

**Die Expression von Cyclin D2 in männlichen Keimzellen  
normaler und pathologischer Differenzierung**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
**GERD SCHAUMBURG**  
aus Bad Wildungen

Gießen 2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. K. Steger

Mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. W. Weidner

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. K. Steger

2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Middendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2016

**Für Petti**

**As the seed is within the banyan tree, and within the seed are the flowers, the fruits, and the shade: So the germ is within the body, and within that germ is the body again.**

Alte indische Weisheit

# Inhaltsverzeichnis

		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellungen.....</b>	<b>1-3</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>4-18</b>
2.1	Histologie des Hodens.....	4
2.2	Normale Spermatogenese.....	5
2.3	Hodentumore und Tumorgenese.....	7
2.4	Zellzyklus und Regulation des Zellwachstums.....	11
2.5	Expression und Funktion von Cyclin D2 im Hoden.....	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19-46</b>
<b>3.1</b>	<b>Material/ Gewebe.....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Humanes Hodengewebe.....	19
3.1.2	Klinische Daten.....	19
3.1.3	Gefriermaterial.....	19
3.1.4	Paraffinmaterial.....	21
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.2.1	Immunhistochemie.....	25
3.2.1.1	Nachweis von CIS-Zellen an Paraffinmaterial.....	26
3.2.1.2	Nachweis von CIS-Zellen an Gefriermaterial.....	29
3.2.1.3	Nachweis von Cyclin D2 an Paraffinmaterial.....	30
3.2.1.4	Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion.....	32
3.2.2	Western Blot.....	33
3.2.3	<i>In-situ</i> Hybridisierung.....	36
3.2.4	Laser Cell Mikrodisektion (LCMD) und Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion.....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47-53</b>
4.1	Immunhistochemie.....	47
4.1.1	Nachweis von testikulären CIS-Zellen.....	47
4.1.2	Nachweis von Cyclin D2 Protein in CIS-Zellen.....	48
4.1.3	Nachweis von Cyclin D2 Protein in Tumorzellen.....	49

	Seite
4.2	Western Blot..... 50
4.3	In Situ Hybridisierung..... 51
4.3.1	Nachweis von Cyclin D2 mRNA in CIS-Zellen..... 51
4.3.2	Nachweis von Cyclin D2 mRNA in Tumorzellen..... 52
4.4	Laser Cell Mikrodisektion und Reverse Transkriptase Polymere- sekettenreaktion..... 53
<b>5</b>	<b>Diskussion..... 54-58</b>
5.1	Erhöhtes Cyclin D2 Protein in präinvasiven CIS- und malignen Tumorzellen..... 54
5.2	Expression von Cyclin D2 Protein im normalen adulten humanen Hoden..... 55
5.3	Vorkommen von Cyclin D2 mRNA im Verlauf der Spermatogene- se..... 56
5.4	Schlussfolgerungen..... 58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung..... 60</b>
<b>7</b>	<b>Summary..... 61</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis..... 62-71</b>
<b>9</b>	<b>Anhang..... 72-86</b>
9.1	Abkürzungen..... 72
9.2	Zusammensetzung der Fixierlösungen..... 75
9.3	Lösungen für Western Blot..... 76
9.4	Lösungen für in situ Hybridisierung..... 77
9.5	Bezugsquellen..... 78
9.6	Lebenslauf..... 82
9.7	Danksagungen..... 85
9.8	Erklärung zur Dissertation..... 86

## 1. Einleitung und Fragestellungen

Hodentumore sind die häufigsten malignen Neoplasien bei Männern zwischen 20 und 40 Jahren und weisen in westlichen Industrieländern eine steigende Inzidenz auf (McKierman et al. 1999, Chaganti et al. 2000).

Einen wesentlichen Fortschritt im wissenschaftlichen Verständnis der Hodentumoren erzielte Skakkebaek (1972). Er beobachtete in Hodenbiopsien von unfruchtbaren Männern, die später Keimzelltumoren entwickelten, ungewöhnliche Keimzellen, die er für präinvasive Vorstufen von testikulären Keimzelltumoren hielt und sie deshalb Carcinoma *in situ* bzw. CIS-Zellen nannte (Skakkebaek 1972), auch bekannt als TIN (testicular intraepithelial neoplasia). Sowohl die morphologische Ähnlichkeit von CIS-Zellen und den fetalen Vorläufern männlicher Keimzellen, den Gonozyten, als auch gemeinsame Oberflächenproteine und Regulationsfaktoren des Zellzykluses ließen vermuten, dass CIS-Zellen aus Gonozyten entstehen und schon früh im Hoden vorkommen. Inzwischen gilt als gesichert, dass sich maligne Hodentumoren (Seminome und Nicht-Seminome) von einer gemeinsamen präinvasiven Läsion, dem CIS, entwickeln (Dieckmann und Skakkebaek, 1999; Rajpert-de Meyts 2006).

Diese CIS-Theorie hat die Früherkennung von Hodentumoren entscheidend verbessert. Seit nunmehr 30 Jahren werden Hodentumore in Risikopatienten über präinvasive CIS-Zellen in Hodenbiopsien früh detektiert. Beim Nachweis von CIS kann der betroffene Hoden lokal bestrahlt und eine nachfolgende Orchiektomie des kontralateralen Hodens wegen sekundärer Neoplasie vermieden werden. Seit kurzem wird versucht, CIS-Zellen im Ejakulat mittels primordialer Keimzell-Marker zu diagnostizieren, um z.B. unfruchtbare Männer auf Keimzelltumoren zu testen (Hoei-Hansen et al. 2007).

Die Entdeckung der Präkanzerose hat auch, wie oben schon erwähnt, zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen im Hinblick auf die testikuläre Tumorgenese geführt. Trotz zahlreicher Studien sind die zur Tumorentstehung führenden molekularbiologischen Mechanismen bis heute nicht vollständig charakterisiert (Rajpert-de Meyts 2006). Die meisten Hodentumoren zeigen mehrere Defekte in der sogenannten Retinoblastoma-Signaltransduktion, die eine wesentliche Rolle in der Zellzyklusregulation spielt, wie z.B. das Herunterregulieren der Expres-

sion des Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins und von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (Bartkova et al. 2003).

Auffällig ist auch die Überexpression von Cyclin D2, die nicht nur in den meisten testikulären Keimzelltumoren (Seminomen, embryonalen Karzinomen und Nichtseminomen), sondern auch in präinvasiven CIS-Läsionen immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Houldsworth et al. 1997, Bartkova et al. 1999, Schmidt et al. 2001).

Die drei D-Cycline (D1, D2 und D3) leiten die mitotische Zellteilung über die Retinoblastoma-Signaltransduktion ein (Wolgemuth et al. 2013). Im Zusammenspiel mit Cyclin-abhängigen Kinasen regulieren sie die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressorproteins und steuern so die Progression der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase. Dazu muss der sogenannte Restriktionspunkt in der G1-Phase überwunden werden. Die Amplifikation des Cyclin D2-Gens und der Nachweis von überexprimiertem Cyclin D2 und Cyclin-abhängiger Kinase 4 auf RNA- und Protein-Ebene in Seminomen und Nicht-Seminomen lassen darauf schließen, dass eine Deregulation des Zellzyklus am Restriktionspunkt eine wichtige Rolle in der frühen Pathogenese testikulärer Keimzelltumoren spielen kann (Chaganti et al. 2000, Schmidt et al. 2001, Jones et al. 2003). Die Bedeutung des Cyclin D2 als Zellzyklus-Regulator in der Tumorgenese geht ebenfalls aus Experimenten mit Inhibin Alpha Knockout Mäusen hervor (Burns et al. 2003).

Dass Cyclin D2 auch für die normale testikuläre Entwicklung essentiell sein könnte, lassen Experimente mit Knock-out Mäusen vermuten, weil Cyclin D2-defiziente männliche Mäuse fruchtbar sind, aber hypoplastische Hoden aufweisen (Sicinski et al. 1996). D-Cycline werden zudem mit spezifischen Funktionen in der Spermatogenese des adulten Hodens in Verbindung gebracht. Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, der die Proliferation der Spermato gonien, die Meiose der Spermatozyten und die Differenzierung der Spermatozoon umfasst (Bergmann, 2005). Dass Cyclin D2 im adulten Hoden der Maus in verschiedenen Reifestadien von Keimzellen exprimiert wird, haben immunhistochemische Studien gezeigt (Beumer et al. 2000), so dass Cyclin D2 neben seiner mitogenen Rolle auch an der Differenzierung bestimmter Entwicklungsstadien und an meiotischen Reifeteilungen im Verlauf der Spermatogenese beteiligt sein könnte. Zur Expression von Cyclin D2 im adulten humanen Hoden liegen kaum Daten vor.

Zudem sind frühere Daten zum Teil widersprüchlich, vermutlich weil das Vorkommen von Cyclin D2 in Entwicklungsstadien von Keimzellen und somatischen Zellen bei immunhistochemischen Methoden unterhalb der Nachweisgrenze liegt (Liao et al. 2004; Diedrichs et al. 2005). Weitere Befunde einer Hochregulation der Cyclin D2 Expression unter Bedingungen einer Wachstumshemmung in humanen und murinen Fibroblasten (Meyyappan et al. 1998) und Untersuchungen am Rattenhoden mit Testosteronentzug (Tan et al. 2005) lassen ebenfalls auf von der Proliferation unabhängige zellspezifische Aufgaben des Cyclin D2 schließen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression und das Vorkommen von Cyclin D2 im adulten humanen Hoden mit hinreichend sensitiven molekularbiologischen Methoden auf Protein- und m-RNA-Ebene eindeutig nachzuweisen und mit der Expression von Cyclin D2 in Carcinoma in situ und testikulären Keimzelltumoren zu vergleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Können Unterschiede in der Expression von Cyclin D2 in verschiedenen testikulären Zellgruppen während der normalen Spermatogenese nachgewiesen werden?
2. Ist die Expression von Cyclin D2 auch im adulten Hoden nachweisbar im Vergleich zu CIS-Zellen und Seminomen?

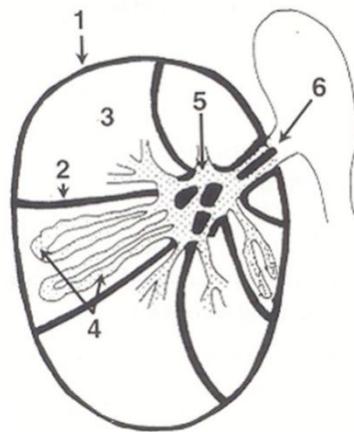
Der Nachweis der Cyclin D2 Expression erfolgte auf m-RNA-Ebene einmal an Hodenhomogenat durch Laser Cell Mikrodisektion (LCMD) und nachfolgende Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und zum anderen am Paraffinschnitt durch *In Situ* Hybridisierung (ISH). Zudem wurde die Cyclin D2 Expression auf Protein-Ebene sowohl an Hodenhomogenat durch einen Western Blot nachgewiesen, als auch am Paraffinschnitt durch Immunhistochemie (IHC).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Histologie des Hodens

Im Hoden werden die männlichen Keimzellen (Spermien) produziert und bereitgestellt sowie die männlichen Geschlechtshormone (Androgene) synthetisiert und sezerniert. Die Spermienproduktion (Spermatogenese) und die Androgensynthese finden in morphologisch und funktionell unterschiedenen Kompartimenten statt, dem tubulären Kompartiment, das die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) enthält, und dem interstitiellen Kompartiment (Interstitium), dem Raum zwischen den Samenkanälchen (Weinbauer et al. 2009; Bergmann, 2006).

Der größte Raum des Hodens wird vom tubulären Kompartiment, den Samenkanälchen oder Keimtubuli, eingenommen. Er wird von radiär verlaufenden Bindegewebssepten in 250 – 350 Lobuli unterteilt (siehe Abb. 1). Zwischen den Septen verlaufen zum Teil stark gewundene Samenkanälchen. Ein gesunder Hoden beinhaltet durchschnittlich 500 – 800 Samenkanälchen. Reife Spermien werden aus dem röhrenförmig angelegten Keimtubulus in ein netzförmiges Gewebe (Rete testis) befördert, das am hinteren Rand des Hodens liegt. Über die Samenleiterchen (Ductuli efferentes) werden die Spermien dem Nebenhoden als physiologischem Speicherorgan zugeführt.

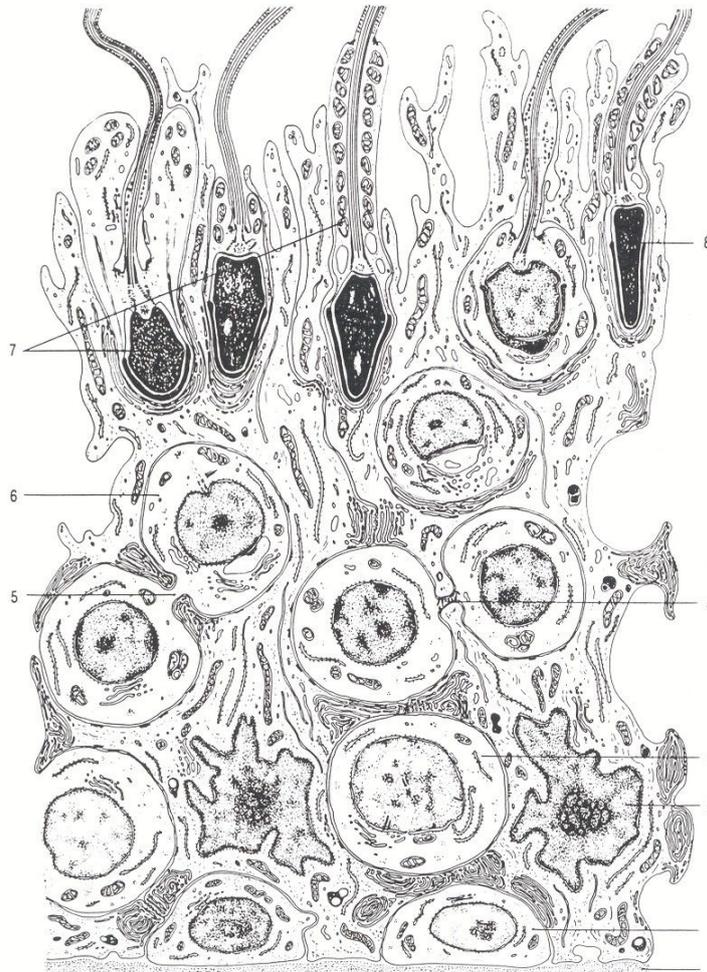


**Abb. 1:** Aufbau des Hodens (modifiziert nach Bergmann und Kliesch 1998a)  
1: Tunica albuginea; 2: Septum; 3: Lobulus testis; 4: Tubuli seminiferi; 5: Rete testis;  
6: Ductuli efferentes

Zwischen den Samenkanälchen liegt das interstitielle Kompartiment. Im Humanhoden befinden sich hier als wichtigster Zelltyp ca. 200 Mio. testosteronproduzierende Leydigzellen (Weinbauer et al. 2009).

## 2.2 Normale Spermatogenese

Die Spermatogenese erfolgt in den Keimtubuli (Samenkanälchen bzw. Tubuli seminiferi), die aus dem innen gelegenen Keimepithel und einer äußeren Wand (Lamina propria) bestehen. Die Lamina propria setzt sich aus überwiegend kontraktilen Zellen (Myofibroblasten) und kollagenen Fasern zusammen (Bergmann 2005). Im Keimepithel liegen Keimzellen verschiedener Reifestadien zwischen somatischen Sertolizellen (Steger 1994; Brehm 2002; Abb. 2).

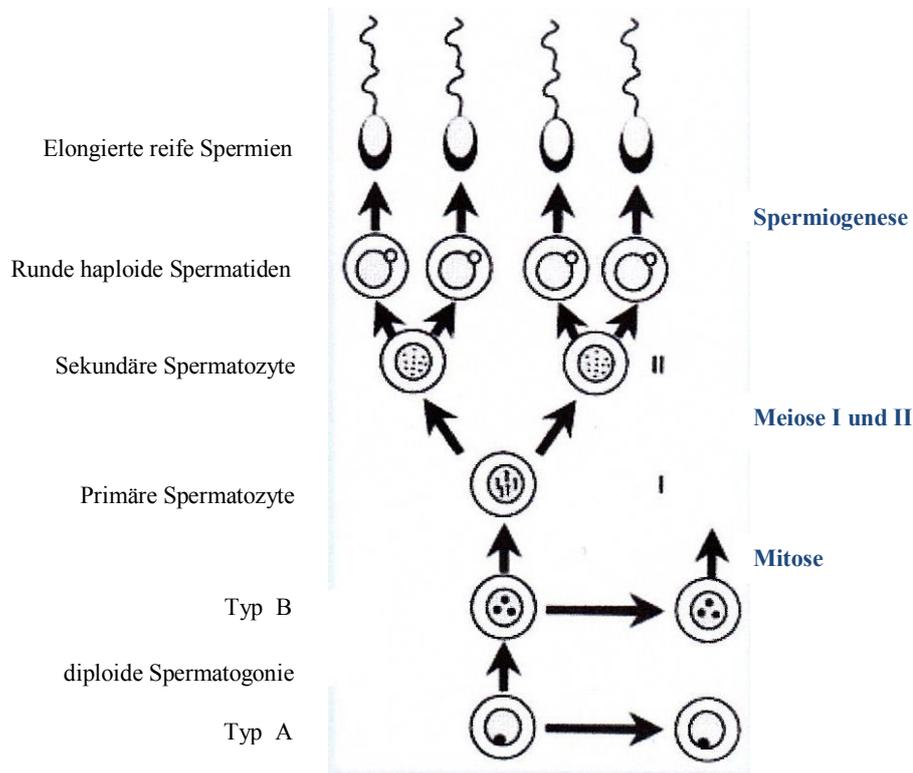


**Abb. 2:** Aufbau des menschlichen Keimepithels (modifiziert nach Sinowatz 1992)

1: Basalmembran; 2: Zellkern einer Sertoli-Zelle; 3: Spermatogonie; 4: Spermatozyte; 5: Interzellularbrücke; 6: runde Spermatozoen; 7: verschiedene Differenzierungsstufen auf dem Weg von der elongierten Spermatozoen hin zur Spermatozoen 8

Einerseits beeinflussen Sertolizellen die Spermatogenese über die hormonellen Stimuli von follikel-stimulierendem Hormon (FSH) und Androgenen (Bergmann, 2005). Andererseits umschließen Sertolizellen die Keimzellen mit ihren Zytoplasmaausläufern und können als Stützzellen zur Stabilisierung der Keimzellen im Keimepithel dienen (Bergmann, 2006). Zudem schotten Sertolizellen die Keimzellen durch Interzellularkontakte vom Blut ab. Sie bilden im Keimepithel eine Blut-Hoden-Schranke und schützen so Keimzellen, die im Verlauf der Spermio-genese Oberflächenantigene exprimieren, vor potentiellen Autoimmunreaktionen.

Erste Vorläufer der männlichen Keimzellen sind primordiale Gonozyten, die während der frühen Embryonalentwicklung in den Hoden einwandern (Looijenga und Oosterhuis 2002). Daraus entwickeln sich diploide Spermatogonien, die typischerweise Kontakt mit der Basalmembran der Tubuluswand haben (siehe Abb. 2). Die Entwicklung der Keimzellen (Spermatogenese) von den Spermatogonien bis zu reifen Spermien verläuft im Keimepithel von der Wand in Richtung Lumen. In einem histologischen Schnitt von Humanhoden unterscheidet man 6 verschiedene Keimzelloassoziationen, d.h. Stadien der Spermatogenese, die in der Längsachse der Keimtubuli angeordnet sind (Bergmann, 2006; Abb. 2). Ab der Geschlechtsreife (Pubertät) beginnen die Spermatogonien, sich zu vermehren. Spermatogonien Typ A bilden einen lebenslangen Pool von Stammzellen, die sich unbegrenzt teilen können. Ein Teil dieser Zellen differenziert sich zu Spermatogonien Typ B, welche sich nach wenigen Zellteilungen (Mitosen) von der Wand des Keimtubulus lösen und in die Meiose eintreten (Abb. 3). Während der DNA-Gehalt der Keimzellen verdoppelt wird, entstehen primäre Spermatozyten. Diese bilden durch die 1. meiotische Reifeteilung jeweils zwei sekundäre Spermatozyten. Bei der 2. meiotischen Teilung entwickeln sich aus sekundären Spermatozyten jeweils vier runde Spermatisden mit haploidem Chromosomensatz. Schließlich differenzieren sich die frühen runden Spermatisden im Prozess der Spermio-genese zu reifen elongierten Spermatozoen. Während dieser Umwandlung werden gleichzeitig der Spermienkopf, das Akrosom und die Geißel des fertigen Spermiums gebildet (Weinbauer et al. 2009; Bergmann, 2006).



**Abb. 3:** Schema der Spermatogenese (modifiziert nach Bergmann 2005)

### 2.3 Hodentumore und Tumorgenese

Der Hodentumor ist mit einer Inzidenz von 8-12/100 000 pro Jahr die häufigste maligne Erkrankung bei Männern zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr (Nicholson und Harland 1995). In westlichen Industrieländern wurde in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Inzidenz beobachtet. Als mögliche Ursache wird eine zunehmende Veränderung von Umweltfaktoren diskutiert (Adami et al. 1994; Moller 1998). Hodentumore werden gemäß der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wie folgt eingeteilt:

**Tabelle 1:** WHO-Klassifikation der Hodentumore (modifiziert nach Mostofi und Sobin 1977)

## **1. Keimzelltumore**

### A. Tumore eines histologischen Typs

1. Seminom (ca. 30-40% aller Keimzelltumore beim Mann)
2. Spermatozytäres Seminom (meist nach 50. Lebensjahr auftretend)
3. Embryonales Karzinom
4. Dottersacktumor/Yolksac-Tumor (ca. 2%; häufigster Tumor des frühen Kindesalters)
5. Polyembryom
6. Chorionkarzinom
7. Teratome

### B. Tumore mit mehr als einem histologischen Typ

1. Embryonales Karzinom und Teratom (Teratokarzinom)
2. Chorionkarzinom und andere Typen
3. Andere Kombinationen

## **2. Keimstrang- bzw. Stromatumore**

### A. Hochdifferenzierte Formen

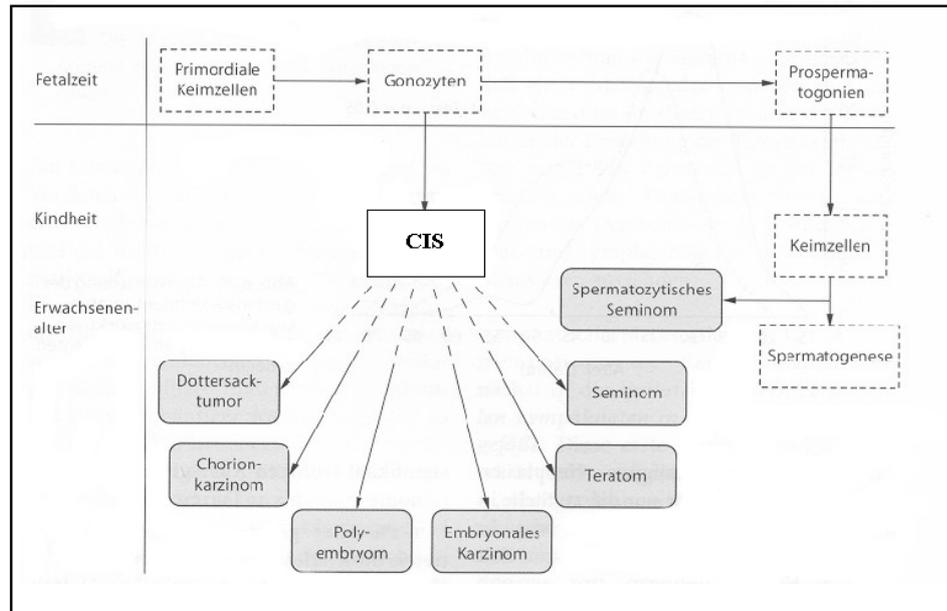
1. Leydig Zelltumor
2. Sertoli Zelltumor (ca. 1%)
3. Granulosazelltumor

### B. Mischformen

### C. Unvollständig differenzierte Formen

Keimzelltumore machen mit etwa 90% die größte Gruppe aller Hodentumore aus. Als Seminome werden Tumore bezeichnet, die aus undifferenzierten Zellen mit hellem Zytoplasma und mikroskopisch deutlich sichtbaren Zellgrenzen bestehen. Charakteristisch ist eine wechselnd starke lymphozytäre Infiltration (Mostofi und Sobin 1977; Mostofi et al. 1998).

