

Die Regulation der NANOG-Expression während der Keimzellreifung und in Keimzelltumoren sowie die Untersuchungen zu Differenzierungsprozessen von Seminomen *in vivo* und *in vitro*

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
Daniel Nettersheim
aus
Bad Münstereifel

Bonn, Juli 2010

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hubert Schorle
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke
Tag der Promotion: 26.10.2010
Erscheinungsjahr: 2010

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hubert Schorle und PD Dr. Katharina Biermann, dass sie es mir ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen. Desweiteren möchte ich mich bei Hubert für die Hilfe und Unterstützung während meiner gesamten Arbeit und die Möglichkeit der Kongressteilnahme bedanken.

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke möchte ich für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dr. Reinhard Büttner und Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst für die Teilnahme als Gutachter an der Promotionskommission danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Leendert Looijenga und Ad Gillis (Erasmus MC, Rotterdam) sowie Herrn Prof. Dr. Stefan Schlatt und Birgit Westernstroer (CeRa, Münster) für die Möglichkeit in Ihren Laboren zu arbeiten und für die Unterstützung im Rahmen meiner Dissertation. Johannes Schulte (Uniklinikum Essen) möchte ich für die Hilfe bei den ersten *in vivo*-Injektionsversuchen danken.

Vielen Dank an alle Mitglieder der AG Schorle sowie der AG Kirfel für ihren Rückhalt und das angenehme Arbeitsklima. Mein Dank gilt auch Susi Steiner, Barbara Reddemann und Mathilde Hau-Liersch die mir bei einigen immunohistochemischen Färbungen geholfen haben. Angela Egert möchte ich meinen Dank für ihre Unterstützung bei den *in vivo*-Injektionsexperimenten und Jörg Bedorf für die Hilfe bei den Ultrastrukturaufnahmen aussprechen. Sehr dankbar bin ich Dr. Dawid Eckert und Dr. Jutta Kirfel für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater und meiner Mutter sowie meiner Schwester für die finanzielle und moralische Unterstützung während meiner Studienzeit und für die Korrekturlesung dieser Dissertation. Vielen lieben Dank auch an meine Freundin Lucienne Knips, die mich seit über vier Jahren begleitet und bedingungslos unterstützt!

Zusammenfassung

Das Homeobox-Protein NANOG übernimmt Schlüsselfunktionen bei der Erhaltung der Selbsterneuerung und der Pluripotenz von undifferenzierten Zellen. Dabei ist es eng in ein regulatorisches Netzwerk mit den Transkriptionsfaktoren OCT3/4 und SOX2 eingebunden. Durch Luziferase-Reporterexperimente wurde gezeigt, dass der 306bp-große NANOG-Promotor die Luziferase-Expression in einer humanen embryonalen Karzinom-Zelllinie kontrollieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass dessen Aktivität von OCT3/4 und SOX2 abhängt sowie durch DNS-Methylierung moduliert werden kann. Die Mechanismen der NANOG-Expressionsregulation wurden während der humanen Keimzellreifung näher untersucht, dabei wurde gezeigt, dass die Herabregulation der NANOG-Expression während der Transition fetaler Gonozyten zu fetalen Spermatogonien durch die Herabregulation der OCT3/4-SOX2-Expression hervorgerufen wird. Eine Methylierung der fünf CpG-Dinukleotide innerhalb des NANOG-Promoters und somit eine epigenetische Repression wird erst bei der Differenzierung der Spermatogonien zu reifen Spermien etabliert. Interessant ist, dass die DNS während dieses Zeitraums global demethyliert wird. Die Methylierung des NANOG-Promoters wird also unabhängig von der globalen Methylierung reguliert. In testikulären Keimzelltumoren konnte der Differenzierungsgrad der Keimzelltumorentität an den DNS-Methylierungsstatus des NANOG-Promoters korreliert werden. Das bedeutet je differenzierter die Tumorentität desto höher die NANOG-Promotormethylierung und umso geringer die NANOG-Expression.

Seminome sind undifferenzierte Tumoren der Keimzellen. Diese Tumoren sind gekennzeichnet durch die Expression von Pluripotenz- und Keimzellmarkern und wachsen uniform, d.h. die Zellen scheinen ihren unipotenten Keimzellcharakter beizubehalten.

Um zu untersuchen unter welchen Bedingungen Seminome differenzieren wurde die Seminom-Zelllinie TCam-2 als Modellsystem verwendet. Weder die transiente und stabile Herunterregulation des Pluripotenzfaktors NANOG oder des Differenzierungs-inhibitors der Keimzellen AP-2 γ noch die Anwendung epigenetischer Modifikatoren

oder morphogener Substanzen führte zu einer Differenzierung der Zellen. Erst nach gemeinsamer Zugabe der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, EGF und FGF4/Heparin wurde eine Differenzierung in Richtung eines gemischten Nicht-Seminoms induziert. Sie bewirken einen Block des BMP-Signalwegs und eine Aktivierung des Hippo-Signalwegs sowie eine Inhibition des Differenzierung blockierenden LIN28/BLIMP1-Signalwegs. Dadurch werden somatische Differenzierungsprogramme nicht länger epigenetisch reprimiert. Die Aktivierung des Hippo-Signalwegs könnte zudem eine Erklärung für die predominante Differenzierung in Choriokarzinom ähnliche Zellen sein. Durch das Hippo-Signalweg-Zielmolekül TEAD4 könnten die TCam-2-Zellen vor der Differenzierung auf ein trophoblastäres Zellschicksal vorbereitet werden, welches dann während der Differenzierung zur Ausprägung kommt.

Eine Injektion von TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen führte zum Wachstum embryonaler Karzinome (EK), dabei wurde festgestellt, dass eine Induktion des EK-Markers SOX2 und eine Herunterregulation des Seminom-Markers SOX17 zu beobachten war. Diese *in vivo*-Transition von einem Seminom zu einem embryonalen Karzinom wurde durch eine erneute *in vitro*-Kultivierung revertiert. Dabei kam es zu einer erneuten Expression von SOX17 und einer Herunterregulation von SOX2.

Einen Monat nach einer Xenotransplantation von TCam-2-Zellen in die Testes von Busulfan behandelten Nacktmäusen konnten Carcinoma-in-situ ähnliche Zellen im Lumen der Tubuli seminiferi nachgewiesen werden, welche nach dreimonatigem *in vivo*-Wachstum in invasive Keimzelltumoren übergingen. Somit konnte durch diese Methode ein KZT-Modell erzeugt werden, welches nun gezielte Untersuchungen zum Verhalten von CIS-Zellen und invasiven Keimzelltumoren *in vivo* erlaubt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinie TCam-2 in der Lage ist *in vitro* und *in vivo* zu differenzieren. Die Richtung des Differenzierungsprozesses hängt dabei von dem zellulären Mikromilieu sowie den Kultivierungsbedingungen ab. Interessant ist die Tatsache, dass diesen Veränderungen in der Tumorklasse kein weiterer Gendefekt unterlag, sondern die Zellen plastisch sind.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Zusammenfassung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1 Humane Keimzellen	5
1.2 Humane Keimzellentwicklung	5
1.3 Entwicklung der humanen Gonadenanlagen	6
1.4 Die humane Spermatogenese	7
1.5 Modelle der Keimzelltumorentwicklung	9
1.6 <i>Humane Keimzelltumoren</i>	10
1.6.1 Typ I Keimzelltumoren	11
1.6.2 Typ II Keimzelltumoren	12
1.6.3 Typ III Keimzelltumoren	14
1.7 Die Seminom-Zelllinie TCam-2	15
1.8 <i>Die Epigenetik</i>	16
1.9 Die RNSi	16
1.10 <i>Die Transkriptionsfaktoren NANOG und AP-2γ</i>	18
1.10.1 Der Transkriptionsfaktor NANOG	18
1.10.2 NANOG in der Keimzellentwicklung und in Keimzelltumoren	19
1.10.3 Der Transkriptionsfaktor AP-2 γ	19
1.10.4 AP- γ in der Keimzellentwicklung und in Keimzelltumoren	19
1.11 Zielsetzung dieser Dissertation	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Verwendete Enzyme	24
2.1.4 Laborgeräte	24
2.1.5 Puffer, Lösungen, Medien	25
2.1.6 Zellkulturlösungen	26
2.1.7 Zellkulturmedien	27
2.1.8 Bakterienkulturlösungen	27
2.1.9 Oligonukleotide zur Detektion humaner mRNS-Sequenzen	28
2.1.10 siRNS-Oligonukleotide	29
2.1.11 shRNS-Oligonukleotide	29
2.1.12 Oligonukleotide zur Synthese von cDNS	29
2.1.13 Primäre Antikörper	29

2.1.14 Sekundäre Antikörper	31
2.1.15 Prokarioten	31
2.1.16 Eukaryoten	31
2.1.17 Mauslinien	32
2.1.18 Kits	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 <i>Mikrobiologische Methoden</i>	33
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Kulturen	33
2.2.1.2 Herstellung von LB-Ampicillin-X-gal-IPTG-Agarplatten	33
2.2.1.3 TA-Klonierung	34
2.2.1.4 pRNATinH1.3-Neo-shRNS-Klonierung	34
2.2.1.5 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	35
2.2.1.6 Isolation von Plasmid-DNS	36
2.2.2 <i>Nukleinsäureanalytik</i>	36
2.2.2.1 DNS-Isolation aus Geweben und Zellen	36
2.2.2.2 RNS-Isolation aus Geweben und Zellen mittels Trizol	37
2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung Nukleinsäure-haltiger Lösungen	37
2.2.2.4 Restriktion mittels Restriktionsendonukleasen	37
2.2.2.5 DNaseI-Verdau von RNS-Lösungen	38
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.2.7 Elution von DNS aus Agarose-Gelen	38
2.2.2.8 Synthese von copy-DNS (cDNS)	39
2.2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion	39
2.2.2.10 Quantitative RT-PCR	41
2.2.2.11 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNS	42
2.2.2.12 <i>In vitro</i> -Methylierung genomischer DNS durch M.SssI	43
2.2.3 <i>Proteinanalytik</i>	43
2.2.3.1 Proteinisolation aus Geweben und Zellen	43
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	43
2.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.2.3.4 Immuno-Blot-Analyse (Western Blot)	45
2.2.3.5 Chemolumineszenz-Detektion	46
2.2.3.6 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran („stripfen“)	46
2.2.4 <i>Zellkultur</i>	46
2.2.4.1 Herstellung von murinem embryonalen Fibroblasten konditionierten Mediums	46
2.2.4.2 Trypsinisieren und Vereinzeln von Zellen	47
2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl	47
2.2.4.4 Einfrieren von Zellen	47
2.2.4.5 Auftauen von Zellen	48
2.2.4.6 Transfektion von Zellen	48
2.2.4.7 Generierung von shRNS exprimierender Zelllinien	49
2.2.4.8 Bestimmung zellulärer Proliferationsraten	49
2.2.4.9 Bestimmung zellulärer Apoptoseraten	49
2.2.4.10 5'-aza-2-Deoxycytidin (5-aza)-Behandlung von Zellen	50
2.2.4.11 Luziferase-Reporterexperimente in humanen Keimzelltumorzelllinien	51
2.2.4.12 Injektion von Zellen in die Flanke von Nacktmäusen	51
2.2.4.13 Injektion von Zellen in die Tubuli seminiferi von Nacktmäusen	52

2.2.5	<i>Histologische Analytik</i>	53
2.2.5.1	Fixierung von Geweben und Zellen	53
2.2.5.2	Permeabilisierung von Zellen	53
2.2.5.3	Einbetten	53
2.2.5.4	Herstellung von Paraffin-Schnitten	53
2.2.5.5	Indirekte Immunfluoreszenz auf Paraffin-Schnitten	54
2.2.5.6	Immunfluoreszenz auf Zellen	54
3.	Ergebnisse	55
3.1.1	Sequenzanalyse des humanen genomischen NANOG-Lokus	55
3.1.2	Regulation der humanen NANOG-Expression	56
3.1.3	Regulation der NANOG-Expression während der humanen Keimzell-Entwicklung	58
3.1.4	Immunohistochemische Untersuchung der globalen DNS-Methylierung während der Keimzellreifung	60
3.1.5	Die Regulation der NANOG-Expression in humanen Keimzelltumoren (KZT) und korrespondierenden Zelllinien	62
3.2.1	Transienter NANOG- und AP-2 γ -„knock-down“ in TCam-2-Zellen	65
3.2.2	Stabiler NANOG- und AP-2 γ -„knock-down“ in TCam-2-Zellen	67
3.3.1	Behandlung von TCam-2- Zellen mit verschiedenen chemischen Agenzien	70
3.4.1	Induktion einer TCam-2-Differenzierung durch Kultivierung in MEF konditioniertem Medium mit FGF4/Heparin	73
3.4.2	Zunahme multinukleärer Zellen durch cM+F-Kultivierung	77
3.4.3	Ultrastruktur der TCam-2-Zellen nach RPMI- und cM+F-Kultivierung	78
3.4.4	Veränderungen in der Genexpression nach cM+F-Kultivierung	80
3.4.5	Veränderungen in der Zytokeratinexpression nach cM+F-Kultivierung	83
3.4.6.1	<i>Signalweganalyse in TCam-2-Zellen nach cM+F-Kultivierung</i>	84
3.4.6.2	Verlust der H2a/H4R3 Dimethylierung durch Reduktion der LIN28- und BLIMP1-Expressionen	86
3.4.7	Während der TCam-2-Differenzierung kommt es nicht zu einer Transition zu einem embryonalen Karzinom	88
3.4.8	Identifizierung differenzierungsauslösender Wachstumsfaktoren	89
3.4.9	<i>In vivo</i> -Injektion von TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen	92
3.3.10	<i>In vitro</i> -Rekultivierung der erzeugten embryonalen Karzinom ähnlichen Zellen	98
3.3.11	<i>In vivo</i> -Injektion von TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Nackt-Mäusen	100
4.	Diskussion	107
4.1.1	Differenzielle Regulation der NANOG-Expression während der Keimzell-Reifung	107
4.1.2	NRR-DNS-Methylierung in humanen Keimzelltumoren und korrespondierenden Zelllinien	107
4.2.	Ein NANOG- oder AP-2 γ -siRNS-„knock-down“ induziert keine TCam-2-Differenzierung	110

4.3.1	cM+F-Kultivierung verändert die Zellmorphologie und Wachstums- charakteristika von TCam-2-Zellen	112
4.3.2	Der Anstieg multinukleärer Zellzahlen deutet auf einen Chorion- karzinom ähnlichen Differenzierungsprozess hin	113
4.3.3	Ähnlichkeiten der differenzierten Zellen mit Dottersacktumorzellen aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen	113
4.3.4	cM+F-Kultivierung führt zur Differenzierung in ein gemischtes Nicht-Seminom	114
4.3.5	Während der cM+F induzierten Differenzierung kommt es zu keiner S→EK	118
4.3.6	TGF-β1, EGF und FGF4 wirken synergistisch während der TCam-2- Differenzierung	118
4.3.7	Mechanismen der TCam-2 <i>in vitro</i> -Differenzierung	121
4.3.8	EK-Wachstum durch <i>in vivo</i> -Injektion von TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen	124
4.3.9	<i>In vitro</i> -Rekultivierung der EKs führt zu Reversion in einen seminoma- tösen Zustand	125
4.3.10	Entstehung CIS ähnlicher Zellpopulationen durch <i>in vivo</i> -Injektion von TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Nacktmäusen	126
4.4.11	Modell seminomätöser Differenzierungsschritte	127
4.4.12	Ausblick	128
 5. Literaturverzeichnis		 130
 6. Anhang		 140
6.1	Bilderanhang	140
6.2	Lebenslauf	158

Abkürzungsverzeichnis

5-aza	5-aza-2-Deoxycytidine
5-mC	5-methyl-Cytidine
°C	Grad Celsius
α	griech. „alpha“ = Signifikanzniveau
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha Fetoprotein
Amp	Ampicillin
AP-2	engl. „activating enhancer binding protein-2“
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCAT1	engl. „branched chain aminotransferase 1“
BLIMP1	engl. „B-lymphocyte induced maturation protein 1“
BMP	engl. „bone morphogenic protein“
bp	Basenpaare
BSA	engl. „bovine serum albumin“ = Rinderserumalbumin
ca.	ungefähr
CD30	engl. „cluster of differentiation 30“
CDX2	engl. „caudal type homeobox 2“
CIS	Carcinoma-in-situ
cM	engl. „MEF conditioned medium“
cM+F	engl. „MEF conditioned medium + FGF4/Heparin“
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
ct	engl. „cycle threshold“ = Zyklengrenzwert
DAZL	engl. „deleted in azoospermia-like“
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNS-Methyltransferase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EGF	engl. „epidermal growth factor“
EK	embryonales Karzinom
ERK1/2	engl. „extracellular-signal regulated kinase 1/2“
et al.	lat. „et altera“ = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	engl. „fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
FGF	engl. „fibroblast growth factor“
FGFR	engl. „fibroblast growth factor receptor“
GDF3	engl. „growth differentiation factor 3“
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
g	Gramm
HAND1	engl. „heart and neural crest derivatives expressed 1“
hCG	humanes Choriongonadotropin
HOXB1	engl. „homeobox B1“
hPa	hecto-Pascal
HRP	engl. „horseradish peroxidase“ = Meerrettichperoxidase
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
IGCNU	engl. „intratubular germ cell neoplasia unclassified“
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
iPS	engl. „induced pluripotent stem cell“
M	Molar

MAGE-A4	engl. „melanoma antigen family-A4“
MAP-Kinase	engl. “mitogen activated kinase-kinase”
Mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP2	Matrix Metallo-Proteinase 2
mRNA	engl. „messenger RNA“ = Boten-RNS
MVH	murines VASA-Homolog
MyoD1	engl. „myogenic differentiation 1“
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NRR	NANOG regulatorische Region
nt	Nukleotide
OCT3/4	engl. „octamer 3/4“
OTX1	engl. “orthodenticle homeobox 1“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAX6	engl. „paired box 6“
PBS	engl. “phosphate buffered saline” = Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	engl. “polymerase chain reaction” = Polymerasekettenreaktion
PDGF	engl. „plateled derived growth factor“
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PLAP	engl. „placenta-like alkaline phosphatase“
PLC- γ	PhospholipaseC-gamma
pmol	picomol
PRMT5	engl. “protein-arginine-methyl-transferase 5”
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	engl. „rounds per minute“ = Umdrehungen pro Minute
RPMI+F	RPMI-Medium + FGF4/Heparin

RT	Raumtemperatur
S→EK	Transition eines Seminoms zu einem embryonalen Karziom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD	engl. "SMA mothers against decapentaplegic"
SOX	engl. "SRY (sex determining region Y)-box"
STAT3	engl. "signal transducer and activator of transcription 3"
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEAD 1/4	engl. "TEA domain 1/4"
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	engl. „unit“ = Enzymeinheit
UTF1	engl. „undifferentiated embryonic cell transcription factor 1“
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Humane Keimzellen

Das Merkmal der geschlechtlichen Vermehrung ist das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Keimzellen, die als Gameten bezeichnet werden. Die männlichen Gameten werden bei den Säugetieren Spermien, die weiblichen Eizellen Oozyten genannt. Diese Keimzellen müssen bei ihrer Entwicklung eine meiotische Zellteilung durchlaufen, damit aus diploiden Ursprungszellen haploide Keimzellen entstehen. Diese Prozesse werden im männlichen Geschlecht Spermatogenese, im weiblichen Oogenese genannt. Durch Verschmelzen dieser unterschiedlichen, haploiden Zellen (Befruchtung = Syngamie) entsteht eine diploide Zygote. Aufgabe der Keimzellen ist die Weitergabe der genetischen Information beider Geschlechter auf ein neues Individuum. Dabei werden die jeweils elterlichen Gene intra- und interchromosomal neukombiniert.

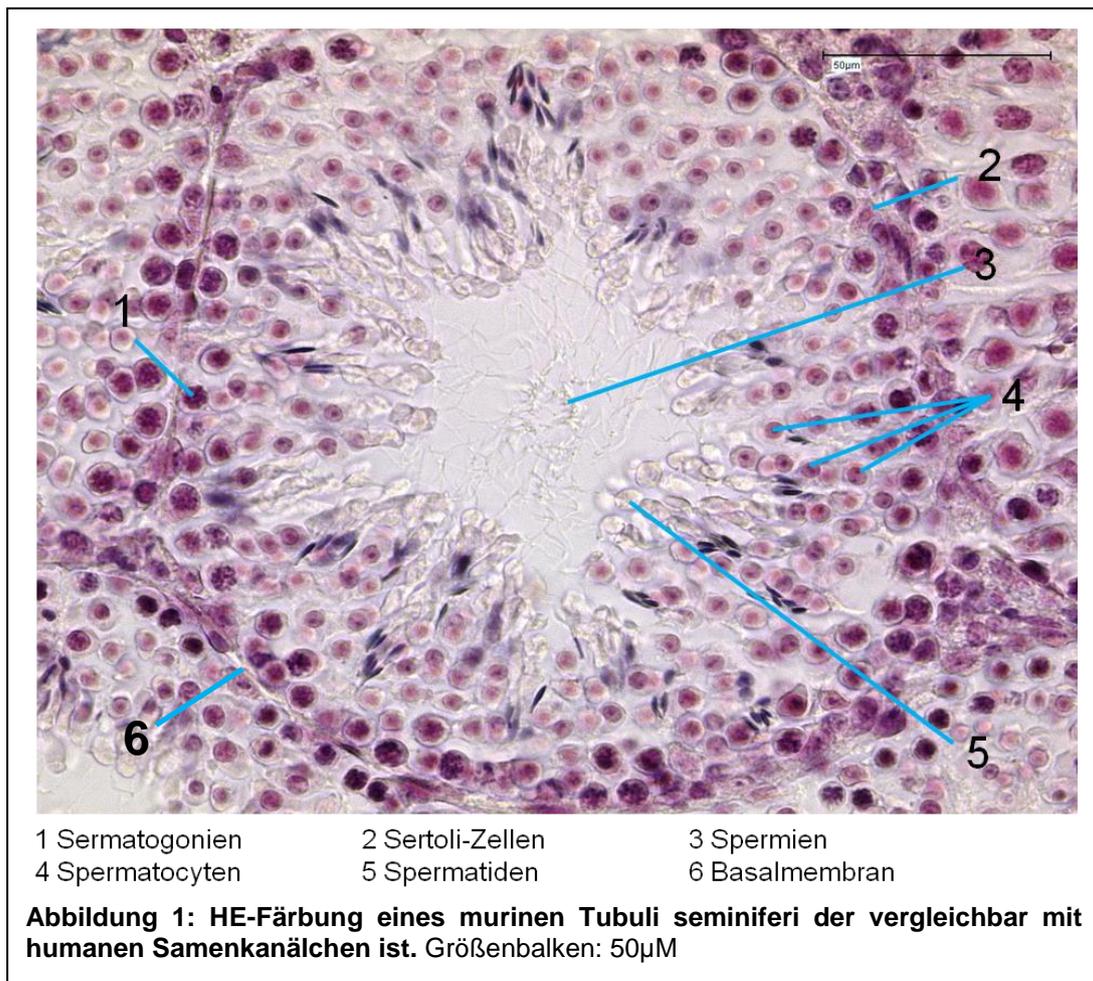
1.2 Humane Keimzellentwicklung

Die Vorläuferzellen der Gameten werden als primordiale Keimzellen oder PGC's (aus dem Englischen für „primordial germ cells“) bezeichnet. In Mäusen konnte während der embryonalen Entwicklung gezeigt werden, dass Zellen des viszeralen Endoderms und des extraembryonalen Ektoderms spezifische BMP-Signalmoleküle (BMP4/BMP8b) exprimieren (de Sousa Lopez et al. 2007). Durch diese sezernierten Signale erlangt eine kleine Gruppe von Zellen innerhalb des Primitivstreifens die Keimzellkompetenz. Diese sind, wie somatische Zellen, diploid und lassen sich bereits in der zweiten Woche der humanen Embryogenese im primären Ektoderm, dem Epiblast, nachweisen. Die primordialen Keimzellen wandern zwischen der vierten und sechsten Woche der humanen Schwangerschaft in den Embryo ein und migrieren entlang der Dottersackwand hin zum Enddarm. Während es zu mitotischen Teilungen kommt, wandern die Zellen entlang des Urdarms in die Genitalleiste ein, die sich danach zu geschlechtsspezifischen Gonaden entwickelt. Während der murinen embryonalen Entwicklung konnte gezeigt werden, dass die für die Rezeptor-

Tyrosinkinase cKIT positiven, primordialen Keimzellen vermutlich an einem „Stem cell factor“ (SCF)-Konzentrationsgradienten entlang wandern (Godin et al., 1991; Besmer et al., 1993; Matsui et al., 1991; Bernex et al., 1996; De Miguel et al., 2002; Runyan et al., 2006). SCF ist der Ligand des cKIT-Rezeptors und wird während der Wanderung der Keimzellen von den umliegenden somatischen Zellen sezerniert. Bei Männern durchlaufen die humanen, fetalen Keimzellen zwischen der 19. und 25. Schwangerschaftswoche eine Differenzierung zu fetalen Spermatogonien (Pauls et al., 2006). Diese kann durch Veränderungen im Expressionsprofil nachvollzogen werden. Fetale Keimzellen exprimieren cKIT und sind negativ für MAGE-A4. Prospermatogonien hingegen exprimieren kein cKIT, dafür aber MAGE-A4 (Pauls et al., 2006). Auch die Expression der Pluripotenzgene NANOG und OCT3/4 werden im Verlauf der Transition herunter reguliert (Gaskell et al., 2004).

1.3 Entwicklung der humanen Gonadenanlagen

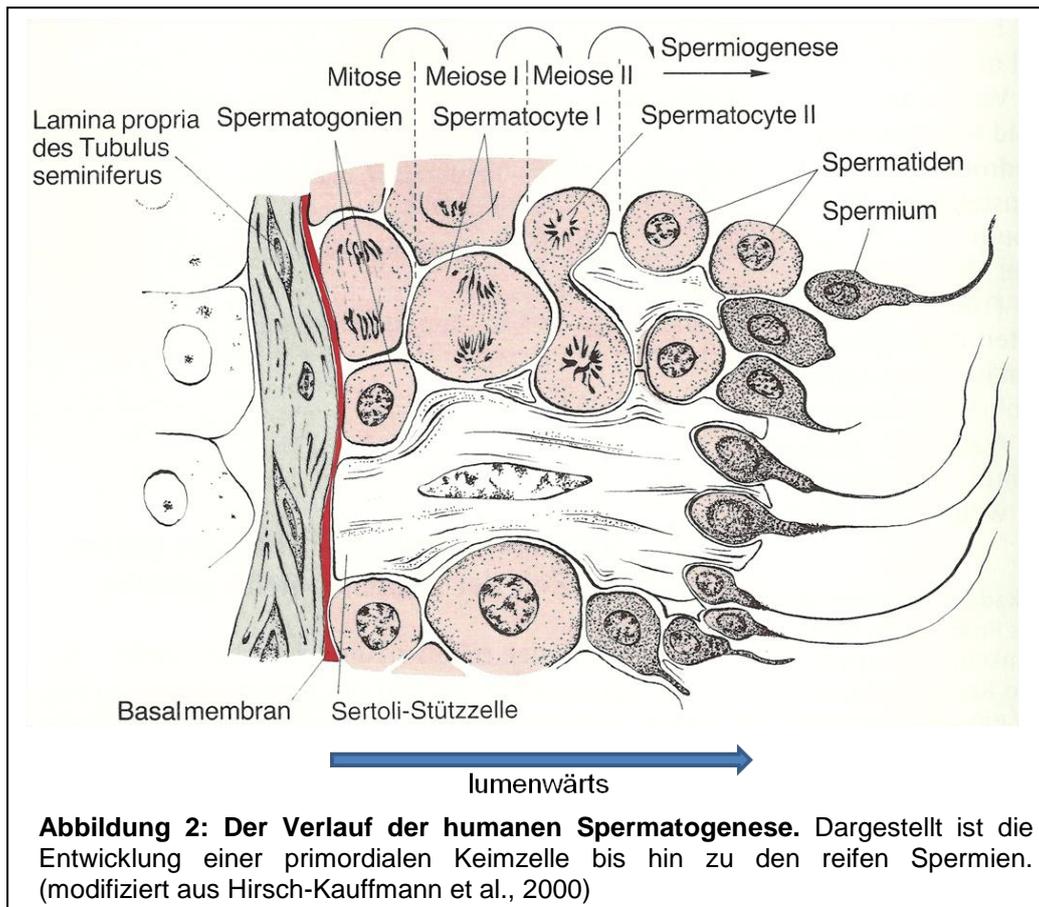
Zum Zeitpunkt der Einwanderung der primordialen Keimzellen in die Genitalleiste kann nicht zwischen einer männlichen oder weiblichen Gonadenanlage differenziert werden, deshalb nennt man diesen Zustand auch die „indifferente Gonadenanlage“. Erst durch Expression des SRY-Proteins erfolgt die sexuelle Differenzierung (Haqq, King, 1995; Goodfellow, Lovell-Badge, 1993). SRY wird dabei in den somatischen Zellen der männlichen Genitalleiste exprimiert. SRY steht für „sex determining region on Y“, dementsprechend befindet sich das kodierende Gen auf dem Y-Chromosom. Fehlt dieses Chromosom und folglich auch die SRY-Expression, kommt es zur Ausbildung eines weiblichen Phänotypen (Haqq, King, 1995; Goodfellow, Lovell-Badge, 1993). Durch die Produktion von Testosteron und die Expression von SRY wachsen die Keimstränge und bilden die Hodenstränge (Chordae testiculaes). Bis zur Pubertät bleiben die Hodenstränge kompakt. In ihrem Innersten persistieren die fetalen Spermatogonien bis zur Ausbildung eines Lumens. Die Hodenstränge werden nun als Tubuli seminiferi bezeichnet (Abb. 1). In diesen liegen die Prospermatogonien der Basalmembran an und werden nun als Spermatogonien bezeichnet. Diese bilden die Stammzellpopulation für die Spermatogenese. Innerhalb der Samenkanälchen befinden sich zwei verschiedene Zellpopulationen, zum einen die Sertoli-Zellen und zum anderen die Keimzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Abb. 1).



Sertoli-Zellen dienen den Tubuli seminiferi als Stützzellen und bilden die Blut-Hoden-Schranke, die die entwickelnden Spermien vor dem körpereigenen Immunsystem und Giften schützt. Zudem unterstützen sie den Testosterontransport zu den Keimzellen. Sertoli-Zellen sezernieren zudem Inhibin, welches über die Hypophyse und das dort gebildete follikelstimulierende Hormon (FSH) die Spermatogenese reguliert. Beim Mann befinden sich im Interstitium des Hodens die Leydig-Zellen, welche ab der Pubertät Testosteron produzieren, das die Spermatogenese stimuliert.

1.4 Die humane Spermatogenese

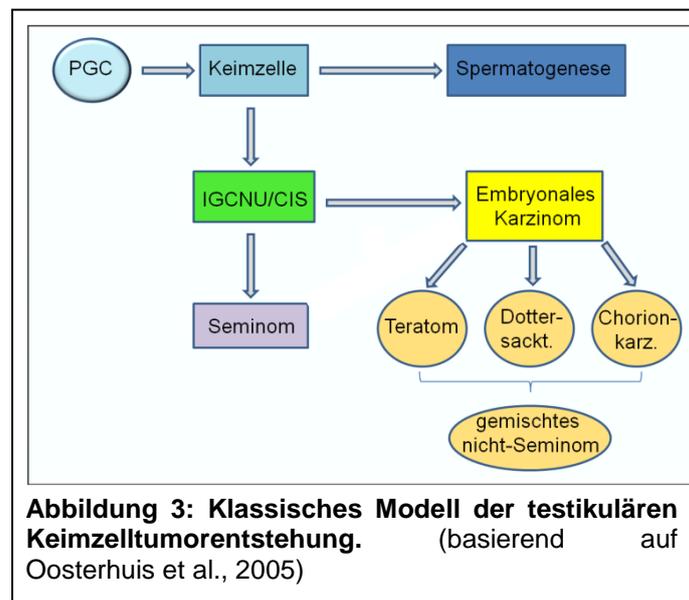
Als Spermatogenese bezeichnet man den gesamten Prozess der Entwicklung von den Keimzellen bis zu den reifen Spermien (Abb. 2). Die einzelnen Entwicklungsschritte der Spermatogenese können räumlich differenziert werden. Die Entwicklung der Keimzellen beginnt an der Basalmembran des Samenkanälchens und schreitet lumenwärts über Spermatozyten I (primäre Spermatozyten), Spermato-



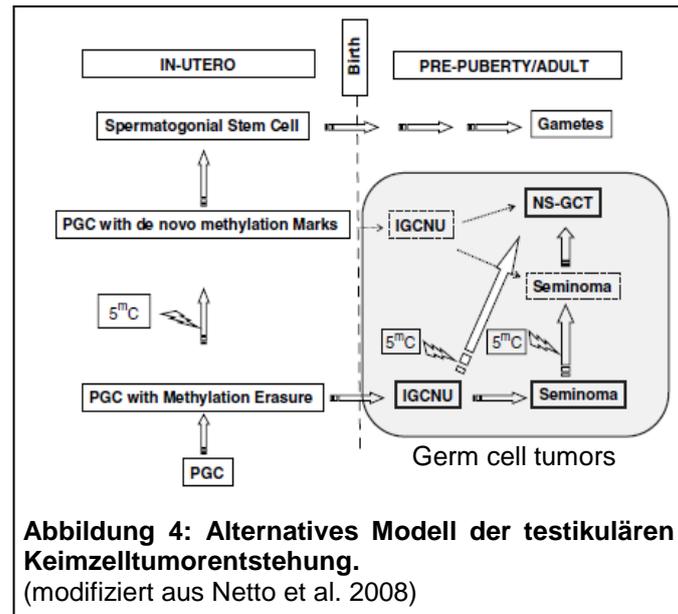
zyten II (sekundäre Spermatozyten) und Spermatiden bis zu den reifen Spermien fort (Hirsch-Kauffmann et al., 2000). Der Beginn der Spermatogenese wird durch eine heteronome, mitotische Teilung eingeleitet, bei der die Keimzellen, die zu diesem Zeitpunkt als A-Spermatogonien bezeichnet werden, durch dünne Zytoplasmabrücken miteinander verbunden bleiben (Burgos et al., 1955; Fawcett et al., 1959; de Rooij et al., 2001). Durch diesen Prozess wird eine Spermatogonie in den Prozess der Spermatogenese eingeschleust. Nach einer weiteren mitotischen Teilung entstehen die B-Spermatogonien, welche sich ebenfalls mitotisch in die primären Spermatozyten teilen (Russell et al., 1990). Nach der ersten meiotischen Reifeteilung (Reduktionsteilung) entstehen haploide, sekundäre Spermatozyten, welche direkt in die zweite Reifeteilung (Äquationsteilung) eintreten. Durch die Aufteilung der Zwei-Chromatid-Chromosomen innerhalb eines jeden Spermatozyten entstehen letztendlich vier haploide Spermatiden. Sie werden in einem mehrere Wochen dauernden Prozess, der sogenannten Spermiohistogenese oder Spermiohistogenese unter aktiver Mithilfe der Sertoli-Zellen in reife Spermien umgewandelt (Skinner et al., 1991).

1.5 Modelle der Keimzelltumorentwicklung

Im klassischen Modell der Keimzelltumorentwicklung (Abb. 3) wird eine Keimzelle als Ursprungszelle der testikulären Keimzelltumoren angesehen. Aus dieser entwickelt sich das Carcinoma-in-situ (CIS), welches als Vorläuferläsion der Seminome und embryonalen Karzinome gilt. Embryonale Karzinome können in Teratome, Dottersacktumoren und Chorionkarzinome ausdifferenzieren. Mischformen dieser Entitäten bezeichnet man als gemischte Nicht-Seminome. Seminome sind nicht in der Lage *in vivo* zu differenzieren (Teilum, 1989; Battifora et al., 1984; Srigley et al., 1988). 2002 wurde die Theorie aufgestellt, dass sich CIS-Zellen aus primordiales Keimzellen entwickeln, die ein aufgehobenes genomisches Prägungsmuster besitzen, aber noch nicht das Entwicklungsstadium erreicht haben, in dem *de novo*-Methylierungen reetabliert werden (Smiraglia et al., 2002). Netto et al. veröffentlichten 2008 eine neue, leicht abgeänderte Theorie (Netto et al., 2008) (Abb. 4). Dabei können CIS-Zellen aus primordiales Keimzellen mit aufgehobenen oder reetablierten genomischen Prägungsmuster entstehen. Je nach Zustand wird dabei entweder die



Differenzierung in die nicht-seminomatösen Keimzelltumorentitäten oder zu Seminomen gefördert. Nach Netto et al. könnte zudem durch *de novo*-Methylierung von CIS- oder Seminom-DNS der Übergang in nicht-seminomatöse Keimzelltumoren eingeleitet werden.



