2763-5_9).
- Schuppe, H.-C.; Meinhardt, A. (2005): Immune privilege and inflammation of the testis. In: *Chemical Immunology and Allergy* (88), S. 1–14.
- Schuppe, H.-C.; Meinhardt, A.; Allam, J. P.; Bergmann, M.; Weidner, W.; Haidl, G. (2008): Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? In: *Andrologia* 40 (2), S. 84–91. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x.
- Schuppe, H.-C.; Monika, F.; Fietz, D.; Meinhardt, A. (2023): Immunologie des männlichen Reproduktionstrakts. In: W. Würfel (Hg.): Reproduktionsimmunologie. 1. Auflage.
- Seidel, C.; Daugaard, G.; Nestler, T.; Tryakin, A.; Fedyanin, M.; Fankhauser, C. et al. (2020): Human chorionic gonadotropin-positive seminoma patients: A registry compiled by the global germ cell tumor collaborative group (G3). In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 132, S. 127–135. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.03.022.
- Sharda, P.; Shruthy, R.; K Priya, N.; Hostur, S.; Kumar Jali, P. (2021): Basic principles of immunohistochemistry and epithelial immunohistochemical markers. In: *ACHR* 6 (1), S. 1–6. DOI: 10.18231/j.achr.2021.001.

- Siska, P. J.; Johnpulle, R. A. N.; Zhou, A.; Bordeaux, J.; Kim, J. Young; Dabbas, B. et al. (2017): Deep exploration of the immune infiltrate and outcome prediction in testicular cancer by quantitative multiplexed immunohistochemistry and gene expression profiling. In: *Oncoimmunology* 6 (4), e1305535. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1305535.
- Skakkebaek, N. E.; Rajpert-De Meyts, E.; Buck Louis, G. M.; Toppari, J.; Andersson, A.-M.; Eisenberg, M. L. et al. (2016): Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. In: *Physiological reviews* 96 (1), S. 55–97. DOI: 10.1152/physrev.00017.2015.
- Skakkebaek, N. E.; Rajpert-De Meyts, E.; Main, K. M. (2001): Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. In: *Hum Reprod* 16 (5), S. 972–978. DOI: 10.1093/humrep/16.5.972.
- Slavis, S. A.; Scholz, J. N.; Hewitt, C. W.; Black, K. S.; Campbell, R. S.; Mayuri, P. et al. (1990): The effects of testicular trauma on fertility in the Lewis rat and comparisons to isoimmunized recipients of syngeneic sperm. In: *Journal of Urology* (143), S. 638–641.
- Sorokin, I.; Welliver, C.; Elebyjian, L.; Feustel, P. J.; McCullough, A. (2015): Interinstitutional variability in testicular volumes and varicocele presence by ultrasound: surprising discrepancies and implications for clinical decision making. In: *Urology* 85 (5), S. 1079–1084. DOI: 10.1016/j.urology.2015.02.018.
- Svechnikov, K. V.; Sultana, T.; Söder, O. (2001): Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. In: *Mol. Cell Endocrinol.* (182), S. 193–201.
- Swerdlow, A. J.; Stavola, B. L. de; Swanwick, M. A.; Maconochie, N. E.S. (1997): Risks of breast and testicular cancers in young adult twins in England and Wales: evidence on prenatal and genetic aetiology. In: *The Lancet* 350 (9093), S. 1723–1728. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)05526-8.
- Tabernero, J.; Paz-Ares, L.; Salazar, R.; Lianes, P.; Guerra, J.; Borrás, J. et al. (2004): Incidence of contralateral germ cell testicular tumors in South Europe: report of the experience at 2 Spanish university hospitals and review of the literature. In: *The Journal of urology* 171 (1), S. 164–167. DOI: 10.1097/01.ju.0000099893.79138.55.
- Taylor, C. R.; Levenson, R. M. (2006): Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. In: *Histopathology* 49 (4), S. 411–424. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x.