Die Seminome sind in der Gruppe der Keimzelltumore mit einem Anteil von ca. 30 - 40% tumorpathologisch mit Abstand am häufigsten vertreten. Mit Ausnahme des spermatozytären Seminoms stammen sämtliche Keimzelltumore (Seminome und Nicht-Seminome) von einer gemeinsamen präinvasiven Läsion, dem Carcinoma in situ (CIS), ab (Abb. 4), auch bekannt als testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN).



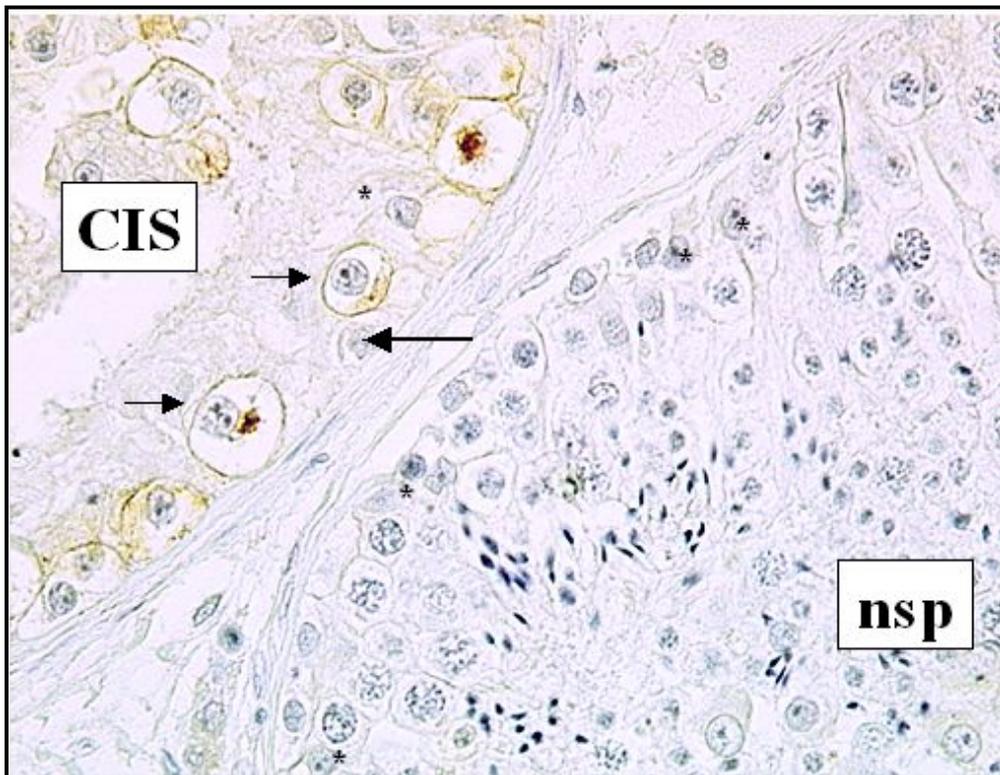
**Abb. 4:** Schema der Histogenese der germinalen Hodentumoren (modifiziert nach Dieckmann und Huland 2001).

Die präinvasiven Zellen gelten als gemeinsame Vorstufen des Seminoms und des embryonalen Karzinoms. Wenn ein CIS die Tubuluswand durchbricht, entsteht der solide Hodentumor und die Krankheit erhält über Lymphwege und die Blutbahn einen systemischen Zugang zum Organismus (Schmoll et al. 2004, Donner et al.2004).

Die unzureichende Entwicklung des männlichen Genitalsystems stellt den größten Risikofaktor für die Entstehung testikulärer Keimzelltumore dar (Skakkebaek et al. 1998, 2003). Das sogenannte testikuläre Dysgenese-Syndrom (TDS) beschreibt neben anatomischen Fehlbildungen auch zahlreiche histologische Abweichungen im Urogenitalsystem. In diesem Zusammenhang kann beispielsweise das Sertoli-cell-only Syndrom (SCO) angeführt werden. Beim SCO sind die Keimtubuli von einer vollständigen Atrophie der Keimzellen betroffen, d.h. sie enthalten ausschließlich Sertoli Zellen (Del Castillo et al. 1947).

Über die Herkunft des CIS ist wenig bekannt. Es gilt als wissenschaftlich anerkannt, dass die Entstehung der testikulären Tumorzellen wahrscheinlich von den atypischen Gonozyten abgeleitet werden kann (Dieckmann et al. 1989; Houldsworth et al., 1997; Steger et al. 1998; Dieckmann und Skakkebaek 1999; Brehm et al. 2002).

Die Standardmethode für die Identifikation von CIS-Zellen im Hodengewebe ist ihr molekularbiologischer Nachweis durch die immunhistochemische PLAP-Färbung (Abb. 5). Das membranständige Enzym plazentare alkalische Phosphatase (engl.: Placenta Like Alkaline Phosphatase oder PLAP) wird von fetalen Gonozyten, präinvasiven CIS-Zellen und invasiven Tumorzellen exprimiert, fehlt dagegen in adulten Keimzellen.



**Abb. 5:** Immunhistochemischer Nachweis der CIS-Zellen mittels PLAP. Der Tubulus links im Bild weist immunopositive CIS-Zellen (→) auf. Eine immunonegative Typ A-Spermatogonie ist mit großem Pfeil (→) markiert. Einen Sertoli Zellkern kennzeichnet das Sternchen (\*). Der Tubulusanschnitt rechts läßt ausschließlich immunonegative Zellen erkennen. CIS: CIS-Tubulus; nsp: Keimtubulus mit normaler Spermatogenese (40er-Objektiv)

Das testikuläre CIS bildet meist große blasenförmige Tumorzellen, die unregelmäßig entlang der Basalmembran angeordnet sind (siehe Abb. 5). Weitere Merkmale präinvasiver Zellen sind ein großer Zellkern mit eher grob strukturiertem Kernchromatin und übermäßig viele große, im Zytoplasma lokalisierte Glykogenvakuolen. Oft sind mindestens zwei Nukleoli vorhanden (Skakkebaek 1972; Berthelsen und Skakkebaek 1981; Skakkebaek et al. 1987; Dieckmann und Loy 1993; Melese et al. 1995).

Im histologischen Schnittpräparat findet man Keimtubuli mit CIS oft in unmittelbarer Nachbarschaft des manifesten Tumors im tumorös veränderten Hodengewebe. Auch im kontralateralen Hoden des Tumorpatienten wird CIS mit einer Inzidenz von ca. 5% nachgewiesen und stellt ein erhebliches Krebsrisiko dar (Nakayama et al. 1996; Dieckmann und Loy 1996; Lin et al. 1997; Dieckmann und Skakkebaek 1999).

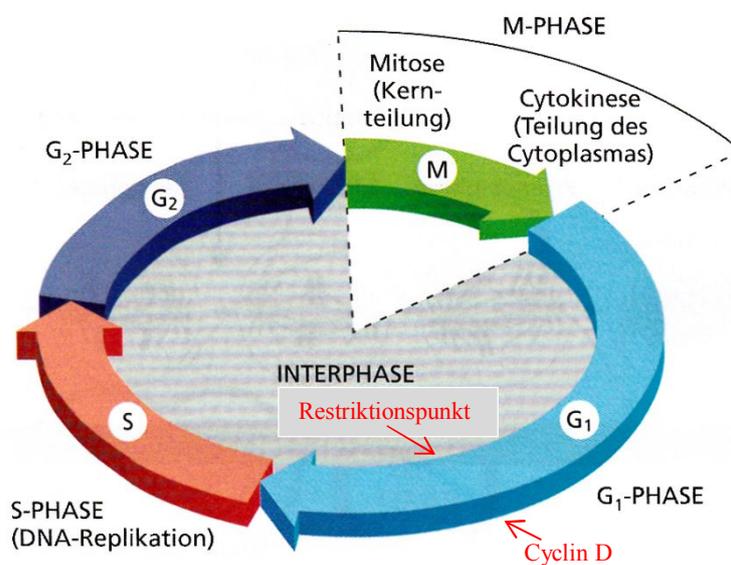
Im genetischen Expressionsmuster weisen präinvasive Zellen Gemeinsamkeiten mit den primordialen Vorläufern der Spermatogonien auf. In Bezug auf die intrazelluläre Steuerung der Zellteilung fällt auf, dass eine fehlerhafte Regulation der fetalen Zellteilung persistieren und anschließend möglicherweise die Entstehung von testikulären Tumorzellen erzwingen könnte (Houldsworth et al. 1997; Bertkova et al. 1999; Rajpert-De Meyts et al. 2003; Høe-Hansen et al. 2004; Sievers et al. 2005).

Vom Zeitpunkt einer fetalen Transformation an bis zur Geschlechtsreife sind meist nur wenige Tumorzellen in den Samenkanälchen zu finden. Die CIS-Zellen scheinen während der Kindheit in einem Zustand der Ruhe zu verweilen und zeigen kaum eine Proliferationsneigung. Mit dem Beginn der Pubertät könnte die hormonelle Stimulierung der männlichen Keimzellen ebenfalls zum Einsetzen von pathologisch verstärktem Wachstum der malignen Tumorzellen beitragen (Skakkebaek et al. 1998; Dieckmann und Skakkebaek 1999; Bartkova et al. 2000; Kliesch 2004; Høe-Hansen et al. 2005).

## **2.4 Zellzyklus und Regulation des Zellwachstums**

Die Regulation des Zellwachstums ist von entscheidender Bedeutung, nicht nur für die Kontrolle der normalen Entwicklung von Spermien, sondern auch zum Vermeiden einer Tumorigenese von Keimzellen. Da sich Keimzellen sowohl mitotischen, als auch meiotischen Teilungen unterziehen und zudem zwischen Keimzellen und den mitotisch inaktiven Sertolizellen hoch koordinierte Mechanismen angenommen werden, benötigt die normale Spermatogenese strenge Kontrollen der Zellzyklusprogression (Steger et al. 1998). Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die die einzelnen Phasen der mitotischen und meiotischen Zellzyklen regulieren, nicht vollständig charakterisiert (Diederichs et al. 2005).

Der mitotische Zellzyklus besteht aus einer sich wiederholenden geordneten Abfolge von Ereignissen, die zur Verdopplung von Zellen führen. Die wichtigsten zellulären Prozesse sind die Replikation der DNA in der S-Phase (Synthese) und das Verteilen der Chromosomen an die Tochterzellen in der M-Phase (Mitose; siehe Abb. 6). Die M-Phase umfasst die Kernteilung oder Mitose und die Zellteilung oder Zytokinese. Zwischen S-Phase und M-Phase liegen die „gap“-Phasen – G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>. In diesen „gap“-Phasen wachsen die Zellen und werden durch Verdoppeln von Proteinen und Organellen auf den Eintritt in die S- bzw. M-Phase vorbereitet. So besteht der Zellzyklus von Eukaryonten aus vier aufeinander folgenden Phasen: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M. G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub> bilden zusammen die Interphase (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** Modell des mitotischen Zellzyklus (modifiziert nach Alberts et al. 2011)

Die Vorgänge des Zellzyklus und die Zellzyklus-Progression werden durch verschiedene intra- und extrazelluläre Signale und durch regulatorische Proteine an mehreren Kontrollpunkten gesteuert. Die entscheidende Schwelle zum Einleiten der Zellteilung stellt der sogenannte Restriktionspunkt R in der G<sub>1</sub>-Phase dar (siehe Abb. 6). Die zentralen Bestandteile des Zellzyklus-Kontrollsystems sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (engl.: CDK = Cyclin Dependent Kinase), deren Aktivität von der Gegenwart regulatorischer Proteine, der Cycline, abhängt. In proliferierenden Zellen binden Cycline des D-Typs hauptsächlich CDK4 oder CDK6 (Matsushime et al. 1994, Hall et al. 1996), um aktive Enzymkomplexe zu bilden, die die Passage des Restriktionspunkts in der G<sub>1</sub>-Phase erleichtern und dadurch die Interphase einleiten (Latella et al. 2001; Blagosklonny und Pardee 2002).

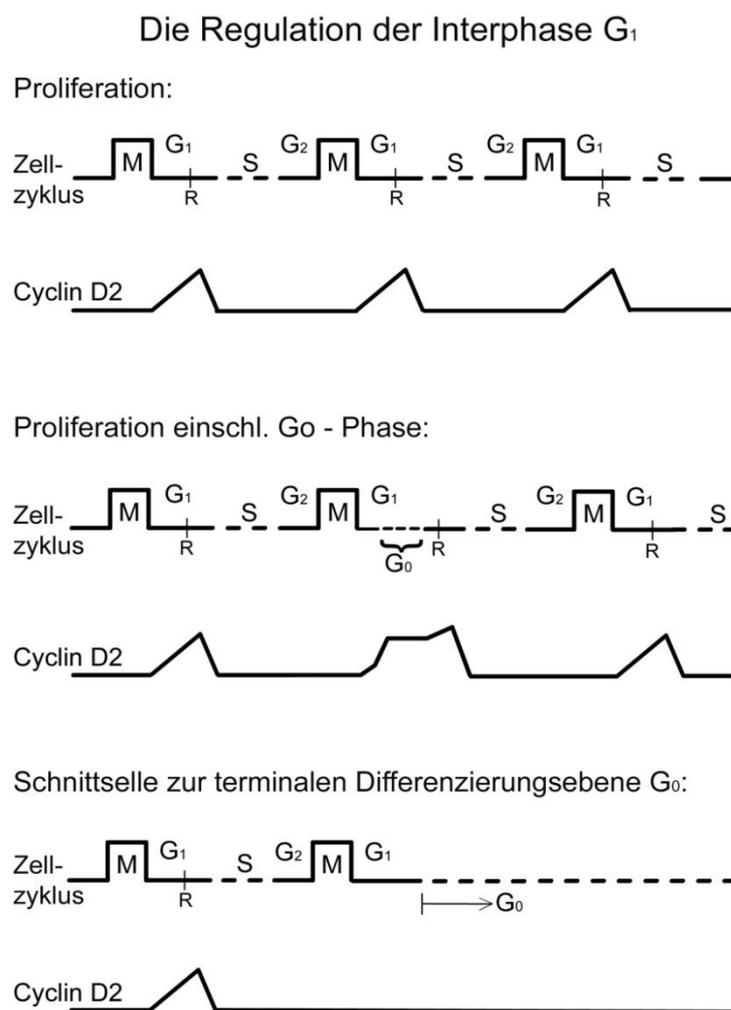
Das Passieren des Restriktionspunkts R signalisiert zunächst, dass eine Zelle sich nun verstärkt auf die Zellteilung konzentriert und hierbei nicht länger auf die externe Stimulation angewiesen ist. Der Punkt R ist genotypisch verankert und markiert nach aller Voraussicht das vorläufige Ende der Interphase.

Zur weiteren Erläuterung erinnert die Rolle der Cycline während dem Verlauf der prämitotischen Interphase im Hinblick auf die kommende Zellteilung an die vorantreibende Aufgabe einer Maschine, in Anlehnung an die Darstellung des Nobelpreiskomitees in 2001 ([www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2001/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/press.html)). Dem zellzyklischen Getriebe würden bei diesem technischen Vergleich eher deren energieübertragende Partnermoleküle entsprechen, die von Cyclinen-abhängigen Proteinkinasen (CDKs). In diesem Sinne ermöglichen Cycline und CDKs der Zelle verschiedene StoffwechsellLeistungen, die zur Vorbereitung der zellulären Proliferation und einer damit verbundenen Entwicklung nötig sind (Diekmann und Skakkebaek 1999; Chaganti und Houldsworth 2000; De Rooij 2001; Liao et al. 2001; Bartkova et al. 2003; Kikuchi et al. 2005).

Es sind mehr als 11 Mitglieder der Proteinfamilie der Cycline beschrieben (Wolgemuth et al. 2013). In der Reihenfolge ihrer Entdeckung wurden die einzelnen Gruppen nach dem Alphabet mit einem Großbuchstaben von A bis M benannt. Die verschiedenen Klassen schließen zum Teil mehrere Subtypen ein (Bartek et al. 1996; Zuh et al. 1998; Ashley et al. 2001; Hunt 2004). In Form einer sogenannten Cyclin-Box ist den Cyclinen eine Aminosäuresequenz gemeinsam, aus der in tertiärer Struktur die Bindungsstelle zur gezielten Aktivierung der CDKs hervorgeht (Nurse 1994; Futcher 1996; Hunt 2004).

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Cyclin D2 ist mit Cyclinen vom Typ D1 und D3 nah verwandt (Ando et al. 1992; Matsushime et al. 1994). Cyclin D2 steuert neben Cyclin D1 und D3 sowie gemeinsam mit den Cyclinen E, A und B die Einleitung der Zellteilung. In Säugetierzellen leiten die D-Cycline mit ihren katalytischen Partnern CDK4 und CDK6 die G1-Phase ein. E-Cycline kontrollieren in komplexer Bindung an CDK2 den Übergang von der G1- in die S-Phase, während Cyclin A2 mit CDK2 die Passage der S-Phase vorantreibt und zusammen mit den B-Cyclinen und CDK1 den Eintritt in die M-Phase reguliert (Wolgemuth et al. 2013). Diesbezüglich weisen die D-Cycline ein charakteristisches Expressionsmuster auf und zeigen in Experimenten mit Knock-Out Mäusen gewisse Redundanz (Sicinski et al. 1996; Kozar et al. 2004; Carthon et al. 2005).

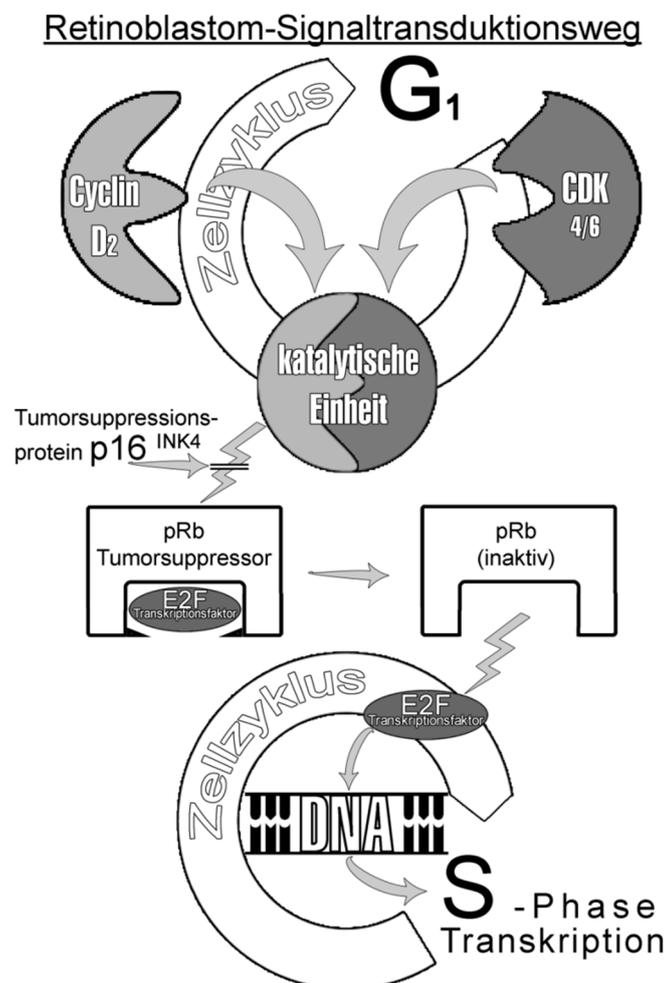
Es scheint, dass der Verlust eines D-Cyclins einfach durch ein verwandtes Mitglied der D-Cycline in den meisten Zelltypen ersetzt werden kann, um erste Konsequenzen im Hinblick auf das Zellwachstum und das Überleben zu vermeiden (Satyanarayana et al. 2009). Bei der Entwicklung von Brustkrebs scheinen neben Cyclin D1 auch andere D-Cycline eine Rolle zu spielen (Zhang et al. 2014). Im Gegensatz zu anderen Cyclinen, die während des Zellzyklus periodisch schwanken, werden die Werte der D-Cycline von extrazellulären Wachstumsfaktoren induziert und kontrolliert (Sherr et al. 1999) und zeigen nur moderate Schwankungen mit Höchstwerten zwischen dem Restriktionspunkt und dem Beginn der S-Phase (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Das Vorkommen von Cyclin D2 im Zellzyklus (modifiziert nach Benninghoff 1994)

Der Zellzyklus wurde gegenüber der Aktivität des Cyclin D2 linear dargestellt. Die prämitotische Sequenz zeigt für das Cyclin D2 zwischen R und S-Phase einen Gipfel. Das Plateau innerhalb der G<sub>1</sub>-Phase steht für einen reversiblen Ruhezustand in der Interphase. Für den Bereich der terminalen Differenzierung entspricht die durchgezogene Linie dem endgültigen Zyklusabschnitt mit ruhender Teilungsaktivität.

Der Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase erfordert die Phosphorylierung des sogenannten Retinoblastom-Tumorsuppressorproteins (pRb), die primär durch aktive Enzymkomplexe aus D-Cyclinen und CDK4 oder CDK6 vermittelt wird. Die Phosphorylierung von pRb erlaubt die Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren vom Rb-Tumorsuppressor, dessen Kontrollfunktion über das Zellwachstum in der prämitotischen G<sub>1</sub>-Phase damit aufgehoben wird (Bartkova et al. 2003; McNerny 2004; Busk et al. 2005). Freies E2F aktiviert anschließend die Transkription von verschiedenen Genen, die für den Eintritt und die Passage der S-Phase benötigt werden (Sandhu et al. 2000; Wolgemuth et al. 2013). Insgesamt sind D-Cycline Komponenten des Retinoblastoma-Signaltransduktionsweges, der den geordneten Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase reguliert (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** Eigenes Schema des Retinoblastom-Signaltransduktionsweges. Die G<sub>1</sub>-Phase wird eingeleitet durch die Bindung von Cyclin D2 und Aktivierung von CDK4/6-Kinasen. Die aktiven Cyclin D2-CDK4/6-Komplexe phosphorylieren das Retinoblastoma Protein (pRb). Dadurch wird seine Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben. Freies E2F stimuliert im Zellkern spezifische Gene und führt damit zum Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase.