1.6 Humane Keimzelltumoren

Testikuläre Keimzelltumoren (KZT) sind in den westlichen Industrienationen Europas und Nordamerikas die häufigsten Malignome von Männern im Alter zwischen 18 und 45 Jahren und ihre Inzidenz ist weiter ansteigend (Adami et al., 1994; Looijenga et al., 1999). Die unklassifizierte intratubuläre Keimzellneoplasie (IGCNU) oder auch Carcinoma-in-situ (CIS) wurde erstmals von Skakkebaek (1972) beschrieben und gilt als neoplastische Vorläuferläsion testikulärer Keimzelltumoren (Skakkebaek, 1972) (Abb. 5). Das CIS geht stets, im Durchschnitt nach 8-10 Jahren, in einen invasiven KZT über (Looijenga et al., 2003; Krabbe et al., 1979). Heutige klinische, epidemiologische und experimentelle Daten sprechen für eine CIS-Entwicklung, der eine Entwicklungsstörung des Keimepithels zu Grunde liegt (Oosterhuis et al., 2005). Das Vorkommen kongenitaler Anomalien im Hoden, wie das „Sertoli-Cell-Only“-Syndrom, ein Spermatogenese-arrest oder die Entwicklung eines CIS bei 25% der Patienten mit testikulären Keimzelltumoren (Berthelsen et al., 1979) untermauern diese Theorie. Sonne et al. konnten zeigen, dass CIS-Zellen von Keimzellen, die in ihrer normalen Entwicklung gestört sind, entstammen (Sonne et al., 2009). Es wird postuliert, dass diese Störung während der embryonalen Entwicklung auftritt. Gonozyten, die nicht in Spermatozyten differenzieren, persistieren ruhend im Hoden bis zur Pubertät. Steigt mit der Pubertät der Testosteronspiegel, wird die Proliferation dieser Prä-CIS-Zellen induziert. Es kommt zur Entwicklung des CIS und später zur

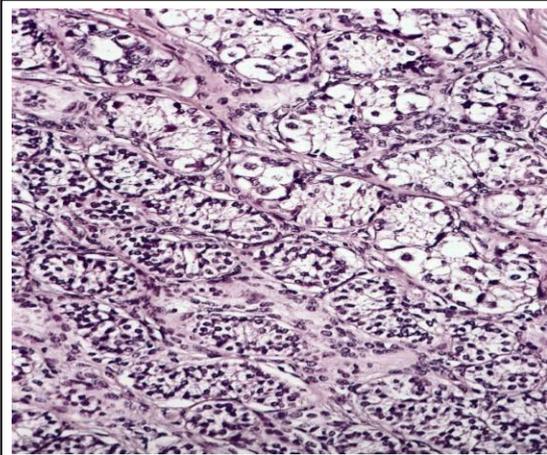


Abbildung 5: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines CIS (IGCNU) ohne invasiven Keimzelltumor. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

weiteren Differenzierung in die invasiven Keimzelltumoren. Eine weitere Hypothese zur Entstehung der Keimzellneoplasie basiert auf der konstanten genetischen Veränderung in invasiven Keimzelltumoren in Form von Amplifikationen spezifischer Regionen des kurzen Arms des Chromosoms 12 (Isochromosom 12p) (Rosenberg et al., 2000). Dabei liegen im Lokus 12p13 die Pluripotenz assoziierten Gene NANOG und GDF3. Auch weitere wichtige Zellzyklus regulierende Gene wie Zyklin D2, die Zyklin abhängige Kinase CDK4 und das Onkoprotein K-ras liegen auf dem Chromosom 12. Störungen in der Regulation dieser Gene könnten als Auslöser einer Keimzellneoplasie-Entwicklung in Frage kommen (Looijenga et al., 1999, Oosterhuis et al., 2005). Auch epigenetische Modifikationen während der Keimzellreifung, wie DNS-Methylierung und Histon-Acetylierung, werden als pathogene Faktoren diskutiert (Oosterhuis et al., 2005). Wie zuvor beschrieben, entsteht aus dem CIS nach 8-10 Jahren ein invasiver Keimzelltumor. Oosterhuis und Looijenga teilen diese in die folgenden drei Gruppen ein (Oosterhuis et al., 2005):

1.6.1 Typ I Keimzelltumoren

Zu den Typ I Keimzelltumoren zählen die (unreifen) Teratome und Dottersacktumoren, deren Inzidenzen bei 0,12 pro 100.000 liegen. Das Wachstum eines Teratoms rekapituliert embryonale Entwicklungsschritte, denn teratomatöse Zellen differenzieren in Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm, Endoderm) (Abb. 6). Anhand des Differenzierungsfortschritts unterscheidet man un-

reife von reifen Teratomen. Reife Teratome treten fast ausschliesslich im Kleinkindalter auf, während man beim jungen Erwachsenen oft Mischformen aus unreifen und reifen Teratomen findet. Teratome zeigen ein biparentales, nur teilweise aufgehobenes genomisches Prägungsmuster. Aus diesem Grund wird eine migra-

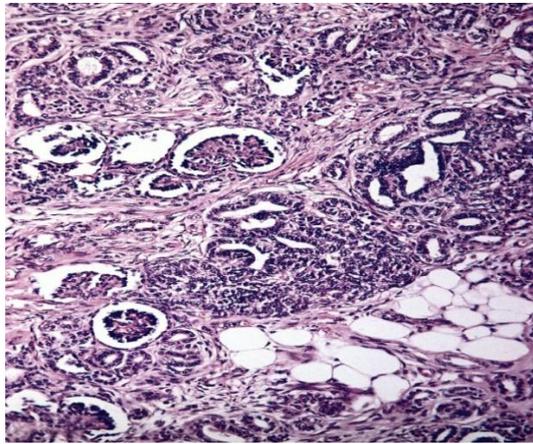


Abbildung 6: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines testikulären Teratoms. Man beachte, die vielfältigen Gewebetypen. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

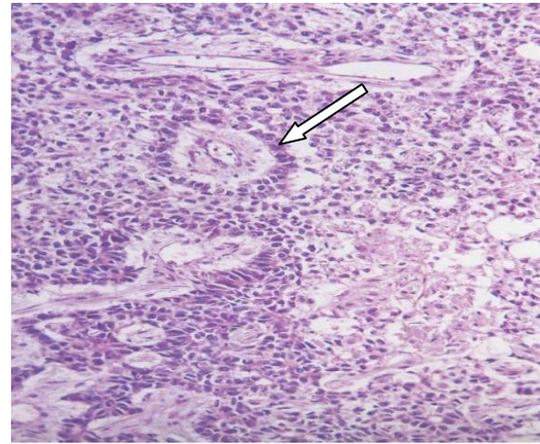


Abbildung 7: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines Dottersacktumors. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

torische Keimzelle als Ursprung angesehen (Bussey et al., 2001; Schneider et al., 2001). Dottersacktumoren bestehen aus frühen embryonalen und extraembryonalen Geweben. Dottersacktumoren sind hoch maligne und metastasieren sehr früh entlang der Lymphbahnen und später entlang der hämatogenen Routen (Krag Jacobsen et al., 1989). Charakteristisch für diese Keimzelltumorentität ist die hohe Sekretion des Alpha-Fetoproteins. Die histologische Detektion von Schiller-Duval-Körpern (Abb. 7B, weißer Pfeil), die einem Glomerulus der Nierenkörperchen ähneln, ist pathognomonisch für Dottersacktumoren (Krag Jacobsen et al., 1989).

1.6.2 Typ II Keimzelltumoren

Zu den Typ II Keimzelltumoren zählen die klassischen Seminome (Abb. 8) (im Ovar: Dysgerminome, im Hirn: Germinome) und die Nicht-Seminome (Oosterhuis et al., 2005). Klassische Seminome werden mit erhöhten PLAP- und LDH-Konzentrationen assoziiert und ähneln sowohl morphologisch als auch in ihrem Expressionsprofil stark primordialis Keimzellen. Sie exprimieren die Keimzellmarker cKIT, AP-2 γ , BLIMP1, VASA und Pluripotenzmarker wie OCT3/4 und NANOG.

Aufgrund der aufgehobenen genomischen Prägung gilt eine postmigratorische primordiale Keimzelle als Ursprungszelle (Smiraglia et al., 2002; Netto et al., 2008). Seminomen wird kein *in vivo*-Differenzierungspotential zugesprochen (Teilum, 1989; Battifora et al., 1984; Srigley et al., 1988). Zu den Typ II nicht-seminomatösen

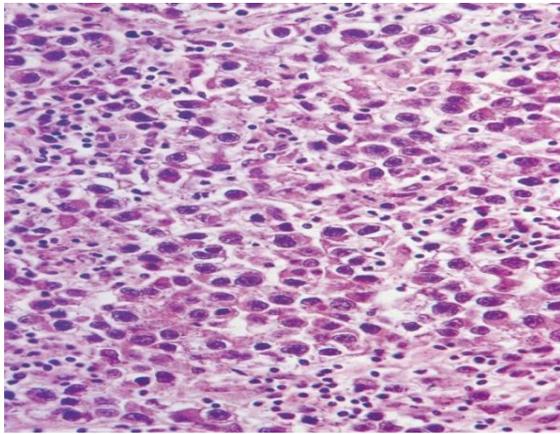


Abbildung 8: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines klassischen Seminoms. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

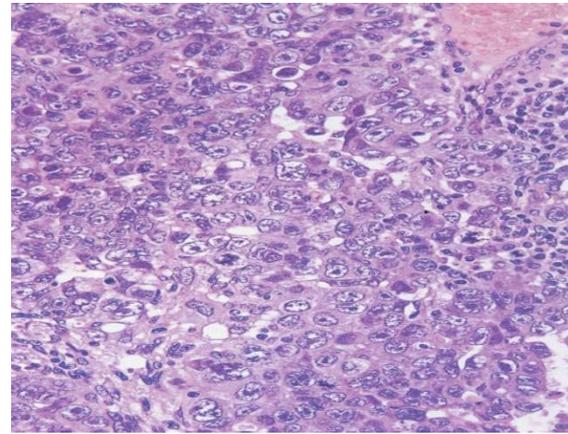


Abbildung 9: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines embryonalen Karzinoms. (Krag Jacobsen et al., 1989)

Keimzelltumoren gehören die embryonalen Karzinome (Oosterhuis et al., 2005) (Abb. 9). Diese Keimzelltumorentität findet sich oft in Kombination mit anderen Keimzelltumoren, wie zum Beispiel Teratomen und/oder Dottersacktumoren. Als diagnostischer Marker für embryonale Karzinome können SOX2 und CD30 dienen (de Jong et al., 2008; Ferreiro et al., 1994). Embryonale Karzinome werden als malignes Gegenstück zu pluripotenten, embryonalen Stammzellen angesehen und gelten als Vorstufe der Teratome, der Dottersacktumoren und der Chorionkarzinome. Im Gegensatz zu Seminomen gilt eine post-migratorische primordiale Keimzelle, die bereits eine erneute *de novo*-DNM-Methylierung durchlaufen hat, als Ursprungszelle der embryonalen Karzinome (Smiraglia et al., 2002). Auch Chorionkarzinome gehören zu den nicht-seminomatösen Keimzelltumoren und bestehen aus Synzytio- und Zytotrophoblastzellen (Abb. 10) (Oosterhuis et al., 2005). Dabei treten sowohl intra- als auch extragonadal auf und sind häufig in Kombination mit anderen nicht-seminomatösen Keimzelltumoren zu finden. Ein Gemisch unterschiedlicher nicht-seminomatöser Keimzelltumoren bezeichnet man als gemischtes Nicht-Seminom oder gemischter Keimzelltumor.

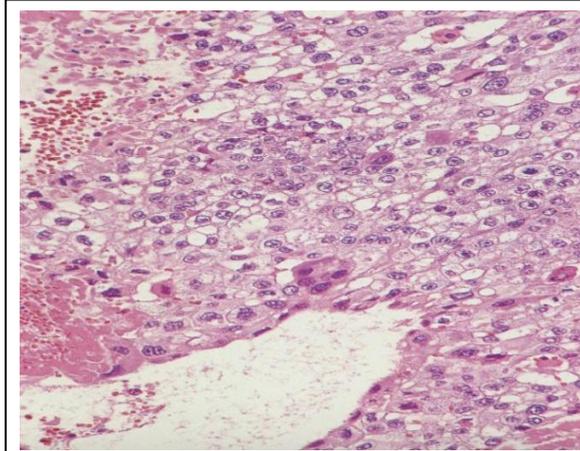


Abbildung 10: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines Chorionkarzinoms. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

1.6.3 Typ III Keimzelltumoren

Die spermatozytären Seminome bilden den Typ III Keimzelltumor (Oosterhuis et al., 2005). Als Ursprungszelle gelten Spermatogonien oder Spermatozyten. Daher besitzen sie teilweise auch ein paternales, genomisches Prägungsmuster. Hauptsächlich kommen spermatozytäre Seminome bei älteren Männern vor, wobei diese Zellen zu keiner Metastasierung neigen (Krag Jacobsen et al., 1989). Die Expression von MAGE-A4 kann als diagnostischer Marker dienen (Oosterhuis et al., 2005).

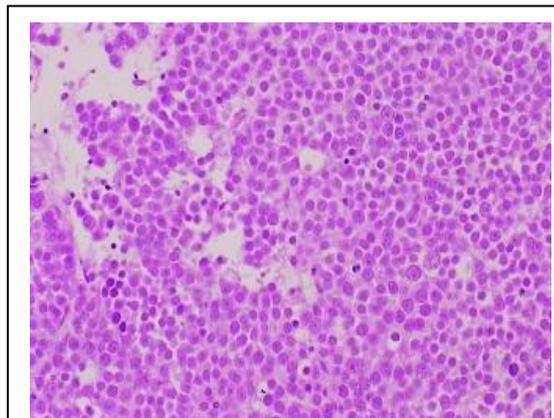


Abbildung 11: Mikroskopische Erscheinung (HE-Färbung) eines spermatozytären Seminoms. Mukoide Tumorzellen heben sich deutlich vom umliegenden Gewebe ab. (aus Krag Jacobsen et al., 1989)

1.7 Die Seminom-Zelllinie TCam-2

Die Primärkultur der Zelllinie TCam-2 wurde aus dem Seminom eines 35-jährigen Mannes etabliert (Mizuno et al., 1993). Die Zellen selbst erscheinen polygonal und flach und das Verhältnis von Nukleus zu Zytoplasma ist groß (Abb. 12). Die Charakterisierung dieser Zelllinie zeigte, dass sie eine Verdopplungszeit von ungefähr 58 Stunden besitzt (Eckert et al., 2008). Wir konnten zeigen, dass diese Zellen Pluripotenz- (NANOG, OCT3/4) und Keimzellmarker (BLIMP1, VASA, AP-2 γ , cKIT) exprimierten und negativ für SOX2 waren. In einer „cDNS-Microarray“-Analyse konnte gezeigt werden, dass TCam-2 Zellen den parallel untersuchten Seminomgeweben zugeordnet werden konnten. In murinen Keimzellen etabliert der

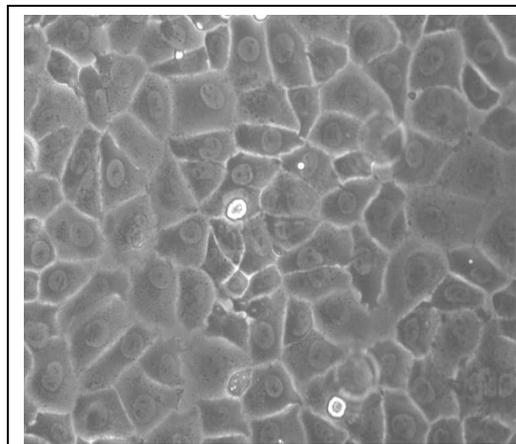


Abbildung 12: Hellfeldaufnahme der TCam-2-Morphologie.
Größenbalken: 50 μ M

Transkriptionsfaktor Blimp1 in Interaktion mit Prmt5 im Nukleus eine symmetrische Dimethylierung des Arginin 3 an den Histonen H2a und H4 (H2A/H4R3me2s). Dadurch werden über epigenetische Mechanismen somatische Differenzierungsprogramme unterdrückt (Ancelin et al., 2006). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass BLIMP1 ebenfalls in humanen CIS-Zellen und Seminomen exprimiert wird (Eckert et al., 2008). Auch in TCam-2-Zellen konnte BLIMP1- und PRMT5-Expression sowie die daraus resultierende H2A/H4R3me2s nachgewiesen werden (Eckert et al. 2009). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die TCam-2-Zelllinie ein Seminom repräsentiert. Dadurch stellt sie das einzige *in vitro*-Seminom-Modell dar und eröffnet Möglichkeiten, die Entstehung und Progression dieser Tumoren zu beleuchten.

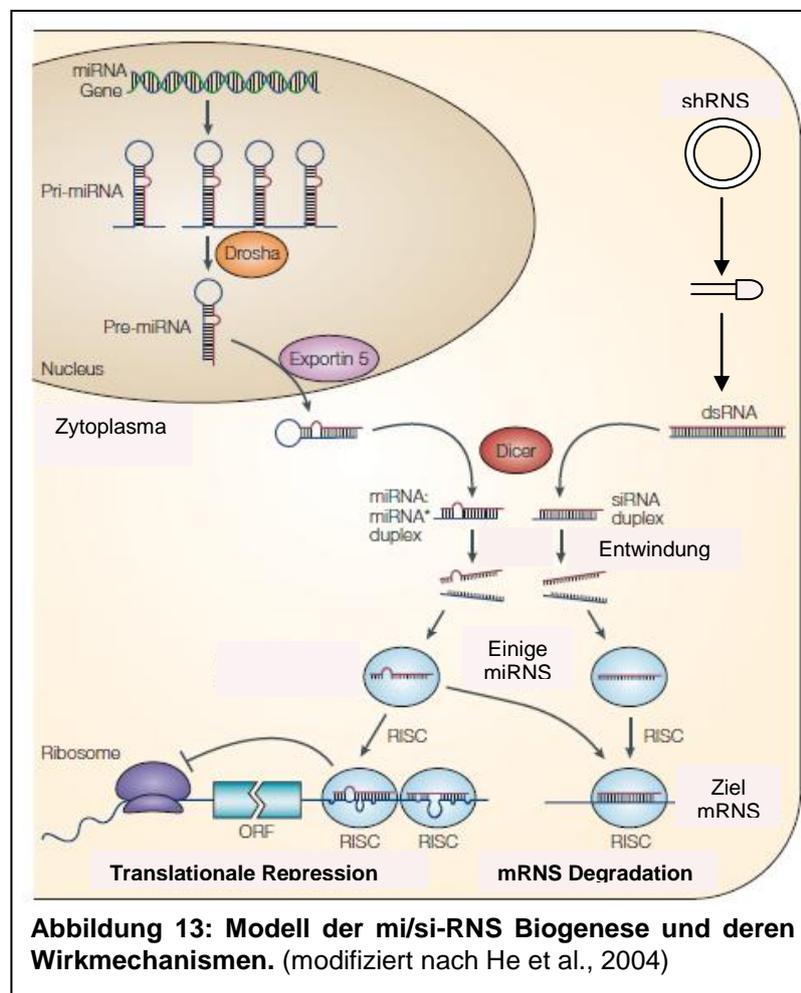
1.8 Die Epigenetik

Hal C. Waddington definierte bereits 1942, ohne die Struktur der DNS zu kennen, die Epigenetik als (frei übersetzt) „den Zweig der Biologie, der die kausalen Zusammenhänge zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, um den ausgeprägten Phänotyp erklären zu können“. Die heutige Definition bezeichnet Epigenetik als „alle meiotischen und mitotischen vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNS-Sequenz selber kodiert sind“ (Egger et al., 2004). Eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen ist die Methylierung von CpG-Dinukleotiden der DNS. Cytosine werden dabei am C⁵-Atom methyliert. Dadurch kann eine Transkription des auf dem entsprechenden DNS-Abschnitt liegenden Gens inhibiert und folglich die Expression dieser Gene herunterreguliert („silenced“) werden. Diese chemische Modifizierung der DNS ist jedoch reversibel. Das Entfernen der Methylgruppe am Cytosin eines CpG-Dinukleotids wird durch Demethylasen vermittelt. DNS-Methylierungen erfolgen hauptsächlich in Promotorbereichen von Genen oder in den CpG-Inseln. Letztere sind 0,5 – 2kb große Regionen im Genom von Eukaryoten mit statistisch erhöhter CpG-Dichte (>60%). Etwa 40-45% aller menschlichen Gene besitzen CpG-Inseln in ihren Promotorbereichen. Die Regulation der Promotor-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung, z.B. bei der epigenetischen Inhibition der Expression von Tumorsuppressorgenen wie RASSF1A sowie bei der genomischen Prägung (Peters et al., 2007).

1.9 Die RNS-Interferenz

Mit dem Begriff der RNS-Interferenz (RNSi) beschreibt man einen natürlichen Mechanismus eukaryotischer Zellen, der die Expression einzelner Gene beeinflussen kann. In diesen Mechanismus sind meist 21 Nukleotid lange RNS-Moleküle involviert, die zu einer genspezifischen Herunterregulation führen. Diese RNS-Moleküle (siRNS) können auch synthetisch hergestellt werden und sind in der Lage nach Transfektion in eine Zelle gezielt die mRNS-Translation der targetierten RNS zu unterbinden. Die Auswirkungen auf die Zelle können anschließend untersucht werden. Diese Technik der gezielten Herabregulation wird als „knock-down“ bezeichnet. Eine Herabregulation kann auch durch die Transfektion von shRNS-

Plasmiden erreicht werden. Der zu Grunde liegende Wirkmechanismus ist bei beiden Möglichkeiten der gleiche, allerdings muss die shRNS nach Transkription in der Zelle erst in eine aktive Form prozessiert werden (Abb. 13). Die shRNS-Fragmente werden dabei von dem Enzym DICER unter ATP-Verbrauch in ihre aktive Form geschnitten.



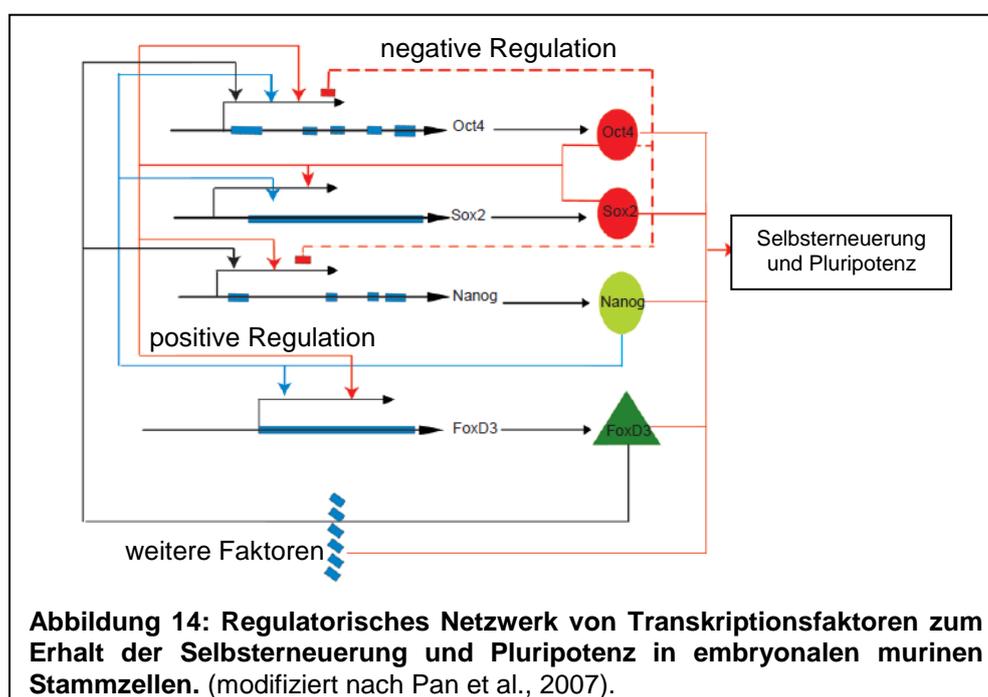
Bei synthetisch hergestellten siRNS entfällt dieser DICER-Prozessierungsschritt, da die Oligonukleotide bereits in trunkierter Form in die Zelle eingeschleust werden. Die doppelsträngige siRNS wird anschließend im sogenannten „RNA-induced silencing-complex“ (RISC) inkorporiert. RISC besteht aus den Endonukleasen DICER und Argonaute2, dem RNS-bindenden Protein TRBP/R2D2/Loquacious/RDE4 und der siRNS. Das Enzym DICER dissoziiert, sobald eine siRNS vorliegt. Die gebundene doppelsträngige siRNS wird entwunden und in Einzelstränge abgebaut. Diese einzelsträngige siRNS bindet an die komplementäre Boten-RNS. Die Endonuklease Argonaute2 schneidet die Boten-RNS einmal, woraufhin Exonukleasen die Restfragmente abbauen. Eine Translation des Proteins wird somit unterbunden. Ist die siRNS jedoch nicht vollständig komplementär zum Zielmolekül, zum Beispiel

aufgrund von Sekundärstrukturen am Bindungsort, kommt es zwar zu einer Bindung der siRNS an die Ziel-RNS, aber nicht zu deren Abbau. Der RISC/siRNS/Ziel-RNS-Komplex blockiert dann sterisch den Aufbau des Translationskomplexes und unterbindet auf diesem Wege ebenfalls eine Translation des Zielproteins.

1.10 Die Transkriptionsfaktoren NANOG und AP-2 γ

1.10.1 Der Transkriptionsfaktor NANOG

NANOG ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen beteiligt ist (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Das NANOG-Gen ist auf dem humanen Chromosom 12p13.31 codiert. Das Protein besteht aus 305 Aminosäuren und ist 34,6 kDa schwer. Es besitzt eine DNS bindende Homeodomäne, welche in der transkriptionellen Regulation von Schlüsselprozessen der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, wie zum Beispiel bei Erhalt der Selbsterneuerungsfähigkeit und Pluripotenz. Überexpression von Nanog ermöglicht eine LIF/STAT3 unabhängige Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen ohne Verlust der Pluripotenz (Chambers et al., 2003). Ein „knock-down“ von NANOG führt hingegen zur Differenzierung ins viszerale Ektoderm (Hyslop et al., 2007) (Abb. 14). NANOG bildet ein regulatorisches Netzwerk mit den Transkriptionsfaktoren OCT3/4 und SOX2 zur Förderung der Selbsterneuerung und zum Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (Pan et al., 2007) (Abb. 14).



1.10.2 NANOG in der Keimzellentwicklung und in Keimzelltumoren

NANOG wird während der Embryonalentwicklung in der inneren Zellmasse der Blastozyste sowie nach Implantation im Epiblasten exprimiert (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Auch in fetalen Gonozyten, IGCNU/CIS-Zellen und undifferenzierten Keimzelltumorentitäten (Seminomen und embryonalen Karzinomen) ist das NANOG-Protein nachweisbar (Hart et al., 2005). In fetalen Spermatogonien und im adulten Hoden sowie in differenzierten Zellen ist NANOG nicht detektierbar. Die Expression von NANOG kann als diagnostischer Marker für pluripotente, undifferenzierte Zellen verwendet werden.

1.10.3 Der Transkriptionsfaktor AP-2 γ

Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern, AP-2 α bis AP-2 ϵ . Das Molekulargewicht der Proteine liegt durchschnittlich bei 46-52 kDa. Alle Proteine der AP-2-Familie besitzen drei charakteristische Domänen-Strukturen. N-terminal befindet sich eine kaum konservierte Transaktivierungsdomäne, an die sich eine basische Region anschließt. C-terminal liegen eine hoch konservierte Dimerisierungsdomäne und eine DNS-Bindedomäne mit Helix-Spanne-Helix-Motiv. AP-2-Proteine können als Homo- und Heterodimere an DNS-Stränge binden und die Transkription aktivieren oder reprimieren (Eckert et al., 2005).

1.10.4 AP-2 γ in der Keimzellentwicklung und in Keimzelltumoren

In humanen Keimzellen kann die AP-2 γ -Expression zwischen der 12. und 20. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden. AP-2 γ ist dabei keimzellspezifisch exprimiert und wird wie NANOG nach der Transition zu fetalen Spermatogonien herunter reguliert (Hoei-Hansen et al., 2004; Pauls et al., 2005; Pauls et al., 2006). AP-2 γ -Nullmutanten sind steril und weisen einen Keimzellverlust auf, welcher die wichtige Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Keimzellentwicklung verdeutlicht. Weber et al. konnten zeigen, dass AP-2 γ eine wichtige Rolle in der Repression mesodermaler Differenzierungsprozesse während der Keimzellentwicklung spielt (Weber et al., 2010). *In vitro* generierte PGCs aus embryonalen Stammzellen zeigten dabei eine Induktion des mesodermalen Markers Brachyury und in der humanen

Seminom-Zelllinie TCam-2 führte eine Herunterregulation von AP-2 γ zu einer Induktion mesodermaler Marker, nämlich HAND1 und MyoD1. Zusätzlich wird AP-2 γ in einigen humanen Keimzelltumorentitäten exprimiert, wie Seminomen und Dysgerminomen, sowie in deren Vorläuferläsion IGCNU/CIS (Hoei-Hansen et al., 2004; Pauls et al., 2005; Pauls et al., 2006). Dies unterstützt die Abstammung der IGCNU/CIS- und Seminomzellen von Keimzellen. Auf Grundlage dieser Beobachtungen kann AP-2 γ als diagnostischer Marker für Keimzelltumoren verwendet werden.

1.11 Zielsetzung dieser Dissertation

Das Homeobox-Protein NANOG spielt eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung und Erhalt der Pluripotenz in undifferenzierten Zellen. NANOG-Expression kann u.a. in fetalen Keimzellen, aber auch in undifferenzierten Keimzelltumoren (Seminomen, embryonalen Karzinomen) sowie in deren Vorläuferläsion (IGCNU/CIS) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Dissertation soll zunächst untersucht werden durch welche Regulationsmechanismen die humane NANOG-Expression kontrolliert wird. Anschließend soll geprüft werden, ob diese Mechanismen auch während der humanen Keimzellentwicklung zum Tragen kommen. Aufgrund des postulierten gemeinsamen Ursprungs von Keimzellen und Keimzelltumoren sollen die NANOG-Regulationsmechanismen auch in Typ I- und Typ II-Keimzelltumoren untersucht und mit den vorherigen Keimzelluntersuchungen verglichen werden. Mit Hilfe dieser Daten wird ein Modell der NANOG-Expressionsregulation während der Keimzellreifung und in testikulären Keimzelltumoren entwickelt.

In weiteren Experimenten soll das *in vitro*- und *in vivo*-Differenzierungspotential von Seminomen (S), einer undifferenzierten Typ II-Keimzelltumorentität näher untersucht werden. Während pluripotente embryonale Karzinome (EK) in alle drei Keimblätter differenzieren können, ist das Differenzierungspotential von Seminomen nahezu unerforscht. Seminomen wird kein *in vivo*-Differenzierungspotential zugesprochen, dennoch könnte diese Tumorentität durch eine Transition zu einem pluripotenten embryonalen Karzinoms ein EK-ähnliches Differenzierungspotential erlangen. Durch unterschiedliche experimentelle Ansätze soll ein Differenzierungsprozess in der Seminom-Zelllinie TCam-2 ausgelöst werden. So soll eine mögliche Transition eines

Seminoms zu einem embryonalen Karzinom nachgewiesen werden und neue Einblicke in seminomatöse Differenzierungsprozesse sowie in die Keimzelltumorentwicklung gewonnen werden. Desweiteren soll eine Abhängigkeit des seminomatösen Wachstums- und Differenzierungsverhaltens zu unterschiedlichen zellulären Mikromilieus und Kulturbedingungen näher untersucht werden. Die differenzierten Zellen sollen molekularbiologisch charakterisiert werden, um die Richtung des Differenzierungsprozesses zu bestimmen. Diese Daten sollen zu einem besseren Verständnis der Keimzelltumorbiologie, insbesondere von seminomatösen Differenzierungsfähigkeiten beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
2-Propanol	Merck	Darmstadt
5'-aza-2-Deoxycytidine	Sigma-Aldrich	München
Acrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth	Karlsruhe
AEC chromogenes Substrat	Dako	Hamburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	München
Agar	Merck	Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich	München
Ampicilin	Roth	Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	München
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	München
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt
Chloroform	Merck	Darmstadt
Desoxiribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen	Karlsbad
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München
Dithiotreitol 0,1M (DTT)	Invitrogen	Karlsbad
Eisessig	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck	Darmstadt
Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck	Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich	München
Glycerin	KMF	Lohmar

Glycerol	Sigma-Aldrich	München
Hefe-Extrakt	Merck	Darmstadt
IPTG Lösung	Fermentas	St.Leon-Rot
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	München
Lämmli-Probenpuffer	Roth	Karlsruhe
Luciferin	Roche	Grenzach
Magermilchpulver	Merck	Darmstadt
Methanol	Merck	Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich	München
Natriumacetat, 3M, pH4,6	Applied Biosystems	Warrington
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat	Sigma-Aldrich	München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	BioRad	München
Natronlauge (5M)	Merck	Darmstadt
Oligonukleotide (Primer)	Sigma-Aldrich	München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt
Phenol/ Chloroform	Roth	Karlsruhe
(PBS)-Tabletten	Sigma-Aldrich	München
Salzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt
Tris	Merck	Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich	München
TRIZOL	Invitrogen	Karlsbad
X-gal Lösung	Fermentas	St.Leon-Rot

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
1,5ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nümbrecht
2,0ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nümbrecht
96-Loch-Mikrotiterplatten	TPP	Trasadingen
24-Well-Zellkulturschalen	TPP	Trasadingen
6-Well-Zellkulturschalen	TPP	Trasadingen

PCR-Reaktionsgefäße 100µl	Axygen	Winsen, Luhe
Petrischalen 10cm	Greiner	Solingen
Roti-PVDF-Membran	Roth	Karlsruhe
Röntgenfilme	Kodak	Rochester
Sterilfilter	Millipore	Schwalbach
Zellkulturflaschen 75cm ²	Greiner	Solingen
Zellkulturschalen 10cm ²	TPP	Trasadingen

2.1.3 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
DNaseI	NEB	Schwalbach
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen	Karlsbad
M.SssI	NEB	Schwalbach
Proteinase K	Merck	Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	NEB	Schwalbach
RNaseOUT	Invitrogen	Karlsbad
SuperScript III Reverse Tr.	Invitrogen	Karlsbad
Trypsin	PAN Biotech	Wien, Österreich

2.1.4 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
7900HT Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems	Darmstadt
Bakterienschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific	Wesseling
Einbettautomat Tissue-TEK VIP	Miles Scientific	?
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR	Darmstadt
Gelsysteme 50ml, 100ml, 250ml	Peqlab	Erlangen
Homogenisator Micra D-8	Labortechnik	Müllheim
Zellkulturinkubator	Heraeus	Hanau
Luminometer Centro LB960	Berthold	Bad Wildbad

Mikroskop Leica DMLB	Leica	Solms
Mikroskop Leica DMIRB	Leica	Solms
Nassblot-Kammer Trans-Blot-Cell	BioRad	München
Netzgerät E143	Consort	Turnhout
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf	Hamburg
Photometer NanoDrop	Peqlab	Erlangen
Sterilbank Hera Safe	Kendro	Langenselbold
Thermocycler PTC-200	MJ Research	Waltham, US
Thermoschüttler Thermomixer c.	Eppendorf	Hamburg
UV-System/ Kamera Classic Uno	Intas	Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries/Roth	Karlsruhe
Wasserbad	GFL	Dülmen
Zentrifugen 5417, 5415D	Heraeus	Hanau

2.1.5 Puffer, Lösungen, Medien

Puffer, Lösung, Medium	Zusammensetzung
10x Ladepuffer	49% Glycerol, 49% H ₂ O, 2% 50x TAE, 1 Spatelspitze Bromphenolblau,
Laufpuffer Western Blot	1 Spatelspitze Xylencyanol 50mM Tris , 384mM Glycin, 0,1% SDS, 1M Tris-Puffer in
20xMOPS	400mM MOPS, 100mM Nac, 10mM EDTA, Wasser, pH-Wert mit HCl oder NaOH einstellen
20xSSC	174g NaCl, 88,2g Na-Citrat add 1l H ₂ O, pH7
50xTAE	2M Tris, 1M NaOAc, 50 mM EDTA
EtBr-Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid, PBT 0,1% Triton-X100, 2,0% BSA in PBS
Luciferase-Assay Puffer	20mM Tricine, 1,07mM (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ *5H ₂ O, 2,67mM MgSO ₄ , 0,1mM EDTA, 33,3mM DTT, 270µM Coenzym A, 530µM ATP, 470µM Luciferin
Luciferase Lysepuffer	5x: 125mM Tris pH 7,8, 10mM EDTA, 100mM DTT,

	50% Glycerol, 5% Triton X-100
PBST	0,1% Tween-20 in PBS
Plasmid-Puffer P1	50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase
Plasmid-Puffer P2	200mM NaOH, 1% SDS
Plasmid-Puffer P3	3,0M KAc pH 5,5
RIPA-Puffer	10 mM Phosphatpuffer, 0,1 % SDS, 1 % Triton-X100, 0,1 %, Natriumdesoxycholat, vor Verwendung Protease-Inhibitor hinzugeben
RNA-Denat.-puffer	6,5% Formaldehyd, 0,5% Ethidiumbromid, 4x MOPS, 50% Formamid (rekristallisiert)
Stripping-Puffer WB	100mM Mecaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,6
Transferpuffer WB	25mM Tris , 192mM Glycin , 20% Methanol
Zellysepuffer	10mM Tris, 10mM NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS, 1% DTT, 100µg/ml Proteinase K

2.1.6 Zellkulturlösungen

Lösung	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München
Dulbecco`s MEM mit Glutamax	Invitrogen	Karlsbad
Fetales Kälberserum (FCS)	Hyclone	Logan
FugeneHD	Roche	Penzberg
L-Glutamin	Invitrogen	Karlsbad
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen	Karlsbad
Matrigel	BD Biosciences	Heidelberg
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen	Karlsbad
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Invitrogen	Karlsbad
RPMI 1640	Invitrogen	Karlsbad
Trypsin	PAN Biotech	Wien

β-Mercaptoethanol	Invitrogen	Karlsbad
Humanes rekombinantes FGF4	R&D Systems	Minneapolis
Humanes rekombinantes TGF-β	R&D Systems	Minneapolis
Humanes rekombinantes EGF	R&D Systems	Minneapolis
Humanes rekombinantes BMP-4	R&D Systems	Minneapolis
Heparin	R&D Systems	Minneapolis

2.1.7 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Fibroblasten-Medium	DMEM, 15% FCS, 50 U/ml P/S, 200nM L-Glutamin, 1X non-essential amino acids, 100nM β-Mercaptoethanol
TCam-2-Medium	RPMI, 10%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S
JKT-1 Medium	MEM, 10%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S
2102EP Medium	MEM, 10%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S
NCCIT Medium	200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S
TERA2 Medium	MEM, 10%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S
RPMI-Feeder Medium	RPMI, 20%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S, 100mM β-Mercaptoethanol

2.1.8 Bakterienkulturlösungen

Medium	Zusammensetzung
1x LB-Medium	10g Trypton, 5g NaCL, 5g Hefe-Extrakt, 16g Agar, ad 1l H2O
5x LB-Medium	50g Trypton, 25g NaCL, 25g Hefe-Extrakt, ad 1l H2O Ampicillin-Stammlösung 100mg/ml Ampicilin

2.1.9 Oligonukleotide zur Detektion humaner mRNS-Sequenzen

Um die Amplifikation möglicher genomischer DNS Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Primer Exon-übergreifend generiert. Bei Transkripten, die nur aus einem Exon entstehen (wie HOXB1), wurde die RNS vor der cDNS-Synthese durch DNaseI verdaut.