- Trabert, B.; Zugna, D.; Richiardi, L.; McGlynn, K. A.; Akre, O. (2013): Congenital malformations and testicular germ cell tumors. In: *International Journal of Cancer* 133 (8), S. 1900–1904. DOI: 10.1002/ijc.28207.
- Tung, K. S.; Harakal, J.; Qiao, H.; Rival, C.; Li, J. C.; Paul, A. G. et al. (2017): Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. In: *Journal of Clinical Investigation* (40), S. 105–112.
- Turksen, K.; Troy, T. C. (2004): Barriers built on claudins. In: *J Cell Sci* (117), S. 2435–2447.
- Turnbull, C.; Rapley, E. A.; Seal, S.; Pernet, D.; Renwick, A.; Hughes, D. et al. (2010): Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. In: *Nat Genet* 42 (7), S. 604–607. DOI: 10.1038/ng.607.
- Varghese, F.; Bukhari, A. B.; Malhotra, R.; De, A. (2014): IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. In: *PLOS ONE* 9 (5), e96801. DOI: 10.1371/journal.pone.0096801.
- Vermeulen, A.; Verdonck, L.; Kaufman, J. M. (1999): A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84 (10), S. 3666–3672. DOI: 10.1210/jcem.84.10.6079.
- Wang, M.; Fijak, M.; Hossain, H.; Markmann, M.; Nusing, R. M.; Lochnit, G.; Hartmann, M. F. (2017): Characterization of the micro-environment of the testis that shapes the phenotype and function of testicular macrophages. In: *Journal of Immunology* (198).
- Weissbach, L.; Bussar-Maatz, R.; Löhrs, U.; Schubert, G. E.; Mann, K.; Hartmann, M. et al. (1999): Prognostic factors in seminomas with special respect to HCG: results of a prospective multicenter study. Seminoma Study Group. In: *European urology* 36 (6), S. 601–608. DOI: 10.1159/000020055.
- Welsch et al. (2014): Lehrbuch Histologie. 4. Aufl.: Urban & Fischer.
- Wennemuth, G.; Aumüller, G.; Bacher, M.; Meinhardt, A. (2000): Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca(2+) response in rat testicular peritubular cells. In: *Biol Reprod* 62 (6), S. 1632–1639. DOI: 10.1095/biolreprod62.6.1632.
- Wilfinger, W. W.; Mackey, K.; Chomczynski, P. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. In: *BioTechniques* 22 (3), 474-6, 478-81. DOI: 10.2144/97223st01.

Wilke, C. Moira; Wu, K.; Zhao, E.; Wang, G.; Zou, W. (2010): Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. In: *International Journal of Cancer* 127 (4), S. 748–758. DOI: 10.1002/ijc.25464.

Willis, S. N.; Mallozzi, S. S.; Rodig, S. J.; Cronk, K. M.; McArdel, S. L.; Caron, T. et al. (2009): The microenvironment of germ cell tumors harbors a prominent antigen-driven humoral response. In: *The Journal of Immunology* 182 (5), S. 3310–3317. DOI: 10.4049/jimmunol.0803424.

Winter, C.; Albers, P. (2011): Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: *Nat Rev Endocrinol* 7 (1), S. 43–53. DOI: 10.1038/nrendo.2010.196.

Wistuba, J.; Neuhaus, N.; Nieschlag, E. (2021): Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie*: Springer, Berlin, Heidelberg, S. 1–44. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-61904-9\\_2-1](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-61904-9_2-1).

World Health Organization (2010): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization (Nonserial Publications). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=684674>.

Xavier, R.; Carvalho, R. Cristina de; Fraietta, R. (2021): Semen quality from patients affected by seminomatous and non-seminomatous testicular tumor. In: *Int. braz j urol.* 47 (3), S. 495–502. DOI: 10.1590/s1677-5538.ibju.2021.99.01.

Xiong, Y.; Hales, D. B. (1993): The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. In: *Endocrinology* 132 (6), S. 2438–2444. DOI: 10.1210/endo.132.6.8504748.

Xu, W.; Liu, H.; Song, J.; Fu, H.-X.; Qiu, L.; Zhang, B.-F. et al. (2013): The appearance of Tregs in cancer nest is a promising independent risk factor in colon cancer. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 139 (11), S. 1845–1852. DOI: 10.1007/s00432-013-1500-7.

Yilmaz, A.; Cheng, T.; Zhang, J.; Trpkov, K. (2013): Testicular hilum and vascular invasion predict advanced clinical stage in nonseminomatous germ cell tumors. In: *Mod Pathol* 26 (4), S. 579–586. DOI: 10.1038/modpathol.2012.189.

Yule, T. D.; Montoya, G. D.; Russell, L. D.; Williams, T. M. (1988): Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. In: *Journal of Immunology* (141), S. 1161–1167.

Znaor, A.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A.; Bray, F. (2014): International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. In: *European urology* 65 (6), S. 1095–1106. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.11.004.

## 12. Anhang

### 12.1 Materialliste

#### 12.1.1 HE-Färbung/Immunhistochemie: Chemikalien, Antikörper, Puffer und Lösungen

Tabelle 21: Verwendete Chemikalien für die HE-Färbung und Immunhistochemie.