Das Cyclin E schließt mit Hilfe der CDK2 die Hyperphosphorylierung von pRb gegen Ende der G<sub>1</sub>-Interphase ab. Fortan inaktiv leitet das pRb den restlichen Teilungszyklus bis zur Mitose. In proliferierenden testikulären Tumorzellen kann die übermäßige Aktivität des Cyclin D2 das Cyclin E nachweislich davon entbinden, gemeinsam mit der CDK2 eine Phosphorylierung des pRb abschließen zu müssen (Schmidt et al. 2001). Versuche mit Prostatakarzinomzellen ohne Cyclin D2 Expression haben ergeben, dass die Applikation von Valproinsäure zur Normalisierung der epigenetischen Prozesse führt und damit das Tumorstadium hemmt (Witt et al. 2013).

Bei dem pRb handelt es sich um den ersten Tumorsuppressor, der früher mit der Entstehung von bösartigen Tumoren der Netzhaut in Verbindung gebracht wurde (p105Rb). Ein frühzeitig komplex strukturierter Aufbau der Retinazellen erfordert zum reibungslosen Ablauf der embryonalen Entwicklung eine reichhaltige Ausstattung mit dem Proteinprodukt des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens RB1 (Goodrich et al. 1991; Nevins et al. 1992). Das RB1-Gen wurde zuerst in Verbindung zum angeborenen Retinoblastom, einer malignen Augenkrankheit, identifiziert. Die vollständige Mutation von pRb bedingt häufig die Ausbildung maligner Tumoren der Netzhaut. Beim Mensch ist ein umfassender Defekt von pRb intrauterin oftmals tödlich. Neben einer größeren Anzahl von weiteren Proteinen, die ebenfalls das Wachstum der Zelle auf zum Teil unterschiedliche Art unterbinden können, sind zwei weitere Homologe des pRb (p107/p130) bekannt. Diesem breiten Spektrum großer Kernproteine wird eine entscheidende Bedeutung für den reibungslosen Ablauf der Spermatogenese besonders bei den einzelnen Schritten der fetalen Differenzierung zugeschrieben (Kastner et al. 1998; Beumer et al. 2000; De Rooij 2001; Yan et al. 2001).

Bei den meisten invasiven Keimzelltumoren kann typischerweise eine Aberration von Chromosom 12 nachgewiesen werden (Summersgill et al. 2001; Pienkova-Grela et al. 2002; Reuter 2005; Giuliano et al. 2005). Die genetische Information auf dem Chromosom 12 kodiert das Cyclin D2 (CCND2) auf dem kurzen Arm (12p) und CDK4 auf dem langen Arm (12q). Das Chromosom 12 spielt demnach eine wichtige Rolle für die Steuerung der Mitose-induzierenden Retinoblastom-Signaltransduktionskaskade (Lukas et al. 1995; Reed et al. 1996; Della Ragione et al. 1996; Pucci et al. 2000; Macleod 2000; Hu et al. 2002). Die Deletion bestimmter Regionen auf Chromosom 12 (12q13 oder 12q22) wird ursächlich für Störungen der zellulären Proliferation verantwortlich gemacht (von Eyben 2004; Veltman et al. 2005).

Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ist eine gestörte Regulation des Zellzyklus während der G<sub>1</sub>-Interphase für die jeweilige Tumorzelle charakteristisch und lässt sich molekularbiologisch als ein funktioneller Defekt in der Retinoblastom-Signalkaskade darstellen (Looijenga et al. 1999; Heidenreich et al. 2000, 2004; Bartkova et al. 2003).

Es ist nicht ausgeschlossen, dass ein zu einem frühen Zeitpunkt deregulierter Zellzyklus in Verbindung mit der Entstehung testikulärer Keimzelltumoren die normale Differenzierung von atypischen Gonozyten maligne beeinflussen und womöglich den Organismus hierdurch bedrohen kann. Der zunehmend unkontrolliert ablaufenden Zellvermehrung einer präinvasiven testikulären Tumorzelle könnte aufgrund der malignen Deregulation der Cyclin D2 Expression ein möglicherweise bereits mittels Erbanlagendiagnostik frühzeitig absehbarer Weg gebahnt werden (Houldsworth et al. 1997; Bartkova et al. 1999; Chaganti und Houldsworth 2000; Nakagami et al. 2002).

## **2.5 Expression und Funktion von Cyclin D2 in männlichen Keimzellen**

Aktuelle Hypothesen zur Rolle des Cyclin D2 als Regulator der testikulären Zellproliferation und zu seiner Funktion in der Spermatogenese beruhen auf meist immunhistochemischen Untersuchungen des Vorkommens und der Expression von Cyclin D2 in adultem Hoden, präinvasiven CIS-Zellen und invasiven testikulären Tumorzellen humanen Ursprungs. Es zeigte sich eine Überexpression von Cyclin D2 Protein in der überwiegenden Mehrheit (60%) der CIS-Zellen und in einer signifikanten Fraktion (80%) invasiver Keimzelltumoren (Seminomen und embryonalen Karzinomen, d.h. Hodentumoren ohne und mit geringem Differenzierungsgrad), während in normalem Hoden kein Cyclin D2 nachweisbar war (Houldsworth et al. 1997; Bartkova et al. 1999). Dabei war die Stärke der Färbung von Cyclin D2 Protein mit dem Differenzierungsgrad der Zellen umgekehrt korreliert (Houldsworth et al. 1997). Aufgrund dieser Daten wird postuliert, dass Cyclin D2 in den frühen Stadien der testikulären Tumorentwicklung als Protoonkogen wirkt. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von Cyclin D2 und dem Proliferationsgrad der Zellen, d.h. dem Anteil von Ki67 positiven Zellen, konnte nicht festgestellt werden.

Später haben andere Autoren mit empfindlicheren Nachweismethoden, wie der reversen Transkriptase-PCR, in den meisten Seminomen und Nicht-Seminomen (69%) eine Überexpression

von Cyclin D2 und CDK4 auf mRNA-Ebene um den Faktor 6 – 8 gefunden und konnten dieses Expressionsmuster im Western Blot und immunhistochemischen Untersuchungen bestätigen (Schmidt et al. 2001). Diese Resultate sprechen dafür, dass die Überexpression von Cyclin D2 und CDK 4 sowohl bei der Spermatogenese, als auch bei der Entwicklung von Keimzelltumoren funktionell relevant ist.

Zudem gibt es genetische Studien an Mäusen und Expressionsstudien zum Cyclin D2 während der testikulären Entwicklung und in adultem Hoden der Maus. Trotz einer potentiellen Rolle von Cyclin D2 in der Spermatogenese führte eine Deletion des Cyclin D2-Gens in transgenen Mäusen nicht zu männlicher Unfruchtbarkeit, aber zu hypoplastischen Testes (Sincinski et al. 1996). Cyclin D2 mRNA fand sich während der Entwicklung muriner Hoden in FSH-abhängigen Zellpopulationen, wie Sertoli-Zellen und Spermatogonien (Nakayama et al. 1996). Insgesamt zeigt das die kritische Rolle von Cyclin D2 in Bezug auf eine normale testikuläre Entwicklung.

Die Ansicht, dass Cyclin D2 eine ausschließlich mitogene Rolle spielt, wurde durch verschiedene Befunde in Frage gestellt. Im adulten murinen Hoden zeigte sich Cyclin D2 in den Zellkernen von Spermatogonien im Stadium VIII des Keimepithels, so dass Cyclin D2 auch bei der Differenzierung von Spermatogonien beteiligt sein könnte. Zudem war Cyclin D2 auch in den Zellkernen von Spermatozyten im Pachytän und Diplotän nachweisbar und sehr schwach in den Kernen runder Spermatisden zu finden (Beumer et al. 2000).

In Zelllinien humaner und muriner Fibroblasten deuteten weitere Resultate zur Expression von Cyclin D2 ebenfalls auf eine Rolle von Cyclin D2 in der zellulären Differenzierung hin (Meyyappan et al. 1998). Es wurden deutliche Anstiege (5 – 20fach) in der Expression von Cyclin D2-mRNA und -Protein beobachtet, wenn das Zellwachstum unter verschiedenen Bedingungen (Kontakthemmung, Serumentzug oder Zellalterung) gehemmt war.

Neuere Daten, nach denen die Expression von Cyclin D2 in der adulten männlichen Ratte bei Testosteron-Entzug hochreguliert wird, deuten auf eine weitere von der Proliferation unabhängige Funktion des Cyclins D2 hin, der Beteiligung an der Androgenregulation. Die Expression des Androgenrezeptors und die Androgen-Wirkung sind wahrscheinlich Auslöser für die Hochregulation von Cyclin D2 in reifen Sertoli-Zellen, die an der Regulation der Spermatogenese beteiligt sind (Tan et al. 2005).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material/ Gewebe**

##### **3.1.1 Humanes Hodengewebe**

In dieser Arbeit wurde humanes Hodenbiopsiematerial untersucht, das im Rahmen der klinischen Diagnostik entnommen wurde. Die Gewebeprobe war von der Größe eines Reiskorns (1 x 2 mm) und reichte für etwa 25-30 Tubulusanschnitte, die in der histologischen Diagnose einer Biopsie als repräsentativ für das gesamte Organ betrachtet werden (Bergmann und Kliesch, 1998b). Das verwendete Hodengewebe wurde von Patienten zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 75/00), die in der Klinik und Poliklinik für Urologie der westfälischen Wilhelms-Universität Münster und der Urologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Verdacht auf Hodentumor bzw. CIS operiert worden sind.

##### **3.1.2 Klinische Daten**

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 47 Patienten (Alter: 22-79 Jahre) mit einem durchschnittlichen Alter von 42,4 Jahren. Im Einzelnen befanden sich darunter 29 Patienten mit der histologischen Diagnose CIS (Alter: 22-34 Jahre) und 6 Patienten mit einem Seminom (Alter: 30-38 Jahre). Die übrigen 12 Patienten hatten einen unauffälligen Befund.

Als Kontrollgewebe wurde intaktes Hodenbiopsiematerial von 10 Patienten (Alter: 28-52 Jahre) mit einem durchschnittlichen Alter von 35,4 Jahren verwendet. Die Biopsieentnahme erfolgte in diesen Fällen zur Bestätigung des Befundes einer Verschlussazoospermie. Die histologische Beurteilung nach dem Score-Count-Verfahren ergab in allen Fällen eine normale Spermatogenese (Score 10-8; nach Bergmann und Kliesch, 1998b und 2009).

##### **3.1.3 Gefriermaterial**

Ein Teil des frischen Hodengewebes wurde in steriler Aluminiumfolie verpackt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Von den Hodenproben wurden nach einheitlichem Protokoll Serien von Gefrierschnitten hergestellt. Der erste, fünfte und zehnte Schnitt einer 10er-Serie diente nach der immunhistochemischen Anfärbung von Frühformen der testikulären Tumorzellen als Referenzmaterial. Das Gefriermaterial wurde auch für das LCMD-Verfahren mit nachfolgender RT-PCR verwendet.

Im Einzelnen wurden die Gefrierschnitte auf Glasobjektträger aufgeschmolzen und luftgetrocknet. Einem Färbevorgang schloss sich die Entwässerung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe an. Die nachfolgende Eindeckelung mit Glyceringel für die anschließende Lichtmikroskopie erfolgte blasenfrei.

## Versuchsprotokoll

### *Beschichtung der Objektträger*

Vor dem Herstellen von Gefrierschnitten wurden Glas-Objektträger zur besseren Haftung der Schnitte mit Chrom-Gelatine beschichtet. Nach dem Herstellen einer Chromalaunlösung (siehe Anhang 9.2) wurden die Objektträger in einen Küvettenhalter einsortiert, kurz im Glasbecken mit 80%igem Alkohol gespült und befeuchtet, für 10 Minuten in Glasbecken mit Chromalaunlösung getaucht und über Nacht bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

### *Herstellung von Gefrierschnitten im Gefriermikrotom*

Bis zum sterilen Aufblocken im Gefriermikrotom wurde das Probenmaterial tiefgekühlt im Gefrierschrank gelagert. Nur im tiefgefrorenen Zustand war unbehandeltes Hodengewebe fest genug für die Herstellung von Dünnschnitten. Hierfür war eine Kühltemperatur von -28 °C bis -30 °C innerhalb des Gefriermikrotom-Gerätes 2800 Frigocut notwendig. Diese Kühlung bewirkte eine Objekttemperatur, die der optimalen Schneidetemperatur von -20 °C bis -22 °C entsprach. Vor dem Schneidevorgang wurde das Gewebe mit Kleber der Marke Tissue-Tek<sup>®</sup> auf Metallobjekthalter befestigt. Dann wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte mithilfe eines Anti-Rollplättchens hergestellt und auf zuvor mit Chromalaun beschichtete Glasobjektträger aufgetragen. Die Gefrierschnitte für das LCMD wurden bedingt durch die Methodik (Laser und Gerät) auf unbeschichtete Deckgläser aufgenommen (76 mm x 26 mm x 0,15 mm).

### *Färbung*

Zur histologischen Beurteilung wurde ein luftgetrockneter und unfixierter Gefrierschnitt auf einen mit Chomalaun beschichteten Objektträger gebracht, mit Hämatoxilin für 45 Sekunden blau eingefärbt und anschließend mit Aqua bidest gespült. Diese Schnellfärbung diente zur ersten Begutachtung der Präparate. Zur Anfärbung des ersten, fünften und zehnten Schnittpräparates aus einer Serie von 10 Folgeschnitten musste der Gefrierschnitt mittels Formalin für die PIAP-Immunhistochemie chemisch fixiert werden.

### *Fixation der Gefrierschnitte*

Während der Einfärbung von einem Schnitt einer Schnittserie mit dem basischen Farbstoff Hämatoxilin blieben die restlichen Schnittpräparate vorübergehend im Gefriermikrotom. Nach kurzer Trockenzeit bei RT (10 Minuten) wurden die Schnitte für die PIAP-Immunhistochemie mit Formol nach Lillie (Rezept siehe Anhang 9.2) für 10 Minuten bei RT chemisch fixiert.

### **3.1.4 Paraffinmaterial**

Ein anderer Teil des frischen Hodengewebes wurde mit der Bouin'schen Lösung chemisch fixiert und nach Auswaschen der Fixierlösung zur mechanischen Konservierung in Paraffin eingebettet. Zum Herstellen von Paraffinschnitten diente das Schlittenmikrotom. Nach dem Schneidevorgang wurden die einzelnen Schnitte im warmen Wasserbad auf beschichtete Glasobjektträger gezogen. Die Schnittpräparate wurden über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet. Vor der weiteren Bearbeitung musste das Paraffin im Xylolbad entfernt werden. An die immunhistochemische Färbung schloss sich die Entwässerung der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe an. Für die Beurteilung im Lichtmikroskop wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckelt.

Das verwendete Paraffinmaterial war für immunhistochemische Färbungen mit dem jeweiligen Primärantikörper nach Protokoll zu behandeln. Zur positiven Kontrolle des gewünschten Färbevorgangs wurde bei Versuchen der immunologischen Detektion von Cyclin D2 ein Kontrollschnitt aus Tumorgewebe mitgeführt und spezifisch eingefärbt. Die Herstellung sowie die Fixation der Schnitte erfolgten nach einem einheitlichen Protokoll.

## Versuchsprotokoll

### *Fixation in Bouin'scher Lösung*

Frisches Hodengewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme mit der Bouin'schen Lösung (Rezeptur siehe Anhang 9.2) fixiert. Nach chemischer Fixierung in Bouin'scher Lösung wies das Hodengewebe eine starke Gelbfärbung auf. Vor dem Einbetten der Probe war daher die gelbliche Farbe durch ausgiebiges Spülen und Entwässern in 70 %igem Alkohol für mindestens 24 h gründlich auszuwaschen.

### *Entwässerung der Probe*

Während etwa 24 h wurde die gelbe Fixierlösung ausgewaschen. Für die nachfolgende Einbettung in Paraffin war die Entwässerung des Gewebes notwendig. Im Entwässerungsgerät Leica TP 1050 wurde das Probenmaterial in einem Körbchen bei dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und danach mit Xylol durchtränkt. Die Abkühlung der Probe auf Zimmertemperatur führte im Anschluss zur erwünschten Aushärtung des hergestellten Präparatblocks. Die Entwässerung lief in folgenden Schritten ab:

- Alkohol 80 % für 2 h.
- Alkohol 96 % für 2 h.
- Alkohol 100 % für 3 h.
- Alkohol 100 % für 3 h.
- Alkohol 100 % für 3 h.
- Xylol für 1 h.
- Xylol für 45 Minuten.
- Xylol für 45 Minuten.
- Paraffin mit 59 °C für 40 Minuten.
- Paraffin mit 59 °C für 40 Minuten.
- Paraffin mit 59 °C für 40 Minuten.

### *Einbetten der Proben*

Das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin erfolgte mit dem Einbettgerät Leica EG 1160. Hierzu wurden die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Förmchen aus Stahl gelegt und danach mit heißem Paraffin von 59 °C übergossen. Zum Auskühlen diente die Kühlvorrichtung des Gerätes.

### *Beschichten der Objektträger*

Vor dem Herstellen von Paraffinschnitten wurden Glasobjektträger (SuperFrost-OT) zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte mit einer Silanelösung beschichtet. Die Objektträger wurden hierfür nach folgendem Protokoll mit APTEX behandelt:

- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- OT kurz in Glasbecken mit Aqua bidest spülen und befeuchten.
- Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.
- OT kurz in Glasbecken mit reinem Aceton spülen und befeuchten.
- Azeton unter laufendem Abzug abdampfen lassen, bis die OT trocken sind.
- OT für 5 Minuten in Glasbecken mit 2 %igem APTEX (4 ml APTEX auf 196 ml Azeton).
- OT für 2 Minuten in Glasbecken mit frischem Leitungswasser stellen.
- OT in Glasbecken unter fließendem Leitungswasser spülen.
- OT für 2 Minuten in Glasbecken mit Aqua bidest stellen.
- Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.
- OT über Nacht bei 37 °C in Trockenschrank (Memmert, Schwabach) trocknen.

### *Herstellen von Paraffinschnitten*

Von den chemisch fixierten und in Paraffin-eingebetteten Präparaten wurden mit dem Schlittenmikrotom je Probe immer etwa 20 Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Zwei Folgeschnitte konnten in einem warmen Wasserbad auf zuvor mit APTEX beschichtete Objektträger geführt werden. Die Trocknung erfolgte über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C.

### *Hämatoxilin/Eosin-Färbung*

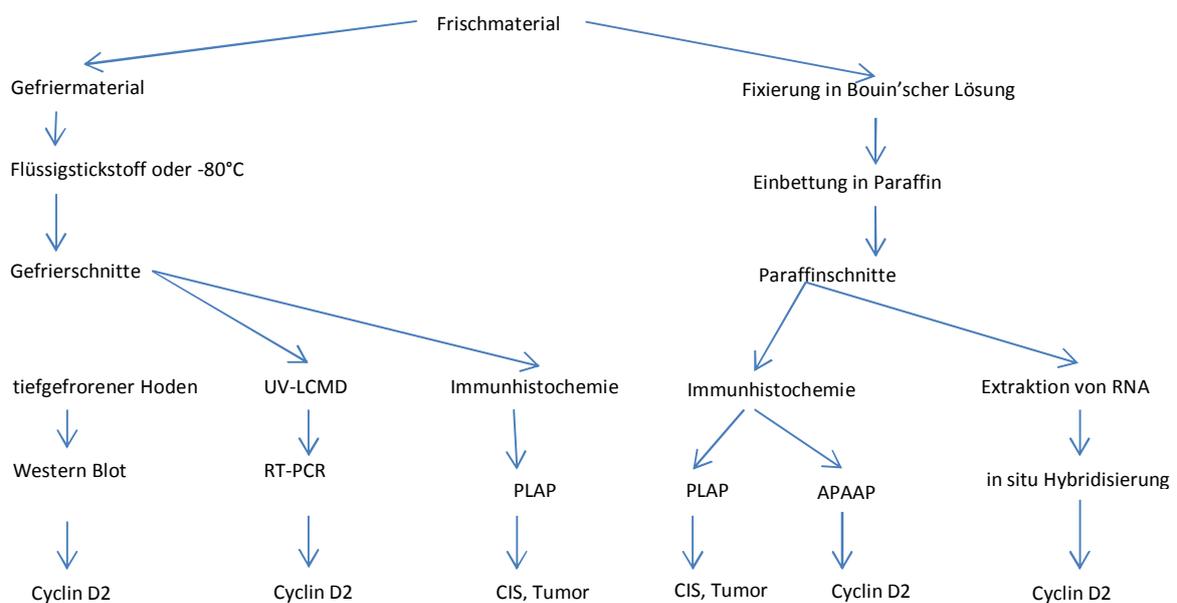
Zur vorläufigen lichtmikroskopischen Beurteilung hinsichtlich der Gewebebeschaffenheit wurde vor der immunhistochemischen Detektion von ausgewählten Gewebeproben zunächst ein HE-Präparat nach folgendem Färbeprotokoll angefertigt:

- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- 1 x 10 Minuten Xylol.
- 1 x 5 Minuten abs. Alkohol (Ethanol).

- 1 x 5 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 70 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 50 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten Aqua dest.
- 7 Minuten in Hämatoxilin nach Mayer.
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.
- 7 Minuten in 1 %iges Eosin.
- kurz in Leitungswasser spülen.
- kurz in 70 %igen Alkohol (Ethanol).
- kurz in 80 %igen Alkohol (Ethanol).
- 1 x 2 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).
- 2 x 2 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 2 Minuten abs. Alkohol (Ethanol).
- 3 x 10 Minuten Xylol.
- Eindecken der gefärbten Schnitte mit Vitro-Clud.