Gen	Vorwärts 5'-3'	Rückwärts 5'-3'	T _{an}	Zyklen
AFP	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	CCCTCTTCAGCAAAGCAGAC	60°C	30
AP-2γ	CCCCTGAGGTCTTCTGCTC	AGAGTCAC ATGAGCGGCTTT	60°C	25
BLIMP-1	GGGTGCAGCCTTTATGAGTC	CCTTGTTTCATGCCCTGAGAT	60°C	30
BMP2	AACGGACATTCCGGTCCTTGC	CGCAACTCGAACTCGCTCAG	60°C	35
BMP4	CACAGCACTGGTCTTGAGATCCTG	CTCAGGGATGCTGCTGAGGTTAAAG	60°C	35
BOULE	TATAAGGATAAGAAGCTGAACATTGGT	CGAAGTTACCTCTGGAGTATGAAAATA	60°C	35
BRACHYURY	GGGTGGCTTCTTCCCTGGAAC	TTGGAGAATTGTTCCGATGAG	60°C	35
CD30	AGCTAGAGCTTGTGGATTCCAG	GTCTTCTTTCCCTTCTCTTCC	58°C	30
cKIT	TCATGGTCGGATCACAAAGA	AGGGGCTGCTTCTCAAAGAG	60°C	30
cMYC	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG	65°C	30
FGFR1	GGGCGGCTCCCCATAC	TGACCTCCTTCAGCAGCTT	60°C	30
FGFR3	GGCCATCGGCATTGACAA	GCATCGTCTTTCAGCATCTTCA	60°C	30
FGFR4	GTGCAGAAGCTCTCCCGCT	TGAGCTTGACTTGCCGGAA	60°C	30
GAPDH	TGGTATCGTGGAAGGACTCATG AC	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	60°C	22
GDF3	AGACTTATGCTACGTAAAGGAGCT	CTTTGATGGCAGACAGGTTAAAGTA	60°C	30
HAND1	ACATCGCCTACCTGATGGAC	CGGCTCACTGGTTAACTCC	60°C	30
HOXB1	CAGAAGGAGACGGAGGCTA	GTGGGGGTGTTAGGTTCTGA	60°C	40
LIN28	TTCGGCTTCTGTCCATGAC	CCACTGCCTCACCCCTCCTT	60°C	30
LIN28B	AGCCCCTTGATATTCCAGTC	AATGTGAATTCCACTGGTTCTCCT	60°C	30
MCFD2	CCCTGTGGCTTTGTAGGGTA	GCAGAAGGGAAATGTGGTGT	60°C	30
NANOG	GATTTGTGGCCTGAAGAAA	AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG	58°C	25
OCT3/4	CGAAAGAGAAAGCGAACCAG	GCCGGT TACAGAACCACACT	60°C	22
PAX6	ACCCATTATCCAGATGTGTTTGCCCGAG	CTGCCGCCATGCCCAGCTTCACCAT	60°C	30
Pri-Let7a/f/d	GCGCGAGGAAACCAGGAT	GCACCACAGGAAGGCTTTTTT	60°C	30
Pri-Let7g	CAGTAAGAAATATGGTGTGGACCTCA	GATGTATTTGTTGTCATGCAAGGAC	60°C	30
PRMT5	TTGCCGGCTACTTTGAGAC	AAGGCAGGAAAGCAGATTGA	60°C	25
SOX17	GAGGGCCAGAAGCAGTGTTA	AGTGATTGTGGGGAGCAAGT	60°C	25
SOX2	ATGCACCGCTACGACGTGA	CTTTTGCACCCCTCCATT	60°C	25
VASA	AGAAAGTAGTGATACTCAAGGACCAA	TGACAGAGATTAGCTTCTTCAAAGT	60°C	30

2.1.10 siRNS-Oligonukleotide

siRNS	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
All stars negative control siRNA	Qiagen	Hilden
Block-IT Fluorescent Control	Invitrogen	Karlsbad
hAP-2 γ -siRNS sc-29696	Santa Cruz	Heidelberg
hBLIMP-1-siRNS sc-37714	Santa Cruz	Heidelberg
hLIN28-siRNS sc-106829	Santa Cruz	Heidelberg
hNANOG-siRNS sc-43958	Santa Cruz	Heidelberg

2.1.11 shRNS-Oligonukleotide

Zielgen	Sequenz 5'-3'		
	Sinnstrang	Schleife	Antisinnstrang
NANOG	CTGGAACAGTCCCTTCTATA	CTCGAG	TATAGAAGGGACTGTTCCAGG
AP-2 γ	GGCAAAGGTTCTATCTGCTTA	TTGATATCCG	TAAGCAGATAGAACCTTTGCC

2.1.12 Oligonukleotide zur Synthese von cDNS

Oligonukleotid	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Oligo-d(T)20-Primer	NEB	Schwalbach

2.1.13 Primäre Antikörper

1. Antikörper	Klon/Code	Firma	Ursprung	WB	IF
5-methyl-Cytidin	ab10805	Abcam	Maus	-	1:200
α -SMA	1A4	Dako	Maus	-	1:200
aktive Caspase-3	ab13847	Abcam	Kaninchen	-	1:200
AFP	A0008	Dako	Kaninchen	1:500	1:200
AP-2 γ	6E4/4	Upstate	Maus	1:600	1:200

BLIMP-1	-	Jaeck	Kaninchen	1:3000	1:200
CK 7	OV-L12/30	Dako	Maus	-	1:200
CK 8	LP3K	R&D Systems	Maus	-	1:200
CK14	LL001	R&D Systems	Maus	-	1:200
CK17	E3	Dako	Maus	-	1:200
CK18	DC10	Dako	Maus	-	1:200
CK19	RCK108	Dako	Maus	-	1:200
CK 20	Ks20.8	Dako	Maus	-	1:200
cKIT	A4502	Dako	Kaninchen	1:1000	1:100
D2-40	M3619	Dako	Maus	1:500	1:200
Desmin	D33	Dako	Maus	-	1:200
E-Cadherin	36/E-Cad.	BD	Maus	-	1:200
H2a/H4R2me2	-	Abcam	Kaninchen	1:500	1:200
MMP-2	MAB13405	Chemicon	Maus	-	1:200
Myogenin	F5D	Dako	Maus	-	1:200
NANOG	N-17	Santa Cruz	Ziege	1:300	1:200
OCT3/4	C-10	Santa Cruz	Maus	1:500	1:200
pAKT1	193H12	Cell Signalling	Kaninchen	1:1000	-
pERK1/2	197G2	Cell Signalling	Kaninchen	1:1000	-
pPLC γ	#2821	Cell Signalling	Kanninchen	1:1000	-
PRMT5	AB3349	Chemicon	Kaninchen	1:500	1:200
pSMAD1/5/8	N-18	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000	-
pSMAD2/3	sc-11769	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000	-
pSMAD7	N-19	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000	-
pSTAT3	79D7	Cell Signalling	Kaninchen	1:1000	-
p- β -Catenin	9565	Cell Signalling	Kaninchen	1:1000	1:200
SOX17	245013	R&D Systems	Maus	1:500	-
SOX2	245610	R&D Systems	Maus	1:500	1:200
tAKT1	#9272	Cell Signalling	Kanninchen	1:1000	-
tERK1/2	#9102	Cell Signalling	Kanninchen	1:1000	-
tPLC- γ	#2822	Cell Signalling	Kanninchen	1:1000	-
Vimentin	GP53	Progen	Maus	-	1:200
β -Actin	AC-15	Sigma Aldrich	Maus	1:10000	-
β -Catenin	6B3	Cell Signalling	Kaninchen	-	1:200
β -hCG	A0231	Dako	Kaninchen	-	1:200

2.1.14 Sekundäre Antikörper

2. Antikörper	Klon/Code	Firma	Ursprung	WB	IF
Alexa-Fluor 488 anti-Maus	A-11001	Invitrogen	Ziege	-	1:400
Alexa-Fluor 568 anti-Maus	A-11037	Invitrogen	Esel	-	1:400
Anti-Maus HRP	61-0120	Invitrogen	Kaninchen	1:1000	-
Anti-Maus Biotin	E0433	Dako	Ziege	-	1:400
Alexa-Fluor 488 anti-Kanin.	A-11008	Invitrogen	Ziege	-	1:400
Alexa-Fluor 568 anti-Kanin.	A-11010	Invitrogen	Ziege	-	1:400
Anti-Kaninchen HRP	65-6120	Invitrogen	Ziege	1:2000	-
Anti-Kaninchen Biotin	E0432	Dako	Ziege	-	1:400
Alexa-Fluor 568 anti-Ziege	A-11057	Invitrogen	Esel	-	1:400
Anti-Ziege HRP	61-1620	Invitrogen	Kaninchen	1:2000	-
Anti-Ziege Biotin	E0466	Dako	Kaninchen	-	1:400

2.1.15 Prokarioten

Prokariot	Genotyp
TOP10F ⁻ <i>E. coli</i> -Stamm	F ['] { <i>lacI</i> q Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galJ galK rpsL endA1 nupG</i>
BMH 71-18 <i>mutS</i> <i>E. coli</i> -Stamm	Thi, supE, Δ(<i>lac-proAB</i>), [<i>mutS</i> ::Tn10][F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15]

2.1.16 Eukaryoten

Eukaryoten	Beschreibung
TCam-2	Humane Keimzelltumorzelllinie aus einem Seminom. Zur Verfügung gestellt von S. Kitazawa
JKT-1	Humane Keimzelltumorzelllinie aus einem Seminom. Zur Verfügung gestellt von K. Kinugawa
NCCIT	Humane embryonale Karzinomzelllinie.

	Zur Verfügung gestellt von S. Gläser
2102EP	Humane embryonale Karzinomzelllinie. Zur Verfügung gestellt von S. Gläser
TERA2	Humane embryonale Karzinomzelllinie. Zur Verfügung gestellt von L.H.J. Looijenga
MEF	murine embryonale Fibroblasten

2.1.17 Mauslinien

Mauslinie	Genotyp
129S2/SvPas	A ^w /A ^w
BL/6	C57BL/6NCrl
CD-1 NUDE	Crl:CD1- <i>Foxn1</i> ^{nu}

2.1.18 Kits

Kit	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
APC Annexin V Kit	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ
BCA Protein Assay Kit	Pierce	Rockford
Click-iT! Edu Proliferation Kit	Invitrogen	Karlsbad
EZ DNA Methylation-Direct Kit	Hiss	Freiburg
pRNATin-H1.2-Neo shRNS Vector Kit	GenScript	Piscataway, NJ
QiaEXII Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
RNAqueous-4PCR Kit	Ambion	Nieuwerkerk
SuperSignal West Substrate	Thermo Scientific	Rockford
TA-Cloning Kit pCR2.1	Invitrogen	Karlsbad

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Kulturen

Eine *Escherichia coli*-Bakterienkultur wurde in 50ml LB-Medium ü/N bei 37°C und 250rpm in einem Bakterenschüttler inkubiert (Vorkultur). 1ml der Vorkultur wurde anschließend 1:100 in LB-Medium verdünnt und noch einmal bis zu einer OD₆₅₀ 0,2 weiter wachsen gelassen (37°C, 250rpm). Nach Abkühlung der Kultur auf Eis und Zentrifugation (5 min, 2500rpm, 4°C) wurde das Pellet in 50ml kalten CaCl₂ (50mM) vorsichtig resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 2500rpm, 4°C). Nun wurde das Bakterienpellet in 10ml kalten CaCl₂ (50mM) + 15% Glycerol resuspendiert und schließlich in 100µl Schritten in Reaktionsgefäßen portioniert. Vor der Lagerung bei -80°C wurden die Aliquots in flüssigen N₂ schockgefrosten.

2.2.1.2 Herstellung von LB-Ampicillin-X-Gal-IPTG-Agarplatten

500ml LB-Agar wurde in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 55°C mit 100µg/ml Ampicillin, 40µl X-Gal (20mg/ml) und 25µl IPTG (100mM) versetzt. Danach wurde der LB-Amp-Xgal-IPTG Agar auf Petrischalen (Ø 9cm) portioniert und zum Gelieren abgekühlt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für maximal 4 Wochen. Die Zugabe von X-Gal und IPTG ermöglichte die Identifikation positiver Bakterienkolonien durch Blau-weiß-Selektion / α-Komplementation. IPTG inhibiert als Galaktopyranosid den lac-Repressor und induziert den lac-Promotor und dadurch die Expression des C-Terminus der β-Galaktosidase. Dieser α-Donor komplementiert die C-Terminal deletierte β-Galaktosidase der *E.coli*-Bakterien. Die so voll funktionsfähige β-Galaktosidase schneidet das Galaktosid X-Gal, dadurch entsteht ein blauer Farbstoff. Da der C-Terminus des α-Donor vor und dessen N-Terminus nach der Klonierungsstelle des Plasmids kodiert ist, führt eine inserierte Fremd-DNS

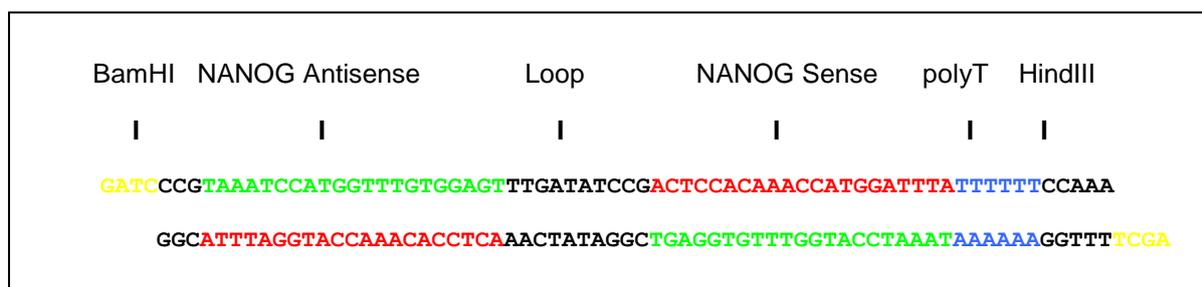
zu einer Verschiebung oder starken Kettenverlängerung des Leserahmens und bewirkt den Abbruch der α -Donor-Expression. Die Kolonien bleiben weiß.

2.2.1.3 TA-Klonierung

Taq-Polymerase hat die Eigenschaft an das 3'-Ende eines PCR-Produkts ein Deoxyadenosin-Molekül anzuhängen. Dies macht sich die Methode der TA-Klonierung zunutze. Das PCR-Fragment lässt sich so einfach in einen Vektor mit Desoxythymidin-Überhängen klonieren. Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert : Vektor) bei 16°C über Nacht.

2.2.1.4 pRNATinH1.3-Neo-shRNS-Klonierung

Um einen shRNS exprimierenden Vektor herzustellen, war es zunächst nötig, das shRNS-Oligonukleotid zu konstruieren. Dabei wurde immer wie im Beispiel des NANOG-shRNS-Entwurfs vorgegangen:



Zunächst wurden zwei komplementäre Oligonukleotide, die die shRNS kodierenden Sequenzen in der Reihenfolge 5'→3' „antisense – loop – sense“ enthalten von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Der Sinnstrang enthielt zusätzlich an seinem 5'-Ende einen BamHI spezifischen Nukleotid-Überhang, während der Antisinnstrang einen HindIII-Überhang besaß. Eine polyT-Sequenz direkt hinter der kodierenden Sequenz fungierte als Stopp-Signal bei späterer Transkription. Die „Loop“-Sequenz stellt eine Faltungstelle dar. Ist die shRNA korrekt transkribiert worden, faltet sich die einzelsträngige RNS an der „Loop“-Sequenz so zusammen, dass die thermodynamisch begünstigten, komplementären „Antisense“- und „Sense“-Sequenzen aneinanderliegen und zu einem Fragment doppelsträngiger RNS

hybridisieren. Dieses doppelsträngige Fragment wurde auch als „short-hairpin“ oder „kurze Haarnadel“ bezeichnet, daher der Name shRNS. Zu Beginn war es nötig, die beiden einzelnen Oligonukleotide zu hybridisieren. Dies erfolgte in einem Reaktionsgefäß, in dem je 1 µg beider Oligonukleotide mit 1 µl 20xSSC und H₂O (Gesamtvolumen: 20 µl) gemischt wurden. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 95°C, an die sich eine einstündige Inkubation bei RT anschloss. Der Expressionsvektor pRNATinH1.2-Neo wurde durch die Restriktionsendonukleasen BamH1 und HindIII linearisiert (siehe Kapitel 2.2.3.4). Das hybridisierte shRNS-Oligonukleotid und der Expressionsvektor wurden nun mit Hilfe von T4 Ligase (400U) in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) bei 14°C über Nacht ligiert. Nun folgte die Transformation kompetenter Bakterien mit anschließender Plasmid-Isolation (siehe Kapitel 2.2.1.6) und Testrestriktionsverdau (siehe Kapitel 2.2.3.4). Die Plasmide wurden zur Verifizierung zusätzlich von der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) durch M13 Primer sequenziert.

2.2.1.5 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Transformation kompetenter Bakterien stellt eine effektive Methode zur Vermehrung von freien DNS-Molekülen (u.a. Plasmide) dar. Die einfachste Methode zur Transformation ist der sogenannte Hitzeschock. Die Bakterienzellen wurden hierbei mit Calciumchlorid behandelt, so dass zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellmembran weniger abstoßende Kräfte bestanden. Bei einem kurzen Hitzeschock (41–43 °C für 45–90 Sekunden) entstehen Poren in der Membran, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann. Es wurden 5 µl eines standardmäßigen 20 µl Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenten *E.coli*-Bakterien in einem Reaktionsgefäß vermischt und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für zwei Minuten mit anschließender einminütiger Inkubation auf Eis. Nun wurden 400 µl 1xLB-Medium zupipettiert und die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. 100 µl der Bakterienkultur wurden auf LB-Ampicillin-Xgal-IPTG-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Isolation von Plasmid-DNS

Pro Isolation wurden 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Die Bakterienkolonie entstammte von einer LB-Amp-Xgal-IPTG Agarplatte. Es wurden nur Ampicillin resistente, weiße Kolonien verwendet. Die Bakterien wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert (3', 13.000 rpm), der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300µl Plasmid-Puffer 1 resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte bei Zugabe von 300µl Plasmid-Puffer 2. 300µl Plasmid-Puffer 3 neutralisierten die Lysereaktion. Nach starkem Schütteln wurde die Suspension zentrifugiert (10', 13.000 rpm) um das ausgefallene SDS zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, es folgten die Präzipitation mit Isopropanol und ein anschließender Waschschrift mit 70%igem Ethanol. Die ausgefällte Plasmid-DNS wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm) pelletiert, luftgetrocknet und in 50µl H₂O aufgenommen.

2.2.2 Nukleinsäureanalytik

2.2.2.1 DNS-Isolation aus Geweben und Zellen

Die Gewebestücke oder Zellpellets wurden über Nacht in 710µl Lyse-Puffer und 40µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) bei 55°C lysiert und am nächsten Morgen wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 300µl 5M NaCl wurden die Proben erneut 5 min geschüttelt und zentrifugiert (10', 13000rpm, 10°C). 750µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 1000µl Isopropanol überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch eine zweistündige Inkubation bei -20°C, daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt an (15', 13000rpm, 4°C). Das Präzipitat wurde zweimal mit 500µl 80%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C für 30 min getrocknet und anschließend in 400µl H₂O aufgenommen. Danach wurde die DNS für eine Stunde bei 50°C gelöst.

2.2.2.2 RNS-Isolation aus Geweben und Zellen mittels Trizol

Das Gewebe oder die Zellpellets wurden in 1000µl Trizol lysiert und bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Proben kräftig geschüttelt und für drei Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15', 10.800rpm, 4°C) wurde ca. 600µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNS erfolgte durch Zugabe von 500µl Isopropanol und einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C. Die präzipitierte RNS wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei RT luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50µl DEPC-Wasser bei 55°C für 10 Minuten resuspendiert.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung Nukleinsäure haltiger Lösungen

Bei der Konzentrationsbestimmung erfolgte die Messung der Absorption mittels Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Das jeweilige Lösungsmittel wurde als Referenz verwendet. Bei aromatischen Aminosäuren als Bestandteil von Proteinen liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda=280\text{nm}$. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260/280nm ergab Auskunft über die Nukleinsäurereinheit der gemessenen Lösung. Optimal ist ein Wert von 1,8 für DNS und 2,0 bei RNS. Die Konzentrationen wurden photometrisch per „NanoDrop“ gemessen.

2.2.2.4 Restriktion mittels Restriktionssendonukleasen

Für den Restriktionsverdau von DNS wurden Typ II Restriktionssendonukleasen verwendet. Für einen analytischen Verdau wurde 1µg DNS mit 2µl 10x Restriktionspuffer und 1,5µl Enzym (10U/µl) versetzt und das Reaktionsvolumen mit ddH₂O auf 20µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C über 20 Minuten. Die Auswertung erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.2.5 DNaseI-Verdau von RNS-Lösungen

Um Kontaminationen von RNS-Lösungen mit genomischer DNS zu eliminieren wurde die DNS mit Hilfe von DNaseI enzymatisch abgebaut. Dazu wurde 1µg RNS mit 1µl DNase-Puffer und 1µl DNaseI versetzt und das Volumen auf 10µl mit RNase freiem Wasser eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT musste die Reaktion durch Zugabe von 1µl 0,25mM EDTA abgestoppt und die DNase durch Hitze inaktiviert (15min, 70°C) werden.

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese stellt eine schnelle und einfach durchzuführende Methode dar, um doppelsträngige DNS-Moleküle in einer Gelmatrix ihrer Größe nach aufzutrennen. Zur Herstellung der Gelmatrix wurde Agarose (Menge variiert je nach erwünschter Porengröße) in 1xTAE-Puffer aufgenommen und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde die flüssige Agarose mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Das DNS-Ladepuffer-Gemisch konnte nun in Taschen definierter Größe geladen werden. Bei Anlegung einer elektrischen Spannung trennen sich die Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach auf. Die Detektion und Dokumentation der Nukleinsäuren wurde unter UV-Licht ($\lambda = 322\text{nm}$) durchgeführt.

2.2.2.7 Elution von DNS aus Agarose-Gelen

Mit Hilfe des „QiaEXII Gel Extraction“-Kits können DNS-Fragmente aus Agarose-Gelen wiedergewonnen werden. Nach Agarose-Gelelektrophorese und Lokalisierung des gewünschten Fragments unter UV-Licht wurde dieses mit einem Skalpell ausgeschnitten. Alle weiteren Schritte wurden nach dem „QiaEX II“-Handbuch durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte hier über eine Silikasäule.

2.2.2.8 Synthese von „copy“-DNS (cDNS)

Durch die reverse Transkription von mRNA in cDNS kann man die einzelsträngige mRNA in doppelsträngige DNS-Moleküle umschreiben. Dabei bedient man sich reverser Transkriptasen aus Viren. Als Startermolekül dient ein Oligonukleotid (Oligo-d(T)), das an die poly(A)-Sequenz der mRNA bindet. Mittels der reversen Transkription (RT) und einer anschließenden Polymerase-Ketten-Reaktion ist man in der Lage, die Transkriptmengen einzelner Gene ins Verhältnis zueinander zu setzen und somit Rückschlüsse über die Regulation von Genen zu ziehen. Mithilfe eines Referenzgens ist es möglich die Transkriptmengen verschiedener Proben zu vergleichen. Die Kombination von cDNS-Synthese und anschließender PCR wird auch als semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet. Für die Synthese von cDNS wurde wie folgt verfahren:

500ng RNA wurde mit 1µl Oligo-d(T) und 1µl dNTPs (10mM) gemischt und das Volumen mit RNase freiem Wasser auf 13µl eingestellt. Anschließend folgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 65°C um eventuelle Sekundärstrukturen der RNS aufzulösen. Nach dem Denaturieren wurde das Nukleinsäuregemisch auf Eis abgekühlt und es folgte die Zugabe von 1µl „SuperScript III“-Reverser Transkriptase, 1µl DTT (0,1M), 1µl RNaseOut und 4µl Reverse Transkriptase-Puffer. Die Synthese der cDNS erfolgte für 1h bei 55°C, an die sich ein 15-minütiger Hitzeinaktivierungsschritt bei 70°C anschloss. Die so gewonnene cDNS konnte nun in einer PCR oder quantitativen RT-PCR benutzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR (aus dem Englischen: „polymerase-chain-reaction“) ist eine feanalytische Technik zur Amplifikation von DNS-Fragmenten. Die PCR-Methode beruht auf der Tatsache, dass sich ausgewählte Startermoleküle (Oligonukleotide, die die Sequenz von Interesse flankieren und als „Primer“ bezeichnet wurden) bei einer bestimmten Temperatur („Annealing“-Temperatur) an homologe Sequenzen binden und sich anschließend in 5`→3`-Richtung durch eine DNA-Polymerase verlängern lassen. Dieser Zyklus kann wiederholt werden, was zu einer Vermehrung (Amplifikation) der Primer flankierten Sequenz führt. Im Verlauf einer PCR wurde die doppelsträngige

Matritzen-DNS bei Temperaturen oberhalb 90°C zu einzelsträngiger DNS denaturiert. Anschließend wurde die Temperatur auf die Hybridisierungstemperatur (Annealing) herabgesetzt und die „Primer“ wurden durch eine thermostabile DNA-Polymerase in 5` → 3` Richtung bei 72°C verlängert. Reaktionsansatz für die Amplifikation Natrium-Bisulfit behandelte Proben:

Zusatz	Menge	Finale Konzentration
Gen. Natrium-Bisulfit behand. DNS	250 ng	5 ng/µl
dNTPS (10mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (10µM)	1 µl	0,2 µM
Primer 2 (10µM)	1 µl	0,2 µM
10x PCR Puffer	5 µl	1x
MgCl ₂ (50mM)	2,5 µl	2,5 mM
Platinum Taq Polymerase (5U/ml)	0,2 µl	0,02U/ml
Destilliertes Wasser	auf 50µl	-

PCR-Protokoll für die Amplifikation Natrium-Bisulfit behandelte Proben

94°C, 2min

94°C, 30“
 54°C, 30“
 72°C, 45“ } 40 Zyklen

Reaktionsansatz für den Nachweis von Transkripten:

Zusatz	Menge	Finale Konzentration
cDNS (50ng/µl)	2 µl	10 ng/µl
dNTPS (10mM)	1 µl	0,2 mM
Primer 1 (10µM)	1 µl	0,2 µM
Primer 2 (10µM)	1 µl	0,2 µM
10x PCR Puffer	5 µl	1x
MgCl ₂ (50mM)	2,5 µl	2,5 mM
Platinum Taq Polymerase (5U/ml)	0,2 µl	0,02U/ml
Destilliertes Wasser	auf 20µl	-

PCR-Protokoll für den Nachweis von Transkripten:

94°C, 2min

94°C, 30"

57-60°C, 30" } 25-35 Zyklen

72°C, 45"

2.2.2.10 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR), auch „Real-Time“-RT-PCR genannt, ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die exakte quantitative Analyse der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst wurden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs wurde anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Technik der quantitativen RT-PCR stellt eine deutlich sensiblere Methode zum Vergleich von Transkriptmengen dar als die semiquantitative RT-PCR. Zum einen können in einer qRT-PCR deutlich geringe Unterschiede in Transkriptmengen detektiert werden, zum anderen können die Transkriptmengen näherungsweise sehr exakt berechnet werden und beruhen nicht auf rein optischen oder graphischen Auswertungen wie nach einer semiquantitativen RT-PCR.

Zur Durchführung einer qRT-PCR wurde hochqualitative RNA (260/280nm = 2.0, 260/230nm =2.0) aus Geweben oder Zellen mit Hilfe des RNAqueous-4 PCR-Kits nach dessen Handbuch isoliert. Die RNS-Proben wurden mit DNaseI verdaut um mögliche DNS-Kontaminationen zu verhindern (siehe Kapitel 2.2.2.5). Die cDNS-Synthese erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben. Die qRT-PCR wurde in einem „7900HT Fast Real-Time PCR System“ durchgeführt. Jede individuelle Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt. Der Ct-Wert wurde ermittelt, wenn die Amplifikationskurve eines Transkripts das Hintergrundfluoreszenzrauschen zum

ersten Mal überstieg. Die quantitativen Transkriptmengen wurden aus den individuellen, gemittelten Ct-Werten relativ zu HPRT ermittelt. Dabei verwendete man folgende Rechnung:

$$\text{mRNS Transkriptmenge} = 2^{(\text{gemittelte Ct HPRT} - \text{gemittelte Ct Transkript } x)}$$

2.2.2.11 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNS

Um DNS-Methylierungsmuster analysieren zu können ist es wichtig, diese DNS-Modifikationen effizient und spezifisch detektieren zu können. Eine Methode stellt die Behandlung von genomischer DNS mit Natrium-Bisulfit und anschließender PCR mit „Primern“, die speziell an die Natrium-Bisulfit behandelte Sequenz angepasst wurden, dar. Bei Säugetieren findet die Methylierung der DNS an CpG-Dinukleotiden statt. Durch Natrium-Bisulfit wurden alle Cytosine innerhalb der genomischen Sequenz, die nicht von einem Guanin gefolgt sind, und alle Cytosine innerhalb eines unmethylierten CpG-Dinukleotides in Uracil konvertiert. Methylierte CpG-Dinukleotide bleiben von dieser Konversion unbetroffen.

Es wurden 500ng genomischer DNS in 20µl H₂O gemischt und nach Anleitung des „EZ DNA Methylation Direct“-Kits konvertiert. Dabei geschah dies in mehreren Schritten. Die Sulfonierung der Cytosine am 6. Kohlenstoffatom kann nur an einzelsträngiger DNS erfolgen, daher wurde die Probe für acht Minuten auf 98°C erhitzt und denaturiert. Es folgte eine 3½-stündige Inkubation bei 64°C. Hier kam es zur hydrolytischen Deaminierung (Abspaltung von NH₄⁺-Ionen) der Cytosin-Sulfonaten zu Uracil-Sulfonaten. Die konvertierte DNS wurde nun über eine Silikasäule aufgereinigt, währenddessen kam es zu einer alkalischen Desulfonierung der Uracil-Sulfonate zu Uracil. Die entsprechenden Cytosine waren nun vollständig zu Uracil konvertiert. In der darauf folgenden PCR-Reaktion wurden die Uracil-Nukleotide durch Thymidin-Nukleotide ersetzt. Unmethylierte CpG-Dinukleotide wurden daher in einer Sequenzierungsreaktion nach Sanger als TpG-Dinukleotide und methylierte CpGs weiterhin als CpGs wiedergegeben.

2.2.2.12 *In vitro*-Methylierung genomischer DNS durch M.SssI

Das Enzym M.SssI ist eine CpG-Methyltransferase die es ermöglicht alle CpG-Dinukleotide innerhalb einer genomischen DNS Sequenz *in vitro* zu methylieren. Gewonnen wird M.SssI aus *E.coli*-Stämmen, die das Methyltransferase-Gen aus dem *Spiroplasma sp.*- Stamm MQ1 tragen. Nach erfolgreicher M.SssI-Behandlung sollten alle CpG-Dinukleotide innerhalb der untersuchten DNS Sequenz methyliert sein und es können so Rückschlüsse über Natrium-Bisulfit-Konversionseffizienzen und über die Richtigkeit der Sequenzierungsreaktion gezogen werden. Durch M.SssI wird eine Reaktion katalysiert, in deren Verlauf eine Methylgruppe auf das 6. Kohlenstoffatom des Cytosins übertragen wurde. S-Adenosylmethionin (SAM) dient hier als Methylgruppendonor.

Zur Herstellung dieser Kontroll-DNS wurden 500ng DNS mit 1µl M.SssI (4U), 160µM SAM, 2µl NEB Puffer 2 und H₂O in 20µl Gesamtvolumen gemischt. Es folgte eine vierstündige Inkubation bei 37°C, der sich eine Hitzeinaktivierung bei 65°C über 15 Minuten anfügte. Die behandelte DNS konnte anschließend für eine Natrium-Bisulfit-Konversion verwendet werden.

2.2.3 Proteinanalytik

2.2.3.1 Proteinisolation aus Gewebe und Zellen

Tiefgefrorenes Gewebe oder pelletierte Zellen wurden in 100µl RIPA-Puffer (100µl/9cm² Wachstumsfläche) lysiert und für 30min bei regelmäßigem Mixen auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000rpm für 20min. Der Überstand, der den Proteinextrakt enthielt, wurde abgenommen und bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Proteinkonzentration wurde mittels des „BCA Protein Assay Kit“ bestimmt, wobei streng nach Herstellerprotokoll verfahren wurde. Nach dem Auslesen der Extinktionswerte der Eichgrade konnte mittels einer Regressionsgleichung die

Konzentration der Proben errechnet werden. Die Konzentration jeder Probe wurde aus einer Duplikatmessung bestimmt.

2.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit deren Hilfe komplexe Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Dabei macht man sich den Effekt zu Nutze, dass negativ geladene Moleküle in einem SDS-Polyacrylamidgel bei angelegter Spannung zur Anode wandern. So erfolgt eine Maskierung der Proteine durch SDS, welches die Moleküle mit unterschiedlich hohen negativen Ladungen versieht. Während der Gelelektrophorese wandern dann hochmolekulargewichtige Proteine aufgrund ihrer Größe langsamer durch das Gel als niedermolekulargewichtige. Die Auftrennung relativ großer Proteine bedarf einer Fokussierung in scharfen Zonen. Dies wurde mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) erreicht. Im großporigen Sammelgel ordnen sich die SDS-Protein-Komplexe zwischen den vorauslaufenden Chloridionen und den Glyzin-Molekülen an. Beim Eintritt in das kleinporige Trenngel wurden die Proteinproben zu einer scharfen Bande gestaucht. Das Glyzin erhält eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Protein-Komplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wurde. Die SDS-Protein-Komplexe trennen sich nun nach ihrer molekularen Masse auf.

Die Gelapparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und anschließend das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol dekantiert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Parallel dazu wurden die Proteinproben (10µg) in 4xLämmli-Probenpuffer denaturiert (10min, 95°C) und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden in das vorbereitete Gel geladen und dann bei 70V elektrophoretisch aufgetrennt. Für diese Arbeit wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die zu verwendenden Trenn- und Sammelgele setzen sich wie folgt zusammen:

Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
4,0ml Wasser	3,4ml Wasser
3,3ml Acrylamid-Lösung (30%)	0,83ml Acrylamid-Lösung (30%)
2,5ml Tris-Puffer (1,5M; pH8,8)	0,63ml Tris-Puffer (1,5M; pH8,8)
0,1ml SDS (10%)	0,05ml SDS (10%)
0,1ml APS (10%)	0,05ml APS (10%)
4,0µl TEMED	4,0µl TEMED

2.2.3.4 Immuno-Blot-Analyse (Western-Blot)

Proteine können nach elektrophoretischer Auftrennung mit der Methode des Elektrotransfers (Towbin et al., 1979) auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membranen übertragen (Western-Blot) und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Transfer wurde mit Hilfe einer Nassblot-Kammer durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer für fünf Minuten in Methanol aktiviert und anschließend für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Nach Waschung des SDS-Polyakrylamid-Gels für 10 min in Transferpuffer wurde es luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt. Auf beiden Seiten wurden jeweils zwei in Transferpuffer getränkte 3MM-Whatmann-Papiere sowie jeweils ein in Transferpuffer getränkter Schwamm platziert. Die Transfereinheit wurde nun so in die Kammer gestellt, dass die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern und durch die hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran binden können. Der Transfer wurde in gekühltem Transferpuffer über Nacht bei 30 V und 4°C durchgeführt. Daraufhin wurde die Membran für 5 min in PBS geschwenkt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran über Nacht bei 4°C in PBSMT geblockt. Die Membran wurde nun bei RT für drei Stunden mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in PBSMT) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Der sekundäre Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde je nach Herstellerangaben (1:1000 oder 1:2000) in PBSMT verdünnt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Abschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBST für jeweils 5 min, bevor eine Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt wurde.

2.2.3.5 Chemolumineszenz-Detektion

Die an die Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Als direktes Reaktionsprodukt entsteht eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das im elektronischen Grundzustand Strahlung abgibt. Diese Strahlung kann mittels Röntgenfilm detektiert werden. Die Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit dem „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ durchgeführt. Dazu wurde die Membran für fünf Minuten in der Reaktionslösung inkubiert und anschließend in eine Fotokassette mit Röntgenfilm gelegt, der nach einer entsprechenden Expositionszeit entwickelt wurde.

2.2.3.6 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran („strippen“)

Nach der Chemolumineszenz-Detektion kann die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden. Dafür wurde die Membran für eine halbe Stunde bei 60°C mit „Stripping“-Puffer gewaschen, um die Reaktionslösung sowie Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Nach der Inkubation mit „Stripping“-Puffer wurde die Membran zweimal für jeweils 10min mit PBST gewaschen und konnte anschließend wie gewohnt mit PBSTM geblockt werden.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Herstellung von murinen embryonalen Fibroblasten konditionierten Mediums

Fibroblasten („Feeder“-Zellen) wurden aus den Rümpfen von 14 Tage alten, murinen Embryonen gewonnen. Die trächtigen Weibchen wurden am entsprechenden Schwangerschaftstag durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus entnommen und in PBS überführt. Die extraembryonalen Gewebe sowie die Organe und die Köpfe der Embryonen wurden entfernt und die Rümpfe in 0,25% Trypsin transferiert. Nach Zerkleinerung des Gewebes wurde es zusätzlich mit einer Pipette noch mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden

die Zellen durch ein Zellsieb vom übrigen Gewebe getrennt und in einem 50ml Blaudeckelröhrchen gesammelt. Es wurde „Feeder“-Medium zugegeben, 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, in „Feeder“-Medium resuspendiert und auf 15 cm-Platten ausplattiert (etwa 1 Platte pro Embryo). Die „Feeder“-Zellen wurden gesplittet, sobald die Zellkulturschale konfluent war. Durch die Behandlung der „Feeder“-Zellen mit Mitomycin C (10 µg/ml) für 2 h im Inkubator bei 37°C wurde deren Proliferation gestoppt. Am folgenden Tag wurden die „Feeder“-Zellen trypsinisiert und erneut auf 15 cm-Platten ausplattiert. Nach Anwachsen der „Feeder“-Zellen erfolgte der Austausch des „Feeder“-Medium gegen RPMI-„Feeder“-Medium. Alle zwei Tage wurde dieses konditionierte Medium gesammelt und durch neues ausgetauscht. Das gesammelte konditionierte Medium wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Trypsinisieren und Vereinzeln von Zellen

Zum Vereinzeln von Zellen auf der Kulturschale wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und anschließend mit Trypsin versetzt sowie für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Trypsin mit der dreifachen Menge an Medium abgestoppt. Ein entsprechender Teil wurde je nach gewünschter Verdünnung in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Nach Trypsinisierung der Zellen wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt. Daraus wurde ein Tropfen in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die dort gezählten Zellen (X) entsprechen einer Zellzahl von $(X \cdot 10^4 / \text{ml}) \cdot 10$. Auf diese Weise konnte die gewünschte Zellzahl berechnet und die Zellen entsprechend ausplattiert oder eingefroren werden.

2.2.4.4 Einfrieren von Zellen

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen trypsinisiert (Trypsin/EDTA, ca. 4 Minuten), vereinzelt, gewaschen (1xPBS) und abzentrifugiert

(800rpm, 5 Minuten). Sie wurden in einem geeigneten Volumen des Einfriermediums aufgenommen und ü.N. bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

2.2.4.5 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

2.2.4.6 Transfektion von Zellen

Die Transfektion humaner Zelllinien ist eine Möglichkeit Fremd-DNS oder RNS-Moleküle in Zellen einzuschleusen. Für den Transport ins Zellinnere wurde die liposomale Transfektion verwendet. Dazu wurde die DNS oder RNS mit kationischen Liposomen gekoppelt. Lipide sind amphiphile Moleküle, bestehend aus mindestens zwei hydrophoben Alkylketten und einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe. Durch die stark unterschiedliche Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln ist es für die Lipide am günstigsten, die polaren Ketten aneinander zu lagern und zwar so, dass die polaren Kopfgruppen vom polaren Lösungsmittel abgeschirmt sind. In flüssigem Milieu bilden die Lipide sogenannte Liposomen aus, die eine bestimmte, kugelförmige Anordnung von oberflächenaktiven Molekülen in einer Flüssigkeit aufweisen. Negativ geladene DNS/RNS-Fragmente können so mit den kationischen Lipidvesikeln komplexieren. Aufgrund der Ähnlichkeit der Lipidvesikel zu Lipiddoppelschichten von Zellmembranen wird ein Verschmelzen mit dieser und dadurch die Aufnahme in die Zelle begünstigt. Als Transfektionsreagenz wurde FuGeneHD verwendet und die siRNS wurde in einem Verhältnis von 5:1 (μl FuGeneHD : μg siRNA) transfiziert, während shRNS exprimierende Vektoren in einem Verhältnis von 5:2 transfiziert wurden. Die Komplexbildung wurde in einem Reaktionsansatz von $100\mu\text{l}$ mit RPMI Medium ohne Zusätze bei RT für 20 min durchgeführt. Anschließend wurden $100\mu\text{l}$ des FuGeneHD-DNS/RNS Komplexes langsam zu 2×10^5 Zellen in 6-Kammer-Zellkulturschalen pipettiert. Bei transienten Transfektionen wurden die Zellen für 48h

bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend zur Analyse die RNS und Proteine isoliert.