Produkt	Hersteller
Ethanol ROTIPURAN <sup>®</sup> , ≥99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Xylene ROTIPURAN <sup>®</sup> , ≥99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TrisBASE	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
BSA, Albumin fraction V, ≥98 %	Merck, Darmstadt, Germany
Haematoxylin nach Mayer	Morphisto GmbH, Frankfurt a.M., Germany
Eosin G-Lösung, 1%	Morphisto GmbH, Frankfurt a.M., Germany
Roti-Mount Aqua <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Eukitt <sup>®</sup>	Fluka Analytical
NovaRed Peroxidase Substrate Kit <sup>®</sup>	Vector Laboratories (Maravai Life Sciences), Burlingame, CA, USA
AEC Peroxidase Substrate Kit <sup>®</sup>	Vector Laboratories (Maravai Life Sciences), Burlingame, CA, USA

10x Tris-Puffer-Lösung:

60,5 g TrisBASE werden in circa 900 ml destilliertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7,6 justiert. Mit destilliertem Wasser wird anschließend auf 1 l aufgefüllt, 90 g NaCl hinzugefügt und der pH-Wert erneut kontrolliert.

1x Tris-Puffer-Lösung:

100 ml 10x Tris-Puffer-Lösung werden mit 900 ml destilliertem Wasser versetzt und 1000 µl Triton mithilfe eines Magnetrührers hinzugefügt.

Tris-EDTA:

25 ml 20x Tris-Puffer-Lösung werden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und auf einem Magnetrührer mit 250 µl Triton versetzt.

Wasserstoffperoxid-Lösung:

6 ml 30% Wasserstoffperoxid werden mit 54 ml 1x Tris-Puffer versetzt.

Bovines Serum-Albumin, 1,5%:

1g bovines Serum-Albumin wird mit 70 ml 1x Tris-Puffer-Lösung in einem Magnetrührer vermischt.

### 12.1.2 RNA-Extraktion

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien zur RNA-Extraktion

Produkt	Hersteller
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Ambion, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Germany
2-Propanolol, ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethanol 70 %	
SDS-Lösung 1 %	

### 12.1.3 DNase-Behandlung und reverse Transkription: Chemikalien und Thermoprotokolle

Tabelle 23: Chemikalien der DNase-Behandlung

Produkt	Hersteller
DNase I, recombinant 10 U	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
25mM MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DNase buffer	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
RNase inhibitor, 40U	Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 24: Thermoprotokoll der DNase-Behandlung

Temperatur (in °C)	Dauer (in min)	Funktion
37	25:00	Arbeitstemperatur DNase
75	5:00	Deaktivierung und Abbau DNase

Tabelle 25: Chemikalien der reversen Transkription

Produkt	Hersteller
10x PCR buffer GOLD	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
dNTP	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
25mM MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
50µM Random Hexamers	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase inhibitor, 20U	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MultiScribe® Reverse transcriptase, 50U	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNA-free water	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

Tabelle 26: Thermoprotokoll der reversen Transkription

Temperatur (in °C)	Dauer (in min)
21	8:00
42	15:00
99	5:00
5	5:00
4	Pause

### 12.1.4 RT-PCR zur Qualitätskontrolle und Gelelektrophorese: Chemikalien und Thermoprotokolle

Tabelle 27: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der RT-PCR

Produkt	Hersteller
10x PCR buffer GOLD	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
dNTP	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
25mM MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GAPDH Primer Forward/Reverse	Siehe Abschnitt 3.2.3
AmpliTaq GOLD DNA polymerase, 5U	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Steriles, bidestilliertes Wasser	

Tabelle 28: Thermoprotokoll der Kontroll-RT-PCR

Temperatur (in °C)	Dauer (in min)
95	09:00
94	00:40
60	00:40
72	0:40
72	7:00
4	Pause



Tabelle 29: Chemikalien und Verbrauchsmaterial der Gelelektrophorese

Produkt	Hersteller
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany
TAE Puffer (1x)	
GelGreen Nucleid Acid Stain	Biotium, Hayward, CA, USA
Gel loading dye purple	New England Biolabs, Ipswich, Boston, MA, USA
Ladepuffer	
50bp-Marker	

### 12.1.5 qRT-PCR mit Berechnung der relativen Genexpression: Verbrauchsmaterial und Thermoprotokoll

Tabelle 30: Verbrauchsmaterial der qRT-PCR

Produkt	Hersteller
TaqMan® Gene Expression Master Mix	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Steriles, bidestilliertes Wasser	