### 3.2 Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Methoden durchgeführt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Übersicht über durchgeführte Methoden

### 3.2.1 Immunhistochemie

Es wurden unterschiedliche Färbetechniken eingesetzt. Zur Detektion von Tumorzellen im Keimtubulus mittels PLAP diente die Avidin-Biotin-Methode (ABC). Dabei hat ein primärer unmarkierter Antikörper das Antigen im Präparat gebunden und wurde dann mit Hilfe eines sekundären konjugierten Antikörpers, dessen antigene Bindungsstelle gegen den primären Antikörper gerichtet war, über eine Färbung nachgewiesen. Nach Applikation des vorgeformten Avidin-Biotin-Enzymkomplexes folgte der farbliche Nachweis der Immunreaktion in Form der Substrat-Chromogenreaktion (Boenisch, 1989). Alle dafür verwendeten Materialien werden nachfolgend aufgeführt:

#### 1. Primärantikörper

Name/Klon	Hersteller	Art	Fixierung	Einbettung	Verdünnung	Färbemethode
PLAP (8A9)	DAKO, Glostrup, Dänemark	Maus	Bouin/Formalin	Paraffin-/Gefriermaterial	1:50 1:50	ABC ABC

#### 2. Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Art	Fixierung	Einbettung	Verdünnung
Biotinylierte Ziege-Anti-Maus Immunglobuline	DAKO, Glostrup, Dänemark	Ziege	Bouin/Formalin	Paraffin-/Gefriermaterial	1:100 1:50

#### 3. Detektionssystem

Name	Hersteller	Verdünnung
Vector Vectastain ABC-Elite-Kit Standard	Vector, Burlingame, England	Ansatz und Verdünnung nach Herstellerangaben

#### 4. Entwicklerlösungen

Name	Hersteller	Farbe
Stable DAB	Research Genetics, Karlsruhe	Braun
HistoMark-Red	KPL, Gaithersburg, USA	Rot
Fast Red TR/Naphthol AS-MX	Sigma, Steinheim	Rot

#### 5. Substanzen zum Gegenfärben

Name	Hersteller
Hämxilin	Shandon, Frankfurt
Contrast Blue	KPL, Gaithersburg, USA

Bei jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Dafür wurde jeweils der primäre Antikörper durch Blockpuffer ersetzt. Die weitere Behandlung der Kontrolle erfolgte gemäß dem üblichen Protokoll. Die negative Kontrolle blieb in allen Fällen unmarkiert.

### 3.2.1.1 Nachweis von CIS-Zellen an Paraffinmaterial

Obwohl ein klinisch vorhandener Tumorverdacht histologisch mittels PLAP-Färbung bestätigt werden konnte, mussten Gewebeproben zur Lokalisation und zum Nachweis von CIS-Zellen erneut mit dem PLAP-Antikörper untersucht werden. Dazu wurden Paraffinschnitte eingesetzt.

#### Versuchsprotokoll

##### Tag 1:

*Waschpuffer (1x Tris-HCl-Puffer) herstellen:*

- 10xTris-HCl-Puffer: 121,1 g Tris-HCl in 800 ml Aqua bidest lösen, mit konzentrierter HCl auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen.
- 1xTris-HCl-Puffer: 100 ml 10xTris-HCl-Puffer (pH 7,6), 8,5 g NaCl und 1 ml Tween 20 mischen und mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und lösen.

*Zitratpuffer herstellen:*

- Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure-Monohydrat in 1 l Aqua bidest lösen.
- Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1 l Aqua bidest lösen.
- 18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und mit konzentrierter HCl auf pH 6,0 einstellen.

*Blockpuffer herstellen:*

- 5 g BSA mit 1xWaschpuffer auf 100 ml auffüllen und mit konzentrierter HCl bzw. NaOH auf pH 7,6 einstellen und aliquotieren.

##### a. Gewebevorbehandlung (Entparaffinieren und Rehydrieren)

- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- Xylol und OT bzw. Paraffinschnitte getrennt über Nacht bei 60 °C in den Trockenschrank.
- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C).
- 1 x 5 Minuten Xylol (RT).
- 1 x 5 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).

- 1 x 5 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 70 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- 1 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler)

#### b. Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Mikrowellenbehandlung

- OT in Standküvette einsortieren.
- 1 x 5 Minuten Zitratpuffer bei RT.
- Standküvette mit Zitratpuffer (pH 6,0) in Tupperdose stellen.
- Tupperdose in Mikrowelle (Privileg 8020, Quelle, Fürth) und 25 Minuten bei 1000 W kochen.
- Verdunsteten Zitratpuffer regelmäßig durch Aqua bidest ersetzen.
- Schnitte danach mindestens 20 Minuten abkühlen lassen.
- 2 x 2 Minuten Aqua dest.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Schnitte mit DAKO-Pen (DAKO, Hamburg) umkreisen.

#### c. Blockierung endogener Enzymaktivitäten (Endogene Peroxidase)

##### 2% ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung herstellen:

- 54 ml Methanol und 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % ig) mischen.
- Inkubation mit 3 % iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung für 30 Minuten bei RT.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

#### d. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- Inkubation mit Blockpuffer (5 % iges BSA) für 30 Minuten bei RT.

#### e. Inkubation mit primärem Antikörper

Es wurde ein monoklonaler Maus-Anti-Human-Antikörper der alkalischen Phosphatase der Plazenta (siehe oben) in der Verdünnung 1:50 in Blockpuffer mit 5% igem BSA verwendet. Mit diesem Primärantikörper wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Auf den jeweils mitgeführten Kontrollschnitten wurde der Primärantikörper durch Blockpuffer ersetzt.

## **Tag 2:**

### f. Inkubation mit sekundärem Antikörper

Es wurden biotinylierte Ziege-Anti-Maus Immunglobuline in einer 1:100 Verdünnung in Blockpuffer verwendet (siehe oben).

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.
- Anschließend, d.h. 30 Minuten vor Gebrauch, Vector Vectastain ABC-Elite-Kit Standard nach Angaben des Herstellers ansetzen.

### g. Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit ABC-Kit in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.

### h. Farbreaktion mit Stable-DAB

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit Stable-DAB in feuchter Kammer für 5-10 Minuten bei RT.
- Abstoppen der Reaktion mit kaltem Waschpuffer.
- 1 x 5 Minuten Aqua dest.
- Gegenfärben mit Hämatoxilin für 15 Sekunden.
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.
- Aufsteigende Alkoholreihe:
  - 1 Minute 70 %iger Alkohol (Ethanol).
  - 1 Minute 96 %iger Alkohol (Ethanol).
  - 1 Minute abs. Alkohol (Ethanol).
  - 1 Minute Xylol.
- Eindecken der Schnitte mit Vitro - Clud.

### 3.2.1.2 Nachweis von CIS-Zellen an Gefriermaterial

Das Identifizieren von CIS-Zellen in Gefrierschnitten durch Markieren mit dem PIAP-Antikörper diente zum Gewinnen von präinvasiven Tumorzellen im LCMD-Verfahren. Beim Pickvorgang wurden aus nativen Gefrierschnitten neben testikulären Tumorzellen auch präinvasive Tumorzellen isoliert und anschließend untersucht.

Das für Gefriermaterial modifizierte Protokoll der PIAP-Färbung lautet:

- Gefrierschnitte für 10 Minuten bei RT lufttrocknen lassen.
- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- Fixation des Gewebes mit Formol nach Lillie für 10 Minuten bei RT.
- Blockierung endogener Enzymaktivitäten durch Inkubation mit 3 % iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Methanol - Lösung für 20 Minuten bei RT.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen.
- Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockpuffer (5 % iges BSA) für 20 Minuten bei RT.
- Inkubation mit Primärantikörper (siehe oben) mit der Verdünnung 1:50 (in 5 % igem BSA) in feuchter Kammer für 1 h bei RT.
- Für den Kontrollschnitt wurde der Primärantikörper durch Blockpuffer ersetzt.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (siehe oben) mit der Verdünnung 1:50 (in 5 % igem BSA) in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard (siehe oben) für 30 Minuten bei RT.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit Stable-DAB in feuchter Kammer für 5-10 Minuten bei RT.
- Abstoppen der Reaktion mit kaltem Waschpuffer.
- 1 x 5 Minuten Aqua dest.
- Gegenfärben mit Hämatoxilin für 15 Sekunden.
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.

- Aufsteigende Alkoholreihe:
- 1 Minute 70 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 Minute 96 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 Minute abs. Alkohol (Ethanol).
- 1 Minute Xylol.
- Eindecken der Schnitte mit Vitro-Clud.

### 3.2.1.3 Nachweis von Cyclin D2 an Paraffinmaterial

Die Detektion von Cyclin D2 in testikulären Tumorzellen erfolgte immunologisch an Paraffinschnitten unter Verwendung der APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-Färbemethode. Dabei hat der primäre Maus-Antikörper an das nachzuweisende Antigen gebunden. Ein danach hinzugefügter sekundärer Brückenantikörper band sowohl den primären Antikörper als auch einen dritten Antikörper, den monoklonalen Maus-Anti-Enzym-Antikörper. An diesen dritten Antikörper war das Enzym gebunden, so dass nach Zugabe von Substrat ein Spaltprodukt entstand, dessen Nachweis über eine Färbung erfolgte. Es wurden die folgenden Primär- und Sekundärantikörper, Detektionssysteme und Farbstoffe verwendet:

#### 1. Primärantikörper

Name/Klon	Hersteller	Art	Fixierung	Einbettung	Verdünnung	Färbemethode
Cyclin D2 (DCS-3)	Sigma, Deisenhofen	Maus	Bouin/ Formalin	Paraffinmaterial	1:50	APAAP

#### 2. Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Art	Einbettung	Verdünnung
Kaninchen-Anti-Maus Immunglobuline	DAKO, Glostrup, Dänemark	Kaninchen	Paraffin	1:25

#### 3. Dritter Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
Monoklonaler APAAP-Maus-Enzymkomplex	DAKO, Glostrup, Dänemark	1:50

#### 4. Entwicklerlösung

Name	Hersteller	Farbe
HistoMark-Red	KPL, Gaithersburg, USA	Rot

Das für Paraffinschnitte geeignete Protokoll lautet:

a. Gewebevorbehandlung (Entparaffinieren und Rehydrieren) - Alkoholreihe

- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- Xylol und OT/Paraffinschnitte getrennt voneinander über Nacht bei 60 °C in Trockenschrank.
- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C).
- 1 x 5 Minuten Xylol (RT).
- 1 x 5 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 70 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

b. Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen

- OT in Standküvette einsortieren.
- 1 x 5 Minuten Zitratpuffer (pH 6,0) bei RT.
- Standküvette mit Zitratpuffer (pH 6,0) in Tupperdose stellen.
- Tupperdose in Mikrowelle und 25 Minuten bei 1000 W kochen.
- Verdunsteten Zitratpuffer regelmäßig durch Aqua bidest ersetzen.
- Schnitte danach mindestens 20 Minuten abkühlen lassen.
- 2 x 2 Minuten Aqua dest.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

c. Blockierung der endogenen Enzymaktivität (Endogene alkalische Phosphatase)

Essigsäure (20 % ig) herstellen:

- 160 ml Aqua bidest und 40 ml Eisessig (100 % ige Essigsäure) mischen.
- Inkubation mit 20 % iger Essigsäure für 10 Sekunden bei RT in Standküvette.
- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Schnitte mit DAKO-Pen umkreisen.

d. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

- Inkubation mit Blockpuffer (5 % iges BSA) für 30 Minuten bei RT.

#### e. Inkubation mit primärem Antikörper

Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Cyclin D2 in einer Verdünnung von 1:50 in Blockpuffer verwendet. Mit diesem Primärantikörper wurde 1 Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Auf den jeweils mitgeführten Kontrollschnitten wurde der Primärantikörper durch Blockpuffer ersetzt.

#### f. Inkubation mit sekundärem Antikörper

Es wurden Kaninchen-Anti-Maus Immunglobuline (1:25 verd.) eingesetzt.

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.

#### g. Inkubation mit APAAP-Maus-Enzymkomplex

Ein löslicher APAAP-Maus-Enzymkomplex (1:50 verd.) wurde verwendet.

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit APAAP-Enzymkomplex in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.

#### h. Farbreaktion (Entwicklung mit HistoMarkRed)

- 3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).
- Inkubation mit HistoMark-Red in feuchter Kammer für 90 Minuten bei RT.
- Abstoppen der Reaktion mit kaltem Waschpuffer.
- 1 x 5 Minuten Aqua dest.
- Gegenfärben mit Contrast BLUE für 15 Sekunden.
- 15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.
- Eindecken der Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine.

### **3.2.1.4 Lichtmikroskopie und Auswertung der Immunreaktion**

Die verschiedenen Färbungen und Immunreaktionen konnten mit dem Leica DM LB-Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar) mit integrierter 3-CCD Color Video Camera KY-F55B (JVC, Friedberg) ausgewertet werden. Für die Abbildungen im Ergebnisteil wurde das folgende und von der Firma Leica hergestellte Objektiv verwendet: N PLAN 40x/0,65 40x. Die digitale Bildaufnahme, Archivierung und Dokumentation wurde mit Hilfe folgender Software durchgeführt: DHS Bilddatenbank V5.00 (Dietermann & Heuser Solution GmbH, Greifenstein Beilstein).

### 3.2.2 Western Blot

Für den Western Blot wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene Hodenproben als Gesamthomogenat eingesetzt. Die Diagnosen einer normalen Spermatogenese, eines CIS oder invasiven Tumors wurden histologisch gesichert, so dass die verwendeten Hodenproben als repräsentativ für die jeweiligen Zelltypen betrachtet werden konnten.

Die zuvor angefertigten Gefrierschnitte (siehe 3.1.3) dienten als Referenzschnitte für die histologische Beurteilung der im Western Blot und in der RT-PCR eingesetzten Hodenproben. Für das Verfahren wurden zunächst Proteine in einer denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Beim Blotten wurden diese Proteine aus dem Polyacrylamidgel durch Elektrotransfer auf eine unbewegliche PVDF-Membran übertragen und dort Cyclin D2-Protein immunologisch nachgewiesen.

#### a. Herstellung des SDS – Polyacrylamidgels

Man benötigte ein Trenngel mit 10% iger Acrylamidkonzentration und ein 5 % iges Sammelgel. Die angegebenen Mengen galten für ein Minigel (0,75 mm x 7,3 cm x 8,3 cm):

<i>10 % Trenngel</i>		<i>5 % Sammelgel</i>	
Acrylamid / BIS	1,7 ml	Acrylamid / BIS	0,50 ml
Tris-Puffer pH 8,8	1,3 ml	Tris-Puffer pH 6,8	0,38 ml
H <sub>2</sub> O	2 ml	H <sub>2</sub> O	2,1 ml
SDS 10 %	50 $\mu\text{l}$	SDS 10 %	30 $\mu\text{l}$
APS 10 %	17 $\mu\text{l}$	APS 10 %	30 $\mu\text{l}$
TEMED	3 $\mu\text{l}$	TEMED	2 $\mu\text{l}$

Acrylamid (30%iges Acrylamid-Mix), Tris-Puffer (siehe Anhang 9.3), Wasser und SDS wurden für das Trenn- und Sammelgel getrennt angesetzt und gut durchmischt. Dann wurde zuerst durch Zugabe der Radikalbildner APS und TEMED die Polymerisation im Trenngel in Gang gesetzt, das Trenngel in die Gießapparatur gefüllt und mit Methanol (100 %) überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wurde der nicht polymerisierte Überstand mit dem Methanol entfernt. Das Sammelgelgemisch wurde mit APS und TEMED versetzt, gut gemischt und auf das Trenngel gegossen. Dabei wurde sofort ein Kamm mit den Platzhaltern für die Proben eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Polymerisationszeit wurde der Kamm entfernt und das Gel mit den Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer (1x Laufpuffer: Tris-HCL, Glycin, SDS; siehe Anhang 9.3) wurde in die Pufferkammern der Anode und der Kathode eingefüllt.

### b. Probenvorbereitung

Hodenproben wurden aufgetaut und mit dem Vortex gut gemischt. Zu jeweils 10 µl Proteinprobe wurden je 10 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (siehe Anhang 9.3) gegeben und das Gemisch sofort 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Probe wurde kurz auf dem Vortex gemischt und kurz zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Nur der Überstand wurde für die Gelelektrophorese verwendet. Zur Kontrolle bzw. zum Molekulargewichtsvergleich wurde pro Gel ein Standard-Proteingemisch in die erste Spur als Marker aufgetragen.

### c. Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer Elektrophorese-Apparatur unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Proben (15 µl) und Proteinmarker (10 µl) wurden vorsichtig mit einer Hamiltonspritze in je eine Tasche auf dem Taschenboden aufgetragen. Nach Verbinden der Elektroden mit dem Stromgeber mit der Flussrichtung zur Kathode hin fand die SDS-Gelelektrophorese bei 200 V statt und wurde nach 45 – 60 Minuten beendet, sobald die Lauf-front mit Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte:

### d. Elektroblothing

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden unmittelbar nach der Gelelektrophorese im „Semi-Dry-Verfahren“ auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte senkrecht zur Trennung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entsprach. Dabei wurden in Puffer getränkte Filterpapiere als Pufferresevoir verwendet. Anschließend konnte das untersuchte Protein mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Im Einzelnen wurde das Trenngel des Elektrophoresegels ausgeschnitten, d.h. das Sammelgel entfernt, und ein Filterpapier sowie eine PVDF-Membran auf diese Trenngelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde kurz mit 100% Methanol getränkt und danach ebenso wie Gel und Filterpapier getrennt für 15 Minuten in Puffer 2 äquilibriert. Zusätzlich wurden je 2 Filterpapiere in Puffer 1 und Puffer 3 getränkt. Anschließend wurde das Blothing-Sandwich blasenfrei unter Verwendung eines angefeuchteten Glasstabes wie folgt zusammengebaut: Filterpapiere aus Puffer 1, ein Filterpapier aus Puffer 2, PVDF-Membran aus Puffer 2, Gel aus Puffer 2, Filterpapiere aus Puffer 3. Nach dem Entfernen von überschüssigem Puffer neben dem Blothing-Sandwich mit Filterpapier wurden die obere Elektrodenplatte und Schutzhaube aufgesetzt und die Elektroden mit dem Stromgeber verbunden. Bei konstanter Stromstärke von 150 mA und unter einer Spannung von 25 V fand das Elektroblothing im Semi-Dry-Verfahren statt.

Nach dem Elektroblothing wurde die PVDF-Membran an einer Seite mit dem Bleistift markiert und für zwei Minuten in Aqua bidest geschwenkt. Danach wurde die Membran kurz mit Methanol benetzt und bei RT kurz getrocknet. Für die Nachweisreaktion wurde die Membran schließlich mit 100 % igem Methanol und Aqua bidest kurz rehydriert.

#### e. Nachweisreaktion

Zur Detektion kamen ausschließlich kommerzielle Antikörper, Detektionssysteme und Farbstoffe zur Anwendung.

##### *1. Primärantikörper*

Name/Klon	Hersteller	Art	Verdünnung	Färbemethode
Polyklonaler Cyclin D2 IgG (C-17)	Santa-Cruz, USA	Kaninchen	1:1000	ABC

##### *2. Sekundärantikörper*

Name	Hersteller	Art	Verdünnung
Biotinylierte Ziege-Anti-Kaninchen IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark	Ziege	1:100

##### *3. Detektionssystem*

Name	Hersteller	Verdünnung
Vector Vectastain ABC-Elite-Kit Standard	Vector, Burlingame, USA	Ansatz und Verdünnung nach Herstellerangaben

##### *4. Entwicklerlösung*

Name	Hersteller	Farbe
True Blue Peroxidase Substrat	KPL, Gaithersburg, USA	Blau

Zuerst wurde die PVDF-Membran mit Blockpuffer I (siehe Anhang 9.3) langsam unter Schwenken mit einem Wippschüttler für 60 Minuten bei RT geschwenkt, um unspezifische kopplungsfähige Gruppen der Membran mittels 5% Milchpulver zu blockieren. Alle weiteren Schritte erfolgten unter langsamem Schwenken auf dem Wippschüttler. Nach dem Entfernen von Blockpuffer I wurde die Membran mit Primärantikörper (10 µl Antikörper in 10 ml Waschpuffer (0,1 M PBS pH 7,4 mit 1% BSA und 0,1% Tween 20; siehe Anhang 9.3) über Nacht bei RT inkubiert. Nach dem Entfernen der Primärantikörperlösung wurde dreimal 10 Minuten bei RT mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Blockpuffer II mit 5% igem Ziegenserum 30 Minuten bei RT blockiert. Nach dem Entfernen von Blockpuffer II wurde der Sekundärantikörper (10 µl Antikörper in 10 ml Waschpuffer; siehe Anhang 9.3) hinzugefügt und 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung und nach intensivem Waschen (3 x je 10 Minuten mit Waschpuffer) wurde mit ABC-Kit (siehe Anhang 9.3) inkubiert und nach dem Entfernen von ABC-Kit wiederum gründlich gewaschen (3 x je 10 Minuten mit Waschpuffer).

#### f. Farbreaktion

Die Detektion der immunmarkierten Proteinbande erfolgte unter Lichtausschluss mit True Blue Peroxidase Substrat für 5-10 Minuten bei RT unter Schwenken auf dem Wippschüttler. Die Farbreaktion wurde gestoppt durch dreimaliges Waschen der Membran mit Aqua bidest. Danach wurde die Membran auf Filterpapier im Trockenschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C unter Lichtabschluss getrocknet. Die Dokumentation und Auswertung der Farbsignale erfolgte mit Hilfe eines Scanners sowie mit Hilfe der Silver Fast Ai 5.5 Software der Firma Laser Soft Imaging, Kiel. Ein zur Kontrolle durchgeführter Western Blot ohne Primärantikörper zeigte keine Farbreaktion.

### **3.2.3 *In Situ* Hybridisierung**

Bei der *In Situ* Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden, die mit der komplementären mRNA der Zelle binden, mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert. Diese Methode wurde benutzt, um spezifische mRNA einer bestimmten Zielsequenz *in situ* nachzuweisen, in diesem Fall Cyclin D2-mRNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden für diesen Nachweis Paraffinschnitte von neun ausgewählten Patienten (Alter: 39-58 Jahre) im mittleren Alter von 39,9 Jahren verwendet. Die histologische Beurteilung ergab in drei Fällen eine sowohl qualitativ als auch quantitativ normale Spermatogenese (Score 10-8; Bergmann und Kliesch, 1998b). Bei den Patienten wurden entweder ein CIS und/oder ein maligner Tumorbefund (Seminom) diagnostiziert. Außerdem wurde ein Schnitt mit „Sertoly-cell-only“ (SCO)-Syndrom als zusätzliche Negativkontrolle mitgeführt.

#### Hygienische Vorbedingungen für den mRNA-Nachweis

Beim Arbeiten mit RNA mussten sämtliche Materialien RNase-frei sein, d.h. Glas, Porzellan, Metall, und Arbeitsgeräte in Alufolie verpackt und für 4 h im Sterilisator bei 180°C autoklaviert und die Arbeitsplatte vor Arbeitsbeginn gründlich mit abs. Alkohol (Ethanol) und RNase-Away\*Reagent gereinigt werden. Man verwendete DEPC als RNase-Inhibitor zur Herstellung von RNase-freien Lösungen. Sämtliche Lösungen, Mikroreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert und die Verwendung frischer Einmalhandschuhe war Pflicht.

### Herstellung Digoxigenin-markierter mRNA Sonden

Zur Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter cRNA diente ein RNA-DIG Kit. Vektoren mit Inserts für Cyclin D2 wurden mit *RcoRI* (antisense) oder *XhoI* (sense) verdaut. Dadurch konnte sense cRNA (*NotI*) und antisense cRNA (*NcoI*) hergestellt werden. Das Schneiden der Cyclin D2-Vektoren geschah mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NotI*. Die geeignete Konzentration der DIG-RNA wurde im semiquantitativen Dot-Blot-Test ermittelt.