2.2.4.7 Generierung shRNS exprimierender Zelllinien

Das Plasmid pRNATinH1.2-Neo wurde als shRNS-Expressionsvektor verwendet. Die Expression des shRNS-Fragmentes unterliegt hier der Kontrolle des Histon1-Promotors. Eine Neomycin-Resistenz-Kassette ermöglicht die Selektion von Zellen mit stabil im Genom integriertem Plasmid. Nach Transfektion des shRNS-pRNATinH1.2-Neo-Konstruktes durch FuGeneHD wurden die Zellen für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde durch ein Selektionsmedium ausgetauscht und dieses alle zwei Tage durch ein frisches ersetzt. Nach Einsatz des „massiven Zelltods“ und Wachstums stabiler Zellklone wurden diese vorsichtig antrypsinisiert und unter dem Mikroskop beobachtet. Bei Abrundung der Zelle, aber vor Verlust des Zellkontakts zur Oberfläche, wurden die Klone mit Hilfe einer Pipette in eine neue Zellkulturschale überführt. Dort wurden die Zellen bis zur Konfluenz in einem Selektionsmedium kultiviert und abschließend auf RNS- und Proteinebene durch RT-PCR- und Western Blot-Analysen die „knock-down“-Effizienzen bestimmt.

2.2.4.8 Bestimmung zellulärer Proliferationsraten

Die Proliferationsraten wurden mittels „Click-iT! Edu Proliferation Kit“ ermittelt. Dazu plattierte man 1×10^4 Zellen auf 24-Kammer-Zellkulturschalen aus. Die Zellen wurden für 45 min mit 100µM EdU inkubiert und die weitere Bearbeitung erfolgte streng nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Auswertung wurden Edu-positive und DAPI-angefärbte Zellkerne in jeweils drei Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop ausgezählt. Diese Werte dienen zur Errechnung der prozentualen Proliferationsraten. Jeder Analysezeitpunkt wurde in Triplikaten untersucht und ausgezählt.

2.2.4.9 Bestimmung der zellulärer Apoptoseraten

Die Analyse der Zellapoptoseraten erfolgte über APC AnnexinV-Messung am FACS. Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser

Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis der Apoptose. Annexin V ist ein 35-36 kD großes Protein, das PS Ca^{2+} abhängig binden kann. Durch Annexin V, an das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin V auch an nekrotischen Zellen binden kann, wurde gleichzeitig eine Färbung mit Propidiumjodid oder 7-Aminoactinomycin (7-AAD) durchgeführt. Diese Farbstoffe können nicht in vitale Zellen eindringen. So war es möglich, lebende (Annexin V- / 7-AAD-) von früh- (Annexin V+/7-AAD -) und spätapoptotischen (Annexin V + / 7-AAD +) Zellen zu unterscheiden. Die Zellen können sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im Durchflusszytometer untersucht werden. Zur Analyse wurden 1×10^4 Zellen auf 6-Kammer-Zellkulturschalen ausplattiert und über den Analysezeitraum standardmäßig kultiviert. Die Apoptosebestimmung erfolgte in Triplikaten.

2.2.4.10 5'-aza-2-Deoxycytidin (5-aza)-Behandlung von Zellen

5-aza-Behandlung von Zellen führt zu DNS-Demethylierung oder Hemi-Demethylierung. 5-aza wurde in die DNS teilender Zellen inkorporiert, wo sie als Inhibitoren der DNS-Methyltransferasen agieren. Die DNS-Cytosin-C5-Methyltransferasen wurden inaktiviert, indem sie mit inkorporiertem 5-aza stabile Komplexe bilden. Hiermit wurde eine Re-Methylierung von CpG-Dinukleotiden nach der Zellteilung verhindert. Dadurch wurde es Transkriptionsfaktoren ermöglicht, an zuvor epigenetisch reprimierte Promotorelemente zu binden, den Transkriptionskomplex aufzubauen und die Genexpression zu initiieren. 5-aza wurde für jedes Experiment neu in DMSO gelöst und im Standardkulturmedium in einer finalen Konzentration von $20 \mu\text{M}$ zu den Zellen gegeben. Nach festgelegten Zeitpunkten wurden DNS/RNS und Proteine isoliert und die Auswirkungen auf die Zelle mit molekularbiologischen Methoden untersucht.

2.2.4.11 Luziferase-Reporter-Experimente in humanen Keimzelltumorzelllinien

Das Plasmid pGL3basic wurde als Ausgangsvektor für Luziferase-Reporterexperimente verwendet. Stromaufwärts vor das Luziferase-Gen kann das zu untersuchende Promotorelement kloniert werden, um die Luziferase-Expression zu regulieren. Die Reporterkonstrukte wurden in TCam-2 Zellen durch das Transfektionsreagenz FuGeneHD (Roche) in einem Verhältnis von 5:2 (μl FuGeneHD : μg Plasmid-DNS) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen (1xPBS) und in 100 μl 1x „Luziferase-Assay“-Lysispuffer lysiert. Nach einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt (14.000rpm) wurden 10 μl des Überstandes je Probe in 96-Lochplatten überführt. Die Messung der relativen Luziferase-Aktivität erfolgte luminometrisch in Triplikaten eine Sekunde nach Injektion des „Luziferase-Assay“-Puffers (Luminometer).

2.2.4.12 Injektion von Zellen in die Flanke von Nacktmäusen

Es wurden pro Maus 1×10^7 Zellen injiziert. Dafür wurden die zuvor unter Standardbedingungen kultivierten Zellen zunächst fünf Minuten trypsinisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der dreifachen Menge an Standardwachstumsmedium abgestoppt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen bestimmt. Die gewünschte Zellmenge wurde abgenommen, für 5 min bei 2000rpm zentrifugiert und im gekühlten (4°C) „Matrigel“ aufgenommen (1×10^7 Zellen / 200ml „Matrigel“). „Matrigel“ ist der Produktname einer gelatinösen Proteinmischung, die von murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom-zellen sekretiert wird. Durch Verwendung von „Matrigel“ können komplexe extrazelluläre Umgebungen imitiert werden. So eingebettete Zellen finden eine Basalmembran-Matrix vor, die ihr Wachstum begünstigt. Mit Hilfe einer Spritze (1ml) mit Kanüle (BD Microlance; 27G 3/4" - Nr. 20; 0,4 x 19mm; REF 302200) wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Spritze wurde bis zur Injektion auf Eis gelagert und die Zellen wurden langsam in die Flanke von Nacktmäusen injiziert.

2.2.4.13 Injektion von Zellen in die Tubuli seminiferi von Nacktmäusen

Pro Hoden wurden 1×10^5 Zellen injiziert. Dafür wurden die zuvor unter Standardbedingungen kultivierten Zellen zunächst für fünf Minuten trypsinisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der dreifachen Menge an Standardwachstumsmedium abgestoppt und die Zellzahl durch Auszählen bestimmt. Die gewünschte Zellmenge wurde abgenommen, für fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und wieder im Standardwachstumsmedium mit 0,05% Trypan-Blau resuspendiert (1×10^5 Zellen / 10 μ l). Bis zur Injektion wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Nacktmäuse wurden zwei Wochen vor dem Injektionstag mit Busulfan behandelt. Dieses wurde intraperitoneal in die Mäuse injiziert (40mg/kg). Die Busulfan-Behandlung führt zum Absterben sämtlicher Keimzellen. Unbetroffen bleiben Sertoli-Zellen. Eine erfolgreiche Busulfan-Behandlung kann durch Messungen der Hodengröße nachvollzogen werden, die im Verlauf der Behandlung deutlich abnimmt. Zum Injektionszeitpunkt wurden die Nacktmäuse durch eine Ketamin-Xylazin-Mischung narkotisiert. Die Injektion des Narkotikums erfolgte ventral, rechts der vertikalen Körperachse in Höhe der Hoden. Anschließend wurde das Ausgangsgesamtgewicht der Mäuse bestimmt. Nun wurde der linke Hoden freipräpariert, während der rechte Hoden in der Bauchhöhle der Maus verblieb. Die Größe des Hodens wurde mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt. Der Ductus efferens wurde frei von Fettgewebe präpariert und mit Hilfe eines Zellstoffstücks unterlegt und stabilisiert. Die vorbereiteten Zellen wurden in die Injektionsnadel pipettiert und anschließend wurde diese in der Halterung der Injektionsmaschine (FemtoJet, Eppendorf, ORT, Deutschland) fixiert. Im Winkel von 0° wurde die Injektionsnadel in den Ductus efferens eingeführt. Die Zellsuspension wurde mit einem Druck von 100-400 hPa eingedrückt. Eine erfolgreiche Injektion kann durch eine Verteilung der blau gefärbten Zellen in den Tubuli seminiferi nachvollzogen werden. Zum Schluss erfolgte die Rücklegung des linken Hodens in das Becken der Maus und die Injektionsstelle wurde mit einem resorbierbaren Faden und drei Stichen zugenäht.

2.2.5 Histologische Analytik

2.2.5.1 Fixierung von Geweben und Zellen

Die Gewebe wurden für 2 h bei 4°C in 4%-Paraformaldehyd inkubiert und anschließend dreimal für 10 min bei RT gewaschen. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei RT in 4%igem Paraformaldehyd inkubiert.

2.2.5.2 Permeabilisierung von Zellen

Die fixierten Zellen wurden mittels 0,2% TritonX-100 in PBS für fünf Minuten permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS bei RT gewaschen.

2.2.5.3 Einbetten

Nach der Fixierung wurden die Präparate zugeschnitten, in Einbettkassetten überführt und erneut 1 h bei 4°C fixiert. Danach wurden die Präparate unter fließendem Wasser ausgiebig gewässert und in die Einbettmaschine gelegt. Dort durchliefen sie zuerst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h 35 min; 80%, 96%, 2x100%, jeweils 1 h), wurden anschließend in Xylol (1 h, 2x 30 min) und schließlich in Paraffin überführt (3x 1h) und schließlich in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Präparate aus den Einbettkassetten genommen und in Paraffinblöcke gegossen, welche bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden.

2.2.5.4 Herstellung von Paraffin-Schnitten

Die Paraffinblöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte von 1-3 µm Dicke wurden angefertigt. Diese wurden bei 45°C im Wasserbad geglättet, auf Objektträger aufgezogen und bei 50°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz auf Paraffin-Schnitten

Die Schnitte wurden zuerst in Xylol (2x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min) und in Wasser überführt. Anschließend folgte die Antigendemaskierung in Citrat-Puffer in der Mikrowelle (5x 5min bei 500 W). Nun wurden die Schnitte 15 min mit Pferde-Serum bei RT geblockt und der Primärantikörper zugegeben (in 1:200 in PBSMT) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe für 5 min bei RT in PBS. Nun wurden die Schnitte mit dem HRP gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT (1:500 in PBSMT) inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Auftropfen des chromogenen AEC Substrates, welches nach Oxidation ein rotes Endprodukt am Lokus des Zielantigens liefert.

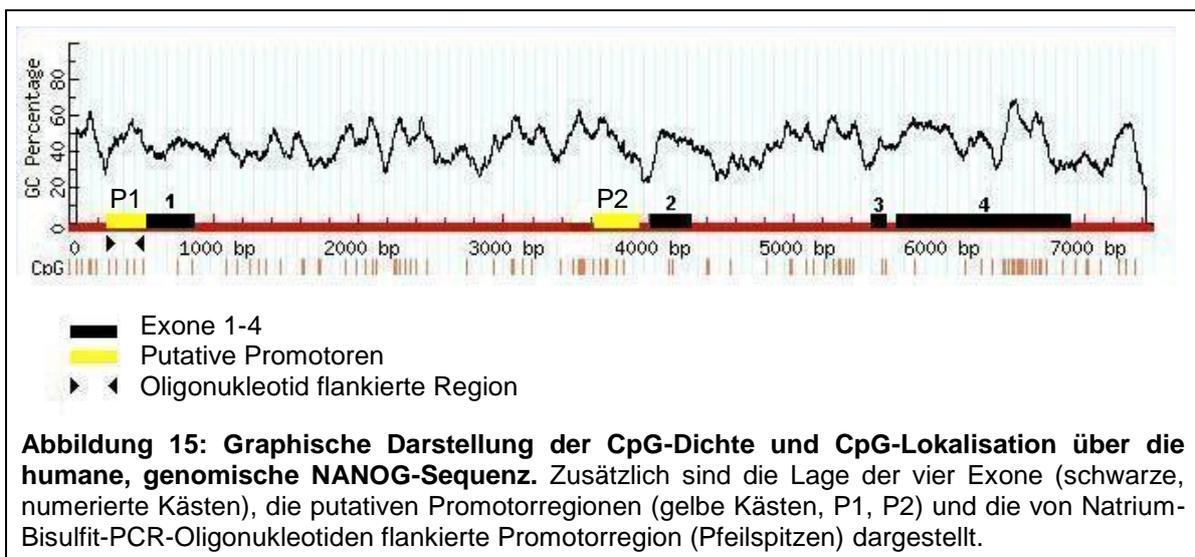
2.2.5.6 Immunfluoreszenz auf Zellen

Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese für 1h bei RT in 1,5% BSA/1xPBS inkubiert. Dadurch sollen unspezifische Bindestellen besetzt und geblockt werden. Es folgte eine dreistündige Inkubation mit dem Primärantikörper in 1,5% BSA/1xPBS. Nach drei Waschschriffen in 1xPBS wurden die Zellen für eine Stunde mit dem fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach erneuten drei Waschschriffen wurden die Zellen mit einer 1xHoechst/1xPBS-Lösung überschichtet (5 Min) um die Zellkerne anzufärben. Nach drei Waschschriffen erfolgte die Auswertung und Bildverarbeitung am Fluoreszenzmikroskop.

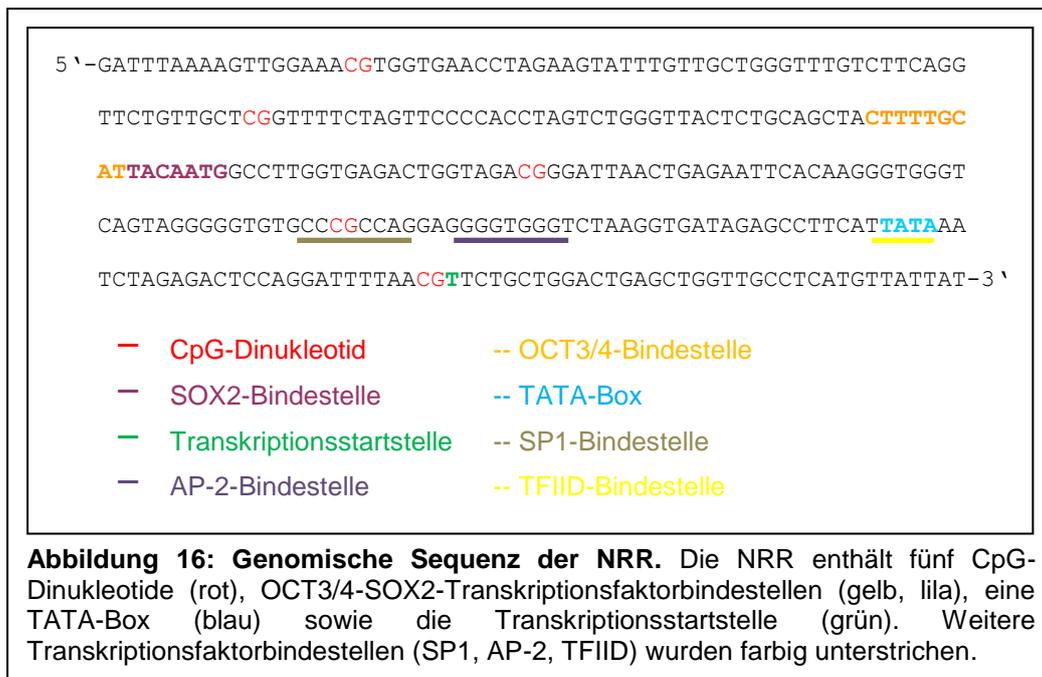
3. Ergebnisse

3.1.1 Sequenzanalyse des humanen genomischen NANOG-Lokus

Zunächst wurde eine Sequenz-Analyse des humanen NANOG-Lokus durchgeführt. Es sollte eine Region identifiziert werden, die im Rahmen von Luziferase-Experimenten verwendet werden kann sowie Ziel einer späteren DNS-Methylierungsuntersuchung werden sollte. CpG-Inseln sowie CpG-Dinukleotide in Promotorbereichen sind Ziel von DNS-Methylierungsprozessen, die zu einer epigenetischen Inaktivierung der jeweiligen Gene führen können. Bei einer Untersuchung der CpG-Dichte über die 8909bp große NANOG-Sequenz auf Chromosom 12p.13.31 durch das Programm „CpG-island searcher“ (<http://cpgislands.usc.edu/>) wurde eine CpG-Insel als eine 0,5-2kb große Region mit einer CpG-Dinukleotiddichte von über 60% definiert. Da keine CpG-Insel gefunden werden konnte, wurde sich auf die Identifizierung eines Promotors konzentriert, dessen Aktivität ebenfalls epigenetisch reguliert werden könnte. Durch das Internetprogramm „PromotorScan1.7“ (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) wurden zwei putative Promotorregionen identifiziert. Eine 306bp große Region direkt stromaufwärts von Exon1 (P1) (Abb.15, P1) und eine weitere 275bp große Region direkt vor Exon 2 (P2) (Abb. 15, P2).



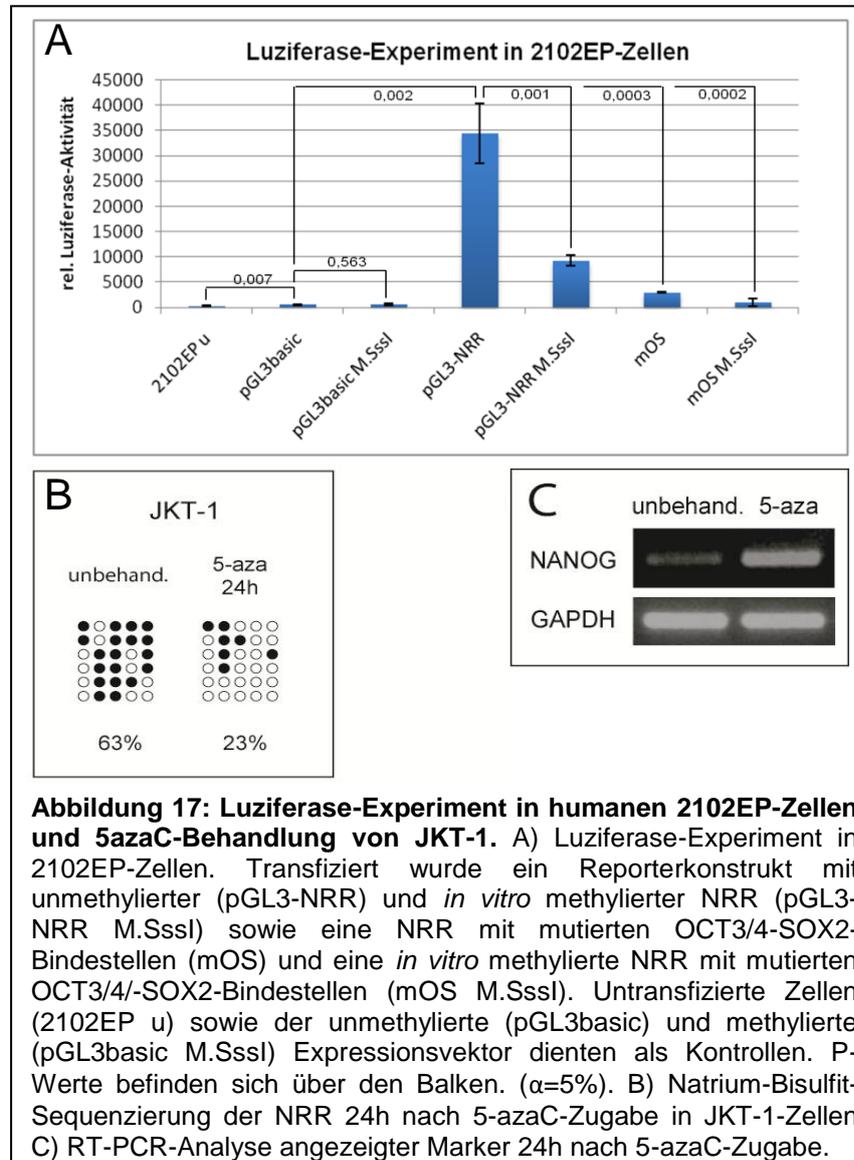
P1 verfügt über eine putative Transkriptionsstartseite sowie eine TATA-Box und Bindestellen für die Transaktivatoren OCT3/4 und SOX2 (Rodda et al., 2005) (Abb. 16). Laut PromotorScan-Software sind ebenso Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1, AP-2 und TFIID vorhanden. P2 stellt, aufgrund der Lage vor Exon 2 und fehlenden OCT3/4-SOX2-Bindestellen mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Promotor dar. Daher wurde sich in weiteren Analysen auf die erste Promotorregion konzentriert. Diese wird im Folgenden als „NANOG Regulatorische Region“ bezeichnet und „NRR“ abgekürzt. Diese Region war bereits Bestandteil von DNS-Methylierungsuntersuchungen und Luziferase-Experimenten im humanen und murinen System (Freberg et al., 2007; Rodda et al., 2005). Sie enthält fünf CpG-Dinukleotide, die methyliert werden könnten und so die NANOG-Expression inhibieren könnten (Abb. 16).



3.1.2 Regulation der humanen NANOG-Expression

Um die Regulationsmechanismen der humanen NANOG-Expression zu untersuchen wurde die NRR 5' vor ein Luziferase-Gen kloniert und in die embryonale Karzinom-Zelllinie 2102EP transfiziert (Abb. 17A). Diese Zelllinie exprimiert sowohl SOX2 und OCT3/4 als auch NANOG. Das NRR-Reporterkonstrukt war in der Lage die Luziferase-Expression 48 Stunden nach Transfektion zu induzieren (Abb. 17A, pGL3-NRR). Durch *in vitro*-Methylierung der NRR wurde die Luziferase-Aktivität hingegen

signifikant um 77% vermindert (Abb. 17A, pGL3-NRR M.Sssl). Diese Daten zeigen, dass die NRR in der Lage war die Luziferase-Expression zu steuern und dass eine Methylierung der fünf CpG-Dinukleotide innerhalb der NRR die Promotoraktivität unterbinden kann. Die Transfektion eines NRR-Reporterkonstrukts mit mutierten

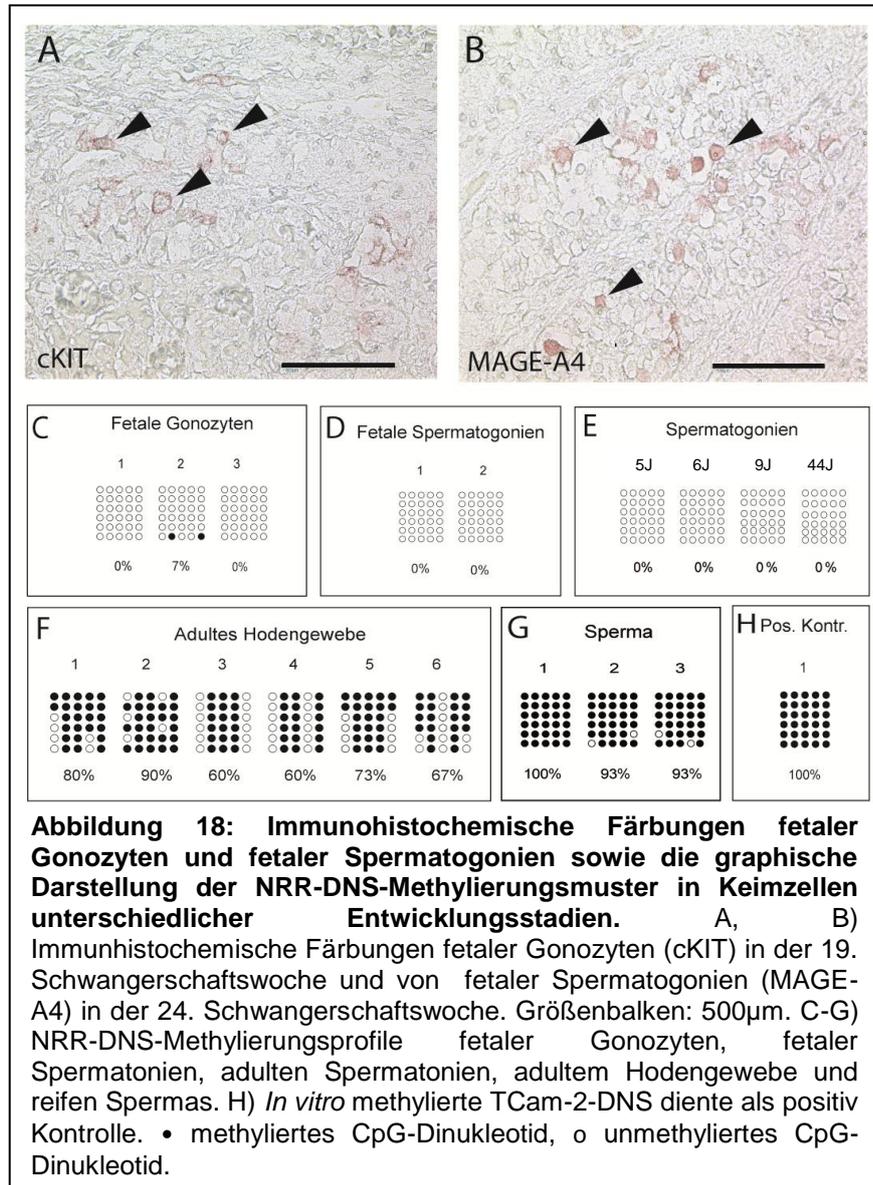


OCT3/4-SOX2-Bindestellen führte zu einer Reduktion der Luziferase-Aktivität um 91% (Abb. 17A, mOS). Ein NRR-Reporterkonstrukt mit mutierten OCT3/4-SOX2-Bindestellen und methylierter NRR reduzierte die Luziferase-Expression sogar um 97% (Abb. 17A, mOS M.Sssl). Um zusätzlich die Korrelation zwischen NRR-DNS-Methylierung und der NANOG-Expression experimentell zu bestätigen, wurde die Keimzelltumorzelllinie JKT-1 mit dem demethylierenden Agens 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azaC) behandelt (Ghoshal et al., 2005). Die NRR lag in JKT-1-

Zellen hypermethyliert vor und nur sehr geringe Mengen des NANOG-Transkripts konnten durch RT-PCR nachgewiesen werden. Nach der 5-aza Behandlung war die NRR demethyliert (Abb. 17B, 63% → 23%) und die NANOG-Expression wurde induziert (Abb. 17C). Diese Experimente zeigen, dass die NRR-Promotoraktivität sowohl durch OCT3/4-SOX2-Transaktivierung als auch durch DNS-Methylierung der fünf NRR-CpG-Dinukleotide beeinflusst werden kann.

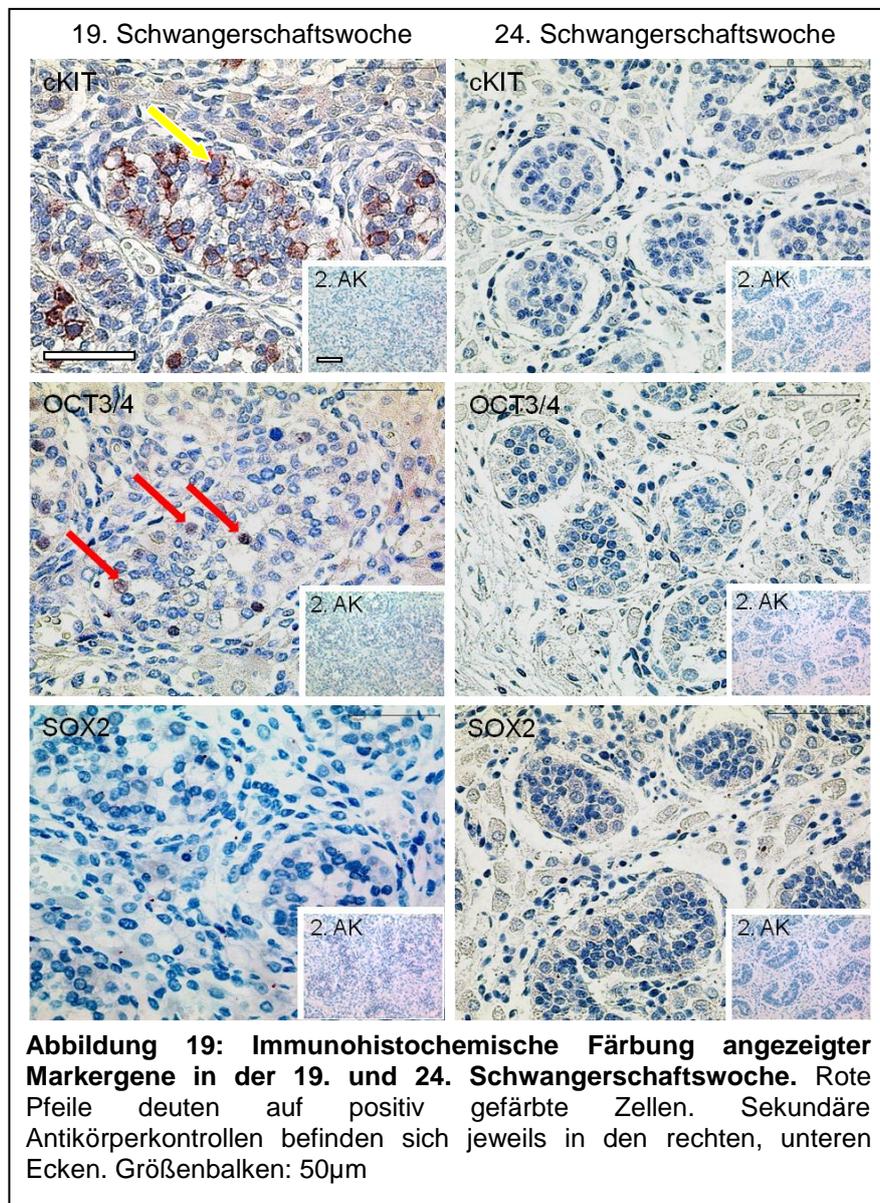
3.1.3 Regulation der NANOG-Expression während der humanen Keimzellentwicklung

Nun sollte untersucht werden, ob die NANOG-Expression mit den NRR-Methylierungsstatus korrelierte. Eine NANOG-Expression kann in frühen Gonozyten detektiert werden. Diese wird aber während der Reifung zu fetalen Spermatogonien herunter reguliert (Hoei-Hansen et al., 2005). In gesundem, postnatalem Hoden kann NANOG ebenfalls nicht detektiert werden (Hart et al., 2005). Um eine Korrelation zwischen der NRR-DNS-Methylierung und der NANOG-Expression während der frühen Keimzellentwicklung zu untersuchen, wurden männliche Gonaden der 19. und 24. Schwangerschaftswoche untersucht. Innerhalb dieses Zeitraums ist die Transition fetaler Keimzellen zu fetalen Spermatogonien abgeschlossen (Pauls et al., 2006). Durch immunohistochemische Färbungen wurden fetale Keimzellen (cKIT+) und fetale Spermatogonien (MAGE-A4+) identifiziert (Pauls et al., 2006) (Abb. 18 A, B), mittels Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten und die DNS isoliert. Zusätzlich wurde DNS aus Spermatogonien 5, 6, 9 und 44 Jahre alter, gesunder Patienten sowie aus reifen Spermien und adultem, gesundem Hodengewebe isoliert. Alle Proben wurden verwendet um das NRR-DNS-Methylierungsmuster mittels Natrium-Bisulfit-Sequenzierung zu untersuchen (Hayatsu et al., 2008). Die NRR lag in fetalen Gonozyten sowie in fetalen und adulten Spermatogonien hypomethyliert vor (Abb. 18 C, D, E). In adultem Hodengewebe und in humanen Spermien lag die NRR dagegen hypermethyliert vor (Abb. 18 F, G). Als Kontrolle diente *in vitro* methylierte TCam-2-DNS (Abb. 18H). Eine vollständig methylierte NRR deutete auf eine erfolgreiche Natrium-Bisulfit-Konversion und eine korrekte Sequenzierungsreaktion hin. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die NANOG-Expression mit den NRR-DNS-Methylierungsstatus fetaler Gonozyten, adulten Hodengewebes und reifen Spermien korrelierte. In fetalen und adulten Spermatogonien war dies nicht der Fall.



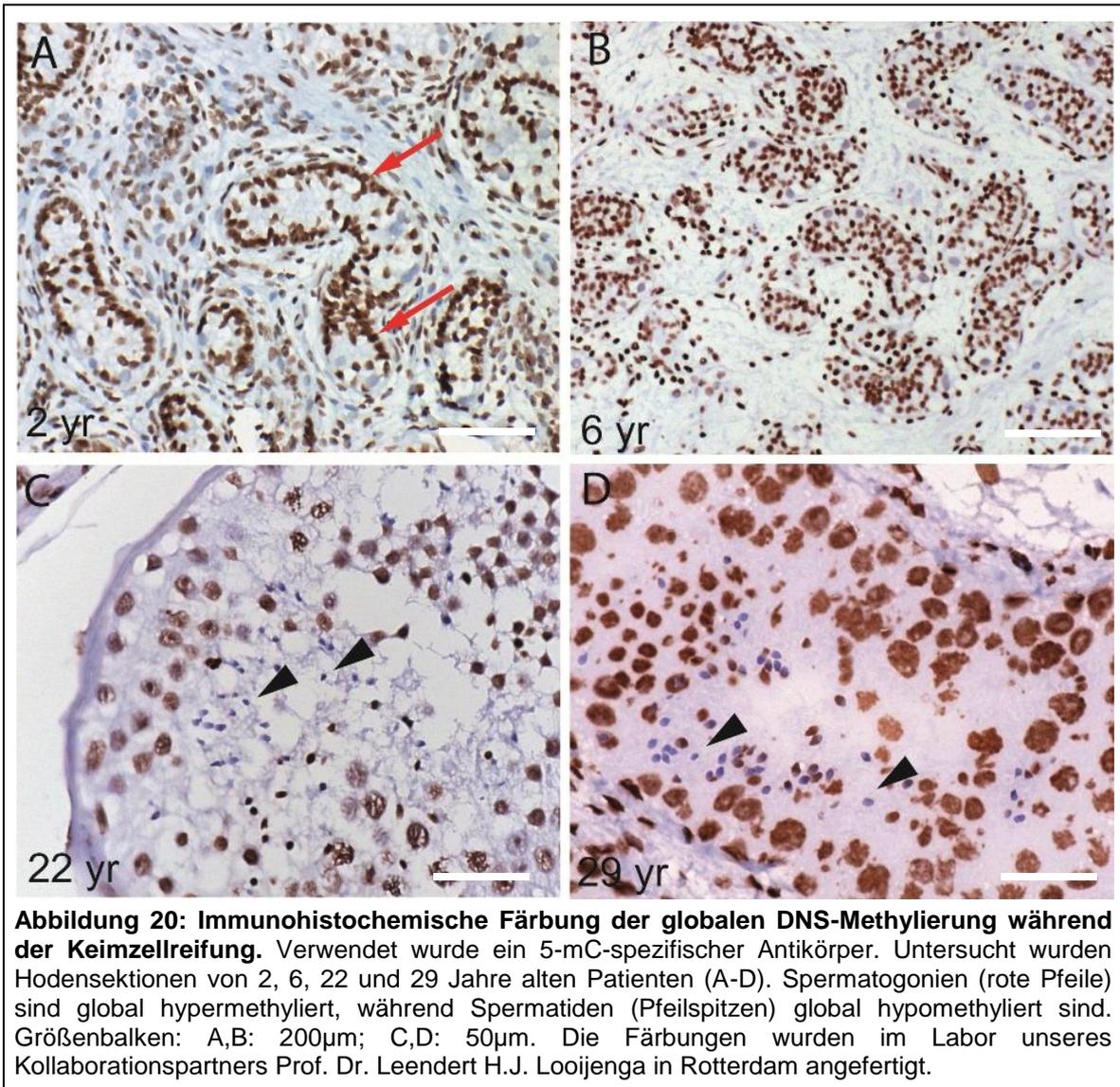
Trotz NRR-Hypomethylierung kann in diesen Zellen keine NANOG-Expression detektiert werden. Daher wurde die Expression der Transaktivatoren OCT3/4 und SOX2 in Spermatozoen untersucht. Dazu wurden Hodensektionen aus der 19. und 24. Schwangerschaftswoche immunohistochemisch angefärbt (Abb. 19). Zusätzlich wurde das cKIT-Protein nachgewiesen, um eine abgeschlossene Transition fetaler Gonozyten in fetale Spermatozoen nachzuweisen (Abb. 19, gelber Pfeil). In der 19. Schwangerschaftswoche konnte in fetalen Keimzellen die Expression von OCT3/4, aber nicht von SOX2 nachgewiesen werden (Abb. 19, rote Pfeile). Nach der Transition zu fetalen Spermatozoen konnte weder OCT3/4- noch SOX2-Expression detektiert werden. Somit ist die fehlende NANOG-Expression in Spermatozoen auf fehlende OCT3/4-SOX2-Expression zurückzuführen. Eine epigenetische Repression

der NANOG-Expression scheint erst nach dem Entwicklungsstadium der Spermato gonien während der Spermatogenese etabliert zu werden.



3.1.4 Immunohistochemische Untersuchung der globalen DNS-Methylierung während der Keimzellreifung

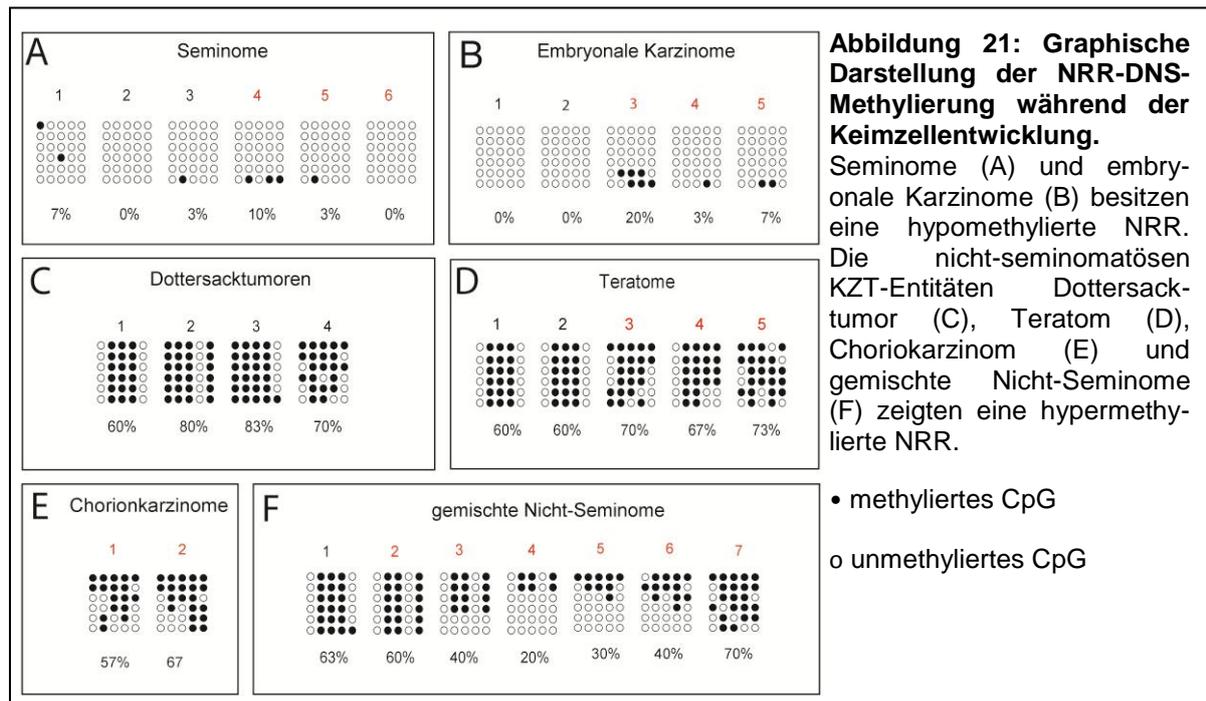
In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob die NRR-DNS-Methylierungsprofile der Keimzellen mit den globalen DNS-Methylierungsstatus korrelierten. Dazu wurden die Hodensektionen von 2, 6, 22 und 29 Jahre alten Patienten durch Immunohistochemie untersucht (Abb. 20 A, B, C, D).