Tabelle 31: Thermoprotokoll der qRT-PCR

Temperatur (in °C)	Dauer (in min)
95	10:00
95	00:15
60	01:00

39x

## 12.1.6 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 32: Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien (Übersicht)

Produkt	Hersteller
CFX96TM RealTime Cyclers	Bio-Rad, Munich, Germany
CFX Manager Software	Bio-Rad, Munich, Germany
SPSS Statistics 27	IBM®, Armonk, USA
Prism 9	GraphPad Software, Boston, USA
Centrifuge MICRO 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
Centrifuge MIRCO 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
Hard-Shell PCR Plates 96-well, thin wall	Bio-Rad, Munich, Germany
Filter tips	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Germany
IKA® T-10 basic Ultra Turrax Homogenizer	IKA® Werke GmbH & CO. KG, Staufen Germany
Microscope Leica® DM750	Leica, Solms, Germany
Microwave oven, CB 1273	Bomann, Kempen, Germany
PCR tubes	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Germany
Sliding microtome, Leica SM2000 R	Leica, Solms, Germany
Histobond adhesive microscope slides	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany
T Professional Trio Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Transilluminator UVsolo	Biometra GmbH, Göttingen, Germany
Transilluminator UVIdoc	Biometra GmbH, Göttingen, Germany

### 13. Publikationsverzeichnis

Islam, R.; Heyer, J.; Figura, M.; Nathaniel, B.; Indumathy, S.; Hartmann, K.; Pleuger, C.; Fijak, M.; Kliesch, S.; Dittmar, F.; Pilatz, A.; Wagenlehner, F.; Hedger, M.; Loveland, B.; Guo, J.; Loveland, K.; Schuppe, H.-C.; Fietz, D. (2023): T cells in testicular germ cell tumors: New evidence of functional contributions by rare subsets. **Journal-Beitrag**. In Vorbereitung.

09/2022: **Präsentation** „Immune characteristics of testicular germ cell tumors: A comparative study of seminoma and embryonal carcinoma“ auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Andrologie

12/2020: **Abstract** „Immunopathology of Testicular Germ Cell Tumors-a clinical approach“, Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, Supplementum 01/2020; Krause & Pacherneegg-Verlag

12/2020: **Poster** „Immunopathology of Testicular Germ Cell Tumors-a clinical approach“ auf dem internationalen Andrologie-Kongress: „Andrology 2020“

#### **14. Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

## **15. Danksagung**

Zum Abschluss möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Hans-Christian Schuppe und Frau Prof. Dr. Daniela Fietz, die mir die Mitarbeit im IRTG-Projekt „Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders“ der Justus-Liebig-Universität Gießen ermöglicht haben und mich exzellent betreut haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Schuppe für sein kritisches Auge in Poster- und Labor-Präsentationen, Abstract-Veröffentlichungen sowie für sein immenses Fachwissen, das mir viel Inspiration für die Literaturrecherche vermittelt hat. Auch die Gelegenheit in seiner andrologischen Sprechstunde im Universitätsklinikum Gießen zu hospitieren, werde ich dankend in Erinnerung behalten.

Frau Prof. Fietz danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung bei labormethodischen Fragestellungen, ihr offenes Ohr und die familiäre Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe. Sie hat mich stets motiviert meine Arbeit fortzusetzen, auch wenn der Weg an einigen Tagen steinig gewesen sein sollte.

Herrn Prof. Dr. Adrian Pilatz und Herrn Dr. Florian Dittmar danke ich für ihre konsequente Betreuung hinsichtlich klinischer und statistischer Fragestellungen.

Frau Dr. Anita Windhorst danke ich für ihre statistische Expertise und Beratung rund um das Thema SPSS®.

Herrn Dr. Rashidul Islam, Frau Shashika Kothalawala und Frau Miriam Figura danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und freundschaftlichen Zusammenhalt im Labor.

Bei Frau Dr. Katja Hartmann und Frau Alexandra Hax möchte ich mich herzlich für ihre Geduld und Einweisungen in laborchemische Methoden bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. Kate Loveland und Herrn Prof. Bruce Loveland, die mit ihrer Kritik, ihren Wünschen und Anregungen stets zur Projektentwicklung beigetragen haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, Detlef, Sabine und Jette Heyer, Traute und Günter Seefuss, Heinz Bullwinkel und all meinen Freunden danken, ohne die mein Studium in Gießen nicht möglich gewesen wäre.