### **Erster Tag *in-situ* Hybridisierung**

- Am Vortag wurden ausgewählte Paraffin-Schnitte und ein Xylolbad über Nacht bei 60 °C in den Trockenschrank gelagert.
- Heizplatte auf 70 °C aufheizen, Wasserbad auf 70 °C aufheizen und Alkoholreihe:
- OT in Küvettenhalter einsortieren.
- 1 x 5 Minuten Xylol (60 °C).
- 1 x 5 Minuten Xylol (RT).
- 1 x 5 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten 70 %iger Alkohol (Ethanol).
- 1 x 5 Minuten DEPC-Wasser.
- 1 x 20 Minuten 0,2 N HCL.
- Proteinase K für 25 Minuten zur Demaskierung antigener Bindungsstellen.
- Inkubationen bei 37 °C erfolgten in einer feuchten Kammer (Incubation Tray, Tupperware), die mit Kleenex-Tüchern und einem Gemisch aus 100 ml Formamid, 20 ml 20 x SSC und 80 ml DEPC-Wasser befeuchtet wurde.
- 1 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

### Prähybridisierung:

- 1 x 5 Minuten 0,2 %ige Glycin-Lösung (Standküvette).
- 15 Sekunden 20 %ige Essigsäure, 4° C (Standküvette).
- 1 x 5 Minuten PBSM (Standküvette).
- 1 x 10 Minuten 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (Standküvette).
- 1 x 5 Minuten PBSM (Standküvette).
- 1 x 45 Minuten Glycerol 20 %ig in DEPC-Wasser.

### Hybridisierung:

Substanzen:	Sense	Antisense
<i>Sonden-Gemisch:</i>		
• DEPC-Wasser	4 µl	4 µl
• Salmon sperm DNA (1mg/ml)	4 µl	4 µl
• Yeast t-RNA (1mg/ml)	8 µl	8 µl
• DIG markierte -cRNA	4 µl	4 µl

### *Hybridisierungspuffer:*

• DEPC-Wasser	56 µl	56 µl
• 20 x SSC (2x)	40 µl	40 µl
• 50 % Dextransulfat (10%)- 70 °C	80 µl	80 µl
• Denhardt-Reagenz (BFP; 1x)	4 µl	4 µl
• Deionisiertes Formamid (50 %)	200 µl	200 µl

### Zur Denaturierung und Hybridisierung:

- Schnitte kurz in 2x SSC tauchen; 10-12 Minuten auf die Heizplatte (70 °C) legen, dann auf einem Kühlakku abschrecken.
- Sonden-Gemisch 10-12 Minuten in Wasserbad (70 °C) stellen, dann in Eiswasser abschrecken.
- Sonden-Gemisch und Hybridisierungs-Puffer zusammenpipettieren und auf die Schnitte geben (50 µl/Schnitt).
- Inkubation in feuchter Kammer über Nacht bei 37 °C unter einem Deckglas.

### **Zweiter Tag *in-situ* Hybridisierung**

#### Posthybridisierung

Waschen zur Reduzierung der Hintergrundfärbung durch eine unspezifische Hybridisierung:

- 4 x 10 Minuten 4 x SSC zum Ablösen der Deckgläser.
- Inkubation (Feuchte Kammer): 1,35 ml 4 x SSC + 150 µl 10 x RNaseA/RNaseT Stammlösung; 30 Minuten bei 37 °C.
- 4 x 5 Minuten 4 x SSC, 37 °C.
- 1 x 15 Minuten 2 x SSC, 60 °C.
- 1 x 5 Minuten 0,1 x SSC, RT.

- 1 x 5 Minuten 2 x SSC, RT.

#### Immunhistochemie:

- 1 x 10 Minuten 1 x TNMT, RT.
- 1 x 1h 3 % BSA in 1 x TNMT, RT.
- 1 x 10 Minuten 1 x TNMT, RT.
- Inkubation (Feuchte Kammer): 666 µl 1 x TNMT + 333 µl 3 % BSA in 1 x TNMT + 2 µl Anti DIG-Fab-Antikörper, konjugiert-alkalische Phosphatase; über Nacht bei 4 °C.

#### **Dritter Tag *in-situ* Hybridisierung**

- 1 x 10 Minuten 1 x TNMT.
- 1 x 5 Minuten NTB.
- 1 x 5 Minuten NTB + 1 ml 1M Levamisol für die Blockade unspezifischer Reaktionen der AP.
- Inkubation (Feuchte Kammer): Entwicklung durch Umsatz des AP-Substrates mit NBT-BCIP-Lösung.
- 1 x 5 Minuten 1 x NTB + 1 ml 1 M Levamisol zum Nachweis von AP.
- 1 x 5 Minuten Aqua bidest.
- Eindecken mit DAKO Glycergel zur Lichtmikroskopie.

#### **3.2.4 Laser Cell Mikrodisektion und Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion**

Für die UV-Laser-assistierte Mikrodisektion (Laser Cell Mikrodisektion oder LCMD) und den Nachweis der empfindlichen mRNA mittels RT-PCR war es entscheidend, das Hodengewebe relativ frisch nach der Entnahme zu verwenden. Von 12 ausgewählten Hodenproben mit histologisch gesicherter Diagnose wurden Serien von Gefrierschnitten angefertigt und die Hälfte mit PLAP gefärbt. Mithilfe der LCMD-Technik gelang es, aus den unbehandelten Schnitten bestimmte Zellen bzw. Zellareale (normale Keimzellen, CIS- und invasive Tumorzellen usw.) gezielt zu isolieren. So war die Untersuchung der Expression von Cyclin D2-mRNA für einzelne Zellprofile des Hodens möglich.

### Histologische Selektion von Zellproben für die RT-PCR

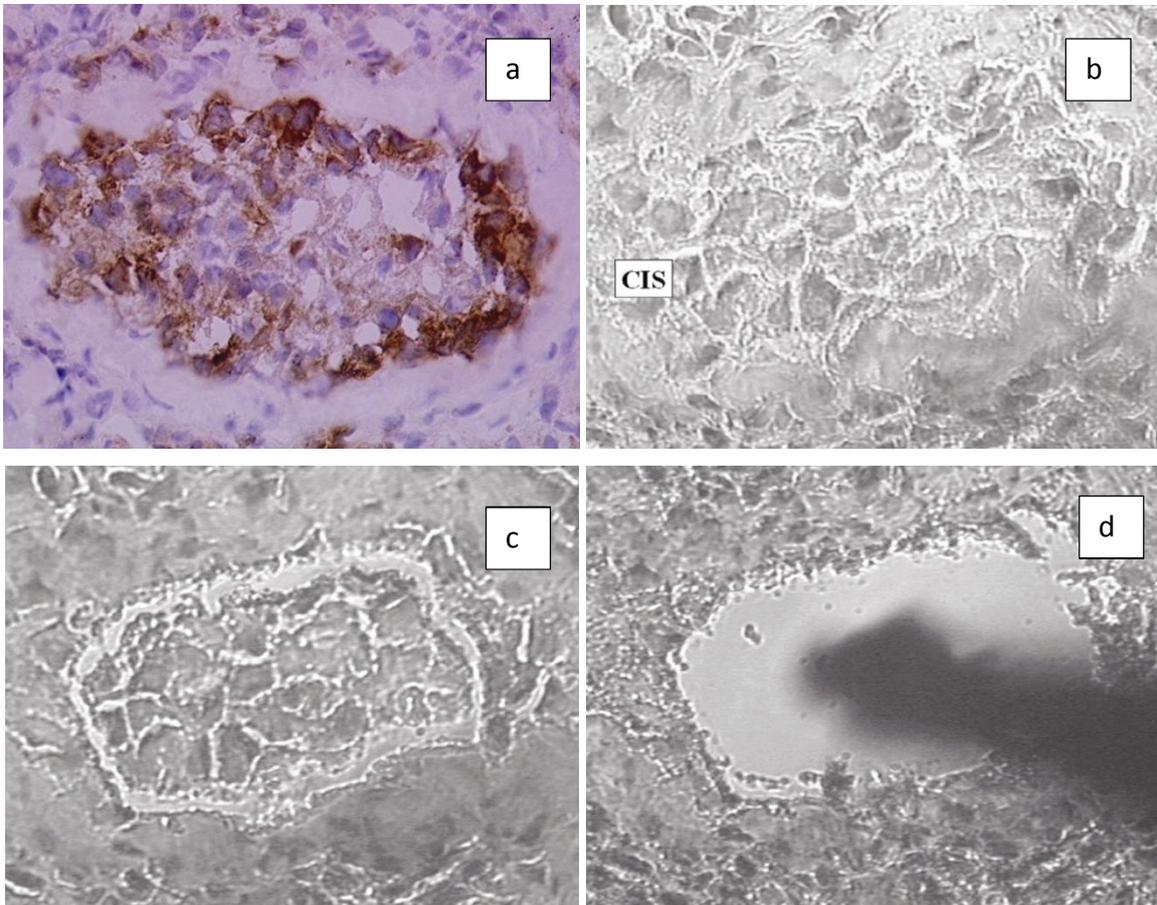
Das LCMD Gerät Palm-MicroBeam setzte sich aus Komponenten für Bildgebung und Probengewinnung zusammen. Zur Mikrodissektion einzelner Areale aus dem Gefrierschnitt waren hierfür notwendige Geräte auf einer erschütterungsfreien Unterlage angebracht (Abb. 10). Das mit einem UV-Laser (Nitrogen/Stickstoff-Laser mit 337 nm, maximale Frequenz 20 Impulse/Sekunde, Impulsdauer 3 ns; Palm GmbH, Wolfratshausen) versehene Hochleistungsmikroskop (Axiovert 135; Zeiss, Oberkochen) war hierfür in Brennweite der UV-Laserstrahlung zu justieren. Über ein Pedal wurde der Laser zugeschaltet. Um das gewünschte Areal als limitierte Zellprobe aus dem Schnitt herauszutrennen, waren zusammenhängende Zellprofile vollständig mit dem fokussierten Laserstrahl zu umfahren. Man orientierte sich mit einer 3-CCD Color Video Camera KY-F55B (JVC, Friedberg), die über ein Kabel mit dem Computerbildschirm verbunden war. Der leistungsstarke Rechner und die entsprechende Software (Palm GmbH, Wolfratshausen) ermöglichten dem Untersucher, den Objektisch für das Heraustrennen der jeweiligen Probe zu steuern. Kleinere Bereiche konnten so aus dem übrigen Verbund eines Gefrierschnittes präzise herausgelöst werden. Mit geführten Bewegungen der Computer-Maus wurde nach Heraustrennen das selektierte Zellmaterial über einen Mikromanipulator (Palm GmbH Wolfratshausen) in ein spezielles Reaktionsgefäß steril übergeführt (Abb.11a-d).



**Abb. 10:** Aufbau des PALM-UV-Laser MicroBeam-Systems

## Gewinnung von präinvasiven Tumorzellen für RT - PCR

Am Beispiel eines Gefrierschnitts wurde der Pickvorgang von CIS dargestellt (Abb.11a-d):



**Abb. 11: Isolierung eines CIS-Tubulus aus Gefrierschnitt mittels LCMD**

Die LCMD lässt sich in drei Schritte aufteilen. Ein mit PIAP-Antikörper markierter CIS-Tubulus (a) wurde mittels Mikroskop bzw. Monitor ausgewählt (b), mit dem Laserstrahl umschnitten (c) und mit steriler Nadel und Mikromanipulator vom Deckglas aufgenommen (d). Für diese Aufnahmen wurde ein 40er Objektiv verwendet.

Damit die gewünschte Probe auch nach der Entnahme für die anschließende Untersuchung frisch blieb, wurden die isolierten Zellen sofort in vorbereitete PCR-Tubes mit je 10  $\mu$ l 1x LCMD-Lösung überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Proben konnten auch über Nacht bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert werden, ohne dass der molekulare Nachweis von mRNA davon beeinträchtigt wurde.

Nachfolgend sind alle Arbeitsschritte für LCMD und RT-PCR aufgeführt.

#### a. Vorbereitungen

- 10 x LCMD Stammlösung herstellen:
- 3,02 g Tris-HCl (500 mM) + 1,16 g KCl (400mM) + 0,30 g MgCl<sub>2</sub> (30 mM) in 50 ml Aqua bidest lösen und pH 7,8-8,0 einstellen.
- 50 µl DEPC zugeben und schütteln.
- Lösung über Nacht in Trockenschrank (37°C) stellen und anschließend autoklavieren; Lösung im Verhältnis 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnen (1x UV-LCMD) und aliquotieren. Die Aliquots werden bei -20°C gelagert.

#### *Protease-Stammlösung herstellen:*

- 10 mg Proteinase K mit 2,0 ml 1x LCMD mischen (5µg/ml) und aliquotieren (Der Zusatz von 1 µl Proteinase K zu 10 µl 1x LCMD entspricht 500 µg/ml).

#### *10x TAE-Laufpuffer herstellen:*

- 48,4 g Tris, 11,4 ml Essigsäure, 20 ml 0,5 M EDTA mischen, pH 8,4 einstellen und auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.

#### *1x TAE-Laufpuffer herstellen:*

#### *Auftragspuffer herstellen:*

- 0,05 g Bromphenolblau (0,5 ml aus 1 % iger Lösung), 0,05 g Xylencyanol (0,5 ml aus 1 % iger Lösung), 3 g Ficoll, 3 ml 5 M EDTA mischen und mit 1 x TAE auf 20 ml auffüllen und filtrieren.

#### *Agarosegel Mini\*-Gelelektrophorese-Apparatur für DNA-Gel*

- Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese mit zugehörigem Sicherheitsdeckel, 6,5cm x 10,5cm x 1,5 cm UV-transparentes Geltablett mit integriertem Lineal, Gummiendblöcke zum Gel gießen, doppelseitiger Gelkamm als Taschenschablone mit Kammhalter bereitstellen.
- Geräte reinigen, mit DEPC Wasser abspülen und bei RT trocknen lassen.
- Die Gummiendblöcke mit dem Geltablett zusammenfügen, Kamm in die dafür vorgesehene Halterung einsetzen und flüssiges Gel in Form gießen.

### *2%iges DNA-Agarosegel*

- 1 g Agarose (2%) in 50 ml 1x TAE-Puffer lösen.
- Agarose-Suspension in Mikrowelle vollständig aufkochen und bei RT auf 60 °C abkühlen.
- 20 µl EtBr zugeben und mischen.
- Agarose-Lösung luftblasenfrei in das mit einem Kamm versehene Geltablett gießen.
- Agarose-Lösung bei RT abkühlen und erstarren lassen.
- Taschenschablone und Gummiblöcke vorsichtig entfernen.
- Verpackung des Gels in Frischhaltefolie und Lagerung im Kühlschrank.

### *Herstellen der Gefrierschnitte*

- 5 µm dicke Gefrierschnitte auf unbeschichtete Deckgläser aufschmelzen und 1 bis 2 Minuten lufttrocknen lassen.
- Schnitte 45 Sekunden mit Hämatoxylin färben.
- Schnitte 10 Sekunden in Aqua bidest spülen.
- Deckgläser in zuvor mit Aqua bidest befüllte Standkuvette einsortieren.
- Kurz in 70 %igen Alkohol (Ethanol).
- Kurz in 96 %igen Alkohol (Ethanol).
- Aufbewahrung der Gefrierschnitte in verschließbarer Standkuvette mit frischem abs. Alkohol (Ethanol) im Kühlschrank.
- Bereitstellung von 10 kleinen (500 µl) PCR-Tubes mit je 10 µl 1x LCMD-Lösung, 2 Pasteur-Pipetten, 1 runden sterilen Pinzette, einem Dewar mit flüssigem Stickstoff, Handschuhen.

## b. Nachbereitung von LCMD und RT-PCR

### 1. Nachbereitung der jeweiligen Proben:

#### *Proteinase K-Behandlung:*

- PCR-Tubes kurz spinnen,
- 1 µl Proteinase K zugeben.
- 1 h bei 52 °C im Wasserbad.
- 10 Minuten bei 95 °C im Wasserbad.
- Kurz im Eiswasser abschrecken.

## 2. RT-PCR:

*Herstellung des Master-Mix I für die Reverse Transkription:*

*Ansatzmengen für Master-Mix (x10):*

- |  |       |
|--|-------|
| • 2,5 µl 10x PCR-Puffer II                   | 25 µl |
| • 2 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung       | 20 µl |
| • 1 µl 5 mM dNTPMix (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) | 10 µl |
| • 1 µl Random Hexamers                       | 10 µl |
| • 1 µl MuLV Reverse Transkriptase            | 10 µl |

Kontrollversuche sind durch Enzyersatz mit DEPC-Wasser durchgeführt worden.

In jedes der PCR-Tubes 7,5 µl Master-Mix pipettieren.

PCR-Tubes in den T3-Thermocycler stellen und das folgende Programm starten:

- |               |                       |
|---------------|-----------------------|
| • 1. Schritt: | 20 °C für 10 Minuten. |
| • 2. Schritt: | 43 °C für 75 Minuten. |
| • 3. Schritt: | 99 °C für 5 Minuten.  |
| • 4. Schritt: | 4 °C ∞.               |

*Herstellung des PCR-Master-Mix II:*

*Ansatzmengen für den forward und reverse primer (je x10):*

- |   |       |       |
|---|-------|-------|
| • 24,5 µl DEPC-Wasser                         | 245µl | 245µl |
| • 4 µl 10 x PCR-Puffer II                     | 40 µl | 40 µl |
| • 3 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung        | 30 µl | 30 µl |
| • 8 µl 5 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) | 80 µl | 80 µl |
| • 1,5 µl 5'-Primer (10 pmol)                  | 15 µl | 15 µl |
| • 1,5 µl 3'-Primer (10 pmol)                  | 15 µl | 15 µl |
| • 0,5 µl Taq-Gold-Polymerase                  | 5 µl  | 5 µl  |

Für negative Kontrollen wurde die Taq-Gold-Polymerase im Master-Mix II mit DEPC-Wasser ausgetauscht. Zur Herstellung von einem 50 µl Ansatz im Reaktionsgefäß konnten 42 ml Master-Mix II auf 10 PCR-Tubes verteilt und je 8 µl RT-Produkt hinzupipettiert werden. Die PCR-Tubes wurden in den T3-Thermocycler gestellt und mit dem Programm gestartet.

*Die Basensequenzen der verwendeten Primer:*

Cyclin D2 sense primer: 5`-AAGCCTCAGGAGCTGCTGGAGT-3`

Cyclin D2 antisense primer: 3`-CACGGTGGCTGAAATTCAAACGG-5`

Im T3-Thermocycler wurde das folgende primerspezifische Programm durchlaufen:

1. Schritt:	95 °C, 3 Minuten	Denaturierung
2. Schritt:	95 °C, 1 Minute	Denaturierung
3. Schritt:	59 °C, 1 Minute	Annealing
4. Schritt:	72 °C, 2 Minuten	Amplifikation
• Schritte 2. – 4. 10 x wiederholen.		
5. Schritt:	95 °C, 1 Minute	Denaturierung
6. Schritt:	59 °C, 1 Minute	Annealing
7. Schritt:	72 °C, 2 Minute	Amplifikation
• Schritte 5. – 7. 10 x wiederholen.		
8. Schritt:	72 °C, 2 Minuten	Denaturierung
9. Schritt:	4 °C ∞.	

Es wurde mit gestopften Spitzen mit/ohne Finntip Filter pipettiert und nur spezielle PCR-Tubes verwendet.

### c. Visualisierung der RT-PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese

*Probenvorbereitung und Auftragen der Proben:*

- Elektrophoresekammer horizontal einstellen und mit Laufpuffer (1xTAE) füllen bis das Gel bedeckt ist.
- 1 µl normierte Markerlösung (100bp DNS-ladder) in Eppendorf-Tube mit 10 µl Auftragspuffer ansetzen und in eine Geltasche pipettieren.
- 15 µl PCR-Produkt in Eppendorf Tube mit 5 µl Auftragspuffer versetzen und in jeweils vorgeformte Taschen pipettieren.
- Sicherheitsdeckel einsetzen und beide Sicherheitsstecker mit Stromgeber verbinden.
- PowerPac einstellen und mit der Elektrophorese starten.

### *Gelelektrophorese*

Die Gelelektrophorese wurde bei 2 A Stromstärke und 125 V Spannung durchgeführt, bis der Marker nach 30 Minuten in seine einzelnen Banden aufgetrennt war.

### *Detektion und Dokumentation*

Die Detektion der gelelektrophoretisch getrennten Amplifikation von DNS geschah unter UV-Licht (High Performance Ultraviolett Transilluminator; Ultra Violet Products, Cambridge, UK). Eine Visualisierung der EtBr-DNS Komplexe war somit möglich.

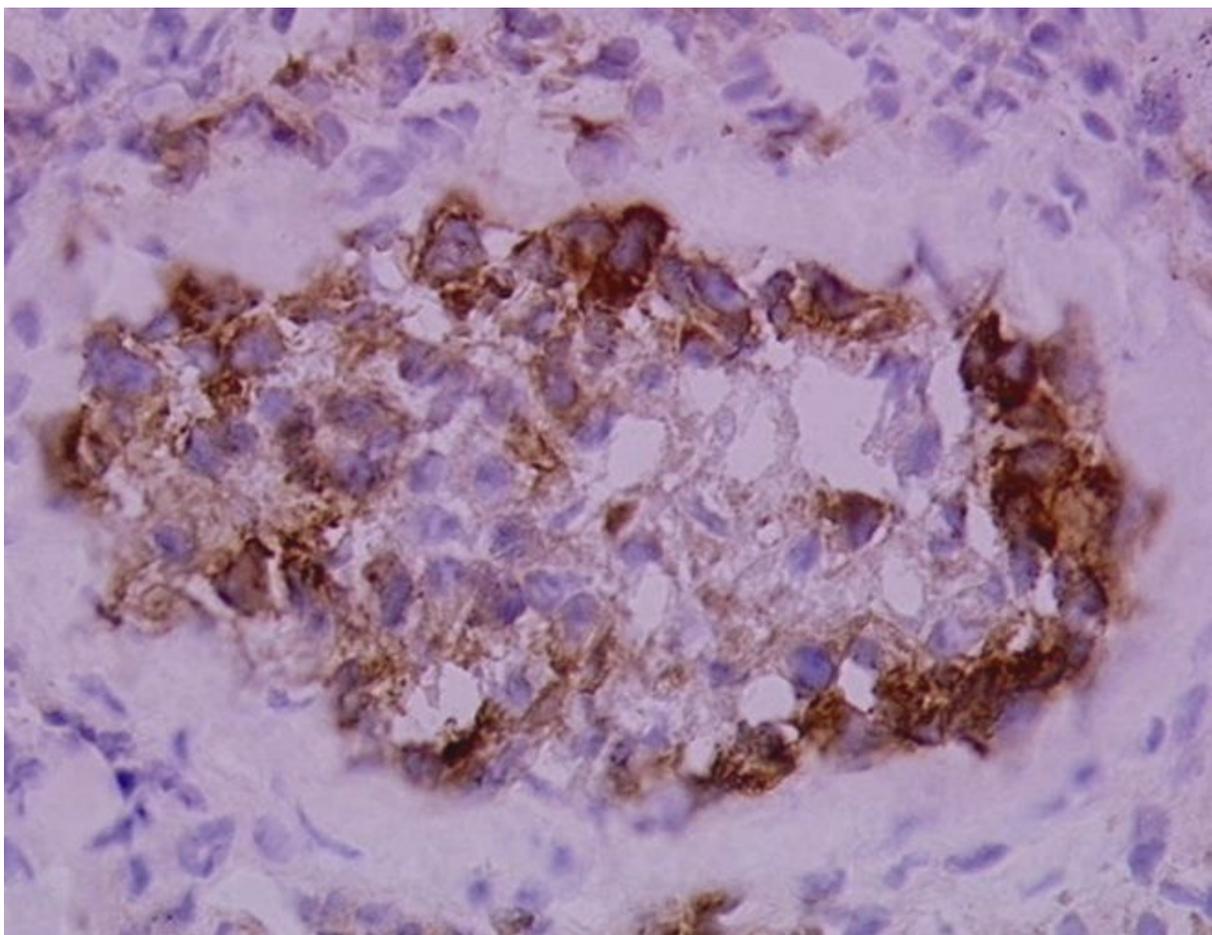
Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde die Polaroid GelCam (Polaroid, Offenbach) mit aufgesetzter Blende/Tubus und dem folgenden Film verwendet: Polaroid-Sofortbildfilm, High-Speed (unbeschichteter schwarz/weiß Film, Typ 667).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemie

#### 4.1.1 Nachweis von testikulären CIS-Zellen

Präinvasive CIS-Zellen konnten in Gefrierschnitten mittels PLAP-Färbung detektiert und so ein klinisch vorhandener Verdacht auf CIS histologisch bestätigt werden (Abb. 12). Die Intensität der Farbreaktion wurde mit Gefrierschnitten, die aus demselben immunhistochemischen Versuch stammten, verglichen. Zwischen einer positiven und negativen Immunreaktion wurde unterschieden. Die Negativkontrollen blieben stets unmarkiert. Einzelne Schnitte aus verschiedenen Färbungen zeigten ein vergleichbares Färbemuster.