Die DNS der Spermatozoen war in allen Altersklassen global hypermethyliert, (Abb. 20A, rote Pfeile). Die DNS der Spermatozoen lag global hypomethyliert vor (Abb. 20C, D, schwarze Pfeilspitzen). Die einzelnen Entwicklungsschritte der Spermatogenese können von der Basalmembran ausgehend lumenwärts nachvollzogen werden. Die globale DNS-Methylierung scheint daher mit fortschreitender Spermatogenese abzunehmen. Somit stehen die globalen DNS-Methylierungen der jeweiligen Keimzellen im Gegensatz zu den NRR-DNS-Methylierungen. Dies ist ein Hinweis, dass die NRR-Methylierung unabhängig von der globalen DNS-Methylierung reguliert wird.

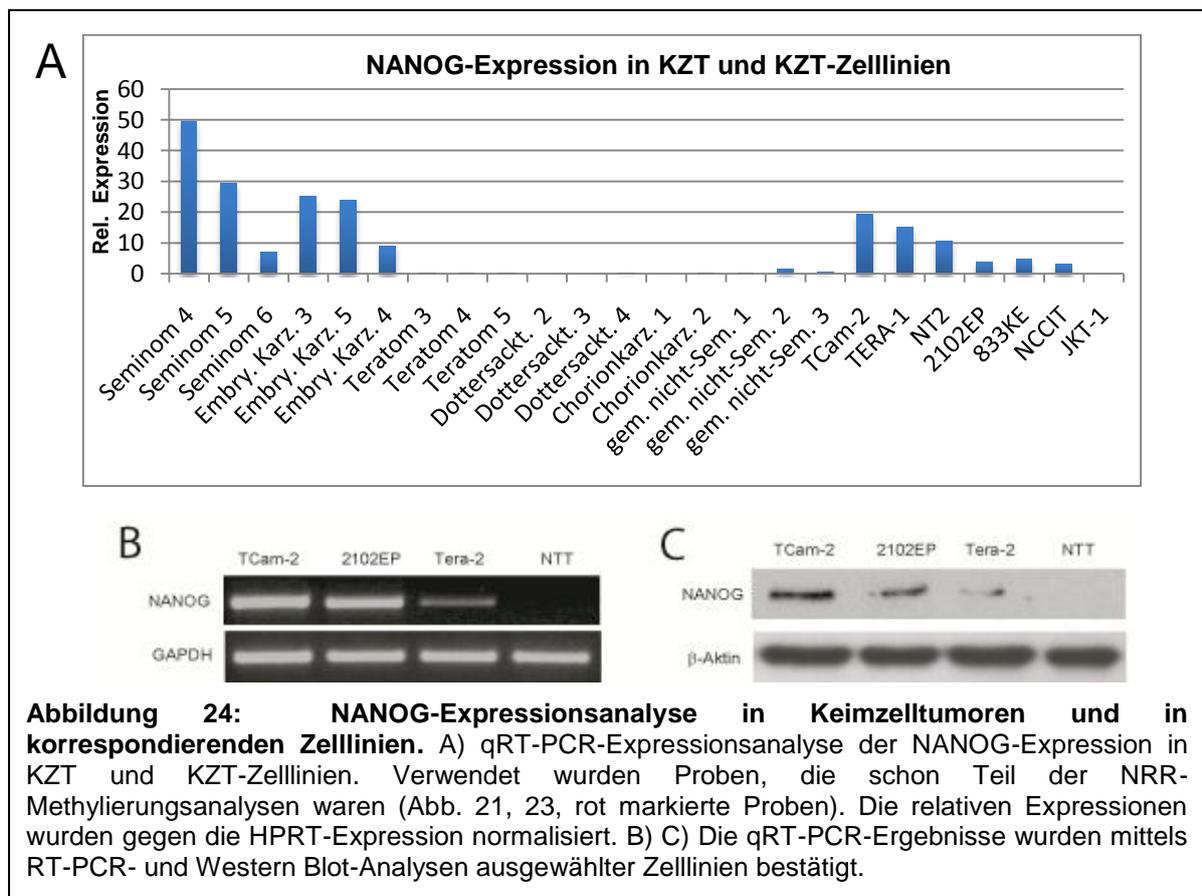
3.1.5 Die Regulation der NANOG-Expression in humanen Keimzelltumoren (KZT) und korrespondierenden Zelllinien

Eine NANOG-Expression kann in CIS, klassischen Seminomen und embryonalen Karzinomen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu verfügen die differenzierten KZT-Entitäten (Dottersacktumor, Chorionkarzinom und Teratom) über keine detektierbare NANOG-Expression (Hart et al., 2005). Um eine mögliche Korrelation



zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorentität und der DNS-Methylierung aufzuzeigen, wurde die NRR in verschiedenen Keimzelltumoren durch Natrium-Bisulfit-Sequenzierung analysiert (Abb. 21). Seminome und EKs, zwei undifferenzierte KZT-Entitäten, zeigten eine starke NRR-Hypomethylierung (Abb. 21 A, B). Teratome, Dottersacktumoren und Chorionkarzinome, drei stark differenzierte KZT-Entitäten, besaßen auch eine stark hypermethylierte NRR (Abb. 21 C, D, E). Gemischte Nicht-Seminome, die sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Tumorelemente enthalten, wiesen eine mäßige NRR-Methylierung auf (Abb. 21 F). Um die NRR-DNS-Methylierungsstatus aus der Analyse der Keimzellen mit den Daten der KZTs vergleichen zu können, wurden die gemittelten Methylierungsgrade errechnet (Abb. 22). Diese Daten zeigen, dass der Differenzierungsgrad mit der NRR-Methylierungshöhe in KZTs korreliert. Eine Untersuchung der NRR-

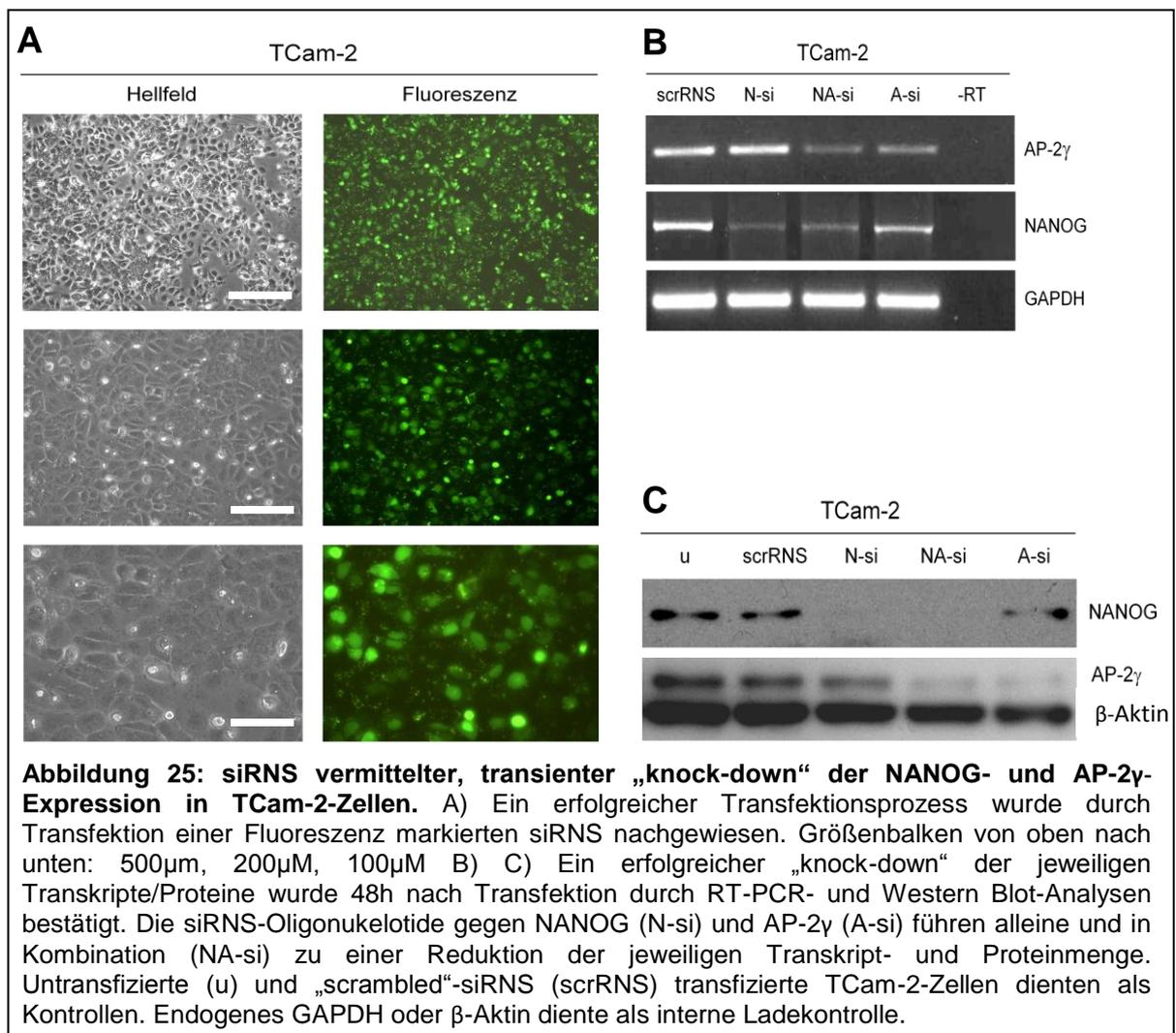
Um zu untersuchen, ob die NANOG-Expression mit der NRR-DNS-Methylierung korrelierte, wurde eine qRT-PCR-Analyse in KZTs und korrespondierenden Zelllinien durchgeführt (Abb. 24A). Es konnte eine hohe NANOG-Expression in Seminomen und EKs nachgewiesen werden, während Teratome, Dottersacktumoren, Chorionkarzinome und gemischte Nicht-Seminome keine NANOG-Expression zeigten. Auch in KZT-Zelllinien mit hypomethylierter NRR (TCam-2, 2102EP, TERA1, TERA2, NT2) war NANOG nachweisbar. Die Zelllinie JKT-1 mit hypermethylierter NRR zeigte keine NANOG-Expression. Zwei Zelllinien EC-Ursprungs, NCCIT und



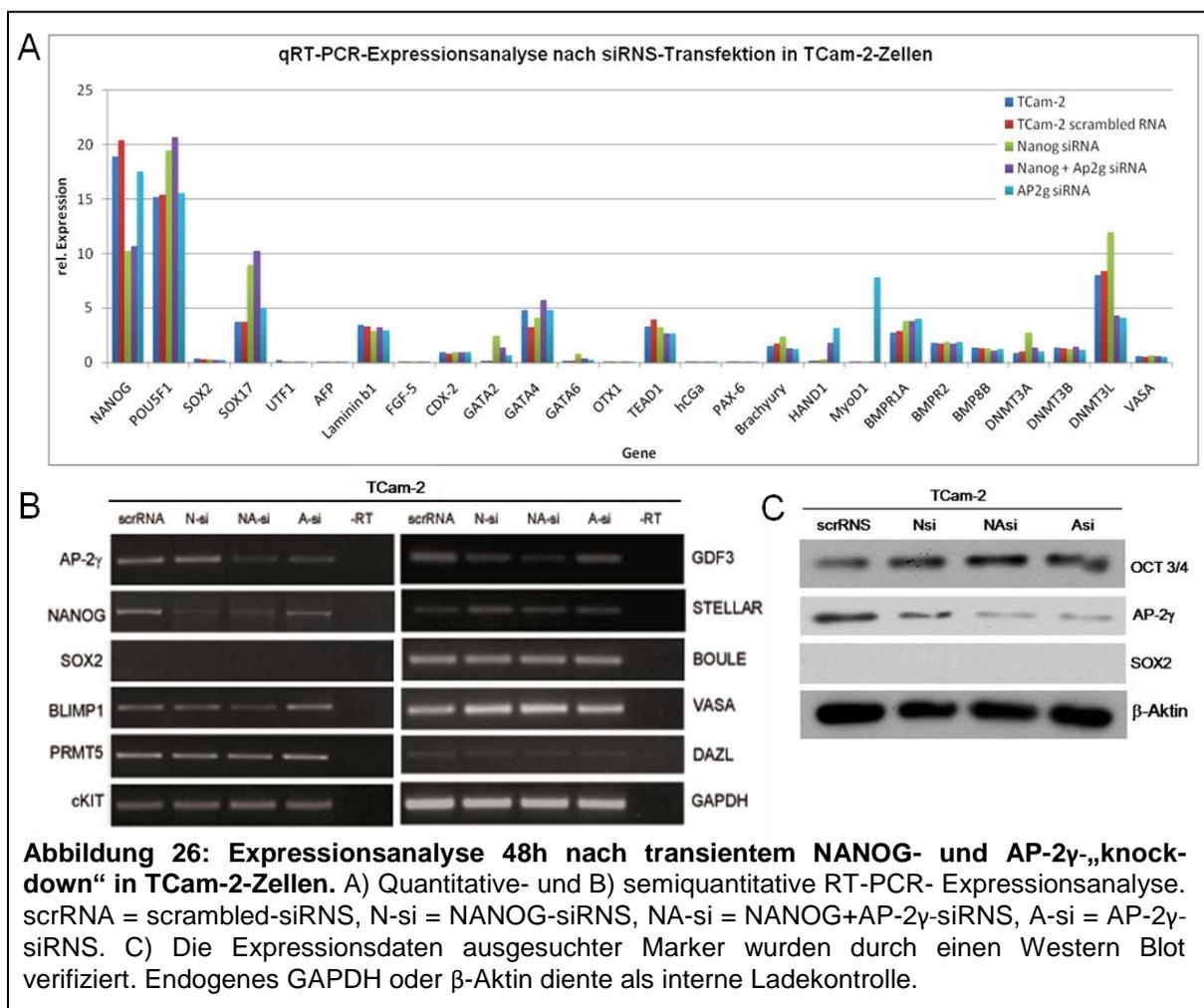
und 833KE exprimierten NANOG trotz NRR-Hypermethylierung (Damjanov et al., 2003; Bronson et al., 1980). Die qRT-PCR-Expressionsdaten wurden durch RT-PCR (Abb. 24B) und Western Blot-Analysen (Abb. 24C) bestätigt. Es konnte in den Zelllinien TCam-2, 2102EP und Tera-2 eine NANOG-Expression nachgewiesen werden, während adultes Hodengewebe negativ für NANOG war. Es konnte in Keimzelltumoren und -Zelllinien gezeigt werden, dass die NANOG-Expression mit dem Differenzierungsgrad der Tumorentität korrelierte (außer in 833Ke und NCCIT). Das hieß je höher der Differenzierungsgrad desto geringer die NANOG-Expression.

3.2.1 Transienter NANOG- und AP-2 γ -„knock-down“ in TCam-2-Zellen

Embryonale Karzinome sind in der Lage in alle drei Keimblätter zu differenzieren und dadurch embryonale Entwicklungsschritte zu rekapitulieren. Doch über das Differenzierungspotential von Seminomen ist nur sehr wenig bekannt und wird kontrovers diskutiert (Teilum, 1989; Battifora et al., 1984; Srigley et al., 1988; Eble et al., 2004; Czaja et al., 1992; Motzer et al., 1988). Es wird vermutet, dass Seminome eine Transition zu einem EK durchlaufen und dann in die weiteren Keimzelltumorsubtypen differenzieren können. Hier sollte untersucht werden unter welchen Umständen eine Differenzierung im Modellsystem TCam-2 induziert werden kann. In einem siRNS basierten, experimentellen Ansatz wurde die Proteinmenge des Pluripotenz assoziierten Markers NANOG in diesen Zellen reduziert. Parallel wurde AP-2 γ und AP-2 γ in Kombination mit NANOG herunterreguliert. AP-2 γ hat sich als



unerlässlich für die Keimzellentwicklung herausgestellt (Weber et al., 2010). Dabei wird AP-2 γ in Keimzellen exprimiert und inhibiert dort somatische Differenzierungsprogramme (Weber et al., 2010). Ein erfolgreicher Transfektionsprozess wurde durch zeitgleiche Transfektion einer Fluoreszenz markierten siRNS nachgewiesen (Abb. 25A). 48 Stunden nach der Transfektion der NANOG- und AP-2 γ -siRNS-Oligonukleotide konnte eine deutliche Reduktion der NANOG- und AP-2 γ -Expression mittels RT-PCR (Abb. 25B) und Western Blot (Abb. 25C) nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Expression ausgesuchter Marker für Pluripotenz, Selbsterneuerung und Keimzellen sowie aller drei Keimblätter mit Hilfe quantitativer RT-PCR überprüft. Nach Transfektion von NANOG- und NANOG+AP-2 γ -siRNS konnte eine Zunahme der OCT3/4- und SOX17-Expression nachgewiesen werden (Abb. 26A, grüner Balken, lila Balken, POU5F1, SOX17).



Zusätzlich konnte eine Induktion der GATA2-Expression sowie der *de novo*-Methylase DNMT3a und von DNMT3l beobachtet werden. Nach AP-2 γ -„knock down“ wurde zudem eine Induktion von zwei mesodermalen Markern gefunden, nämlich MyoD1 und HAND1 (Abb. 26A, hellblauer Balken). Die qRT-PCR-Expressionsdaten wurden durch eine semiquantitative RT-PCR und Western Blot-Analyse ausgesuchter Marker verifiziert (Abb. 26 B, C). Weitere Expressionsveränderungen konnten in dem untersuchten Markerset nicht detektiert werden.

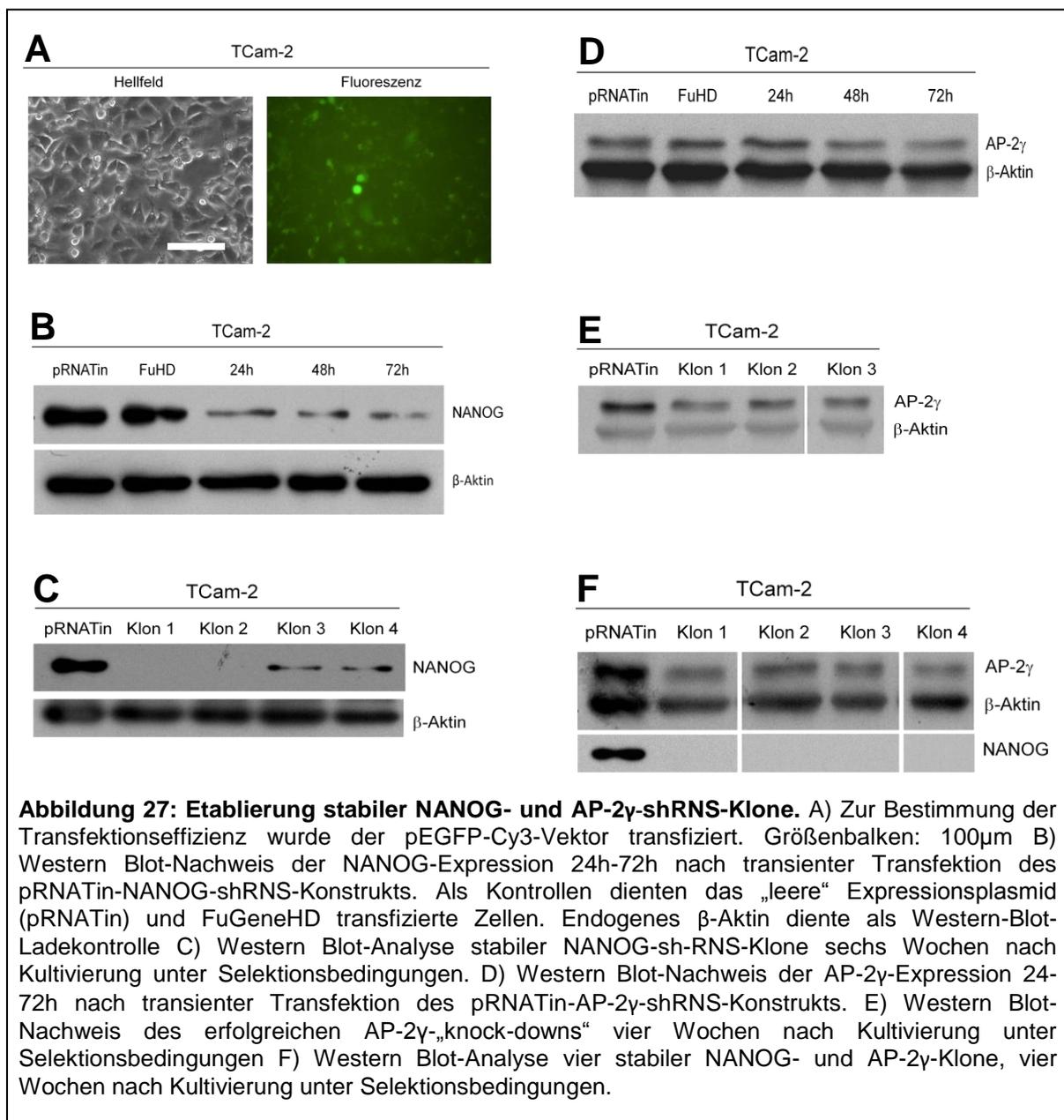
Trotz der sichtbaren Herunterregulation von NANOG führte der transiente NANOG-siRNS-„knock down“ zu keinen morphologischen Veränderungen in der seminomatösen Zelllinie TCam-2 (Anhang 1).

Die Hochregulation von OCT3/4 und SOX17 könnte in der Lage sein, die NANOG-Expressionsverminderung zu kompensieren und den undifferenzierten Zustand der Zellen unabhängig von NANOG aufrecht zu erhalten. Nach dem transienten „knock-down“ von AP-2 γ konnte zwar eine Induktion der mesodermal assoziierten Gene HAND1 und MyoD1 nachgewiesen werden, eine Reduktion von Pluripotenz- und Selbsterneuerungsmarkern konnte jedoch nicht detektiert werden. Da auch hier keine morphologischen Veränderungen festzustellen waren, wurde eine Differenzierung der TCam-2 Zellen ausgeschlossen.

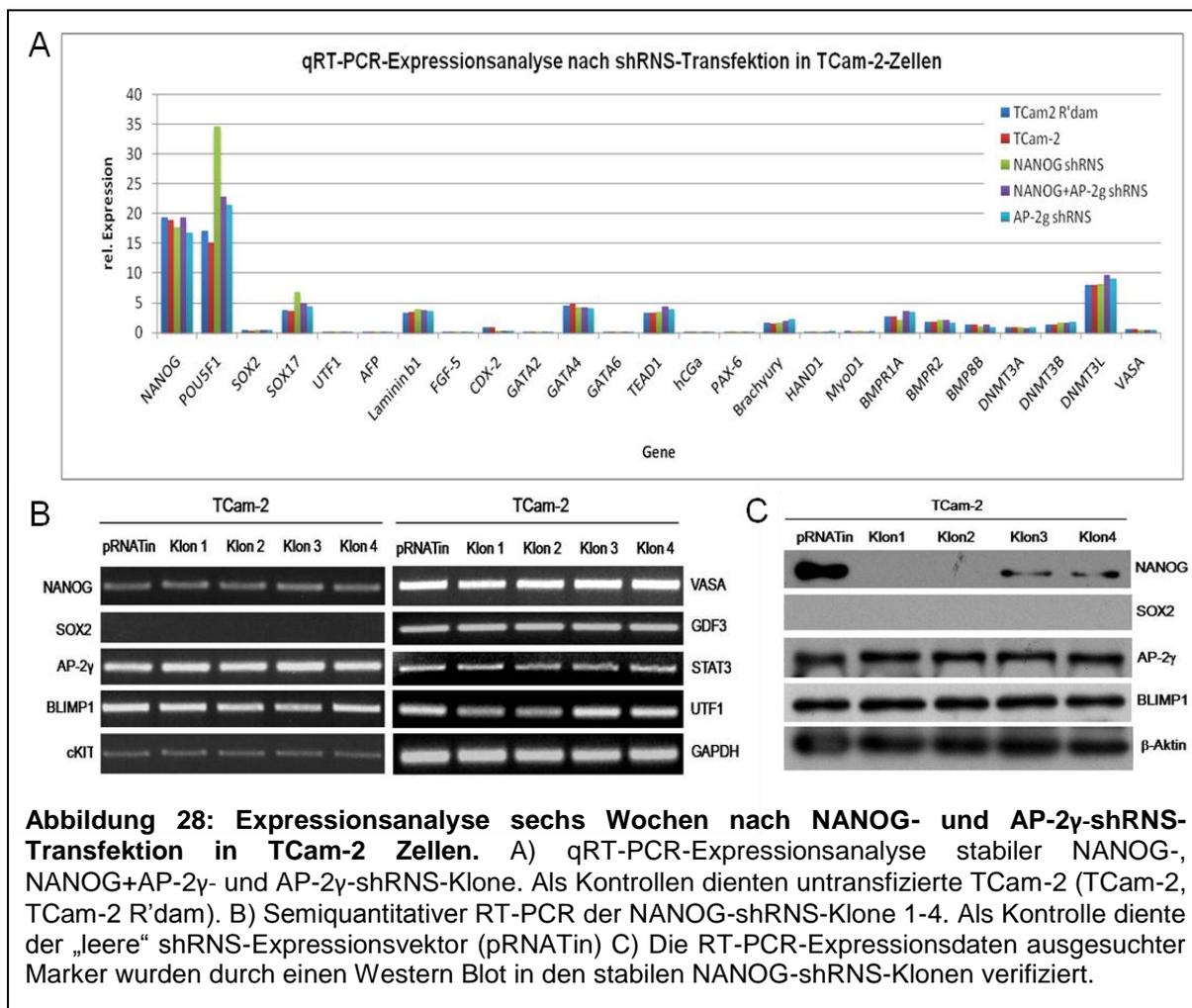
3.2.2 Stabiler NANOG- und AP-2 γ -„knock-down“ in TCam-2-Zellen

Da nach den transienten „knock-down“-Experimenten eine Heraufregulation von Differenzierungsmarkern wie HAND1 und MyoD1 beobachtet wurde, bestand die Möglichkeit das der kurzzeitige Verlust der NANOG- und/oder AP-2 γ -Expression nicht ausreichte um die TCam-2-Zellen zu differenzieren. Um den Effekt einer langfristigen NANOG- und AP-2 γ -Expressionsreduktion in TCam-2-Zellen zu untersuchen, wurden stabile Klone durch den Einsatz von shRNS-Konstrukten generiert. Durch Transfektion eines GFP-Reporterplasmids konnte ein erfolgreicher Transfektionsprozess (65%) nachgewiesen werden (Abb. 27A). Die „knock-down“-Effizienz und die Spezifität des NANOG-shRNS-Konstrukts wurden zunächst durch eine transiente Transfektion in TCam-2-Zellen getestet (Abb. 27B). Bereits 24h nach der Transfektion zeigte sich eine deutliche Reduktion der NANOG-Proteinmenge um 90%. Dieses Konstrukt wurde zur Generierung stabiler Klone eingesetzt, die mit Hilfe der auf dem shRNS-Plasmid kodierten G148-Resistenzkassette selektioniert wurden.

Sechs Wochen nach Transfektion und Kultivierung wurden vier Klone durch einen Western Blot auf ihre „knock-down“-Effizienzen hin überprüft (Abb. 27C). In Klon 1 und 2 konnte keine NANOG-Expression mehr nachgewiesen werden, während Klon 3 und 4 noch 20% Expression zeigten (grafisch ermittelt durch das Programm „ImageJ“). Bei der Generierung der stabilen AP-2 γ - und NANOG+AP-2 γ -shRNS-Klone wurde das gleiche Prozedere, wie bei der Etablierung der stabilen NANOG-shRNS-Klone angewandt. Mittels Western Blot wurde zunächst, in einem transienten Transfektionsansatz die Effizienz des AP-2 γ -shRNS Konstrukts bestätigt (Abb. 27D).



Anschließend wurden die stabilen Klone auf ihre AP-2 γ -„knock down“-Effizienzen hin untersucht (Abb. 27 E, F), wobei es nicht möglich war stabile AP-2 γ -shRNS-Klone zu generieren, die eine „knock down“-Effizienz von >55% aufwiesen. Dies könnte bedeuten, dass eine zu hohe Reduktion der AP-2 γ -Expression zum Zelltod oder zu terminaler Differenzierung führt. Wie im transienten Ansatz konnte durch eine quantitative RT-PCR-Analyse eine Hochregulation von OCT3/4 und SOX17 in den stabilen NANOG-shRNS-Klonen nachgewiesen werden. Der NANOG-„knock down“ selber war nicht nachweisbar und deutet an, dass es zu einer Inhibition der Translation anstatt zu einer Degradierung der Ziel-Boten-RNS kommt. Dies wird bei



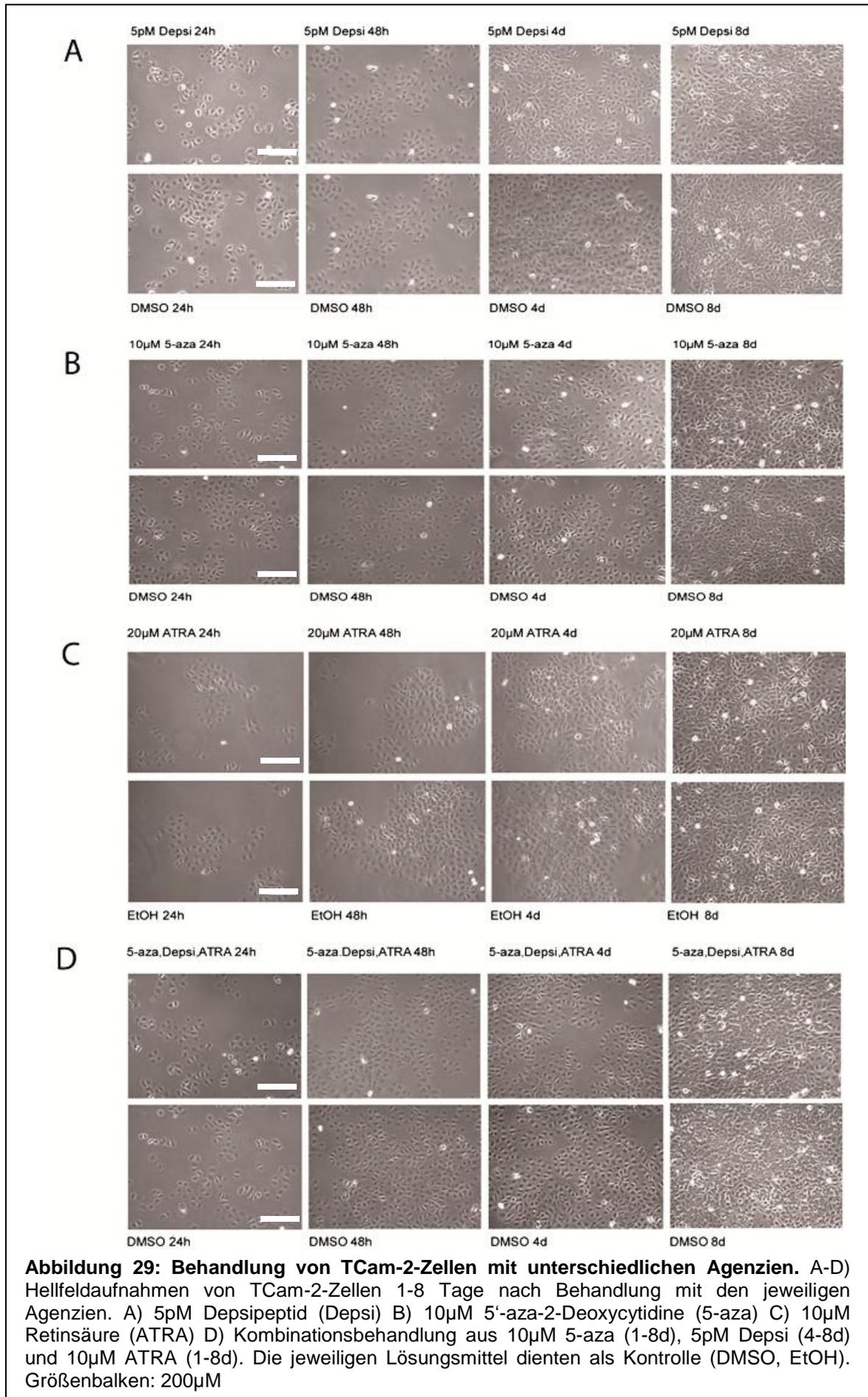
si/sh-Oligonukleotiden beobachtet die nicht vollständig komplementär zu ihrem Zieltranskript sind oder an dieses nicht vollständig binden können. Auch die Deregulationen von GATA2, DNMT3a und DNMT3l, die im transienten Ansatz beschrieben wurden, waren nicht detektierbar, ebenso wenig die Induktion von MyoD1 und HAND1 nach dem AP-2 γ -„knock-down“ von 55%. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden durch eine semiquantitative RT-PCR- und Western Blot-Analyse

der NANOG-„knock down“-Klone verifiziert (Abb. 28 B, C). Es konnten keine weiteren Expressionsveränderungen im untersuchten Markersset in den stabilen Klonen gefunden werden. Wie im transienten „knock down“-Experiment wurden keine morphologischen Anzeichen einer Differenzierung entdeckt (Anhang 2). Das NANOG-shRNS-Konstrukt wurde als zusätzliche Kontrolle in 2102EP embryonale Karzinomzellen transfiziert (Anhang 3). Wenige Tage nach Transfektion veränderte sich die Morphologie der Zellen von klein und polygonal zu sehr groß, flach und rund (Anhang 3 A, B). Die Reduktion der NANOG-Expression konnte in den morphologisch veränderten 2102EP-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Anhang 3 C, D, E, F). Die transienten und stabilen „knock down“-Experimente zeigen, dass TCam-2 Zellen eine Reduktion der NANOG- und AP-2 γ -Expression kompensieren können und ihren seminomatösen, undifferenzierten Status aufrecht erhalten können.

3.3.1 Behandlung von TCam-2-Zellen mit verschiedenen chemischen Agenzien

Als ein wichtiger Indikator einer beginnenden Differenzierung wurden morphologische Veränderungen angesehen. Ebenso sollten eine Herunterregulation von Pluripotenz- und Selbsterneuerungsmarkern sowie eine Induktion von Keimblattmarkern als Anzeichen einer Differenzierung gelten. Basierend auf diesen Kriterien schien die transiente und stabile Reduktion der NANOG- und AP-2 γ -Expression nicht in der Lage zu sein, eine Differenzierung in TCam-2-Zellen zu induzieren.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Zelllinie mit unterschiedlichen chemischen Agenzien behandelt. Dazu wurden TCam-2-Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Depsipeptid (Abb. 29A, Depsi), dem global demethylierenden Reagenz 5'-aza-2-Deoxycytidin (Abb. 29B, 5-aza) und der differenzierungsinduzierenden Chemikalie all-trans-Retinsäure (Abb. 29C, ATRA) behandelt. Auch Kombinationsbehandlungen mit allen drei Reagenzien (Abb. 29D, 5-aza, Depsi, ATRA) wurden durchgeführt. Es konnten in allen experimentellen Ansätzen keine morphologischen Veränderungen detektiert werden (Abb. 29 A, B, C, D). Auch bei deutlich höheren Konzentrationen von Depsipeptid und ATRA war dies nicht der Fall (Anhang 4, Anhang 5), lediglich Depsipeptid führte ab einer Konzentration von 20pM zum Zelltod



(Anhang 4). Durch eine semiquantitative RT-PCR-Expressionsanalyse konnte lediglich eine Induktion von PAX6 nach 5-aza-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 30A). Die Expressionen der übrigen untersuchten Marker blieben nach allen angewendeten Behandlungen unverändert (Abb. 30 A, B). 5-aza und Retinsäure be-

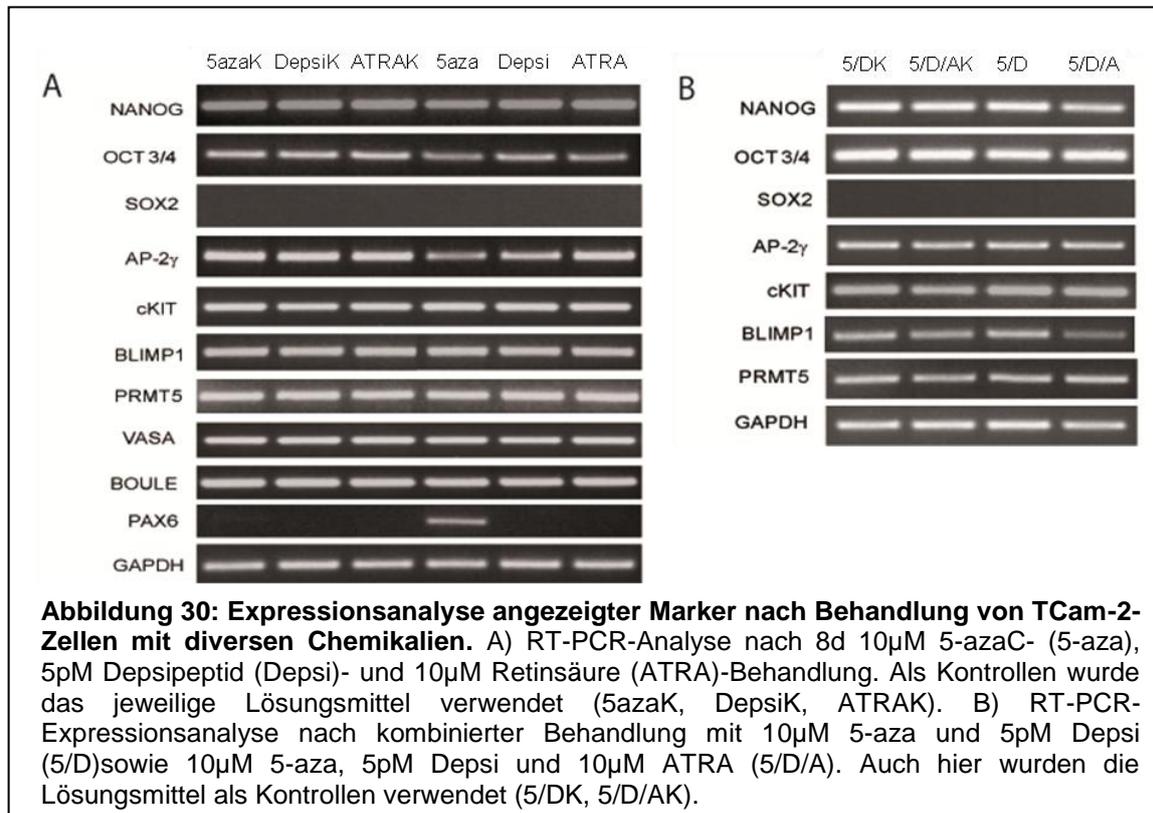


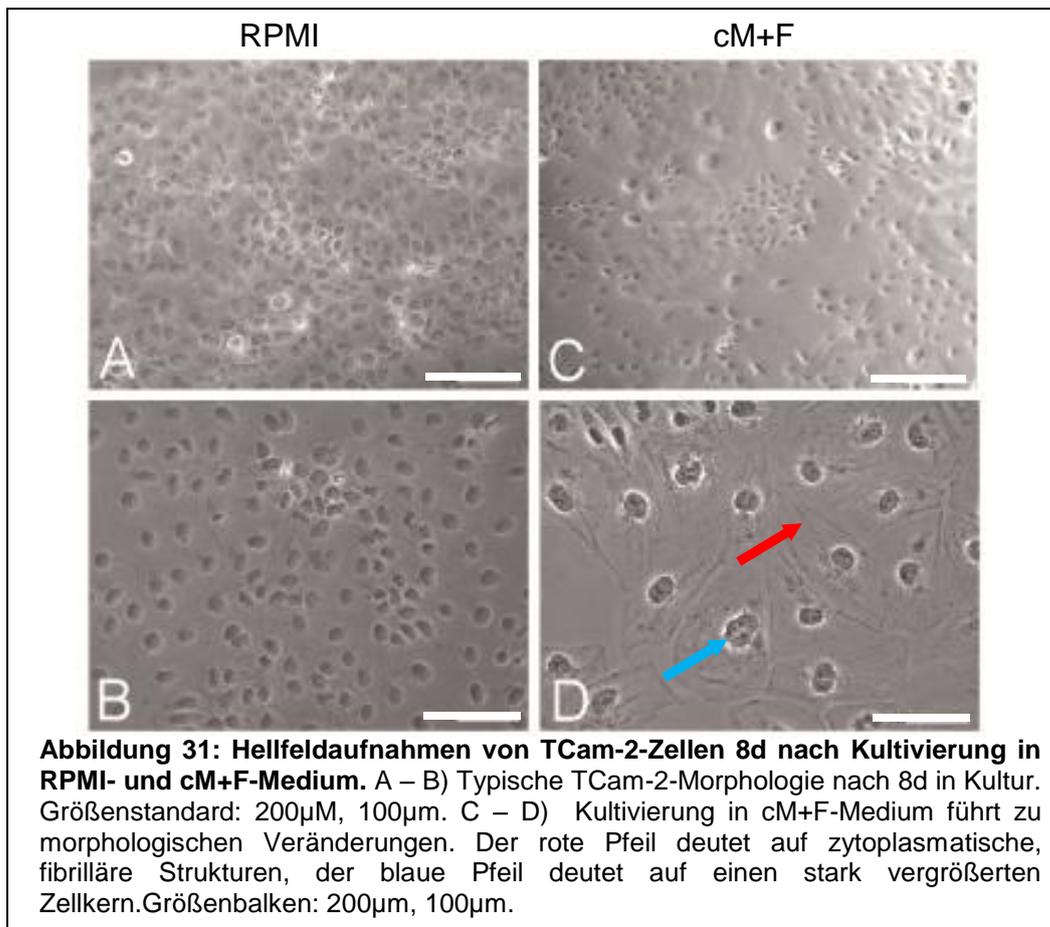
Abbildung 30: Expressionsanalyse angezeigter Marker nach Behandlung von TCam-2-Zellen mit diversen Chemikalien. A) RT-PCR-Analyse nach 8d 10 μ M 5-azaC- (5-aza), 5pM Depsipeptid (Depsi)- und 10 μ M Retinsäure (ATRA)-Behandlung. Als Kontrollen wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet (5azaK, DepsiK, ATRAK). B) RT-PCR-Expressionsanalyse nach kombinierter Behandlung mit 10 μ M 5-aza und 5pM Depsi (5/D) sowie 10 μ M 5-aza, 5pM Depsi und 10 μ M ATRA (5/D/A). Auch hier wurden die Lösungsmittel als Kontrollen verwendet (5/DK, 5/D/AK).

sitzen beide sehr kurze Halbwertszeiten und sind zudem lichtempfindlich. Um die Funktionalität von 5-aza nachzuweisen wurde das DNS-Methylierungsmuster des hochkonservierten LINE-1-Promotors untersucht. Da sich viele tausend dieser retrotransposablen, repetitiven Elemente über das menschliche Genom verteilen, können so Rückschlüsse über den Genom weiten Methylierungszustand gezogen werden (Yang et al., 2004). Nach 5-aza-Behandlung der Seminom-Zelllinie TCam-2 konnte eine Dosis abhängige Reduktion der LINE-1-Promotor-DNS-Methylierung durch Natrium-Bisulfit-Sequenzierung aufgezeigt werden (Anhang 6A). Die ATRA-Funktionalität wurde an NCCIT-Zellen nachgewiesen. Acht Tage nach Behandlungsstart wiesen die Zellen deutliche morphologische Anzeichen einer Differenzierung auf (Anhang 6B). Zusätzlich wurde die DNS-Methylierung der Retinsäure-Rezeptor- β 2-(RAR- β 2)-Promotorregion untersucht (Anhang 6C). In TCam-2-Zellen war diese Region hypomethyliert. Die Expression des RAR- β 2-Rezeptors wurde zusätzlich durch eine RT-PCR nachgewiesen (Anhang 6C).

Retinsäure vermittelte Signaltransduktion ist demnach über diesen Rezeptor möglich (Mongan et al., 2007). Die gefundenen Daten zeigten, dass TCam-2-Zellen auch nach 5-aza-, Depsi- und ATRA-Behandlung ihren undifferenzierten Status aufrecht erhalten konnten und nicht zu differenzieren waren.

3.4.1 Induktion einer TCam-2-Differenzierung durch Kultivierung in MEF konditioniertem Medium mit FGF4/Heparin

Mit dem Ziel eine Differenzierung zu induzieren wurden die Zellen in einem weiteren Experiment in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) konditionierten Medium (cM) mit FGF4/Heparin kultiviert (cM+F). Dieses Kulturmedium enthält ein breites Spektrum verschiedener Hormone, Zytokine und Chemokine, die eine Differenzierung der TCam-2-Zellen auslösen könnten. Das Mitogen FGF4 übernimmt zahlreiche zelluläre Funktionen, die sowohl mit Differenzierung als auch mit Proliferation und Selbsterneuerung assoziiert sind. Das Mikromilieu der Zellen bestimmt, welche Funktion zum Tragen kommt. Heparin verstärkt dabei die Bindung von FGF4 an seine Rezeptoren (Kosaka et al., 2006; Erlebacher et al., 2004; Wilder et al., 1997). Zunächst wurde durch RT-PCR gezeigt, dass TCam-2-Zellen die FGF-Rezeptoren 1 – 4 exprimieren (Anhang 7). Bereits nach vier Tagen in Kultur veränderte sich die Zellmorphologie der TCam-2-Zellen im Vergleich zu Standardkultivierungsbedingungen (RPMI) deutlich (Abb. 31 A, B, C, D). Die Zellkerne und Zytoplasmen erschienen drastisch vergrößert (Abb. 31D, blauer Pfeil) und wurden von auffälligen, fibrillären Strukturen durchzogen (Abb. 31D roter Pfeil). Danach wurden Zellen, die in MEF konditioniertem Medium mit (cM+F) und ohne FGF4/Heparin (cM) kultiviert wurden, mit RPMI mit (RPMI+F) und ohne FGF4/Heparin (RPMI) kultivierten Zellen verglichen (Abb. 32). Innerhalb der cM+F-Kulturen konnten geordnete Strukturen erkannt werden. Stark vergrößerte Zellen (Abb. 32A, weißer Pfeil) umschlossen dabei Foci von Zellen mit unveränderter Morphologie (Abb. 32A, gelber Kreis). Diese Beobachtung konnte nur nach Kultivierung in cM+F gemacht werden. Bei Wachstum in cM fiel ebenfalls eine Größenzunahme der Zellen auf (Abb. 32B, blauer Pfeil), fibrilläre Strukturen konnten unter diesen Wachstumsbedingungen nicht beobachtet werden. Nach Kultivierung in RPMI+F konnte ebenfalls eine beginnende Ausbildung der fibrillären Strukturen beobachtet werden (Abb. 32C, roter Pfeil), eine extreme Größenzunahme der Zellen blieb jedoch aus. TCam-2-Wachstum in RPMI führte zum



gewohnt polygonalen Erscheinungsbild der Zellen (Abb. 32D). Durch eine Zytokeratin 8-Immunfluoreszenzfärbung konnte die Netzwerkstruktur hervorgehoben werden (Abb. 32 E - H). Die proliferative Aktivität der TCam-2-Zellen wurde durch ein EdU-Inkorporationsexperiment nach Kultivierung in den vier verschiedenen Kulturmedien untersucht (Abb. 32 I - L). Parallel wurde CK18 durch Immunfluoreszenz detektiert. Nach cM+F- und cM-Kultivierung konnte keine Proliferation in den morphologisch veränderten Zellen (EdU-, CK18+) nachgewiesen werden (Abb. 32 I, J). Proliferierende Zellen konnten nur noch innerhalb der Foki, die von dem Netzwerk umschlossen wurden, gefunden werden. Der Großteil der RPMI+F und RPMI kultivierten Zellen war proliferativ. CK18 positive Zellen wurden hingegen nicht gefunden (Abb. 32 K, L). Die Proliferationsraten wurden auch in einem unabhängigen Experiment bestimmt (Abb. 33). Dort führte die Kultivierung in cM+F und cM innerhalb eines Kultivierungszeitraums von acht Tagen zu einer deutlichen Vermin-

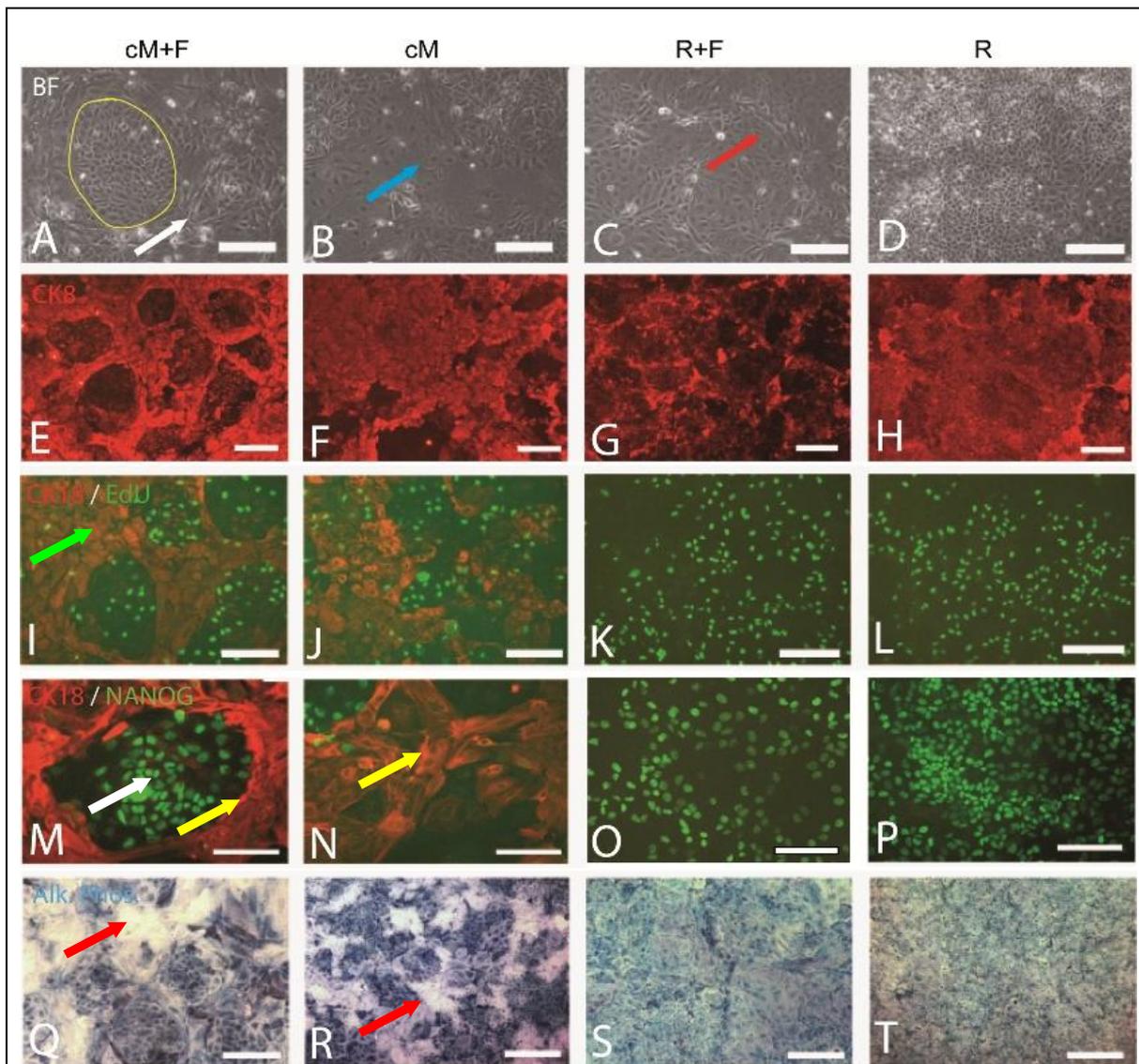
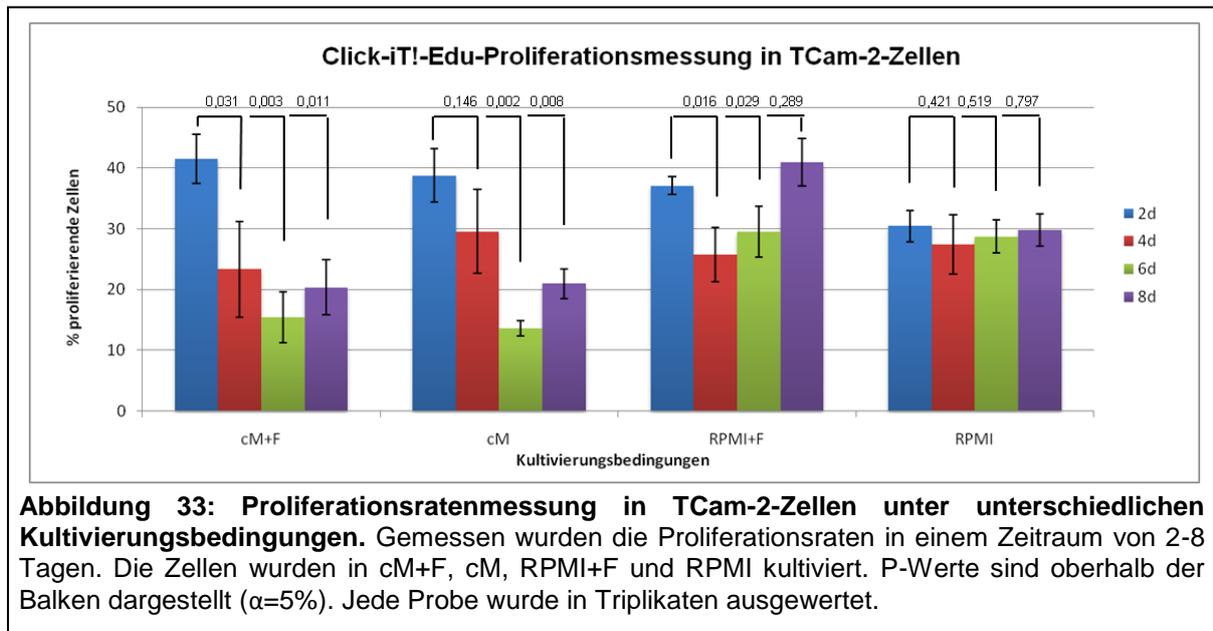


Abbildung 32: Hellfeldaufnahmen und Fluoreszenzfärbungen angezeigter Marker nach Kultivierung von TCam-2-Zellen unter vier verschiedenen Kulturbedingungen. Alle Bilder wurden acht Tage nach Kultivierungsbeginn in cM+F-, cM-, RPMI+F- und RPMI-Medium aufgenommen. Größenbalken: 200µM. Die sekundären Antikörperkontrollen zeigen keine unspezifischen Färbungen (Anhang 8).

derung der Proliferation (~ 50 - 65%). Durch den Student's *t*-Test konnte aufgezeigt werden, dass die Veränderungen der Proliferationsraten signifikant waren (Abb. 33, oberhalb der Balken). Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichten, dass sich während der cM+F-Kultivierung unterschiedliche Zellpopulationen etablierten. Zum einen eine Population morphologisch stark vergrößerter, unproliferativer Zellen, die netzwerkartige Strukturen ausbildeten und zum anderen Zellverbände morphologisch unveränderter, proliferativer Zellen, die innerhalb dieser Strukturen wuchsen.



Um einen Verlust der Pluripotenz- und Selbsterneuerungsfähigkeit nachzuweisen wurde NANOG durch eine Immunofluoreszenzfärbung angefärbt (Abb. 32 M - P). Um die beiden Zellpopulationen besser voneinander zu unterscheiden zu können wurde zusätzlich CK18 angefärbt. Eine NANOG-Expression konnte in den morphologisch veränderten Zellen nach cM- und cM+F-Kultivierung nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 32 M, N, gelbe Pfeile), während die Zellen innerhalb der Foki noch NANOG exprimierten (Abb. 32 M, weißer Pfeil). In RPMI und RPMI+F kultivierten Zellen konnte das NANOG-Protein ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 32 O, P). Zusätzlich wurde eine alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung durchgeführt (Abb. 32 Q - T). Eine hohe Aktivität dieses Enzymes ist charakteristisch für pluripotente Zellen, wie zum Beispiel embryonale Stammzellen. AP-Aktivität war in morphologisch veränderten Zellanteilen nicht mehr nachweisbar (Abb. 32 Q, R, rote Pfeile). Im Gegensatz dazu waren alle RPMI und RPMI+F kultivierten Zellen AP positiv (Abb. 32 S, T).

Um die Vitalität der TCam-2-Zellen nach Kultivierung in cM-, cM+F-, RPMI+F- und RPMI-Medium nachzuweisen, wurden die Apoptoseraten während eines achttägigen Wachstumszeitraums durch eine AnnexinV-Färbung ermittelt (Abb. 34). Dabei verdoppelte sich die Anzahl apoptotischer Zellen während des Analysezeitraums in allen Ansätzen ($\sim 15\% \rightarrow 30\%$), während die Anzahl lebender Zellen um ca. 20% sank. Dies spiegelt ein erwartetes Verhalten einer zwei-dimensional wachsenden Zellkultur bei Erreichen der Konfluenz wieder.

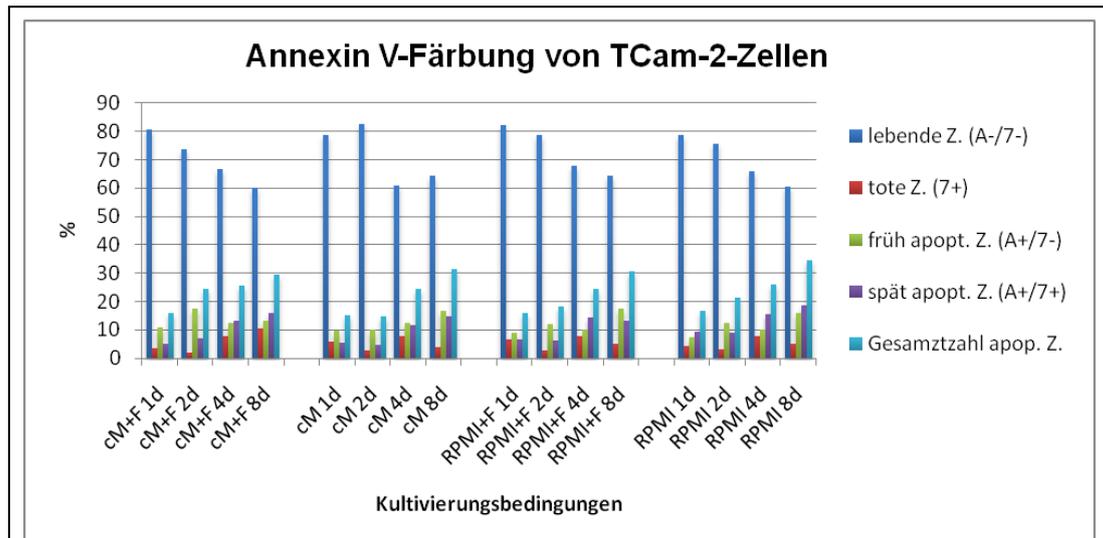
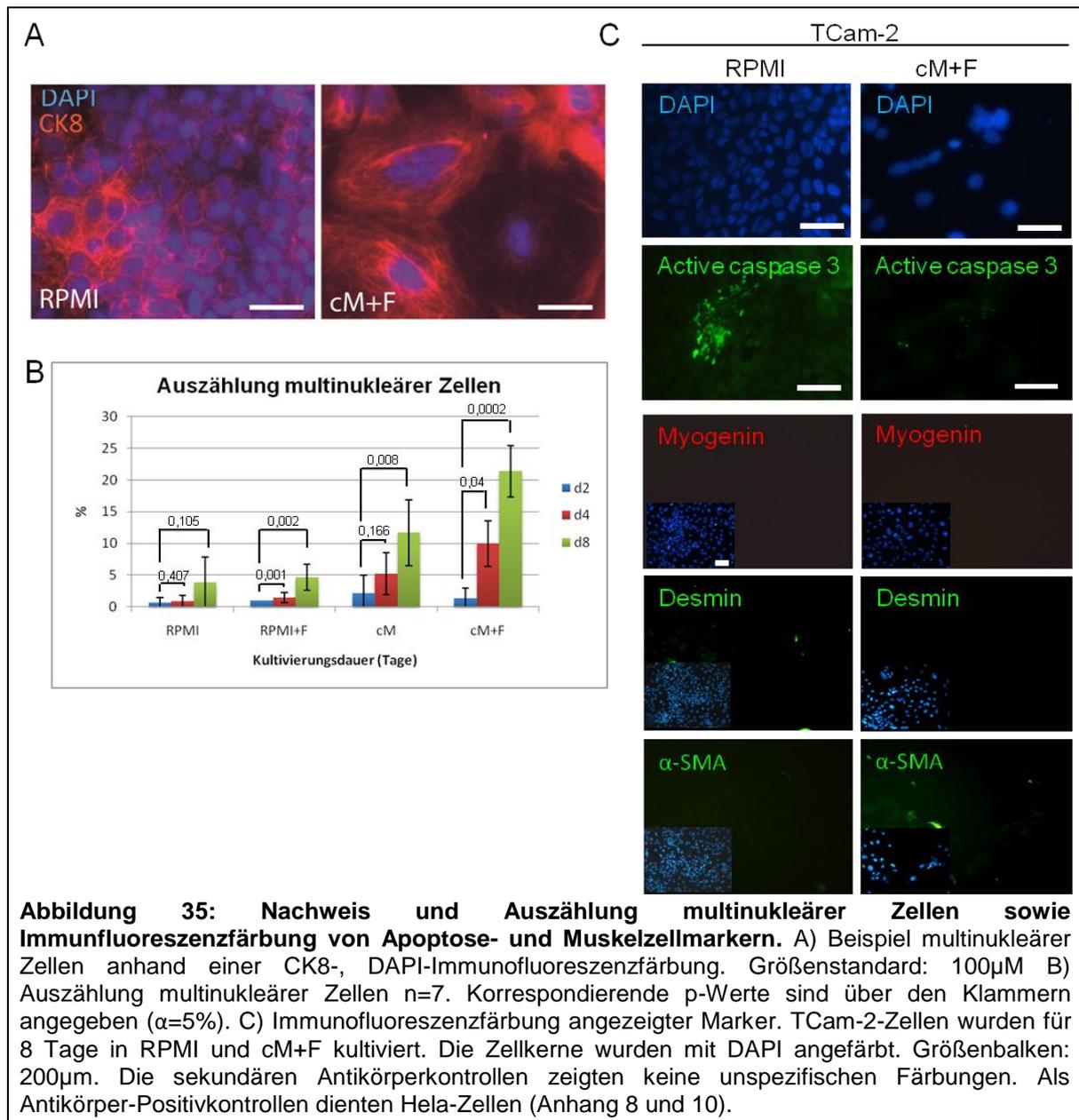


Abbildung 34: AnnexinV-Apoptosemessung in TCam-2-Zellen nach Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien. Gemessen wurden die lebenden, toten, frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen. Aus den letzten zwei Messungen wurde der Gesamtanteil apoptotischer Zellen errechnet. Die TCam-2-Zellen wurden in cM+F, cM, RPMI+F, RPMI kultiviert. 5×10^5 Zellen wurden eingemessen. A = AnnexinV, 7 = 7-AAD.

3.4.2 Zunahme multinukleärer Zellen durch cM+F-Kultivierung

Während der cM+F-Kultivierungsexperimente wurde festgestellt, dass viele der differenzierten Zellen multinukleär waren (Abb. 35A). Eine Auszählung nach zwei-, vier- und achttägiger Kultivierung in vier verschiedenen Kulturmedien (Abb. 35B) verdeutlichte die starke Zunahme multinukleärer Zellen nach cM+F-Kultivierung (um 20%). Auch cM-Kultivierung führte zu einem Anstieg multinukleärer Zellen (um 11,8%). Nach Kultivierung in RPMI+F und RPMI zeigte sich ein vergleichbar geringer Anstieg (RPMI: um 3,2%; RPMI+F: um 3,4%). Eine negative Immunofluoreszenzfärbung der aktiven Caspase 3 (Abb. 35C, Aktive Caspase 3) zeigte, dass die multinukleären Zellen nicht apoptotisch waren. Solche multinukleären Zellen sind charakteristisch für Muskel- oder Synzytiotrophoblastzellen der Plazenta. Auch in Chorionkarzinomen, die aus Synzytio- und Zytotrophoblastzellen bestehen, sind multinukleäre Zellen zu finden. Um eine Muskelzellen ähnliche Differenzierung detektieren zu können, wurde die Expression von Muskelzellmarkern durch Immunofluoreszenzfärbungen untersucht (Abb. 35C, Myogenin, Desmin, α -SMA). Eine Expression dieser Marker konnte nicht nachgewiesen werden. Somit war ein Differenzierungsprozess in Richtung Muskelzellen auszuschließen und es lag die Vermutung nahe, dass die multinukleären Zellen einen Chorionkarzinom ähnlichen Differenzierungsprozess durchlaufen könnten.



3.4.3 Ultrastruktur der TCam-2-Zellen nach RPMI- und cM+F-Kultivierung

Um Besonderheiten in der Ultrastruktur der morphologisch veränderten TCam-2-Zellen zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 36). Ein Vergleich zwischen RPMI (Abb. 36A, RPMI) und cM+F kultivierten TCam-2 (Abb. 36B, cM+F) verdeutlichte wiederum die extremen Größenunterschiede der Zellen. Die cM+F kultivierten Zellen besaßen einen sehr unregelmäßig geformten Zellkern mit zytoplasmatischen Einstülpungen (Abb. 36B, weißer Pfeil). Die Aufnah-

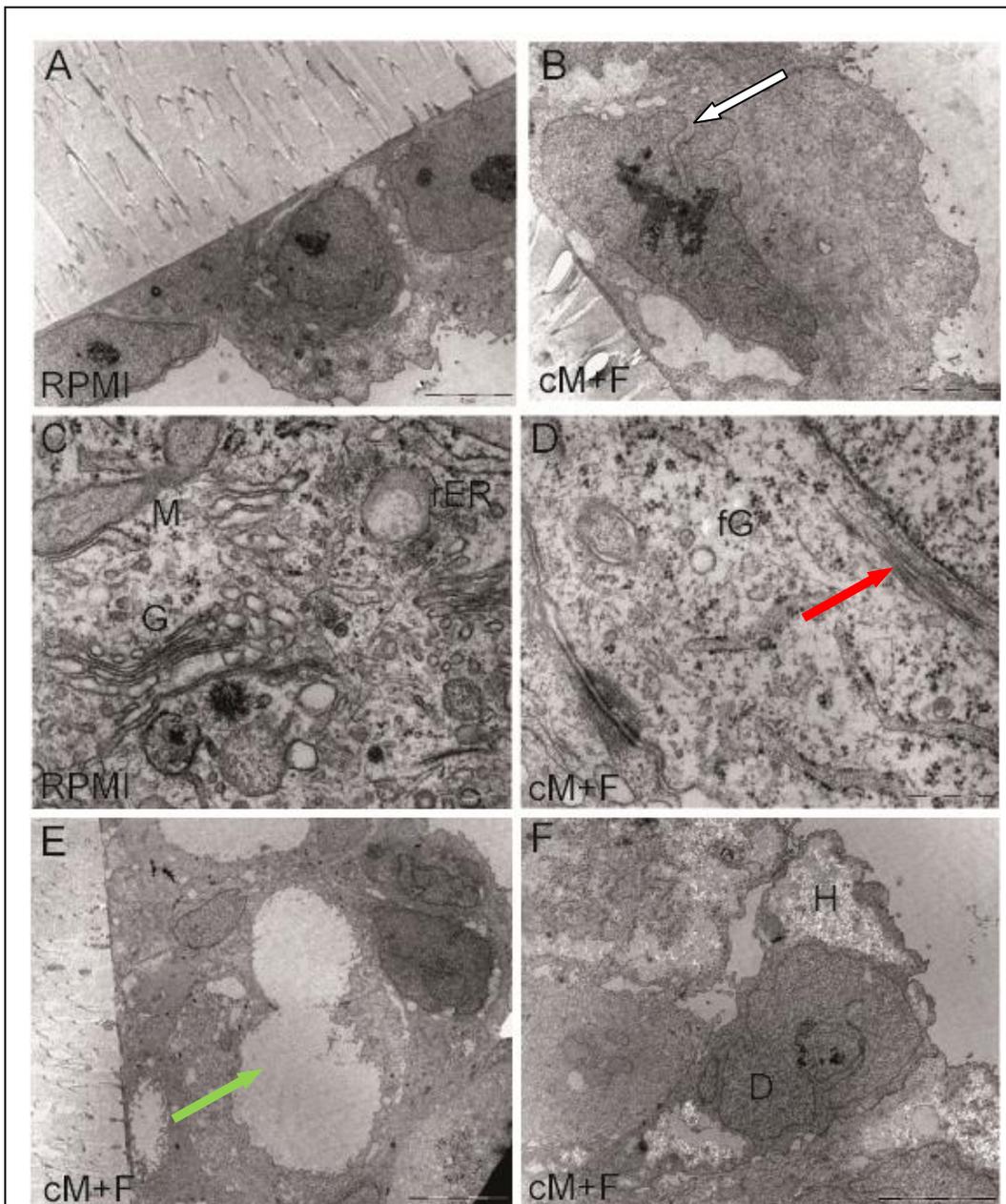


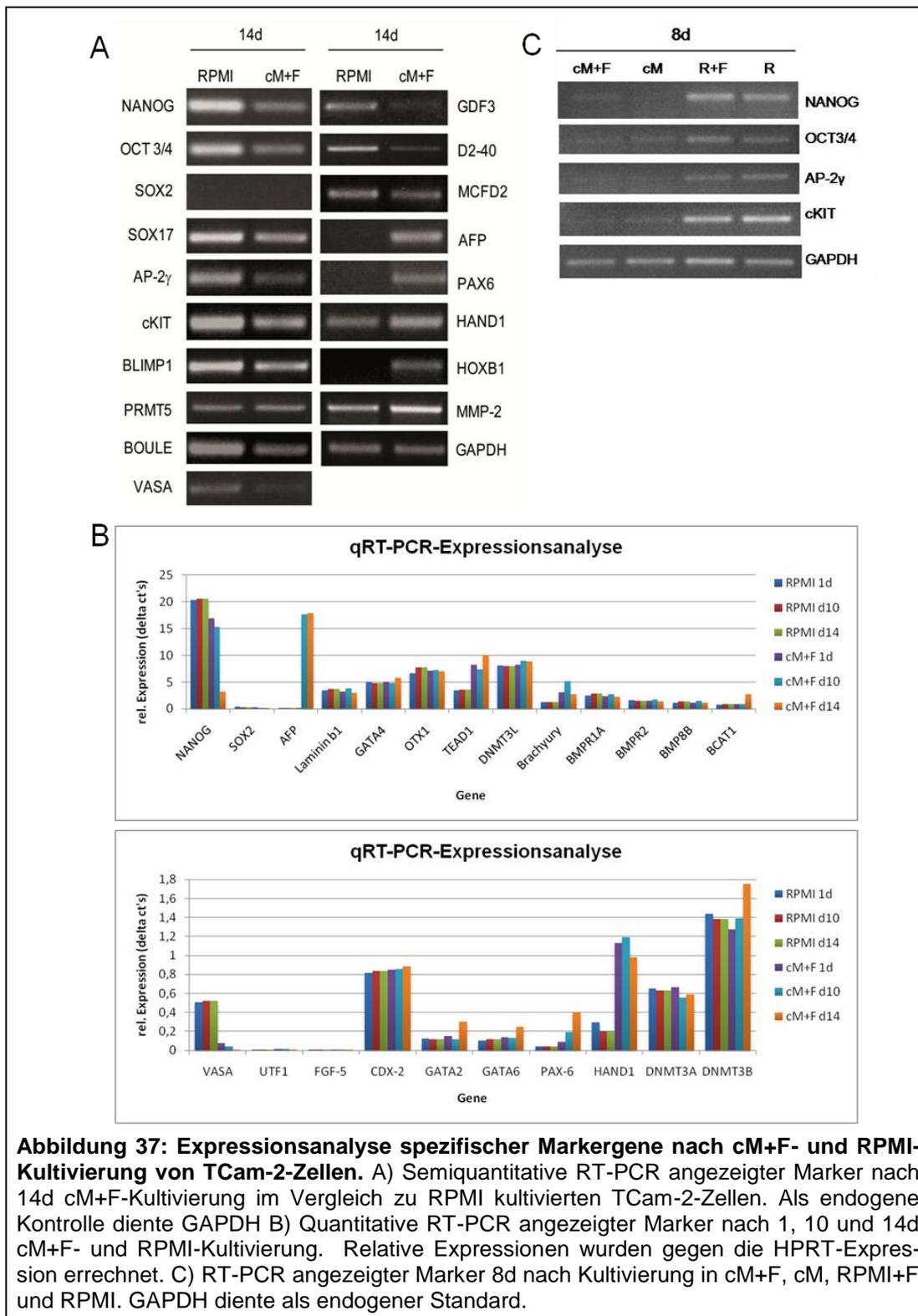
Abbildung 36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der TCam-2-Zellen 8d nach RPMI- (A,C) und cM+F-Kultivierung (B,D,E,F). Der weiße Pfeil (B) deutet auf einen irregulär geformten Zellkern mit zytoplasmatischen Einstülpungen und der rote Pfeil (D) auf prominente, fibrilläre Strukturen im Zytoplasma der differenzierten Zellen. Ebenfalls konnten große, „Vakuolen“-artige Strukturen im Zytoplasma der cM+F kultivierten Zellen gefunden werden (E, grüner Pfeil). M=Mitochondrium, G=Golgi-Apparat, rER=raues Endoplasmatisches Retikulum, fG=freies Glykogen, H=elektronenmikroskopisch heller Bereich, D= elektronenmikroskopisch dunkler Bereich.

men des Zytoplasmas zeigten, dass die Zellorganellen RPMI kultivierter TCam-2-Zellen (Abb. 36C) deutlich enger zusammen lagen als bei den differenzierten Zellen. Zusätzlich fielen bei den morphologisch veränderten Zellen eine höhere Menge freien Glykogens und fibrilläre Strukturen, die das Zytoplasma durchzogen, auf (Abb. 36D, roter Pfeil). Desweiteren konnten in diesen Zellen sehr große „Vakuolen“-artige

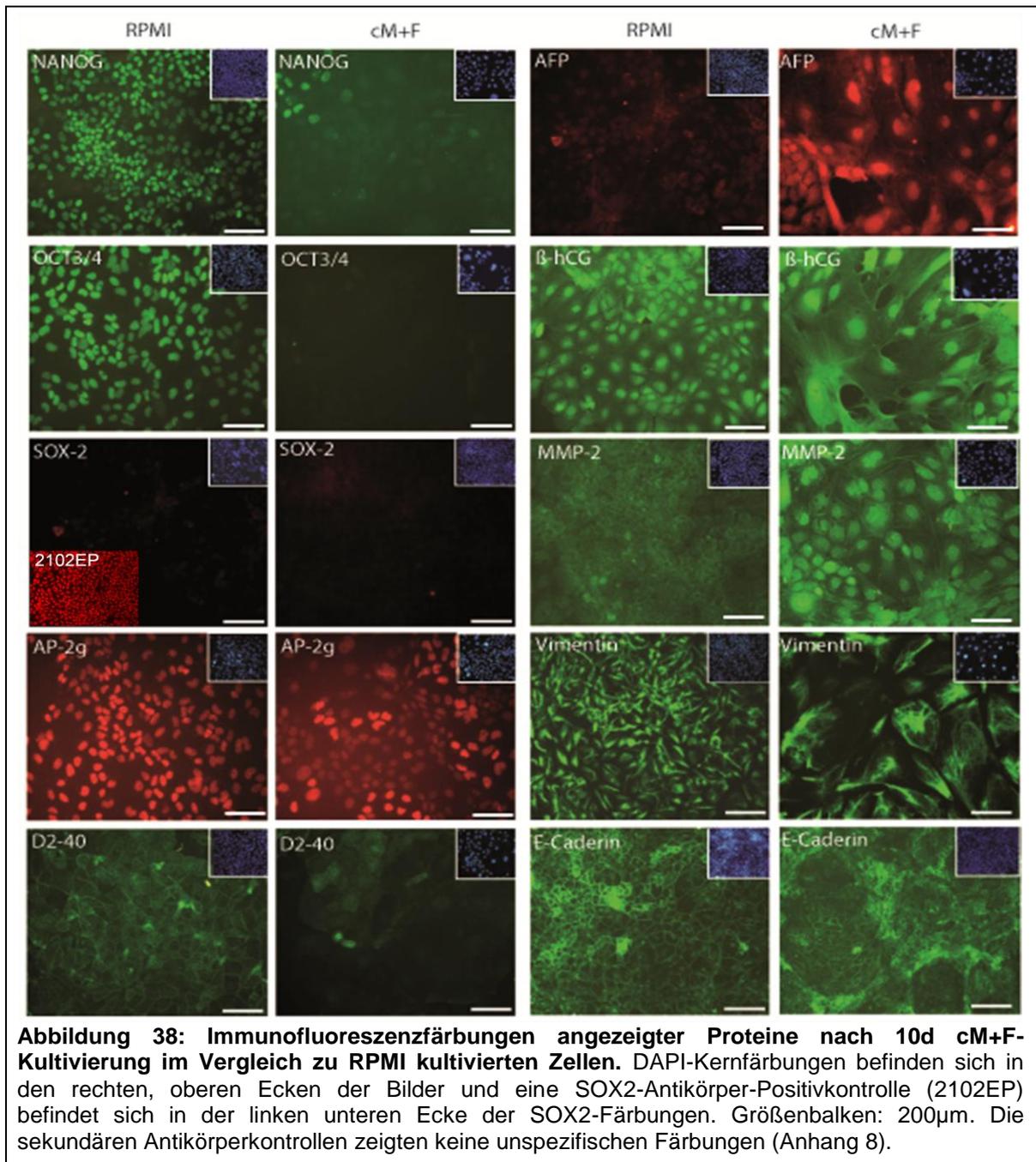
Vesikel (Abb. 36D, grüner Pfeil) sowie elektronenmikroskopisch helle und dunkle Bereiche (Abb. 36 F, H, D) nachgewiesen werden. Dies sind ultrastrukturelle Charakteristika die auch in Dottersacktumoren gefunden werden können (Nogalez-Fernandez et al., 1977). Demnach deutete die Ultrastrukturuntersuchung darauf hin, dass die TCam-2-Zellen einen Dottersacktumor ähnlichen Differenzierungsprozess durchlaufen könnten. Zusammen mit der zuvor aufgestellten Theorie einer chorionkarzinomatösen Differenzierung (siehe Kapitel 3.4.2) ergibt sich die Annahme, dass cM+F-Kultivierung zu einer Differenzierung in ein gemischtes Nicht-Seminom führt.