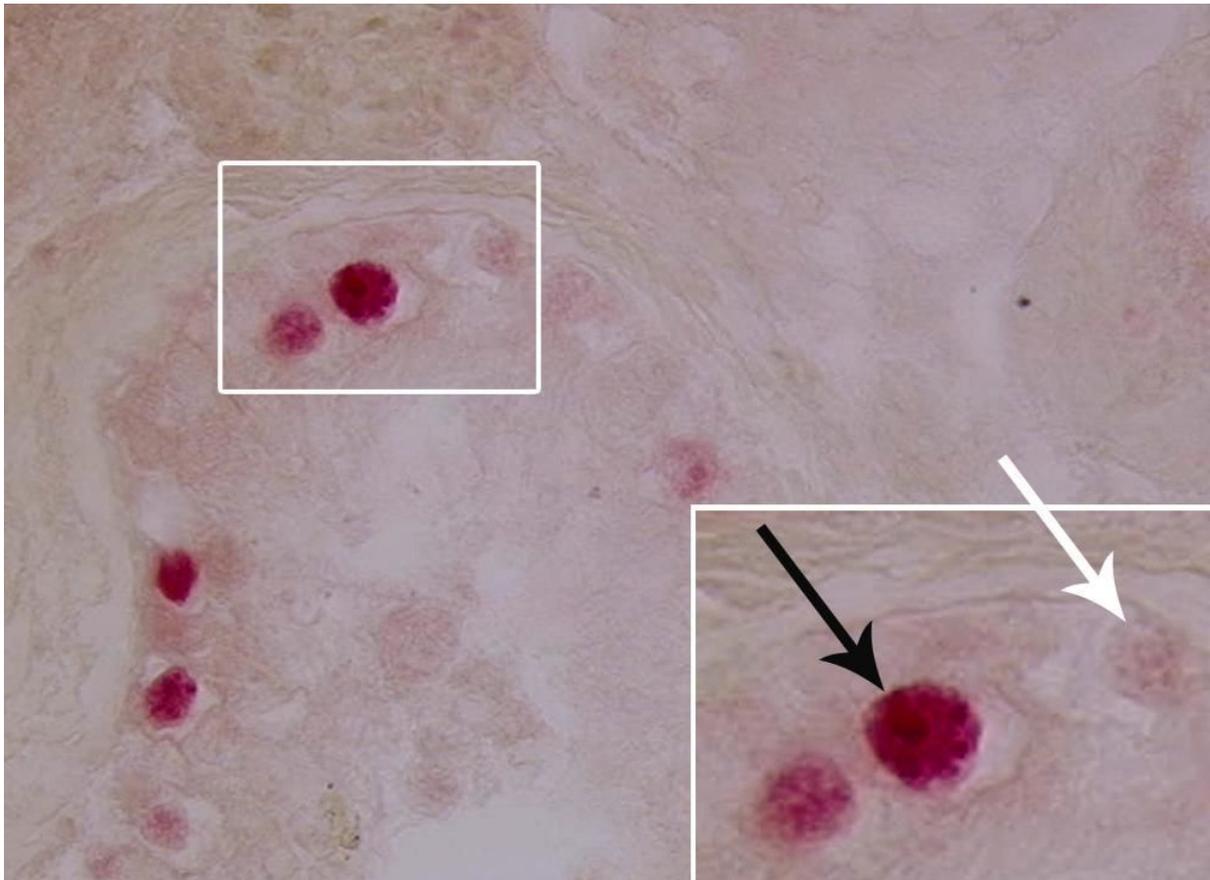


**Abb. 12:** Immunhistochemischer Nachweis von CIS-Zellen

Es wird ein mit PLAP-Antikörper markierter CIS-Tubulus gezeigt (Aufnahme mit 40er Objekt). Immunopositive CIS-Zellen liegen am Rand des Keimtubulus.

#### 4.1.2 Nachweis von Cyclin D2-Protein in CIS-Zellen

Cyclin D2-Protein konnte in den meisten präinvasiven Tumorzellen (CIS-Zellen) immunhistochemisch detektiert werden (Abb.13). Die Immunreaktion fand vorwiegend im Zellkern statt.

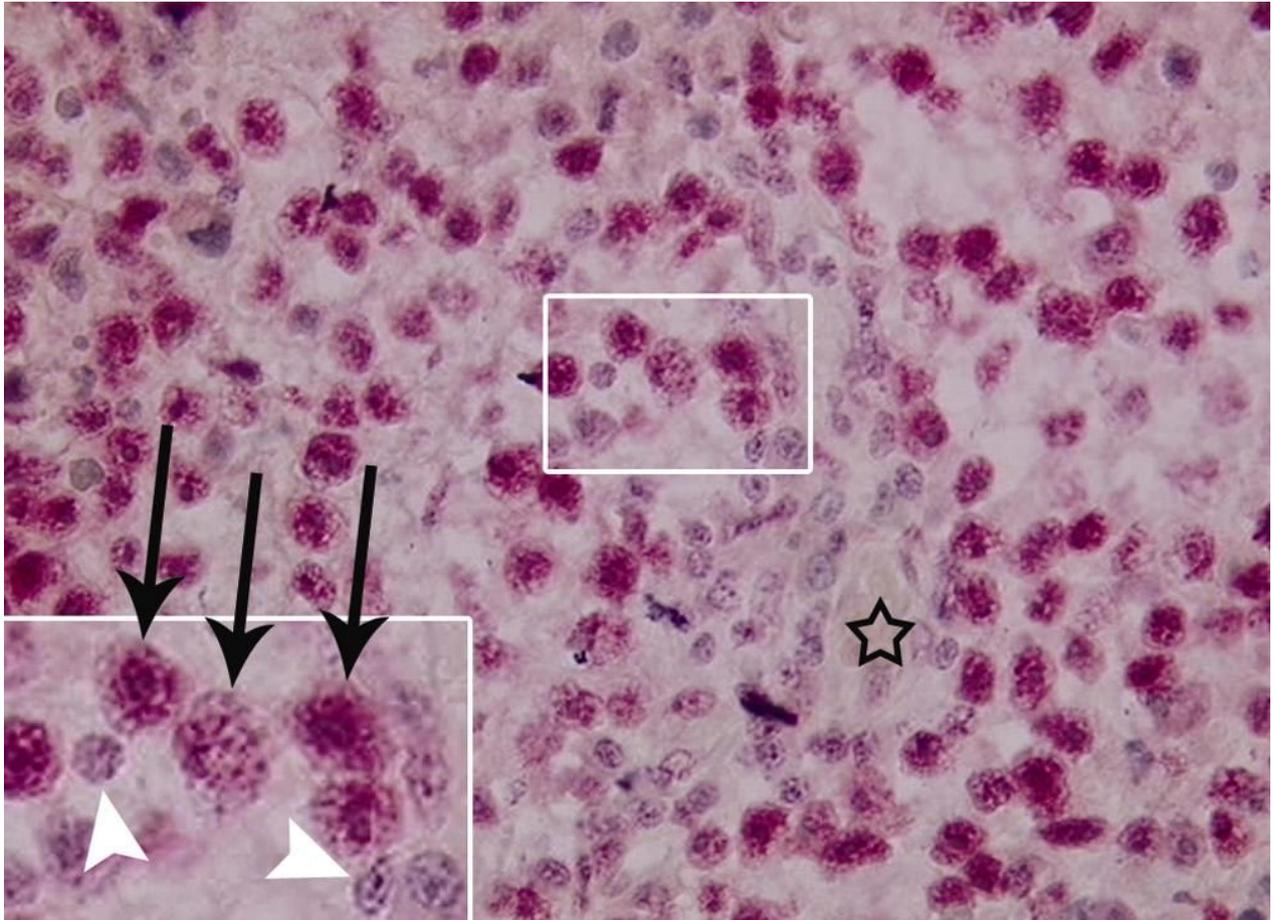


**Abb. 13:** Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D2 in CIS-Zellen

Cyclin D2 wurde in CIS-Zellen von Paraffinschnitten unter Verwendung der APAAP-Färbemethode detektiert. Der abgebildete Tubulus weist basalständige CIS-Zellen auf. Im vergrößerten Bildausschnitt deutet ein schwarzer Pfeil auf den immunopositiven Kern einer präinvasiven Tumorzelle. Daneben befindet sich eine nicht markierte Spermato gonie (weißer Pfeil).

### 4.1.3 Nachweis von Cyclin D2 in Tumorzellen

In invasiven Tumorzellen (Seminomen) wurde das Cyclin D2 ebenfalls mithilfe einer spezifischen Immunreaktion nachgewiesen. Die Kerne der positiv markierten Seminomzellen erschienen rot eingefärbt (Abb. 14).

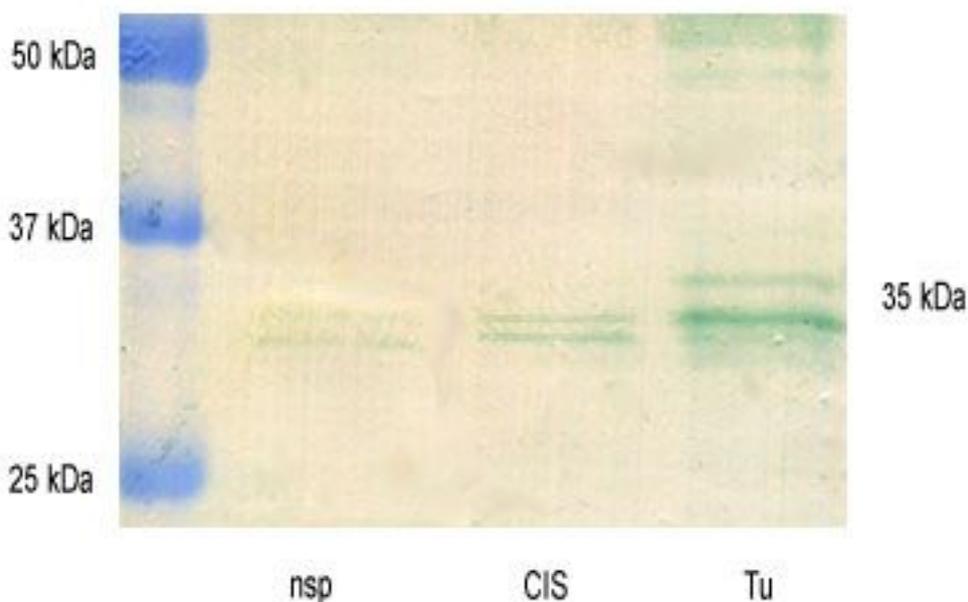


**Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D2 in Seminomzellen

Cyclin D2 wurde in testikulären Tumorzellen von Paraffinschnitten unter Verwendung der APAAP-Färbemethode detektiert. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt Tumorzellen und Lymphozyten. Schwarze Pfeile weisen auf gefärbte Zellkerne der Tumorzellen hin. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf immunonegative Lymphozyten. Mit einem Sternchen ist ein leicht schräg angeschnittenes Blutgefäß gekennzeichnet.

## 4.2 Western Blot

Die Detektion von Cyclin D2-Protein im normalen adulten Hoden und testikulären Tumoren mithilfe der Western Blot Analyse von Hodenhomogenat ergab eine Bande bei einem Molekulargewicht von 35 kDa (Abb. 15). Im Gegensatz zur oben beschriebenen immunhistochemischen Analyse ermöglichte der Western Blot sogar den Nachweis von Cyclin D2-Protein in normal differenzierten Keimzellen. Das aus intaktem Hodengewebe gewonnene Homogenat zeigte eine schwach positive Bande (Abb. 15: nsp). Das Homogenat von präinvasiven Tumorzellen ergab entsprechend dem Gehalt von CIS-Zellen eine deutliche Bande von Cyclin D2 (Abb. 15: CIS). Ein ausschließlich aus malignen Tumorzellen (Seminom) bestehendes Proteingemisch zeigte im Western Blot eine starke Bande für Cyclin D2 (Abb. 15: Tu).



**Abb. 15:** Cyclin D2-Protein Nachweis mit dem Western Blot

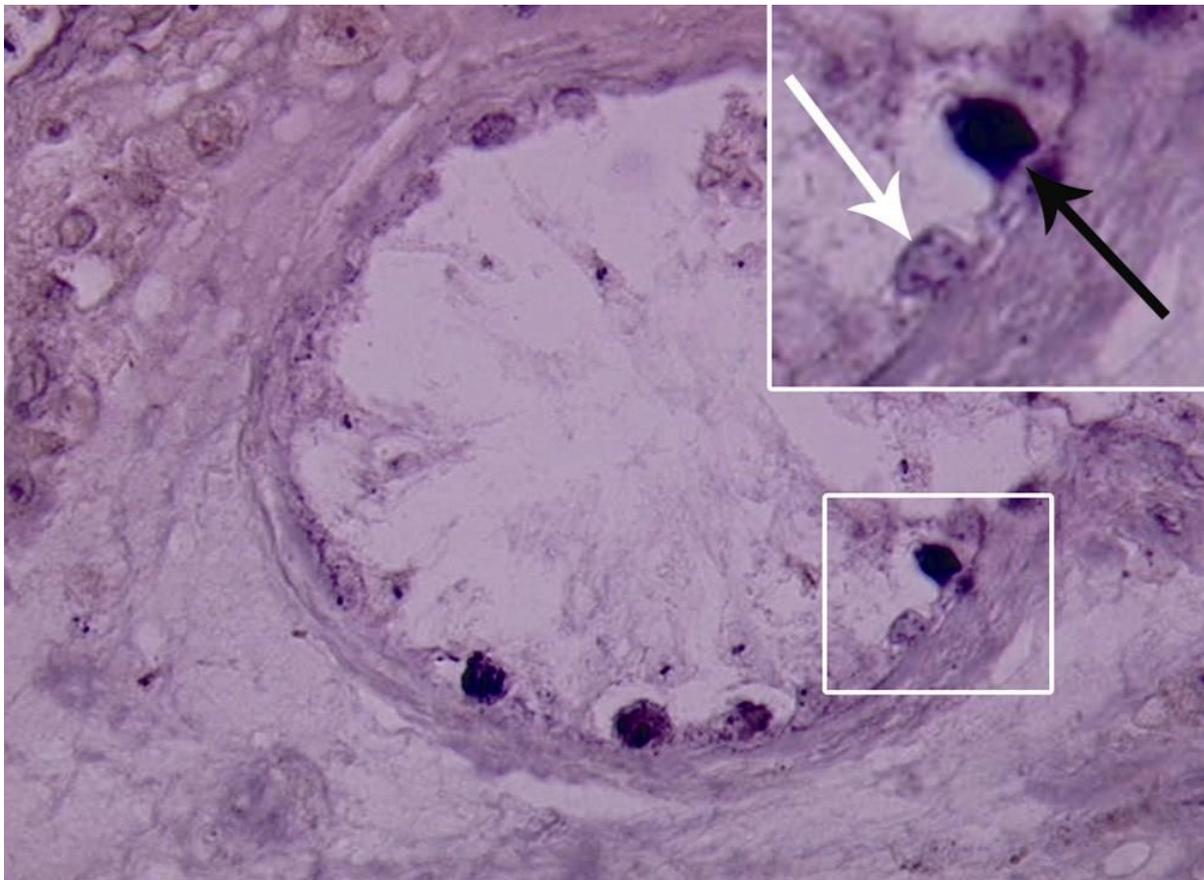
Die Detektion von Cyclin D2-Protein am humanen Hodenhomogenat aus Gefriermaterial erfolgte mit Hilfe der ABC-Methode. Das Proteingemisch vom normalen Hoden (nsp) ergab eine schwach positive Bande von Cyclin D2. Die testikulären Homogenate mit präinvasivem CIS führten zu einer starken Bande (CIS). Ein Homogenat aus Seminomzellen (Tu) zeigte im Western Blot dagegen eine deutliche Bande für Cyclin D2, deren Intensität dem untersuchten Gehalt maligner Zellen entsprach.

### 4.3 *In-situ* Hybridisierung

Mittels *in-situ* Hybridisierung wurden *in-vivo*-Signale von Cyclin D2 auf Transkriptionsebene in präinvasiven und malignen testikulären Tumorzellen nachgewiesen. Negative Kontrollen wurden zur Überprüfung der positiven Farbreaktion mitgeführt.

#### 4.3.1 Nachweis von Cyclin D2 mRNA in CIS Zellen

In präinvasiven CIS-Zellen wurden starke positive Signale der Expression von Cyclin D2-mRNA in Form einer schwarzen Farbreaktion detektiert (Abb.16). Insbesondere waren die Zellkerne von CIS-Zellen markiert, während das stark glykogenhaltige Zytoplasma dieser CIS-Zellen ausgewaschen wurde und daher keine Farbreaktion zeigte.

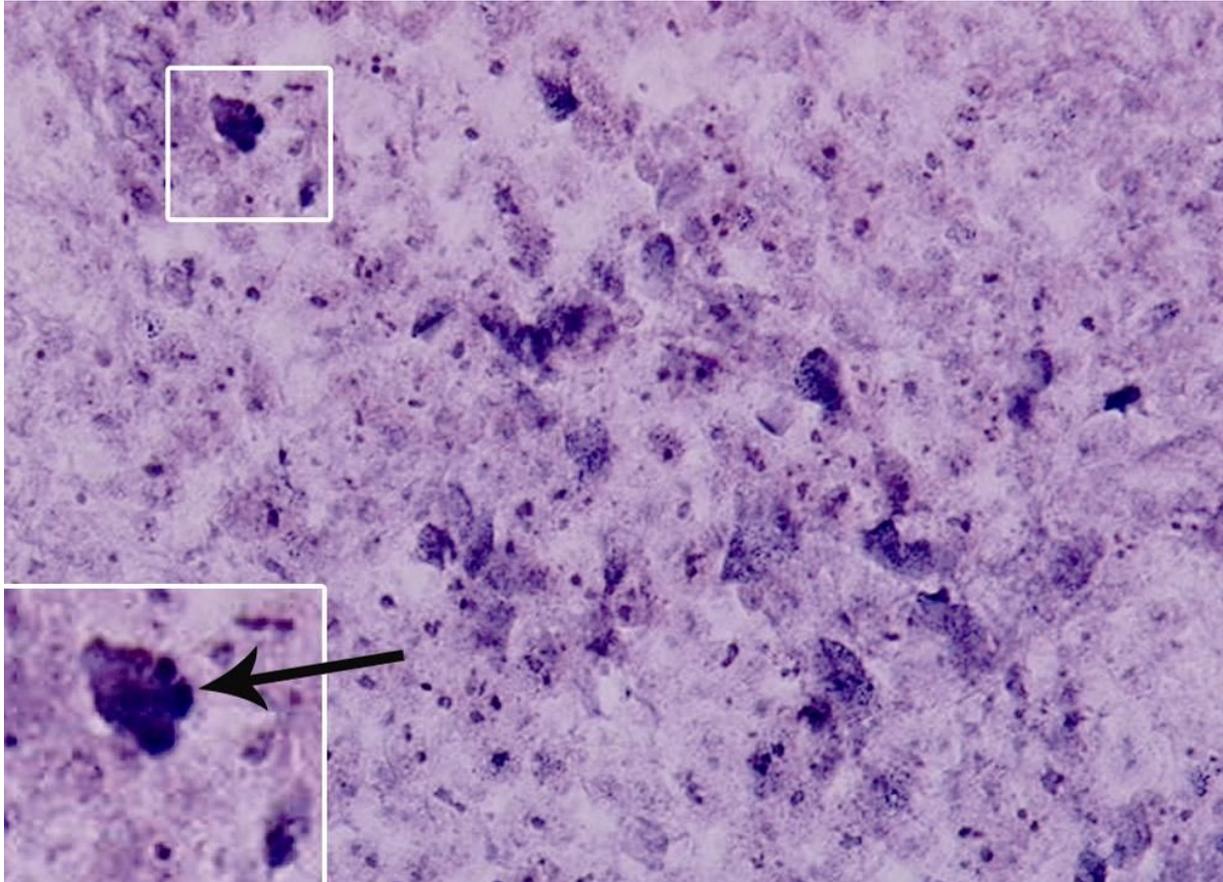


**Abb. 16:** Cyclin D2-mRNA in CIS-Zellen

Die Expression von Cyclin D2-mRNA zeigt sich in einer schwarzen Immunofärbung der Zellkerne präinvasiver Tumorzellen. Der aus einem CIS Tubulus heraus vergrößerte Bildausschnitt zeigt eine Tumorzelle in Nachbarschaft zu einer Spermatozoa. Der schwarze Pfeil deutet auf den positiv eingefärbten Kern der präinvasiven Tumorzelle. Der weiße Pfeil zeigt auf den unmarkiert gebliebenen Zellkern einer Spermatozoa.

### 4.3.2 Nachweis von Cyclin D2 mRNA in Tumorzellen

Der Nachweis von Cyclin D2-mRNA mittels *in-situ* Hybridisierung ergab auch in invasiven Tumorzellen reproduzierbare, deutliche Signale durch eine immunogene Farbreaktion (Abb.17). Die Cyclin D2-mRNA wurde gewebeständig in den Zellkernen von Seminomen detektiert und visualisiert.