3.4.4 Veränderungen in der Genexpression nach cM+F-Kultivierung

Durch cM+F-Kultivierung konnten morphologische Veränderung in den TCam-2-Zellen induziert werden. Zudem konnte eine verminderte Proliferationsrate in den morphologisch veränderten Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf sollten auch Veränderungen in der Genexpression der Zellen untersucht werden. Dadurch sollte die Richtung des Differenzierungsprozesses näher bestimmt werden. In den cM+F kultivierten Zellen konnte im Vergleich zu RPMI kultivierten Zellen eine deutliche Herabregulation der Pluripotenzgene NANOG und OCT3/4 durch quantitative und semiquantitative RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 37 A, B). Keimzellmarkergene wie AP-2 γ , cKIT, BLIMP1, VASA, BOULE und GDF3 und die drei Seminommarker D2-40, MCFD2 und SOX17 waren nach vierzehntägiger cM+F-Kultivierung ebenfalls herunterreguliert (Abb. 37 A, B). Die Heraufregulation der Keimblattmarker HAND1, PAX6 (Teratom typisch) und von AFP (Dottersacktumor typisch) sowie die Hochregulation der trophektodermalen Marker TEAD1, GATA2 und GATA6 (Chorionkarzinom typisch) deuteten auf einen nicht-seminomatösen Differenzierungsprozess hin (Abb. 37 A, B). Zusätzlich kam es zu einer Heraufregulation des somatischen Markers HOXB1 und der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2). Die Tatsache das sowohl cM+F- als auch cM-Kultivierung zu einer deutlichen Reduktion der NANOG-, OCT3/4-, AP-2 γ - und cKIT-Expression führte, zeigte, dass cM für die Induktion der TCam-2-Differenzierung verantwortlich ist (Abb. 37C). Die Expressionsdaten ausgesuchter Markergene wurden zudem durch immunohistochemische Fluoreszenzfärbungen auf Protein-Ebene bestätigt (Abb. 38).



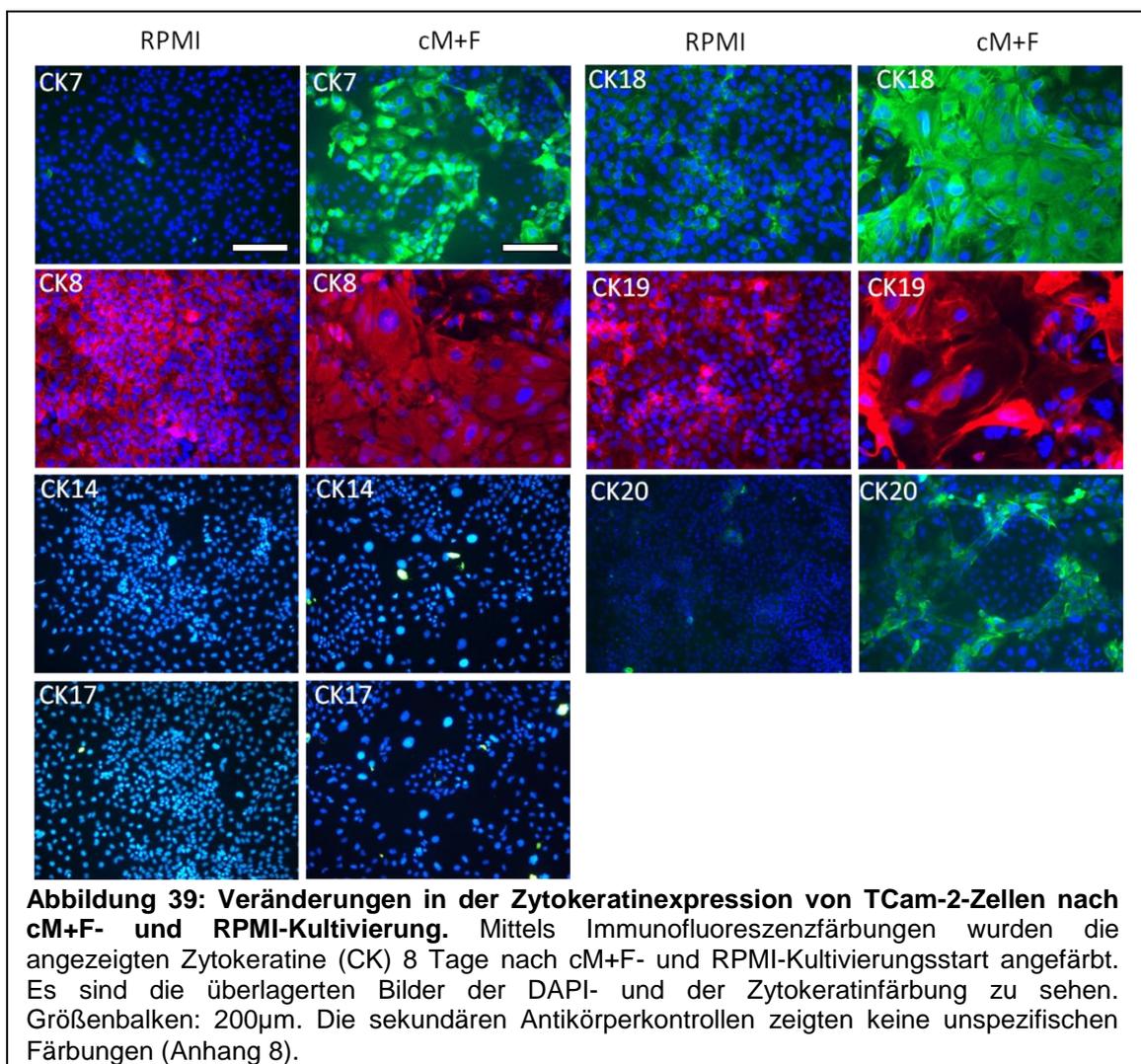
Es konnte die Herunterregulation von NANOG, OCT3/4, AP-2 γ und D2-40 sowie die fehlende SOX2-Expression und die Heraufregulation von AFP und MMP-2 in den cM+F kultivierten Zellen bestätigt werden. Zusätzlich konnte in den morphologisch veränderten und unveränderten Zellen eine vergleichbar hohe β -hCG-Expression detektiert werden (Abb. 38, β -hCG, MMP-2).



Bei der Metastasierung von Tumoren kommt es zu einem Phänotypwechsel, bei dem die Tumorzellen ihre zellspezifischen Eigenschaften verändern oder verlieren und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen. Diesen Prozess bezeichnet man als epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT). Um eine mögliche EMT nachvollziehen zu können, wurden Vimentin und E-Cadherin durch Immunfluoreszenz angefärbt. Eine unveränderte Expression beider Proteine in RPMI und cM+F kultivierten Zellen deutete auf keine epitheliale-mesenchymale-Transition hin (Abb. 38, Vimentin, E-Cadherin).

3.4.5 Veränderungen in der Zytokeratinexpression nach cM+F-Kultivierung

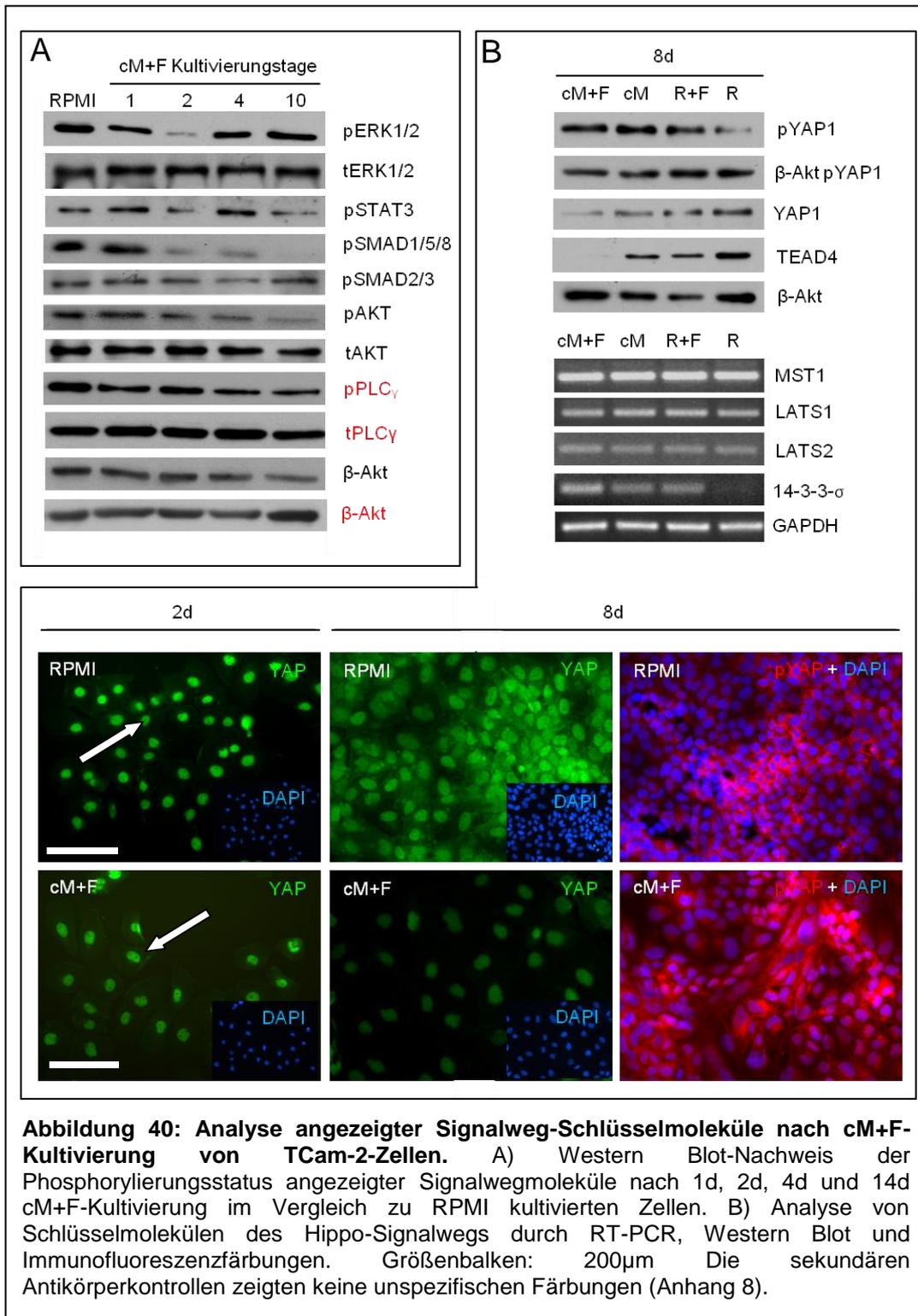
In den unterschiedlichen Zelltypen des Körpers und in vielen Tumorzellen ist die Zytokeratinexpression individuell verschieden. Veränderungen in diesem Expressionsmuster können Auskunft über die Richtung eines Differenzierungsprozesses geben. Eine starke CK7-Expression kann in Synzytiotrophoblastzellen und Chorionkarzinom-Zelllinien gefunden werden (Maldonado-Estrada et al., 2004), auch Koi et al. zeigten auf, dass 95% ihrer isolierten murinen Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen CK18 positiv waren (Koi et al., 2002). CK18- und CK19-Expression wurde in Chorionkarzinomen, Dottersacktumoren und Teratomen nachgewiesen (Lifschitz-Mercer et al., 1991). CK19-Expression konnte zusätzlich an den Differenzierungsgrad von Keimzelltumoren korreliert werden. Je differenzierter der Tumor desto höher die CK19-Expression. Aus diesem Grund wurde das Zyto-



keratinexpressionsmuster nach achttägiger cM+F- und RPMI-Kultivierung durch Immunofluoreszenzfärbungen untersucht (Abb. 39). Während der cM+F-Kultivierung kam es zu einer Induktion der CK7-, CK18-, CK19- und CK20-Expression. Die CK8-Expression blieb, im Vergleich zu RPMI kultivierten Zellen unverändert. CK14- und CK17-Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die veränderten Zytokeratinexpressionen zeigen, dass die TCam-2-Zellen differenzieren.

3.4.6.1 Signalweganalyse in TCam-2-Zellen nach cM+F-Kultivierung

Die Phosphorylierung von intrazellulären Rezeptordomänen oder von Signalwegmolekülen führt zu deren Aktivierung und letztendlich zur Signaltransduktion in die Zelle. Daher wurden die Phosphorylierungszustände unterschiedlicher zellulärer Signalwege während eines vierzehntägigen cM+F-Kultivierungszeitraums untersucht (Abb. 40 A, B, C). So sollten Rückschlüsse auf Signalwege gezogen werden, die durch Kultivierung der TCam-2-Zellen in cM+F-Medium aktiviert wurden. Es wurden sowohl sehr frühe (4h, 8h, 14h) als auch späte (24h, 48h, 4d, 14d) Zeitpunkte untersucht (Anhang 11) (Abb. 40A). Zwischen vier und vierzehn Stunden nach Kultivierungsbeginn konnten keine Veränderungen in der Phosphorylierung der untersuchten Proteine nachgewiesen werden (Anhang 11). 24 Stunden nach cM+F-Kultivierungsbeginn konnten erste Unterschiede detektiert werden (Abb. 40A). Der Phosphorylierungsgrad des MAP-Kinase-Signalwegmoleküls ERK1/2 (pERK1/2) nahm innerhalb von zwei Tagen nach Kultivierungsbeginn deutlich ab. Anschließend stieg die Phosphorylierung wieder auf das Ausgangsniveau an. Die Gesamtmenge des unphosphorylierten ERK1/2 (tERK1/2) Proteins blieb hingegen während des analysierten Zeitraums unverändert. Auch die Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) zeigte ein Minimum am zweiten Tag und normalisierte sich anschließend wieder. Demnach könnte die Verminderung der ERK1/2- und STAT3-Phosphorylierung an Tag 2 der Differenzierung Auswirkungen auf die Aktivität anderer Signalmoleküle haben. Die Aktivität der SMAD1/5/8-Moleküle (pSMAD1/5/8), welche in BMP vermittelte Signaltransduktion involviert sind (Heldin et al., 1997; Massagué et al., 1998) fiel ab Tag 2 deutlich ab. SMAD2/3-Proteine sind in der TGF- β /Aktivin/Nodal vermittelten Signalkaskade eingebunden.



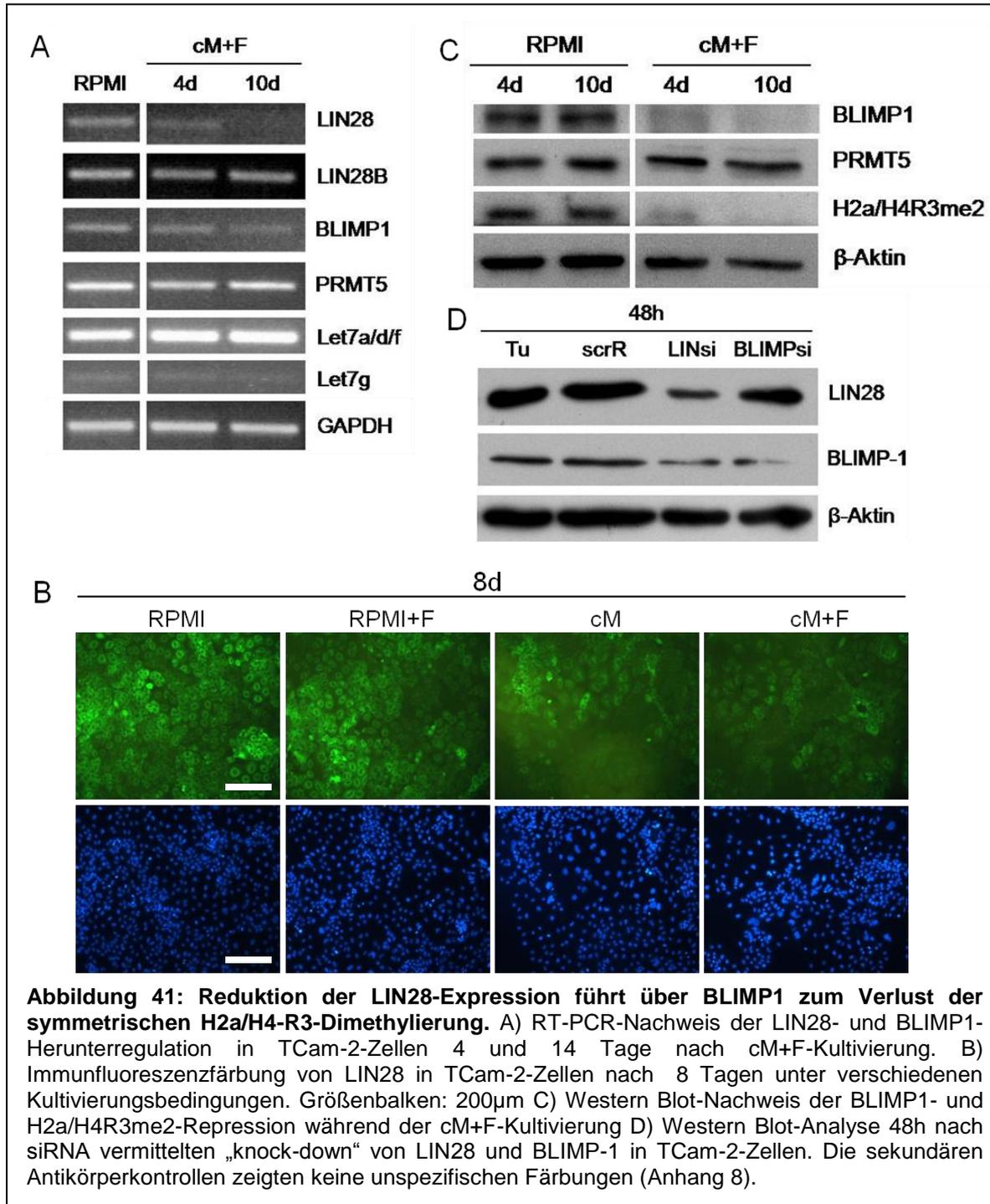
Deren Phosphorylierungszustand (pSMAD2/3) veränderte sich während des analysierten Zeitraums nicht. Die Aktivität von AKT1 (pAKT1) und PLC- γ (PhosphoholipaseC-gamma) (pPLC γ) nahm über den zehntägigen Analysezeitraum nur leicht ab.

Der Hippo-Signalweg kontrolliert das Organwachstum, induziert Kontaktinhibition bei Erreichen der Zellkonfluenz und wird als pathogener Faktor in der Krebsentwicklung diskutiert. Desweiteren ist dieser Signalweg in der Lage proapoptische Signale zu transduzieren (Zeng et al., 2008; Downward et al., 2008). Ein Schlüsselmolekül des Hippo-Signalwegs ist YAP1. Im aktiven Zustand ist YAP1 im Zellkern lokalisiert und fungiert dort als Transkriptionsfaktor. Eine Inaktivierung erfolgt im Zytoplasma durch Phosphorylierung von YAP1 mit Hilfe von 14-3-3-Proteinen. Durch einen Western Blot konnte gezeigt werden, dass die YAP1-Phosphorylierung (pYAP) in den differenzierten Zellen (cM+F, cM) deutlich erhöht, während die Menge des unphosphorylierten YAP1-Proteins in diesen erniedrigt war (Abb. 40B). Auch die Expression des YAP-Zielproteins TEAD4 war in den cM+F kultivierten TCam-2-Zellen deutlich vermindert (Nishioka et al., 2009) (Abb. 40B). Durch eine RT-PCR basierte Analyse konnten unveränderte Transkriptmengen der Hippo-Signalweg-Schlüsselmoleküle MST1, LATS1 und LATS2 nachgewiesen werden (Abb. 40B). Diese Moleküle stehen oberhalb von YAP1 in der Signalkaskade (Zeng et al., 2008). Zudem konnte eine Hochregulation von 14-3-3- σ in den differenzierten Zellen detektiert werden, weiterhin sind auch Proteine der 14-3-3-Familie in der zytoplasmatischen Retention und Phosphorylierung des YAP1-Proteins involviert (Zeng et al., 2008). Eine Immunfluoreszenzfärbung verdeutlichte, dass in cM+F und RPMI kultivierten TCam-2 die YAP1-Expression nach zweitägiger Kultivierung noch deutlich nukleär nachweisbar war (Abb. 40B, weißer Pfeil). Im Laufe der *in vitro*-Kultivierung wurde jedoch eine verminderte Menge des unphosphorylierten YAP1-Proteins in den cM+F kultivierten Zellen gefunden (Abb. 40B, cM+F YAP d8). Parallel dazu stieg der Phosphorylierungsgrad von YAP1 deutlich an (Abb. 40B, cM+F d8 pYAP+DAPI). Diese Daten deuten darauf hin, dass der Hippo-Signalweg während der Differenzierung der TCam-2-Zellen aktiviert wird und für die verminderte Proliferationsrate der cM+F kultivierten Zellen verantwortlich sein könnte.

3.4.6.2 Verlust der H2a/H4R3 Dimethylierung durch Reduktion der LIN28- und BLIMP1-Expressionen

Lin28 und Blimp1 regulieren die Entwicklung muriner primordialer Keimzellen *in vivo* und *in vitro* (West et al., 2009). Beide Proteine sind auch in humanen Keimzelltumoren wie Seminomen und embryonalen Karzinomen exprimiert (West et

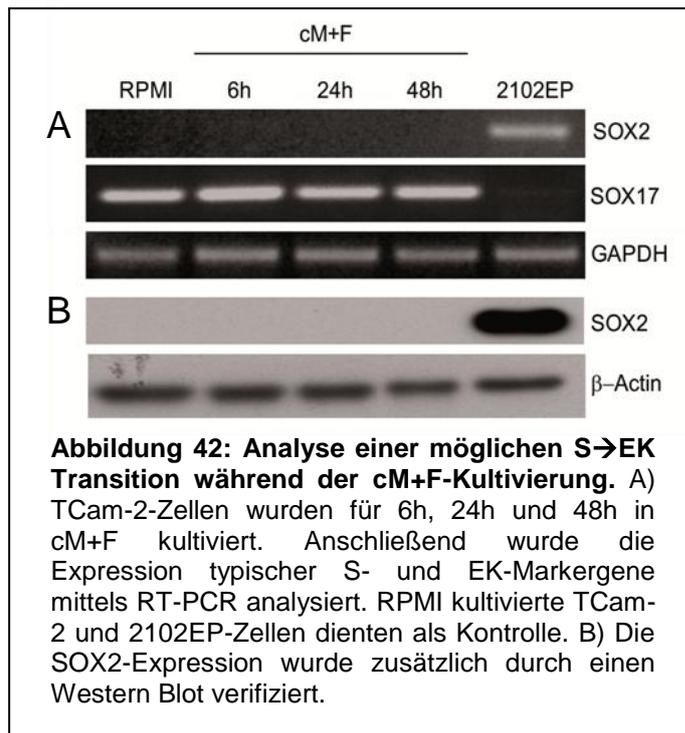
al., 2009). Es wurde gezeigt, dass Blimp1 von Lin28 über die let7 miRNS-Familienmitglieder negativ reguliert werden kann. Blimp1 und Prmt5 etablieren im Zellkern eine symmetrische Dimethylierung des Arginin 3 an den Histonen H2a und H4. Dadurch werden somatische Differenzierungsprogramme reprimiert (Ancelin et al., 2006). Auch in TCam-2-Zellen kolokalisieren BLIMP1 und PRMT5 im Zellkern (Eckert et al., 2008). Während der cM+F-Kultivierung kam es nach vier Tagen zu ei-



ner Reduktion der LIN28-Expression (Abb. 42A). Nach zehntägiger Differenzierung konnte kein LIN28-Transkript mehr nachgewiesen werden (Abb. 41A). Die Expression der LIN28-Isoform LIN28B blieb dabei unverändert (Abb. 41A). Auch BLIMP1 wurde herunterreguliert (Abb. 41A), während sich die Transkriptmengen von PRMT5 und der pri-let7a/d/f/g-miRNS nicht veränderten (Abb. 41A). Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die LIN28-Expressionsreduktion in den differenzierten Zellen bestätigt werden (Abb. 41B). Die Reduktion der BLIMP1-Expression und die unveränderte PRMT5-Expression wurden zusätzlich durch einen Western Blot nachgewiesen (Abb. 41C). Es wurde gezeigt, dass die symmetrische H2a/H4R3-Dimethylierung (H2a/H4R3me2s) zeitgleich mit der BLIMP1-Expression aufgehoben wurde (Abb. 41C). Im murinen System steht Lin28 oberhalb von Blimp1 in der Signalkaskade (West et al., 2009). Durch einen siRNS basierten, transienten LIN28- oder BLIMP1-„knock down“ in TCam-2-Zellen sollte überprüft werden, ob dies auch im humanen System der Fall ist. Da ein LIN28-„knock down“ zeitgleich zu einer Reduktion der BLIMP1-Expression führte, umgekehrt dies jedoch nicht detektiert wurde schien dies so zu sein (Abb. 41D). Durch den Verlust der H2a/H4R3me2s könnte die Induktion somatischer Differenzierungsprogramme begünstigt werden.

3.4.7 Während der TCam-2-Differenzierung kommt es nicht zu einer Transition zu einem embryonalen Karzinom

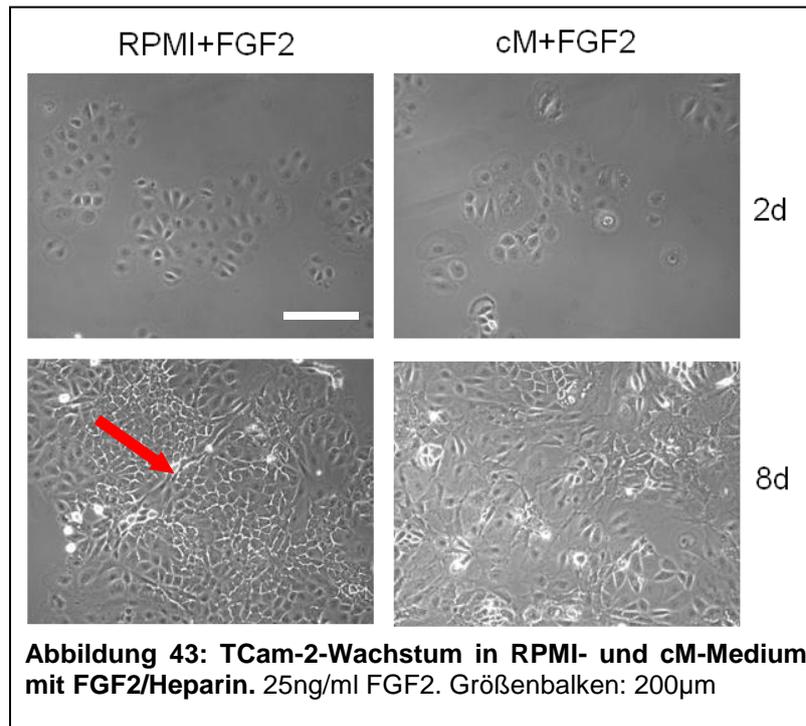
Seminomzellen könnten in der Lage sein zu einem embryonalen Karzinom zu transitieren und so ein vergleichbares Differenzierungspotential erlangen. Um eine mögliche „Seminom zu embryonalen Karzinom Transition“ (S→EK) nachzuweisen, wurde die Expression typischer Seminom- und EK-Marker mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Da sich bereits nach zweitägiger cM+F-Kultivierung morphologische Anzeichen einer Differenzierung zeigten, wurde davon ausgegangen, dass eine Transition zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen sein müsste (Anhang 12). Aus diesem Grund wurden die Zellen zu sehr frühen Zeitpunkten untersucht (6h, 24h und 48h nach cM+F-Kultivierungsbeginn) (Abb. 42). Klassische Seminome exprimieren kein SOX2, dafür aber SOX17. Embryonale Karzinome exprimieren hingegen SOX2, aber kein SOX17 (de Jong et al., 2008). Innerhalb des untersuchten Zeitraums konnte keine SOX2-Induktion nachgewiesen werden und auch SOX17 wurde nicht herunterreguliert. (Abb. 42).



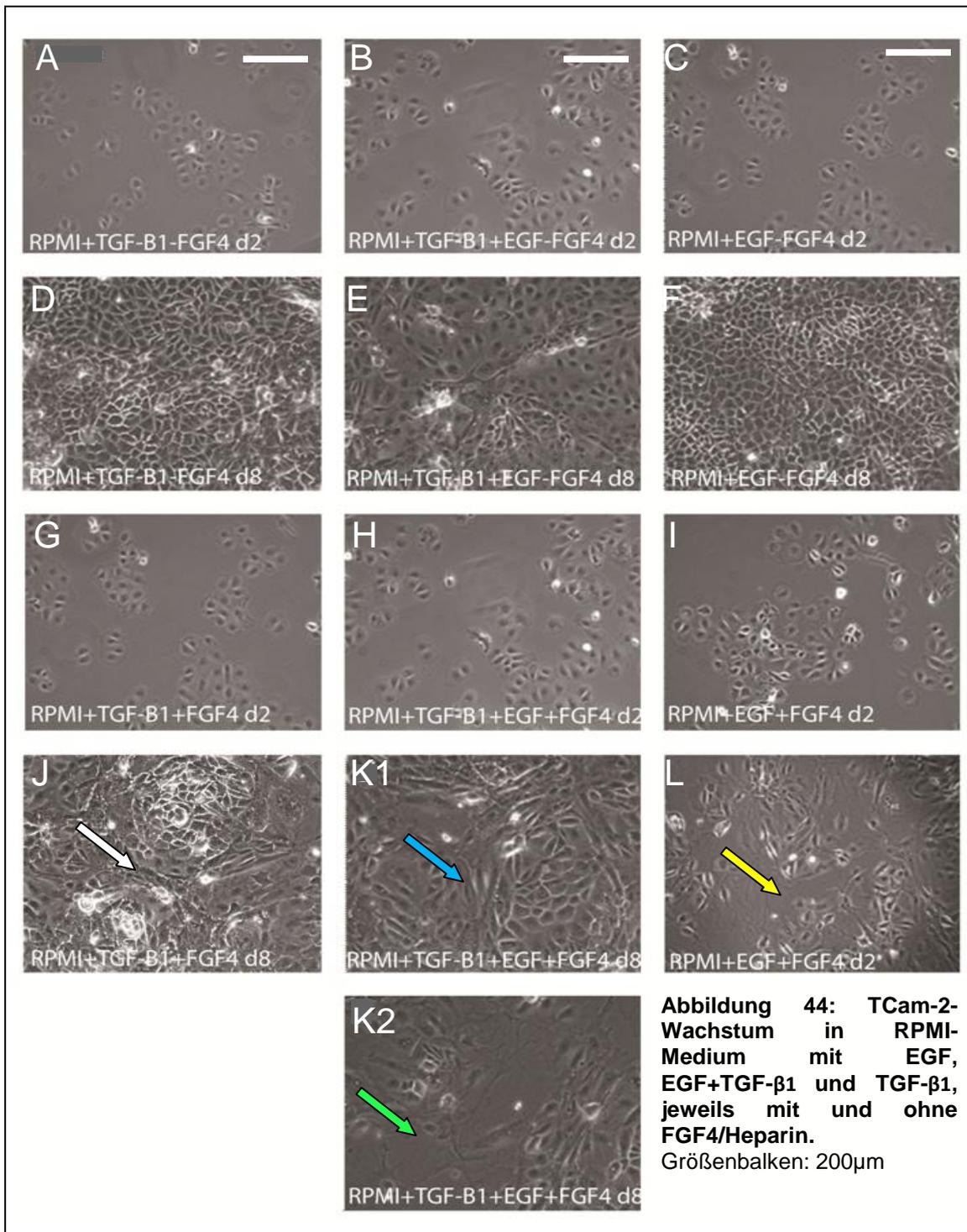
Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse an, dass es während der cM+F Kultivierung zu keiner S→EK kam und die TCam-2-Zellen direkt in ein gemischtes Nicht-Seminom differenzieren.

3.4.8 Identifizierung differenzierungsauslösender Wachstumsfaktoren

Zuvor wurde gezeigt, dass das cM-Medium die Differenzierung der TCam-2-Zellen induziert. Zusätzlich war die proliferative Aktivität der Zellen nach cM- und cM+F-Kultivierung vermindert und FGF4 wurde für die Initiation und Ausbildung der zellulären netzwerkartigen Strukturen sowie für den erhöhten Anteil multinukleärer Zellen verantwortlich gemacht. Es galt nun Wachstumsfaktoren zu identifizieren, die im konditionierten Medium enthalten sind und für die zuvor beschriebenen Effekte mitverantwortlich sein könnten. Dazu wurden TCam-2-Zellen in RPMI-Medium kultiviert, dem zusätzliche Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, EGF, BMP4, FGF2, und PDGF) alleine und in Kombinationen mit FGF4/Heparin zugegeben wurden. Zunächst wurde auf morphologische Veränderungen geachtet. Kultivierung der TCam-2-Zellen in RPMI-Medium mit BMP4 (25ng/ml) oder PDGF α (25ng/ml) führte zu keinen morphologischen Veränderungen, auch der Zusatz von FGF4/Heparin bewirkte dies nicht (siehe Anhang 13).

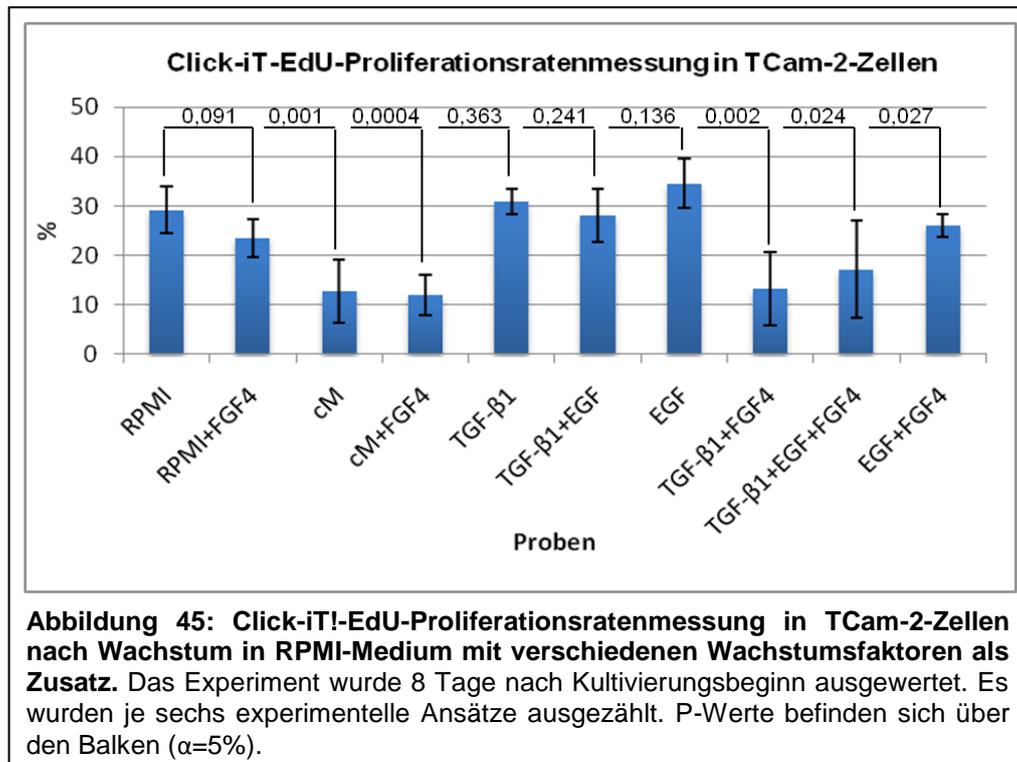


Die Kultivierung in RPMI mit FGF2/Heparin (25ng/ml) führte zu annähernd dem gleichen Phänotyp wie Wachstum in RPMI mit FGF4/Heparin, das heißt, es konnte die Initiation netzwerkartiger Strukturen beobachtet werden (Abb. 43, roter Pfeil). Somit stellte sich die Frage, ob FGF2 in der Lage ist, den gleichen morphologischen Phänotyp wie cM+F Kultivierung auszuprägen. Dies wurde durch die Kultivierung in cM und FGF2/Heparin bestätigt (Abb. 43). Acht tägige Kultivierung von TCam-2-Zellen in RPMI mit TGF- β 1 (25ng/ml) oder EGF (100ng/ml) oder TGF- β 1+EGF führte zu keinen morphologischen Veränderungen (Abb. 44 A-F). Wurden die Zellen im RPMI-Medium mit TGF- β 1 und FGF4/Heparin kultiviert, kam es zur Ausbildung netzwerkähnlicher Strukturen (Abb. 44 G, J, weißer Pfeil). Die Zugabe von EGF und FGF4/Heparin führte nach acht Tagen zu einer extremen Größenzunahme der Zellen (Abb. 44 I, L, gelber Pfeil). Die stark vergrößerte Morphologie dieser Zellen ist vergleichbar mit der Morphologie cM und cM+F kultivierter TCam-2-Zellen (Abb. 32 A, B). Die Kombination aus TGF- β 1+EGF+ FGF4/Heparin führte sowohl zur Größenzunahme als auch zur Ausbildung der Netzwerkstrukturen (Abb. 44 K1, K2). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine kombinatorische Kultivierung in TGF- β 1+EGF+FGF4/Heparin in der Lage ist den cM+F induzierten Phänotyp auszuprägen. Die Kultivierung von TCam-2-Zellen in RPMI-Medium mit Heparin führte zu keinerlei morphologischen Veränderungen und verdeutlichte, dass Heparin für die beobachteten Effekte nicht verantwortlich war. (Anhang 14).