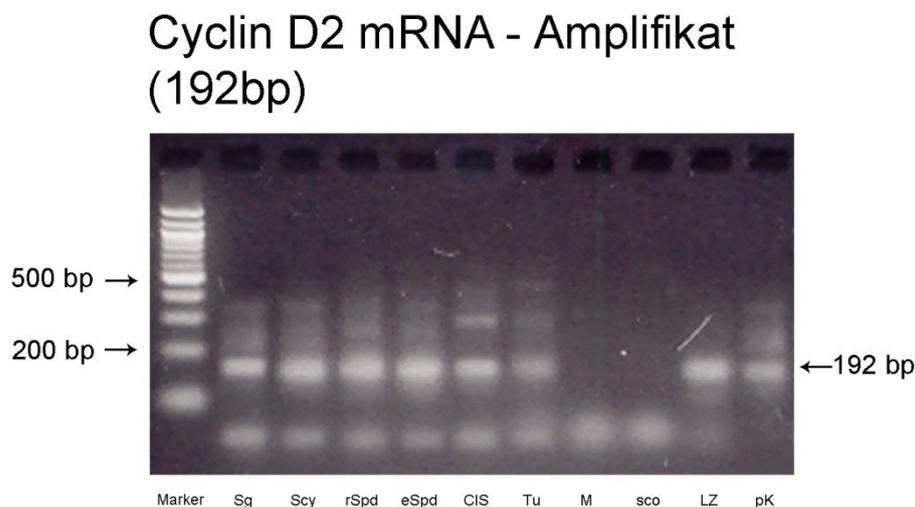


**Abb. 17:** Cyclin D2 mRNA in Tumorzellen

In Seminomen wird die Expression von Cyclin D2-mRNA über eine schwarze Immunfärbung der Zellkerne detektiert. Im vergrößerten Bildausschnitt zeigt ein Pfeil den Zellkern einer Tumorzelle mit einer starken Färbung von Cyclin D2 mRNA.

#### 4.4 Laser Cell Mikrodisektion und Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Unter Verwendung der Laser Mikrodisektion einzelner Zellen haben wir homogene Zellprofile aus testikulären Gefrierschnitten isoliert und das Vorkommen von Cyclin D2-mRNA in verschiedenen Keimzellpopulationen des Hodens mit normaler Spermatogenese sowie terminal differenzierten Sertoli-Zellen und präinvasiven und malignen Tumorzellen mittels RT-PCR-Technik untersucht. Die Kombination von einheitlicher Probenselektion mit molekular-genetisch äußerst empfindlicher Nachweisttechnik erlaubte die Detektion von Cyclin D2-mRNA in verschiedenen Reifestadien von Keimzellen, CIS-Zellen und invasiven Tumorzellen (Abb. 18). Außer den postmitotischen Zellen (Myofibrozyten und Sertoli Zellen) zeigten sämtliche hier untersuchten Keimzellpopulationen transkriptionale Aktivität des Cyclin D2, sogar elongierte Spermatisden und Leydigzellen. In negativen Kontrollen wurde die PCR ohne Enzym (RT) angesetzt oder zellzyklisch inaktives Probenmaterial (Myofibrozyten, SCO) verwendet. Als Positivkontrolle (pK) diente ein gesamter Tubulusquerschnitt.



**Abb. 18:** Agarosegelelektrophorese

Die Detektion von Cyclin D2-mRNA erfolgte durch transkriptionale Amplifikation einer 192 bp Sequenz, die im Agarosegel eine fluoreszierende Bande ergab. Marker: 100 bp-Leiter; Sg: Spermatogonien; Scy: Spermatozyten; rSpd: runde Spermatisden; eSpd: elongierte Spermatisden; CIS: carcinoma in situ; Tu: Tumor (Seminom); M: Myofibrozyten; sco: Sertoli cell only; LZ: Leydig Zellen; pK: positive Kontrolle (Tubulusquerschnitt)

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde das potentielle Vorkommen von Cyclin D2 auf Protein- und mRNA-Ebene im adulten humanen Hoden mit normaler Spermatogenese und in verschiedenen Formen testikulärer Tumore mittels Immunhistochemie, Western Blot und *in-situ* Hybridisierung untersucht. Zudem wendeten wir als besonders empfindliche Nachweistechnik die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) auf einzelne Zellgruppen an, die mittels Laser Cell Mikrodissektion (LCMD) isoliert wurden. Im adulten humanen Hoden war Cyclin D2-Protein mithilfe des Western Blots nachweisbar, im Vergleich zum Anteil in Carcinoma in situ und testikulären Keimzelltumoren jedoch niedrig. Mittels LCMD und RT-PCR war Cyclin D2-mRNA in sämtlichen Reifestadien von männlichen Keimzellen des adulten humanen Hodens nachzuweisen. Dagegen konnte in Myofibrozyten und Sertoli-Zellen keine Cyclin D2-mRNA detektiert werden.

### 5.1 Erhöhtes Cyclin D2 Protein in präinvasiven CIS- und malignen Tumorzellen

Während der immunhistochemische Nachweis von Cyclin D2 in normalen Keimzellen des adulten humanen Hodens negativ ausfiel, ergab er reproduzierbare, deutliche Signale sowohl in Kernen von präinvasiven CIS-Zellen, als auch in Kernen invasiver Tumorzellen (Seminom). Dabei war keine Korrelation zwischen der Cyclin D2-Färbung und der Proliferation festzustellen, die über den Proliferationsmarker Ki67 bestimmt wurde. Die starke Färbung der Zellkerne in CIS-Zellen und malignen Keimzelltumoren ließ allerdings auf eine Überexpression von Cyclin D2 in diesen Zellen schließen. Insgesamt bestätigen diese Resultate frühere immunhistochemische Befunde zur Expression von Cyclin D2-Protein in präinvasiven CIS-Zellen, verschiedenen Keimzelltumoren und davon abgeleiteten Zelllinien (Houlsworth et al. 1997, Bartkova et al. 1999, Chaganti et al. 2000, Schmidt et al. 2001).

Weiterhin führte ein Western Blot zu vergleichbaren Ergebnissen. Hodenhomogenat mit präinvasivem CIS ergab eine deutliche Bande für Cyclin D2-Protein, während das Homogenat aus Seminom eine starke Proteinbande zeigte, deren Intensität dem Gehalt maligner Zellen entsprach.

Da für diese Untersuchungen gleiche Mengen pro Bande aufgetragen wurden, deuten große Unterschiede in den Proteinbanden auf eine Deregulation der Cyclin D2 Expression in CIS-Zellen und malignen Tumorzellen hin, insbesondere unter dem Aspekt, dass in normalem Keimepithel nur eine viel schwächere Proteinbande von Cyclin D2 nachgewiesen wurde.

Diese Resultate konnten durch Daten zur Expression von Cyclin D2 auf RNA-Ebene untermauert werden. Mittels *in-situ* Hybridisierung konnte Cyclin D2-mRNA sowohl in präinvasiven CIS-Zellen, als auch in Seminomzellen eindeutig detektiert werden. Im Gegensatz dazu ergaben Spermato gonien im normalen Keimepithel keine sichtbaren *in-vivo*-Signale für Cyclin D2. Die Ursache dafür liegt eventuell an der nicht ausreichenden Empfindlichkeit der *in-situ* Hybridisierung. Ravnik und Mitarbeiter (2005) konnten z.B. unter Anwendung dieser Methode Cyclin D2 im murinen Hoden nicht lokalisieren, weil dessen Expression in Keimzellen möglicherweise zu niedrig war, um mit der *in-situ* Hybridisierung detektiert werden zu können.

## **5.2 Expression von Cyclin D2-Protein im normalen adulten humanen Hoden**

Ob Cyclin D2-Protein im adulten humanen Hoden exprimiert wird, war bisher unklar. Die wenigen immunhistochemischen Nachweise vom normalen humanen Hoden ergaben keine positiven Signale für Cyclin D2-Protein (Houldsworth et al. 1997, Bartkova et al. 1999), weil wahrscheinlich die Werte der Cyclin D2 Expression unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode lagen. Gelegentlich zeigte adulter humaner Hoden in der immunhistochemischen Analyse von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten schwache Signale von Cyclin D2-Protein in Spermato gonien (Chaganti et al. 2000). Andere Autoren fanden deutliche Signale einer Cyclin D2-Immunofärbung vorwiegend in späteren Stadien der humanen Spermatogenese, wie in den Kernen von Spermato tiden (Schmidt et al. 2001).

In der vorliegenden Studie ließ sich mittels Western Blot eine schwache, aber eindeutige Bande von Cyclin D2-Protein im Homogenat von adultem humanen Hoden nachweisen. Dieser neue und wichtige Befund besagt, dass Cyclin D2-Protein auch im normalen Keimepithel des adulten humanen Hodens vorkommt, wenn auch in viel geringerer Menge als in präinvasiven CIS-Läsionen und malignen Keimzelltumoren.

### 5.3 Vorkommen von Cyclin D2 mRNA im Verlauf der Spermatogenese

In dieser Studie konnten mithilfe der Laser Cell Mikrodissektion verschiedene Zellpopulationen in normalen Keimtubuli isoliert und ihre m-RNA mittels RT-PCR amplifiziert werden. Mit dieser spezifischen und hochempfindlichen Methode konnte gezeigt werden, dass Cyclin D2-mRNA nicht nur in CIS-Zellen und Seminomzellen vorkommt, sondern auch in verschiedenen Entwicklungsstadien von normalen Keimzellen nachweisbar ist. In Myofibrozyten und Sertoli-Zellen ließ sich keine Cyclin D2-mRNA detektieren, weil diese ausdifferenzierten Zellen keinen aktiven Zellzyklus besitzen. Im Gegensatz dazu zeigten sämtliche hier untersuchten Keimzellpopulationen verschiedener Entwicklungsstadien von Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatisden bis hin zu elongierten Spermatisden transkriptionale Aktivität des Cyclin D2. Andere Autoren haben bereits in immunhistologischen Studien an intaktem Hodengewebe eine Cyclin D2-Expression entweder in den Zellkernen von Spermatogonien (Chaganti et al. 2000) oder von Spermatisden nachgewiesen (Schmidt et al. 2001). Es sind bisher keine weiteren Studien zur Cyclin D2-Expression im adulten humanen Hoden bekannt. Mehrere Arbeitsgruppen haben aber das Expressionsmuster von Cyclin D2 im Hodengewebe der Maus mit normaler Spermatogenese untersucht. Während Nakayama und Mitarbeiter (1996) eine hohe Expression von Cyclin D2-mRNA in Spermatogonien gefunden haben, konnten sie keine positiven Signale in den restlichen Keimzellpopulationen des adulten Mäusehodens erkennen, möglicherweise weil die Cyclin D2-Werte unterhalb der Nachweisgrenze der *in-situ* Hybridisierung lagen. Eine andere Studie zeigte im adulten Maushoden eine Cyclin D2-Expression in Spermatogonien um das Stadium VIII des Keimepithels herum, wenn undifferenzierte Spermatogonien in differenzierte Spermatogonien übergingen (Beumer et al. 2000). Daraus lässt sich schließen, dass Cyclin D2 an diesem Differenzierungsschritt beteiligt sein könnte. Cyclin D2 wurde auch in Spermatozyten gefunden und kam ebenfalls in Spermatisden vor (Beumer et al. 2000). In Spermatozyten wurde Cyclin D2 in Zellkernen des Pachytäns exprimiert, die sich zu der Zeit in der Prophase der ersten meiotischen Teilung befanden. Daher könnte Cyclin D2 wie viele andere Zellzyklusproteine auch in der meiotischen Teilung eine Rolle spielen.

Insgesamt ergaben die von uns durchgeführten Untersuchungen der Cyclin D2-Expression auf mRNA-Ebene mittels LCMD und RT-PCR ein Verteilungsmuster von Cyclin D2-mRNA im adulten humanen Hoden, das mit früheren Resultaten im humanen Hoden und im Mäusehoden vergleichbar ist.

Allerdings erbrachte die Kombination aus LCMD und RT-PCR erstmals in dieser Arbeit den Nachweis von Cyclin D2 für alle Reifestadien der männlichen Keimzellen.

Die von uns gefundenen spezifischen Signale von Cyclin D2-mRNA in Spermatogonien bedeuten, dass Cyclin D2 nicht nur bei der Regulation der Proliferation, sondern auch bei der Differenzierung von Spermatogonien eine Rolle spielen könnte. Es handelt sich allerdings im Sinne einer Monade um nicht voneinander zu trennende Prozesse. Positive Signale von Cyclin D2-mRNA in Spermatozyten sind weitere Hinweise, dass Cyclin D2 im Verlauf der Spermatogenese noch weitere Funktionen haben könnte, z.B. die Beteiligung an meiotischen Teilungen. Mithilfe der RT-PCR konnten wir zudem die Expression von Cyclin D2-mRNA in runden Spermatischen klar nachweisen, während Beumer und Mitarbeiter (2000) in immunhistochemischen Analysen nur sehr schwache Signale von Cyclin D2-Protein in den Zellkernen von runden Spermatischen beobachtet haben. Es ist möglich, dass die Expression von Cyclin D2-Protein in diesem Entwicklungsstadium zu niedrig ist, um immunhistochemisch detektierbar zu sein entweder wegen einer niedrigen Translationsaktivität oder eines hohen Umsatzes von Cyclin D2-Protein in diesen Zellen.

Ein andere Arbeitsgruppe hat das Expressionsmuster von Cyclin D2-mRNA im Verlauf der postnatalen Hodenentwicklung in adulten Mäusen mittels quantitativer RT-PCR und die Expressionsprofile isolierter Keimzellpopulationen bestimmt und beobachtet, dass die Cyclin D2 Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien von Keimzellen im Verlauf der Spermatogenese von Spermatogonien bis hin zu den reifen elongierten Spermatischen kontinuierlich abnahm (Diederichs et al. 2005). Ein Vergleich mit unseren Daten ist nicht möglich, weil wir das Expressionsprofil von Cyclin D2 in Keimzellpopulationen des adulten humanen Hodens nur qualitativ untersucht haben. Um die Cyclin D2-Expression auf mRNA-Ebene im Verlauf der Spermatogenese zu quantifizieren und mit früheren Daten zu vergleichen, könnte in neuen Studien die transkriptionale Aktivität von Cyclin D2 in den verschiedenen Reifestadien von Keimzellen detektiert und das Verhältnis zum Zellprotein ermittelt werden.

Wie aus immunonegativen Resultaten in Sertolizellen vom Mäusehoden zu erwarten (Beumer et al. 2000), konnten wir auch unter Anwendung einer äußerst empfindlichen Methode keine Expression von Cyclin D2-mRNA in terminal differenzierten Zellen detektieren, wie Sertolizellen und Myofibrozyten.

Andererseits haben wir in interstitiellen Leydigzellen Cyclin D2-mRNA nachgewiesen, obwohl in diesen Zellen im adulten Hoden kaum Teilungsaktivität vermutet wird, wohingegen Leydigzellen im fetalen und unreifen Hoden als mitotisch aktiv angesehen werden (Ravnik et al. 1995). Dementsprechend zeigten Leydigzellen im adulten Mäusehoden kein immunoreaktives Signal für Cyclin D2 (Beumer et al. 2000). Unser Befund, dass Cyclin D2-mRNA in geringer Menge in Leydigzellen im adulten Humanhoden vorkommt, lässt darauf schließen, dass Cyclin D2 hier neben seiner mitogenen Rolle weitere Funktionen hat, z.B. an einer Signaltransduktionskaskade beteiligt sein könnte.

Die Beobachtung, dass Cyclin D2-mRNA auch in elongierten Spermatischen von Humanhoden exprimiert wurde, ist besonders überraschend, weil man nicht ohne weiteres nachvollziehen kann, welche Funktion Cyclin D2 in terminal differenzierten Spermien erfüllen könnte. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass eventuell etwas Cyclin D2-mRNA im Verlauf der Spermatogenese in den reifen Spermien verbleibt, um einen neuen Zellzyklusapparat wiederherzustellen. Es könnte auch auf der Ebene der terminalen Differenzierung in humanen männlichen Keimzellen etwas paternale mRNA benötigt werden, um die prämitotische G1-Phase neu einzuleiten. Das kann man zumindest aus früheren Befunden schlussfolgern, nach denen reife Spermien zum Zeitpunkt der Befruchtung paternale mRNAs auf die Oozyte übertragen (Ostermeier et al. 2004).

#### **5.4 Schlussfolgerungen**

Im Western Blot der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch im adulten humanen Hoden Cyclin D2-Protein exprimiert wird, wenn auch deutlich weniger als in präinvasiven CIS-Läsionen und Seminomen. Der zusätzliche Nachweis von Cyclin D2 in sämtlichen Keimzellstadien des normalen Hodens, der in dieser Studie erbracht wurde, deutet auf eine scheinbare Beteiligung von Cyclin D2 auch an der Differenzierung und meiotischen Reifeteilungen hin. Das mit unserer Studie belegte Cyclin D2-Vorkommen in elongierten Spermatischen ist vereinbar mit der Tatsache, dass mRNA vom Spermium auf die Eizelle übertragen wird. Eine mögliche Funktion dort bleibt zu klären.

In zukünftigen Studien wäre zu berücksichtigen, dass die Effekte von D-Cyclinen nicht nur durch die zellspezifische Expression bestimmt werden, sondern wegen der funktionellen Redundanz auch durch unterschiedliche biologische Aktivitäten ihrer verwandten Proteine (Mullany et al. 2008). Darüber hinaus wird die Cyclin-Aktivität durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert, wie die Proteolyse, posttranslationale Modifikation und subzelluläre Lokalisation (Vermeulen et al. 2003), die in unsere bisherigen Untersuchungen nicht einbezogen wurden.

## 6 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Cycline vom D-Typ als Regulatoren des Zellzyklus den Übergang von der frühen G1-Phase in die S-Phase steuern und so die mitotische Zellteilung einleiten. Eine Amplifikation des Cyclin D2-Gens und eine Überexpression des Cyclin D2-Proteins konnte aufgrund früherer Studien nicht nur in invasiven Keimzelltumoren (Seminomen und embryonalen Karzinomen) sondern auch in präinvasiven CIS-Läsionen nachgewiesen werden. Frühere Befunde an Cyclin D2-defizienten männlichen Mäusen und wenige immunhistochemische Daten vom adulten humanen Hoden lassen vermuten, dass Cyclin D2 nicht nur eine wichtige Rolle in der Pathogenese testikulärer Keimzelltumoren spielt, sondern auch für die normale Hodenentwicklung und Spermatogenese im adulten Hoden essentiell sein kann.

Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich der Cyclin D2-Expression im normalen adulten Hoden, in CIS-Läsionen und Seminomen. Dazu wurde das Vorkommen von Cyclin D2-mRNA und -Protein im adulten humanen Hoden mit normaler Spermatogenese und in verschiedenen Formen testikulärer Tumore mittels Immunhistochemie, Western Blot und *in situ* Hybridisierung am Gewebehomogenat untersucht. Zudem kam als äußerst sensitive Methode die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) an einzelnen Keimzellpopulationen zur Anwendung, die mittels Laser Cell Mikrodissektion (LCMD) isoliert wurden.

Eine Überexpression von Cyclin D2 in präinvasiven CIS-Läsionen und Seminomen zeigte sich auf Proteinebene immunhistochemisch und mithilfe des Western Blots sowie auf RNA-Ebene mittels *in-situ* Hybridisierung. Der Western Blot belegte das Cyclin D2-Vorkommen auch im adulten Hoden. Darüber hinaus war durch Isolierung testikulärer Zellprofile mittels LCMD kombiniert mit hochsensitiver RT-PCR der Nachweis von Cyclin D2 in sämtlichen Keimzellstadien des Humanhodens von Spermatogonien über Spermatozyten und runden Spermatischen bis hin zu elongierten Spermatischen möglich. Während Myofibrozyten und Sertoli-Zellen keine Signale ergaben, war Cyclin D2-mRNA in interstitiellen Leydigzellen nachweisbar. Die Detektion einer Überexpression von Cyclin D2 in präinvasiven CIS-Läsionen und Seminomen bestätigt frühere Resultate. Die vorliegenden Nachweise einer Cyclin D2-Expression in sämtlichen Keimzellstadien des normalen Hodens deuten auf neue von der Proliferation unabhängige Funktionen des Cyclin D2 in der Spermatogenese des adulten humanen Hodens hin.

## 7 Summary

It is well established that D-type cyclins as regulators of the cell cycle govern the passage from early G1-phase to S-phase and in this way initiate cell division. Earlier studies have indicated gene amplification and overexpression of cyclin D2 not only in invasive germ cell tumours but also in preinvasive CIS lesions. Previous findings on cyclin D2-deficient male mice and immunohistochemical data of adult human testis suggest that cyclin D2 not only plays an important role in developing testicular germ cell tumours but also is essential for development and spermatogenesis of normal adult testis.

The aim of this study was to compare the expression of cyclin D2 in normal adult testis, CIS-lesions and testicular tumours. To this end, the possible occurrence of cyclin D2-mRNA and -protein in adult human testis with normal spermatogenesis and in different types of testicular tumours was investigated using immunohistochemistry, Western blot analysis and *in situ* hybridization from tissue homogenate. Moreover, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used on different germ cell populations, which were isolated by Laser Cell Microdissection (LCMD).

Overexpression of cyclin D2 appeared on the protein level by means of immunohistochemistry and Western blot as well as on the RNA level by means of *in situ* hybridization in preinvasive CIS and seminomas. Western blot analysis demonstrated the presence of cyclin D2 also in normal adult testis. Further, due to isolating testicular cell profiles by LCMD in combination with highly sensitive RT-PCR it was possible to detect cyclin D2-mRNA in all stages of male germ cells in adult human testis from spermatogonia over spermatocytes and round spermatids to elongated spermatids. While no cyclin D2-mRNA was found in myofibrocytes and Sertoli cells, cyclin D2-mRNA was detectable in interstitial Leydig cells. Detection of cyclin D2-overexpression in preinvasive CIS lesions and invasive seminomas confirm earlier results. The present evidences of cyclin D2-expression in all stages of male germ cells in adult human testis imply novel proliferation-independent functions of cyclin D2 during spermatogenesis of the adult human testis.

## 8 Literaturverzeichnis

Adami H, Bergström R, Möhner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M. Testicular cancer in nine northern european countries. *Int J Cancer* 1994; 59: 33-38.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Auflage 2011; Wiley VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim

Ando K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Griffin JD. Regulation of G<sub>1</sub>/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993); 90: 9571-9575.

Ashley T, Walpita D, de Rooij DG. Localisation of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J Cell Sci* (2001); 114: 685-693.

Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Current Opinion in Cell Biology* (1996); 8: 805-814.

Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. D-type cyclins in adult human testis and testicular cancer: Relation to cell type, proliferation, differentiation and malignancy. *Journal of Pathology* (1999); 187: 573-581.

Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. Cell cycle regulators in testicular cancer: Loss of p18<sup>INK4C</sup> marks progression from carcinoma *in situ* to invasive germ cell tumours. *Int. J. Cancer* (2000); 85: 370-375.

Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS* (2003); 111: 252-266.

Bergmann M, Kliesch S. Spermatogenese. In: *Andrologie*. Krause W, Weidner W (eds), Enke-Verlag Stuttgart, 1998a; 9-14.

Bergmann M, Kliesch S. Hodenbiopsie. In: Andrologie. Krause W, Weidner W (eds), Enke-Verlag, Stuttgart, 1998b; 66-71

Bergmann M. Spermatogenese – Physiologie und Pathophysiologie. Urologe 2005; 44: 1131-1138

Bergmann M. Physiology of spermatogenesis. In: Andrology for the clinician. Schill WB, Comhaire FH, Hargreave TB (eds) Springer Verlag Berlin Heidelberg 2006; 272-281

Bergmann M, Kliesch S. Biopsie und Histologie der Hoden. In: Andrologie. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009; S. 162-172

Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Value of testicular biopsy in diagnosing carcinoma in situ of testis. Scan J Urol Nephrol 1981; 15: 165-168.

Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gedeman IS, Kal HB, de RooijDG. Involvement of the D-Type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. Biol Reprod (2000); 63: 1893-1898.

Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. Cell Cycle (2002); 1:103-110.

Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K. Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. Journal of Pathology (2002); 197: 647-653.

Burns KH, Agno JE, Sicinski P, Matzuk MM. Cyclin D2 and p27 are tissue-specific regulators of tumorigenesis in inhibin alpha knockout mice. Mol Endocrinol (2003); 17(10):2053-2069.

Busk PK, Hinrichsen R, Bartkova J, Hansen AH, Christoffersen TE, Bartek J, Haunso S. Cyclin D2 induces proliferation of cardiac myocytes and represses hypertrophy. Exp Cell Res (2005); 303(1): 149-161.

Carthon BC, Neumann CA, Das M, Pawlyk B, Li T, Geng Y, Sicinski P. Genetic replacement of cyclin D1 function in the mouse development by cyclin D2. *Mol Cell Biol* (2005); 25(3): 1081-1088.

Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Research* (2000); 60: 1475-1482.

De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* (2001); 121: 347-354.

DelCastillo EB, Trabuco A, de la Balze FA. Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocr* 1947; 7: 493-502.

Dieckmann KP, Loy V, Huland H. Carcinoma in situ of the testis: clinical significance, diagnosis and therapy. *Urologe A* 1989; 28: 271-280.

Dieckmann KP, Loy V. Prevalence of bilateral testicular germ cell tumors and early detection by testicular intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 1993; **23**, 22-23.

Dieckmann KP, Loy V. Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *J Clin Oncol* 1996; **14**, 3126-3132.

Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma-in-situ of the testis: Review of biological and clinical features. *Int. J. Cancer* (1999); **83**, 815-822.

Dieckmann KP, Huland H. Hodentumoren. In: *Urologie*, Hautmann RE, Huland H (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin, 2001; 223-236.

Diederichs S, Naumer N, Schultz N, Hamra FK, Schrader MG, Sanstede ML, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. Expression patterns of mitotic and meiotic cell cycle regulators in testicular cancer and development. *Int J Cancer* (2005); 116(2): 207-217.

Donner J, Kliesch S, Brehm R, Bergmann M. From carcinoma in situ to invasive germ cell tumour. *APMIS* 2004; **112**(2), 79-88.

Futcher B. Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* (1996); **12**, 1635-1646.

Giuliano CJ, Kerley-Hamilton JS, Bee T. Retinoic acid represses a cassette of candidate pluripotency chromosome 12p genes during induced loss of human embryonal carcinoma tumorigenicity (In Process Citation). *Biochem Biophys Acta* (2005) ; **1731**(1), 48-56.

Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* (1991); **67**, 293-302.

Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67-108

Heidenreich A, Srivastava S, Moul JW, Hofman R. Molecular Genetic Parameters in Pathogenesis and Prognosis of Testicular Germ Cell Tumors. *European Urology* (2000); **37**, 121-135.

Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Hansen MA, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H. Identification of genes differentially expressed in testis containing carcinoma in situ. *Mol Hum Reprod* (2004); **10**(6), 423-431.

Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Ann Oncol* (2005); **16**(6), 863-868.

Hoei-Hansen CE, Carlson E, Jorgensen N, Leffers H, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. Towards a non-invasive method for early detection of testicular neoplasia in semen samples by identification of fetal germ cell-specific markers. *Human Reproduction* (2007); **22**(1): 167-173

Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RSK. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differentiation* (1997); **8**, 293-299.

Hunt T. The discovery of cyclin (I). *Cell* (2004); **116**, 63-65.

Jones RH, Vasey PA. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer* (2003); **39**: 147-156

Kastner A, Espanel X, Brun G. Transient accumulation of retinoblastoma/E2F-1 protein complexes correlated with the onset of neuronal differentiation in the developing quail neural retina. *Cell Growth Differ* (1998); **9**, 857-867.

Kliesch S. Diagnostik und Primärtherapie des Hodentumors. *Urol A* (2004); **12**, 1494-1499.

Kozar K, Ciemerych MA, Rebeel VI, Shigematsu H, Zagozddzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D cyclins. *Cell* (2004); **118**(4), 477-491.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **277**, 680-685

Latella L, Sacco A, Pajalunga D. Reconstruction of Cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Mol.Cell.Biol.* (2001); **21**, 5631-5643.

Liao C, Li SQ, Wang XY, Muhlrads S, Bjartell A, Wohlgemuth D. Elevated levels and distinct patterns of expression of A.type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in male germ cell tumors. *Int. J. Cancer* (2004); **108**, 654-664.

Lin IJ, Shu SG, Chu HY, ChiCS. Primary intracranial germ-cell tumor in children. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (1997); **60**, 259-264.

Looijenga L, De-Munnik H, Oosterhuis W. A molecular model for the development of germ cell cancer. *Int. J. Cancer* (1999); **83**, 809-814.

Looijenga LH und Oosterhuis JW. Pathology of testicular germ cell tumors: views and news. *Anal Quant Cytol Histol* (2002); **25**(5), 263-279.

Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Stauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* (1995); **375**, 503-506.

Macleod K. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics and Development* (2000); **10**, 81-93.

Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* (1994); **14**, 2066-2067.

McInerney CJ. Cell Cycle-regulated transcription in fission yeast. *Biochem Soc Trans* (2004); **32**(6), 967-972.

McKierman JM, Goluboff ET, Liberson GL, Golden R, Fisch H. Rising risk of testicular cancer by birth cohort in the United States from 1973-1995. *J Urol* (1999); **162**, 361-363

Melese T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1995); **7**, 319-324.

Meyyappan M, Wong H, Hull C, Riabwol KT. Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. *Molecular and Cellular Biology* (1998); **5**, 535-545.

Moller H. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS* 1998; **106**, 232-238.

Mostofi FK, Sobin LH. Histological typing of testis tumours. In: *International histological classification of tumours*, No.16. World Health Organization, Genf, 1977; 1-39.

Mostofi FK, Sesterhenn JA. Histological typing of testis tumours. WHO International histological classification of tumours. Second edition. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer 1998.

Mullany LK, White P, Hanse EA, Nelsen CJ, Goggin MM, Mullany JE, Anttila CK, Greenbaum LE, Kaestner KH, Albrecht JH. Distinct proliferative and transcriptional effects of D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle* (2008); **7**(14): 2215-2224

Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G<sub>1</sub>/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* (2002); **14**, 1847-1857.

Nakayama H, Nishiyama H, Higuchi T, Kaneko Y. Change of cyclin D2 mRNA expression during murine testis development. *Growth Differ* (1996); **38**, 141-151.

Nevins JR. A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* (1992); **258**, 424-429.

Nicholson PW, Harland SJ. Inheritance and testicular cancer. *Br J Cancer* (1995); **71**, 421-426.

Nurse P. Ordering S Phase and M Phase in the cell cycle. *Cell* (1994); **79** (4), 447-450.

Pienkova-Grela B, Grygalewicz B, Bregula U. Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 in seminoma and non seminoma groups of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* (2002); **134**(2), 102-108.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* (2004); **429**: 154

Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bertek J, Skakkebaek NE. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS* 2003; **111**(1), 267-278.

Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma *in situ*: genetic and environmental aspects. *Human Reproduction Update* (2006); **12**(3): 303-323

Ravnik SE, Rhee K, Wolgemuth DJ. Distinct patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Dev Genet* (1995); **16**(2), 171-178.

Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High Frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) Inactivation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* (1996);**56**, 3630-3633.

Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol* (2005); **18**(2), 51-60.

Sandhu C, Slingerland J. Deregulation of Cell Cycle in cancer. *Cancer Detection and Prevention* (2000); **24**, 107-118.

Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* (2009); **28**: 2925-2939

Schmidt B, Rose A, Steinhoff C, Strohmeier T, Hartmann M, Ackermann R. Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Research* (2001); **61**, 4214-4221.

Schmoll HJ, Souchon R, Krega S. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the european germ cell cancer consensus (EGCCCG). *Ann Oncol* (2004); **15**, 1377-1399.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* (1999); **13**, 1501-1512.

Sievers, S, Alemazkour K, Zahn S, Perlman EJ, Gillis AJ, Looijenga LH, Gobel U, Schneider DT. IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stades of primordial germ cell development (In Process Citation). *Genes Chromosomes Cancer* (2005); **44**(3), 256-264.

Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is a FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* (1996); **384**, 470-474.

Sinowatz F. Männliche Geschlechtsorgane. In: *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, Hees H, Sinowatz F (Hrsg.). Dt. Ärzte-Verlag, Köln, 1992; 285-301.

Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *The Lancet* (1972); **2**, 516-518.

Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Gwicerman A, Muller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumors except spermatocytoma. *Int. J. Androl.* (1987); **10**, 19-28.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Gwicerman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* (1998); **106**, 3-12.

Skakkebaek NE, Holm M, Hoei-Hansen C, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. *APMIS* (2003); **111**, 1-11.

Steger K. Die postnatale Ontogenese des Hodens beim Schaf: Eine histologische, ultrastrukturelle, morphometrische, Lektin- und immunhistochemische Untersuchung. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der Universität Regensburg (1994).

Steger K, Ahleithe I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki67 protein and proliferating antigen. *Mol Hum Reprod* (1998); **4**, 227-233.

Summersgill B; Osin P, Lu YJ. Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* (2001); **85**(2), 213-220.

Tan KAL, Turner KJ, Saunders PTK, Verhoeven G, De Gendt K, Atanassova N, Sharpe RM. Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biology of Reproduction* (2005); **72**, 1151-1160

van Eyben FE. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* (2004); **131**(2), 93-138.

Veltman I, Veltman J, Janssen I, Hulsbergen-van de Kaa C, Oosterhuis W, Schneider D, Stoop H, Gillis A, Zahn S, Looijenga L, Gobel U, van Kessel AG. Identification of recurrent chromosomal aberrations in germ cell tumors of neonates and infants using genomewide array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* (2005); **43**(4), 367-376.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, de-regulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* (2003), **36**(3), 131-149

Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie* 2009; 3. Auflage, pp 15-61

Witt D, Burfeind P, von Hardenberg S, Opitz L, Salinas-Riester G, Bremmer F, Schweyer S, Thelen P, Neesen J, Kaulfuss S. Valproic acid inhibits the proliferation of cancer cells by re-expressing cyclin D2. *Carcinogenesis* 2013; **34**(5): 1115-1124.

Wolgemuth DJ, Manterola M, Vasileva A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *Int J Dev Biol* 2013; **57**:159-168

Yan W, Kero J, Suominen J, Toppari J. Differential expression and regulation of the retinoblastoma family of proteins during testicular development and spermatogenesis. *Oncogene* (2001); **20**, 1343-1356.

Zhang Q, Sakamoto K, Wagner KU. D-type cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2014; **382(1)**: 583-592.

Zuh X, Naz RK. Expression of a novel isoform of cyclin I in human testis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* (1998); **249**, 56-60.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>ABC</b>	<b>A</b> vidin <b>B</b> iotin <b>C</b> omplex
<b>APAAP</b>	<b>A</b> lkalische <b>P</b> hosphatase <b>A</b> nti <b>A</b> lkalische <b>P</b> hosphatase
<b>APS</b>	<b>A</b> mmonium <b>p</b> ersulfat
<b>APTEx</b>	3- <b>A</b> mino <b>p</b> ropyl <b>t</b> riethoxy- <b>S</b> ilane
<b>Aqua bidest</b>	Zweifach destilliertes <b>W</b> asser
<b>ATP</b>	<b>A</b> denosin <b>t</b> riphosphat
<b>Bp</b>	<b>B</b> asen <b>p</b> aare
<b>BSA</b>	<b>B</b> ovines <b>S</b> erum <b>a</b> lbumin
<b>C</b>	<b>C</b> ytosin
<b>cRNA</b>	<b>C</b> opy- <b>R</b> NA
<b>Cdk</b>	<b>C</b> yclin <b>d</b> e <b>p</b> endent <b>k</b> inase
<b>CIS</b>	<b>C</b> arcinoma <b>i</b> n <b>s</b> itu
<b>CTP</b>	<b>C</b> ytidin <b>t</b> riphosphat
<b>Da</b>	<b>D</b> alton
<b>DAB</b>	<b>D</b> iaminobenzidin
<b>DEPC</b>	<b>D</b> iethyl <b>p</b> yrocarbonat
<b>DNA (DNS)</b>	<b>D</b> esoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	<b>D</b> esoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	<b>d</b> esoxy-Ribonucleosid <b>t</b> riphosphat
<b>DTT</b>	<b>D</b> ithio <b>t</b> hreitol
<b>EDTA</b>	<b>E</b> thylendiamin <b>t</b> etraessigsäure
<b>EtBr</b>	<b>E</b> thidium <b>b</b> romid
<b>FSH</b>	<b>F</b> ollikel-stimulierendes <b>H</b> ormon
<b>G</b>	<b>G</b> uanin
<b>g</b>	<b>G</b> ramm
<b>GTP</b>	<b>G</b> uanosin <b>t</b> riphosphat
<b>H</b>	<b>S</b> tunde ( <b>h</b> our)
<b>HCl</b>	<b>S</b> alzsäure

## Abkürzungen Fortsetzung

<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b> (1000 Da)
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mRNA</b>	Boten (messenger)-RNA
<b>MG</b>	Molekulargewicht
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumionen
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PBS</b>	engl.: Phosphate buffered saline oder Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	engl.: Polymerase chain reaction oder Polymerasekettenreaktion
<b>PLAP</b>	engl.: Placental like alkaline phosphatase oder Plazentale alkalische Phosphatase
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinyliden-Difluorid
<b>RNA (RNS)</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase Polymerase chain reaction
<b>SCO</b>	Sertol-Cell-Only
<b>SDS</b>	Natrium (Sodium) dodecylsulfat
<b>T</b>	Thymin

## Abkürzungen Fortsetzung

<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TIN</b>	Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	Unit Enzymeinheit
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>LCMD</b>	Laser Cell Mikrodissektion
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Watt
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µmol</b>	Mikromol

## 9.2 Zusammensetzung für Fixierlösungen

### Herstellung der Chromalaunlösung:

- 5 g Gelatine-Pulver (für OT-Beschichtung) in 1 l Aqua dest auf 35 °C erwärmen.
- 0,5 g Chromalaun zugeben und auf 40°C erwärmen.
- Lösung auf 20 °C abkühlen lassen.
- Lösung mit Faltenfilter filtrieren.
- Lösung in sauberes Glasbecken füllen.

### Herstellung von neutral gepuffertem Formol nach Lillie:

- 900 ml Aqua dest abmessen.
- 4 g Natriumdihydrogenphosphat und
- 6,5 g Dinatriumdihydrogenphosphat hinzugeben und lösen.
- 100 ml Formol (35 %ig) hinzugeben.
- pH 7,0 einstellen.

### Herstellung der Bouin'schen Lösung:

- 15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung mit
- 5 ml Formalin (35 %ig; Sigma, Steinheim) mischen,
- 1 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) zusetzen.

### 9.3 Lösungen für den Western Blot

#### Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

1,5 M Tris-HCL-Puffer (pH 8,8)

1,0 M Tris-HCL-Puffer (pH 6,8)

30%ig Acrylamid-Mix bzw. Acrylamid/NN'-Methylenbisacrylamid 29:1

*10x Laufpuffer-Stammlösung:* 30,25 g Tris-HCl, 187,67 g Glycin und 10 g SDS in 1l Aqua bidest

*2x Laemmli-Probenpuffer:* 4% SDS, 20% Glycerin, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.004% Bromphenolblau und 0,125M Tris-HCl pH 6,8

#### Lösungen für das Elektroblothing

- *Puffer 1:* 36,3 g Tris-HCl (0,3 M) mit 200 ml Methanol im Becherglas mischen und auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.
- *Puffer 2:* 3 g Tris-HCl (25 mM) mit 200 ml Methanol in Becherglas mischen und auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.
- *Puffer 3:* 3 g Tris HCl (25 mM) und 5,2 g Amino-Caprinsäure (40 mM, Sigma, Steinheim) mit 20 ml Methanol im Becherglas mischen und auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.
- *0,1M PBS-Puffer:* 1 Tablette PBS (Sigma, Steinheim) in 200 ml Aqua bidest lösen und pH 7,4 einstellen.
- *Blockpuffer I (5%iges Milchpulver):* 0,75 g entfettetes Trockenmilchpulver (Milchhof, Marburg) in 15 ml 1 x 0,1 M PBS (pH 7,4) lösen.
- *Waschpuffer:* 100 ml 0,1 M PBS (pH 7,4), 0,1 g BSA (1%) und 0,01 g Tween 20 (0,1%) mischen
- *Blockpuffer II (5%iges Ziegen Serum):* 10 ml 1x 0,1 M PBS (pH 7,4) mit 0,5 ml Ziegen Serum mischen.
- *ABC-Kit:* 10 ml 0,1 M Tris-HCl mit vier Tropfen der Lösung A und mit vier Tropfen der Lösung B laut Herstellerangaben (Vector, Burlingame, USA) mischen.

#### 9.4 Lösungen für *in situ* Hybridisierung

- *0,2 N HCl*: 5,2 ml 25%ige HCl und 200 ml DEPC Wasser
- *20xSSC Stammlösung*: 88,23 g Natriumcitrat, 175,29 g NaCl mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen, pH 7,0 einstellen, 1 ml DEPC zugeben, bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubieren und autoklavieren.
- *PBSM-Puffer*: 1 Tablette PBS in 200 ml DEPC Wasser lösen, 1ml 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugeben.
- *50%iges Dextransulfat*: 5 g Dextransulfat in 10 ml DEPC Wasser lösen, einige Tage im Kühlschrank stehen lassen, aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.
- *Denhardt-Reagenz*: 200 mg BSA, 200 mg Ficoll 400, 200 mg Polyvinylpyrolidon in 10 ml DEPC Wasser lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern.
- *10xTNMT-Puffer*: 121,1 g Tris-HCl, 58,4 g NaCl, 4,17 g MgCl<sub>2</sub> in 1l Aqua bidest lösen.
- *5xNTB-Puffer*: 60,5 g Tris-HCl, 29,2 g NaCl, in 1 l Aqua bidest lösen, pH 9,6 einstellen, 1 ml DEPC zugeben, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren und autoklavieren.
- *1M Levamisol*: 2,4 g Levamisol in 10 ml 1xNTB-Puffer lösen, aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.

## 9.5 Bezugsquellen

### 9.5.1 Stoffe und Reagenzien

ABC-Elite Kit Standard; Vector Vectastain	Vector Laboratories, Burlingame, England
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/NN'-Methylenbisacrylamid	Sigma, Steinheim
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, Steinheim
APTEX (3-Aminopropyl-triethoxysilan)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
BSA (bovine serum albumin)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Chromalaun	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dinatriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNA-Größenstandard (100 bp DNA-ladder)	New England Biolabs, Schwalbach
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ficoll	Serva, Heidelberg
Formalin (35 % ig)	Sigma, Steinheim
Gelatine-Pulver für OT-Beschichtung	Merck, Darmstadt
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hämatoxilin	Shandon, Frankfurt
HCl konz.	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
MuLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NTB/BCIP	KPL, Wedel
Pikrinsäurelösung	Ridel-deHaen, Seelze
Proteinase K	Sigma, Steinheim

## Fortsetzung Stoffe und Reagenzien

RcoRI (antisense)	New England Biolabs, Schwalbach
RNase-Away*Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-DIG Kit	Boehringer, Mannheim
Salmon-sperm DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Stable-DAB	Research Genetics, Karlsruhe
Standardproteingemisch	Biotech, München
Taq-Gold-Polymerase	Promega, Mannheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen
XhoI (sense)	New England Biolabs, Schwalbach
Xylencyanol	Sigma, Steinheim
Xylol	Roth, Karlsruhe
Yeast-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

## 9.5.2 Geräte

Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf
Blottingapparatur Trans-Blot*	Bio-Rad, München
SD-Dry Transfer Cell	
3-CCD Color Video/Camera KY-F55B	JVD, Friedberg
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Bensheim
Elektrophorese-Apparatur Mini Protean 3 <sup>®</sup>	Biorad, München
Entwässerungsgerät Leica TP 1050	Leica, Bensheim
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Gefriermikrotom Kryostat 2800 Figocut E	Leica-Systems, Nussloch
Gelelektrophorese-Apparatur Agargel Mini <sup>®</sup>	Biometra, Göttingen
LB-Lichtmikroskop Leica DM	Leica, Wetzlar
pH-Meter: InoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
pH-Elektrode und pH-Einstabmesskette	Schott, Mainz
Polaroid Gel Cam	Polaroid, Offenbach
Scanner AV 630	Avision Inc, Taiwan
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Bensheim
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA-Werke, Staufeu
Stromgeber Power Pack 200	Biorad, München
T3-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 12-24	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank	Memmert, Schwalbach
UV-LCMD-Gerät Palm MicroBeam	Palm, Wolfratshausen
Vortex	Heidolph, Schwalbach
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Wippschüttler	Eigenbau

### 9.5.3 Sonstiges Material

DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Dewar Gefäß	Isitherm KGW, Karlsruhe
Einmalfilterpapiere Whatman 3MM	Whatman GmbH, Rothenburg
Hamiltonspritze	Bonaduz, Schweiz
Hamilton-Microliter-Syringes	
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Pasteurpipetten	MAGV, Rabenau
PCR-Tubes, dünnwandig	Axygen Scientific Inc., Union City, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostic, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, gestopft, Finntip Filter	Labsystems, Helsinki, Finnland
Polaroid Sofortbildfilme Typ 667	Polaroid, Offenbach
PVDF-Membran Westran*	Schleicher und Schuell, Dassel
Super-Frost-Objektträger	Langenbrinck, Emmerdingen
Tissue Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup> Compound	Sakura, Torrence, USA

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 9.7 Danksagungen

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Steger, dem Leiter des andrologisch-urologischen Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der technischen Voraussetzungen.

Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, Direktor des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, möchte ich für seine persönliche Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit recht herzlich danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. vet. med. R. Brehm, für die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung bei der Versuchsplanung und Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle und Herrn PD Dr. L. Fink danke ich für die Gelegenheit, im pathologischen Institut das LCMD Gerät benutzen zu dürfen.

Für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials danke ich Herrn Prof. Dr. Weidner (Justus-Liebig-Universität Gießen) und Herrn Prof. Dr. Hertle (Universität Münster).

Frau Jutta Dern-Wieloch, Frau Gerlinde Ehrhardt, Frau Alexandra Hax und Frau Anne Hild gilt ein Dankeschön für den freundlichen Beistand im Labor.

## 9.8 Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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