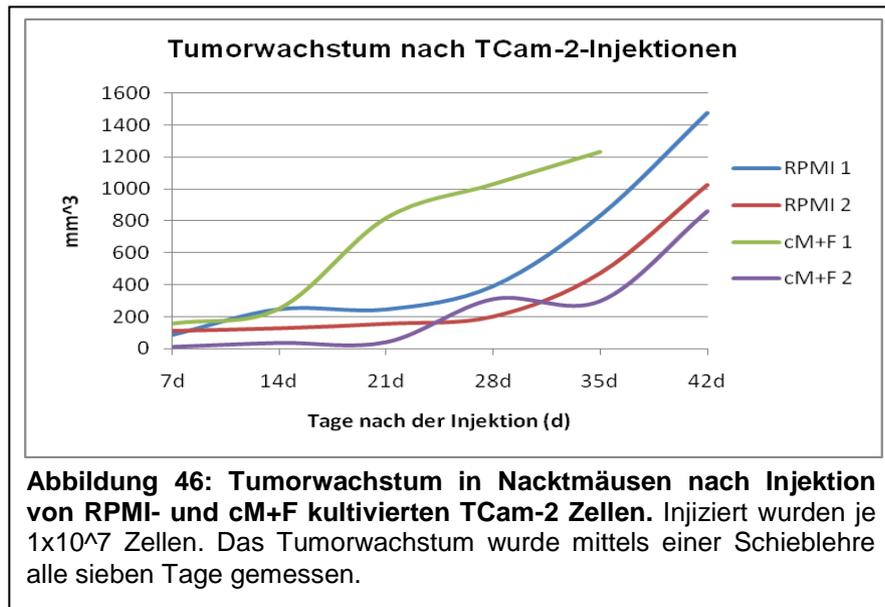
Eine Bestimmung der Proliferationsraten ergab, dass eine Kultivierung in RPMI mit TGF- β 1 oder EGF oder TGF- β 1+EGF im Vergleich zu RPMI kultivierten Zellen keine Veränderung der proliferativen Aktivität bewirkt (Abb. 45). Erst die Kultivierung von TGF- β 1 oder TGF- β 1+EGF mit FGF4/Heparin führte zu einer vergleichbaren Reduktion der Proliferationsrate wie cM- und cM+F-Kultivierung (Abb. 45). Das Wachstum in RPMI+EGF+FGF4/Heparin bewirkte eine vergleichbare Verminderung der Proliferationsrate wie RPMI+F-Kultivierung (Abb. 45). Diese Ergebnisse lassen

vermuten, dass TGF- β 1 und FGF4/Heparin die Proliferationsrate von TCam-2-Zellen synergistisch reduzieren können und das TGF- β 1, EGF und FGF4 für die morphologischen Veränderungen der TCam-2-Zellen verantwortlich sind.

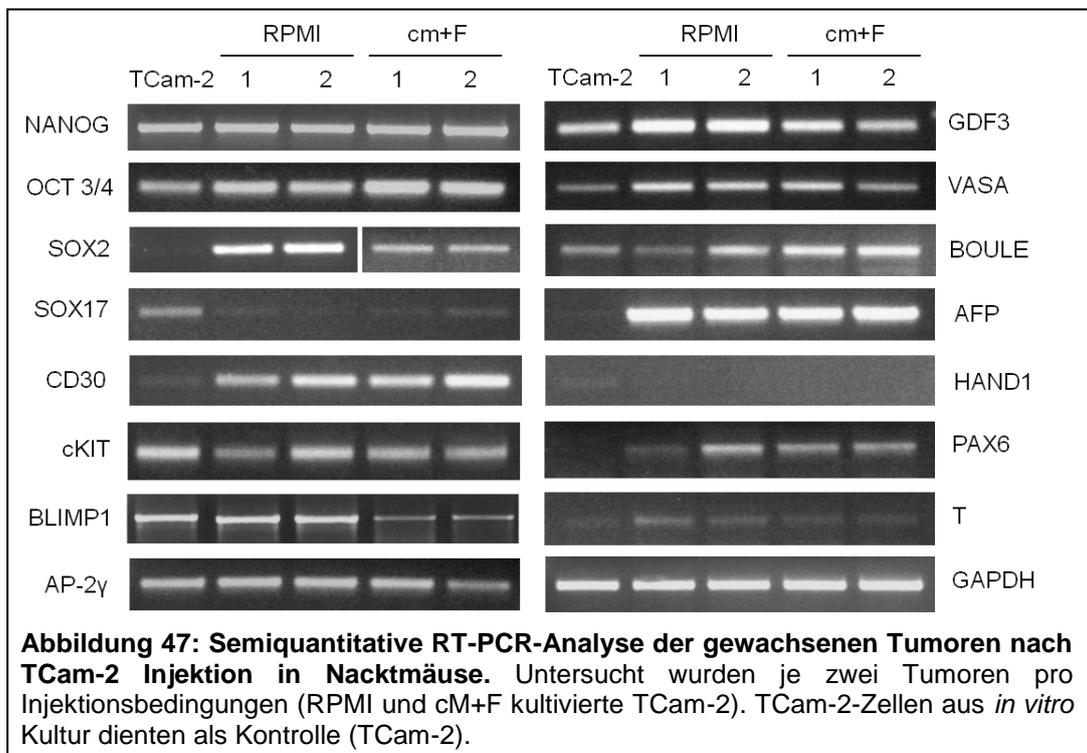


3.4.9 *In vivo*-Injektion von TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen

Durch Injektion der undifferenzierten und differenzierten TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen sollte die Tumorigenität der Zellen geprüft werden. Vor der Injektion wurden die TCam-2-Zellen für acht Tage in RPMI- und in cM+F-Medium kultiviert. Die TCam-2-Zellen wurden in „Matrigel“ eingebettet in die Flanke von je drei Nacktmäusen injiziert. Das Tumorstadium wurde regelmäßig mit Hilfe einer Schieblehre gemessen (Abb. 46). Nach drei Wochen (in einem Fall bereits nach zwei Wochen (cM+F1)) konnte eine deutliche Zunahme der Tumorstadium gemessen werden. Nach maximal 42 Tagen wurden die Tumoren präpariert. Durch eine anschließende semiquantitative RT-PCR konnte eine Induktion von SOX2 und CD30 und eine Herunterregulation von SOX17 in allen Tumorstadium nachgewiesen werden (Abb. 47). Die Expression von Pluripotenzmarkern, wie NANOG, OCT3/4 und GDF3, konnte in allen untersuchten Tumorstadium detektiert werden (Abb. 47).



Auch keimzelltypische Marker wie AP-2 γ , cKIT, BLIMP1, VASA und BOULE konnten sowohl nach Injektion RPMI als auch cM+F kultivierter TCam-2-Zellen detektiert werden (Abb. 47). Zusätzlich konnte die Expression des ektodermalen Markers AFP, des endodermalen Markers PAX6 sowie des mesodermalen Markergens BRACHYURY (T) beobachtet werden.



Neben der RT-PCR-Analyse wurden die Tumorgewebe durch Immunhistochemie angefärbt. Morphologisch zeigten sich die Tumorzellen als kleine, polygonale, eng

wachsende Zellen mit großem Zellkern (Abb. 48, HE). Das Zytoplasma war in vielen Zellen eosinophil und fein granulär (Abb. 48, hellblaue Pfeile), es zeigten sich aber auch Zellen mit klarem Zytoplasma (Abb. 48, gelbe Pfeile). Die Zellverbände waren

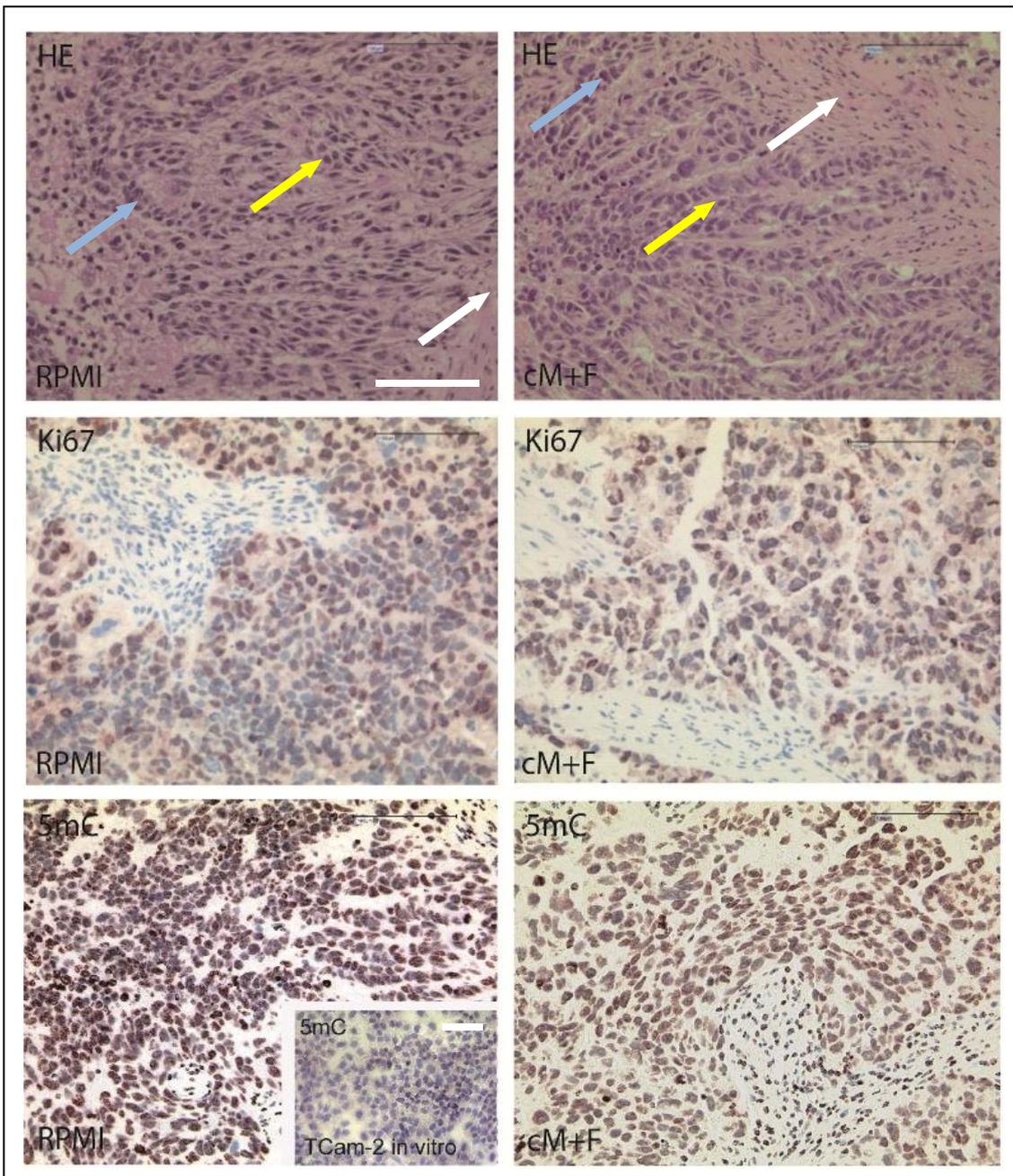
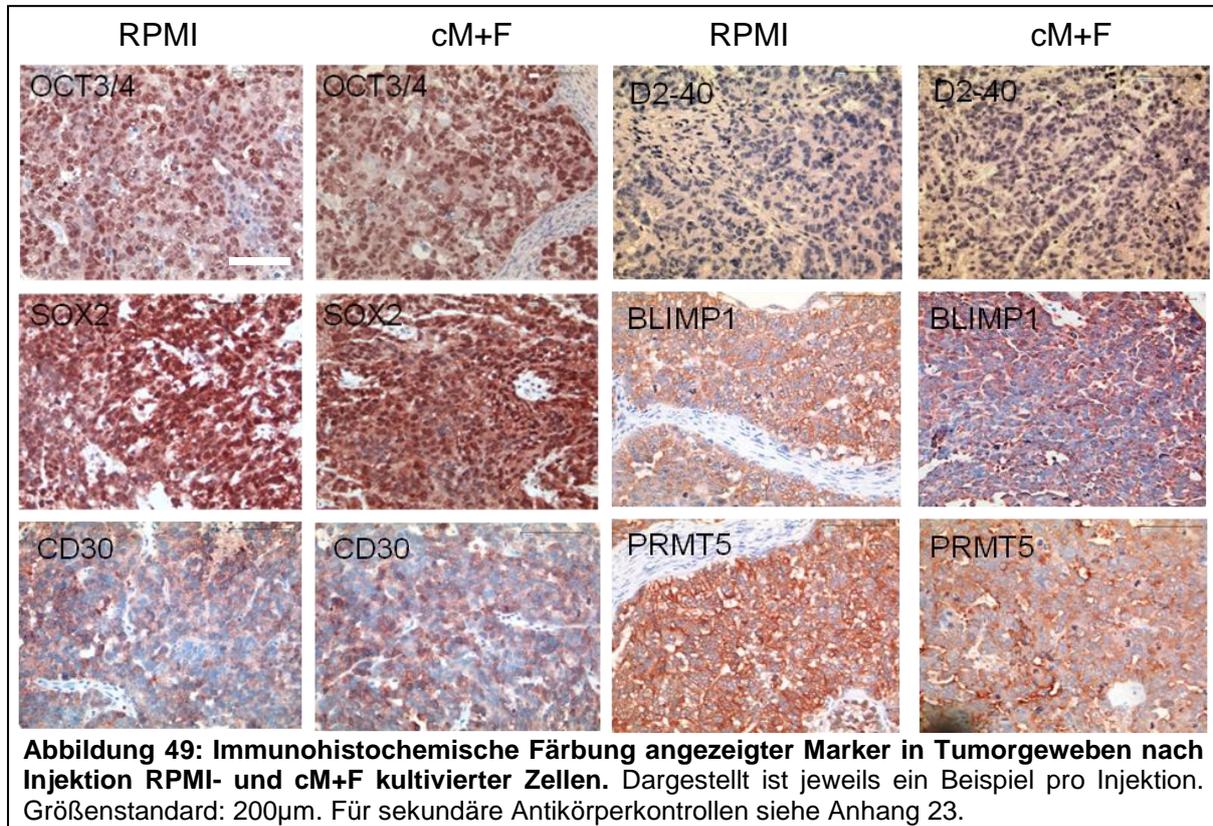


Abbildung 48: HE- und immunohistochemische Färbungen der Tumorgewebe nach Injektion von RPMI und cM+F kultivierten TCam-2-Zellen in Nacktmäuse. Durch die HE-Färbung (HE) konnten morphologische Besonderheiten hervorgehoben werden. Die proliferative Aktivität der Tumorzellen wurde durch eine Ki67 (Ki67)-Färbung nachgewiesen. Durch einen 5-methyl-Cytosin spezifischen Antikörper (5mC) wurde eine globale Hypermethylierung der Tumorzellen nachgewiesen. Dargestellt ist jeweils ein Beispiel pro Injektion. Größenbalken: 200µm. Für sekundäre Antikörperkontrollen siehe Anhang 15.

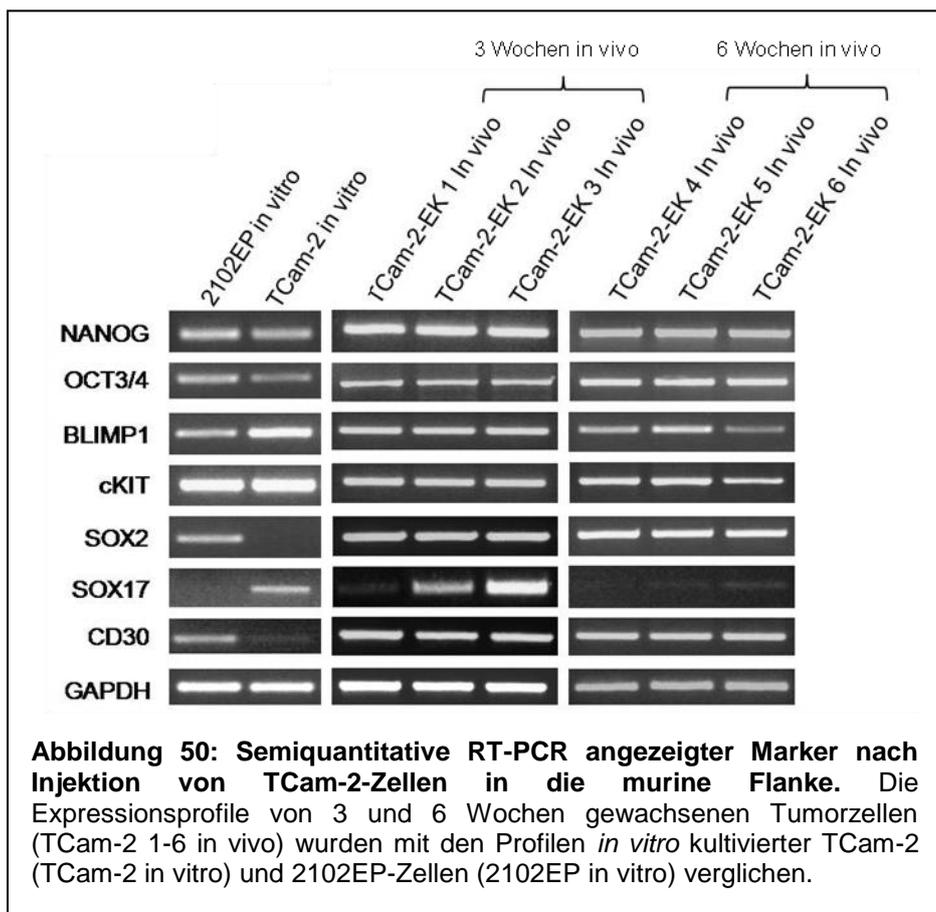
vereinzelt von Bindegewebe durchzogen (Abb. 48, HE, weiße Pfeile). Die zellulären Begrenzungen waren teilweise sehr schwierig auszumachen. Diese morphologischen

Charakteristika sind typisch für embryonale Karzinomzellen (Krag Jacobsen et al., 1989). Eine immunohistochemische Ki67-Färbung (Abb. 48, Ki67) zeigte, dass die Tumorzellen stark proliferativ waren. Globale DNS-Hypermethylierung ist charakteristisch für nicht-seminomatöse Keimzelltumoren, inklusive embryonalen



Karzinomen. Die DNS der Seminome ist dagegen global hypermethyliert (Lind et al., 2007). Eine immunohistochemische Färbung der globalen DNS-Methylierung zeigte, dass die Tumorzellen im Vergleich zu *in vitro* kultivierten TCam-2 global stark methyliert waren (Abb. 48, 5mC). Zusätzlich konnte die Expression von OCT3/4, SOX2 und CD30 in allen Tumorgeweben immunohistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 49, OCT3/4, SOX2, CD30). Die Expression des Seminom-Markers D2-40 war nicht nachweisbar (Abb. 49, D2-40). Das BLIMP1- und PRMT5-Protein konnte nur zytoplasmatisch nachgewiesen werden (Abb. 49, BLIMP1, PRMT5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *in vivo*-Injektion undifferenzierter und differenzierter TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen zu Tumoren vom Typ embryonalen Karzinom führte. Um die zeitliche Dauer der *in vivo*-Transition von TCam-2-Zellen genauer einzugrenzen, wurden undifferenzierte Zellen in die Flanke von Nacktmäusen injiziert. Nach drei- und sechswöchigem *in vivo*-Wachstum wurden die Tumorzellen isoliert und untersucht. Die Expressionen von NANOG, OCT3/4,

BLIMP1 und cKIT konnten in allen untersuchten Proben zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden (Abb. 50). Die drei Wochen *in vivo* gewachsenen Tumorzellen exprimierten SOX2 und CD30 sowie SOX17. Nach sechswöchigem *in vivo*-Wachstum war keine SOX17-Expression mehr nachweisbar. Das Expressionsprofil dieser Zellen war vergleichbar mit dem der embryonalen Karzinom-Zelllinie 2102EP (Abb. 50). Durch Immunohistochemie wurde die Zellmorphologie untersucht (Abb. 51). Nach dreiwöchigem *in vivo*-Wachstum konnten noch verbleibende Seminom-Zellen erkannt werden (Abb. 51, TCam-2-EK *in vivo* 1-3, weiße Pfeile). Zusätzlich konnte die Expression von SOX2 und SOX17 nachgewiesen werden. Nach sechswöchigem *in vivo*-Wachstum zeigten die Zellen eine EK typische Morphologie (Abb. 51, HE, TCam-2-EK *in vivo* 4-6). Seminom ähnliche Zellen waren nun nicht mehr zu finden. Die EK-Zellen waren SOX2 positiv und vollständig SOX17 negativ. Parallel zu diesen Experimenten wurden auch 2102EP embryonale Karzinom-Zellen



zum Vergleich in Nacktmäuse injiziert. Nach vierwöchigem Tumorstadium wurden die Tumoren präpariert. Eine HE-Färbung zeigte, dass die Zellen eine EK typische Morphologie besaßen (Anhang 17, HE). Die Ki67-Färbung konnte eine hohe proli-

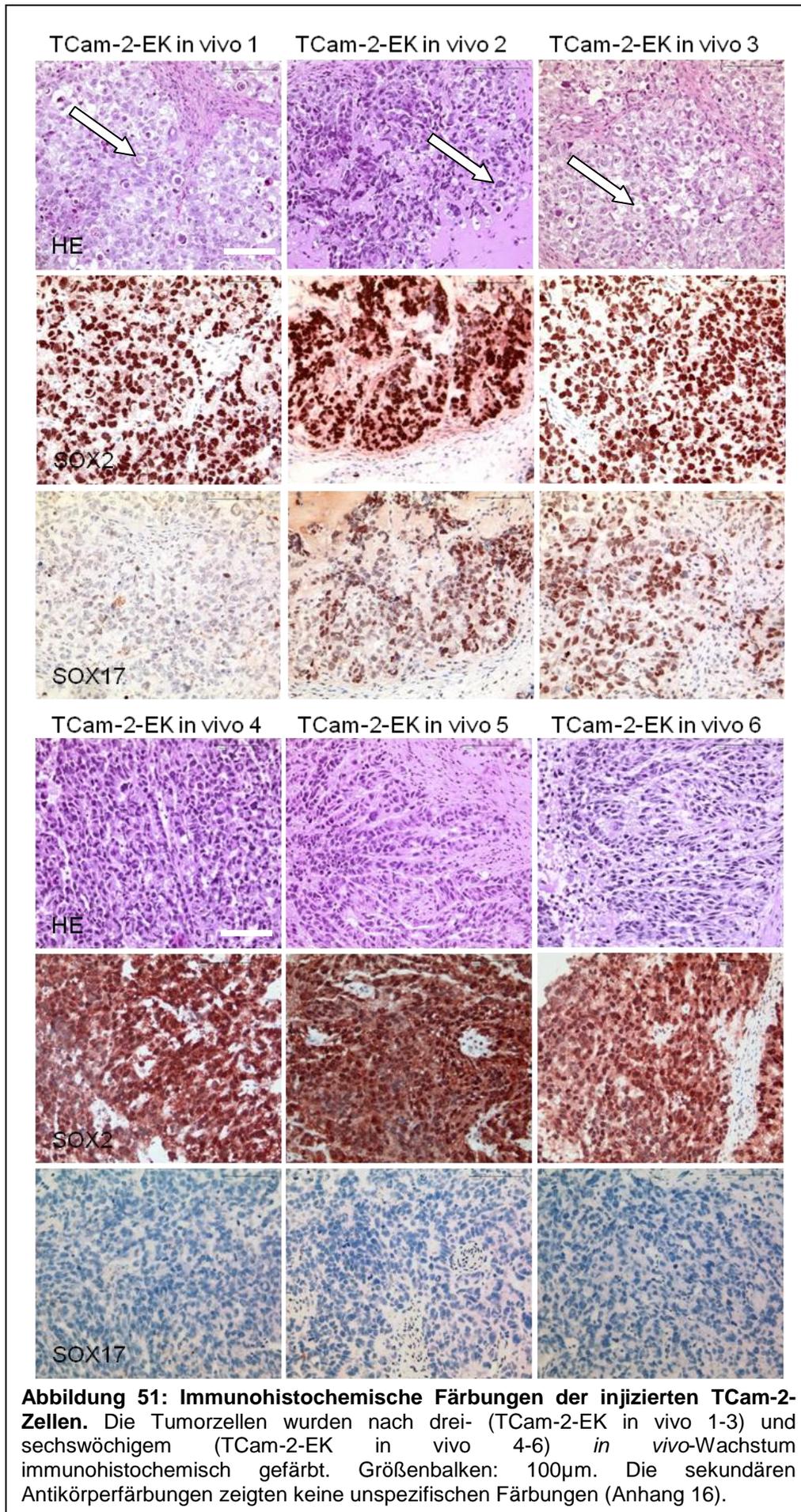


Abbildung 51: Immunohistochemische Färbungen der injizierten TCam-2-Zellen. Die Tumorzellen wurden nach drei- (TCam-2-EK in vivo 1-3) und sechswöchigem (TCam-2-EK in vivo 4-6) *in vivo*-Wachstum immunohistochemisch gefärbt. Größenbalken: 100µm. Die sekundären Antikörperfärbungen zeigten keine unspezifischen Färbungen (Anhang 16).

ferative Aktivität nachweisen (Anhang 17, Ki67). Global zeigte sich die DNS der Tumorgewebe stark methyliert (Anhang 17, 5mC). Die SOX2-, CD30-, BLIMP1- und PRMT5-Proteine wurden durch Immunohistochemie nachgewiesen, wobei die Proteine BLIMP1 und PRMT5 nur zytoplasmatisch detektiert wurden (Anhang 17, SOX2, CD30, BLIMP1, PRMT5). Die Tumorzellen exprimierten sowohl die Pluripotenzgene NANOG und OCT3/4 als auch SOX2 und CD30 (Anhang 18). Weiterhin konnten die Expressionen der Keimzellmarker cKIT, BLIMP1, AP-2 γ und GDF3 nachgewiesen werden. Die Zellen waren negativ für VASA, BOULE, AFP und HAND1. PAX6 und BRACHYURY wurden hingegen in allen untersuchten Proben exprimiert. Dies ist ein Hinweis, dass hier möglicherweise ein teratomatöser Differenzierungsprozess begonnen hatte.

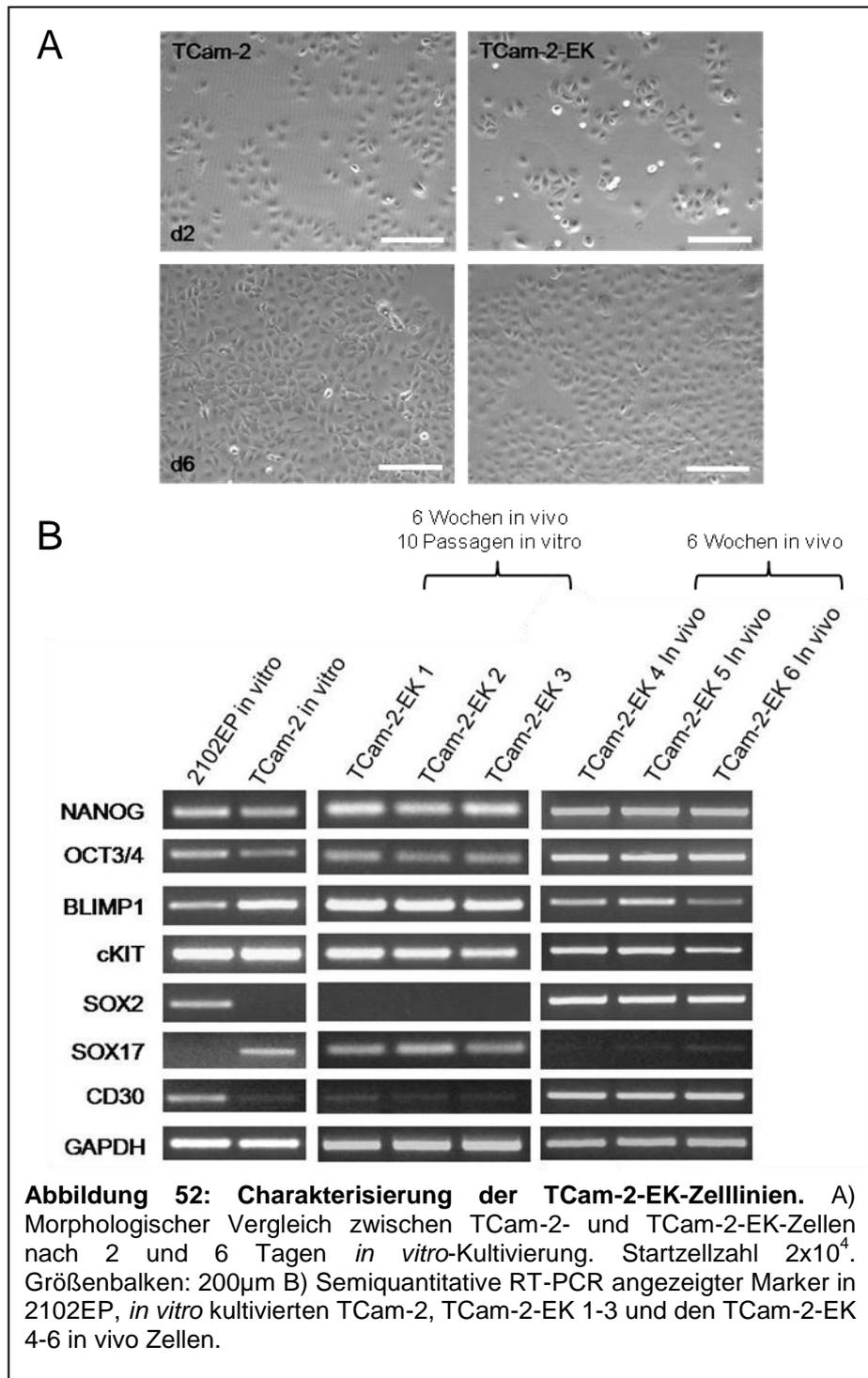
Zusammenfassend verdeutlichten die Resultate der Injektionsexperimente, dass die *in vivo*-Injektion von differenzierten und undifferenzierten TCam-2-Zellen in beiden Fällen zum Wachstum eines EKs führte. Im Gegensatz zum cM+F induzierten *in vitro*-Differenzierungsprozess können die seminomatösen TCam-2-Zellen *in vivo* in der somatischen Umgebung der murinen Flanke in ein EK transitieren. Diese Beobachtungen legten nahe, dass seminomatöse Differenzierungsprozesse von den Wachstumsbedingungen und vom zellulären Mikromilieu abhängen.

3.4.10 *In vitro*-Rekultivierung der *in vivo* erzeugten embryonales Karzinom ähnlichen Zellen

Nun sollte untersucht werden, ob dieser Transitionsschritt reversibel ist und ob die TCam-2-Seminom-Zellen über eine Plastizität verfügen, die es ihnen erlaubt zwischen zwei undifferenzierten Zuständen zu wechseln. Daher wurde ein Teil der sechs Wochen *in vivo* gewachsenen EK-Zellen (siehe Abb. 50, TCam-2-EK *in vivo* 4-6) *in vitro* kultiviert und daraus wieder Zelllinien etabliert (TCam-2-EK 1-3). Die Zelllinien wurden nach zehn Passagen *in vitro*-Kultivierung untersucht. Morphologisch konnten keine Unterschiede zwischen TCam-2- und TCam-2-EK-Zellen festgestellt werden (Abb. 52A). Das Expressionsprofil der neu generierten TCam-2-EK-Zelllinien war identisch mit dem Expressionsprofil *in vitro* kultivierter TCam-2-Zellen (Abb. 52B). Um nachzuweisen, dass es sich bei den Ursprungszellen der TCam-2-EK Zellen um EK-Zellen handelte, wurde ein Teil der frisch isolierten Tumorzellen fünf Stunden nach *in vitro*-Ausplattierung durch Immunofluoreszenz

SOX2 und CD30 gefärbt (Anhang 19). Es konnte sowohl ein SOX2- als auch ein starkes CD30-Signal nachgewiesen werden.

Diese Resultate zeigten, dass die *in vivo*-Transition der TCam-2-Zellen zu einem EK reversibel war. Unter normalen Kulturbedingungen sind TCam-2-Zellen in der Lage, den seminomatösen Charakter der Zelllinie aufrecht zu erhalten oder den EK ähnlich-

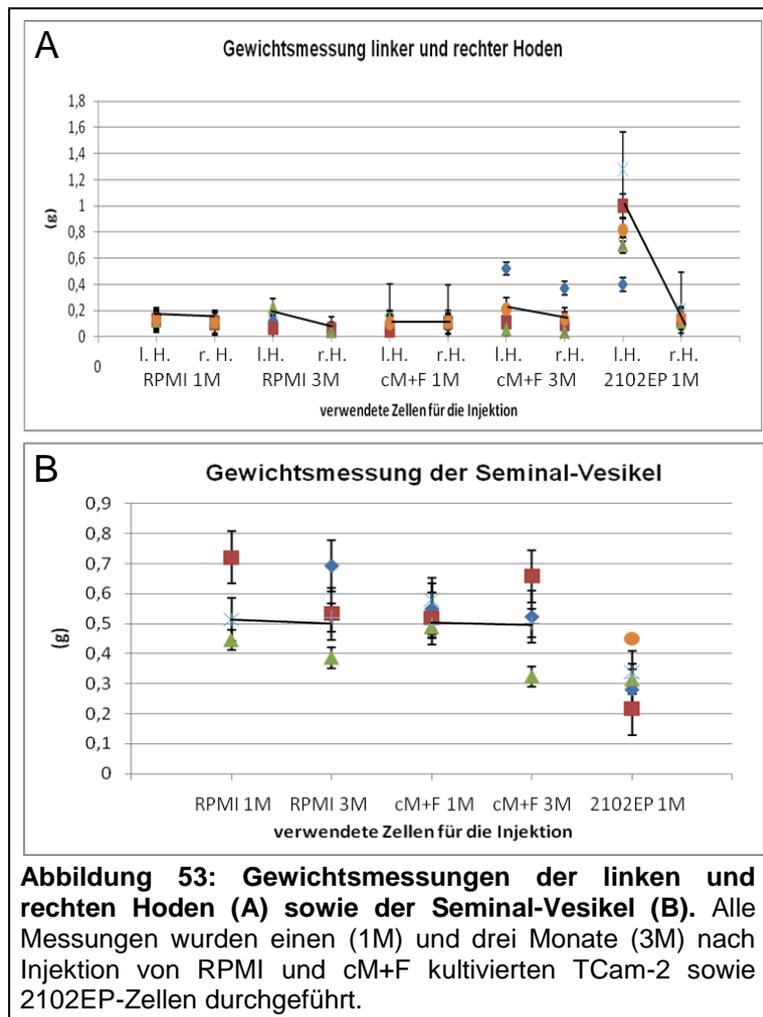


en Zustand der *in vivo*-Tumorzellen in einen seminomatösen Zustand zurückführen. In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, ob *in vitro* differenzierte TCam-2-Zellen (cM+F) ebenfalls in der Lage sind, wieder zu Zellen mit Seminom-Charakter zu revertieren. Dazu wurden TCam-2-Zellen für zwölf Tage unter cM+F Kulturbedingungen differenziert und anschließend für weitere zwölf Tage im Standardwachstumsmedium (RPMI) weiter kultiviert (Anhang 20). cM+F induzierte morphologische Veränderungen konnten durch RPMI-Kultivierung nicht rückgängig gemacht werden. Die differenzierten Zellen behielten ihre stark vergrößerte Zellform bei und auch die netzwerkartigen Strukturen blieben erhalten. Somit induziert die Kultivierung in cM+F-Medium eine irreversible Differenzierung in TCam-2-Zellen.

3.4.11 *In vivo*-Injektion von TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Nacktmäusen

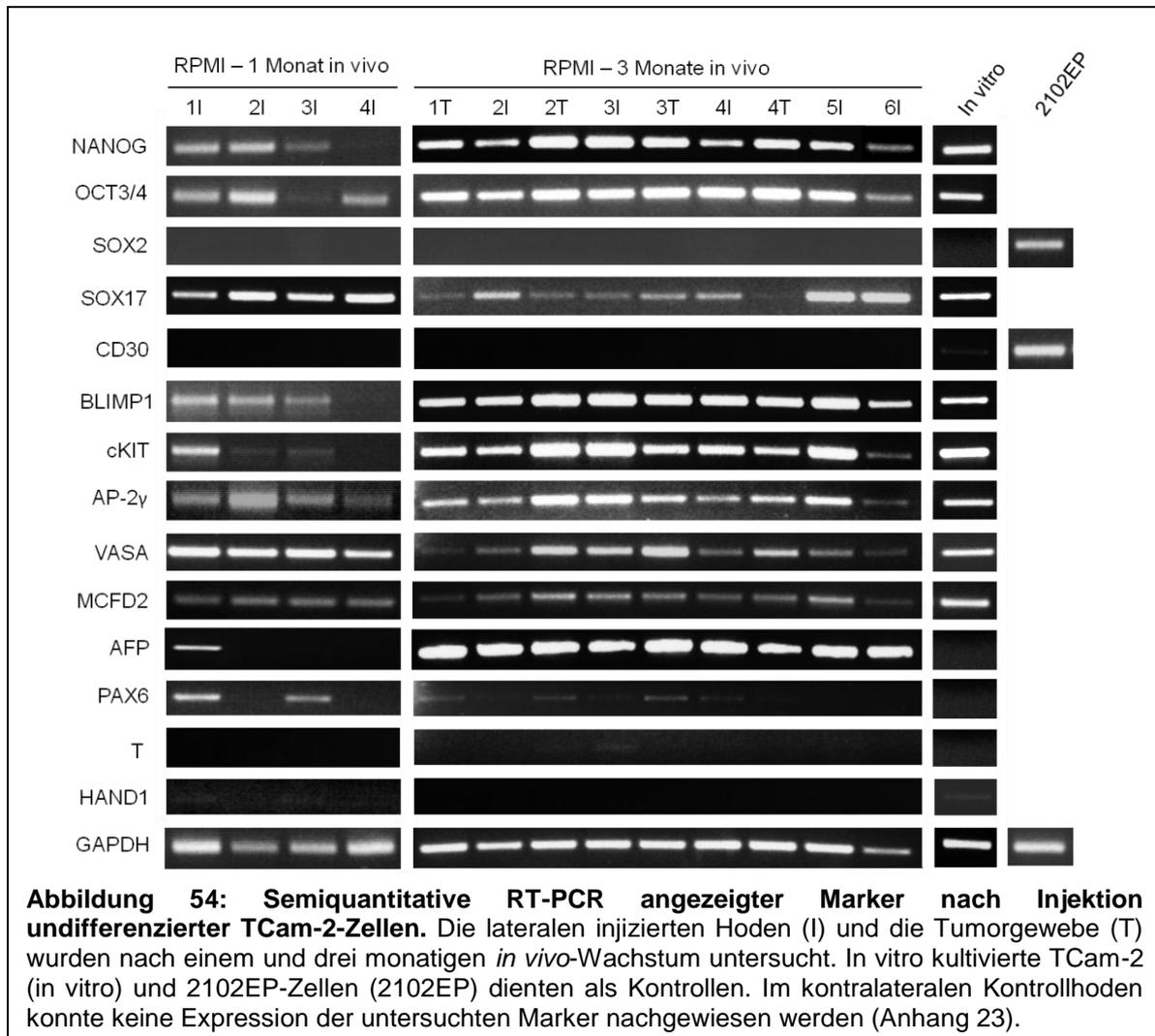
Im folgenden Experiment wurden undifferenzierte und differenzierte TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Busulfan behandelten Nacktmäusen injiziert (Anhang 21). Busulfan ist ein synthetisches Zytostatikum, das Anwendung in der Krebstherapie findet. Die Behandlung der Mäuse mit diesem Alkylans führt nach wenigen Wochen zu einem „Sertoli-Cell-Only“-Syndrom in den Tubuli seminiferi. Durch diese Behandlung der Mäuse wird eine biologische Nische für die TCam-2-Zellen geschaffen. Die Zellen wurden durch den Ductus efferens in die Tubuli Seminiferi injiziert und anhand der Trypan-Blau-Färbung (Anhang 21, blauer Pfeil) konnte der Injektions- und Verteilungsprozess nachvollzogen werden (Anhang 21, rote Pfeile). Nach einem und drei Monaten wurden die Hoden sowie unterschiedliche Organe zur Analyse entnommen. Parallel wurden 2102EP embryonale Karzinomzellen zur Kontrolle injiziert. Die Gewichte der linken (injizierten) Hoden und der rechten Kontrollhoden waren einen Monat nach RPMI und cM+F kultivierten TCam-2-Injektionen nahezu identisch (RPMI: links 0,13g; rechts 0,11g / cM+F: links 0,11g; rechts 0,11g), während die linken Hoden der Tiere mit injizierten 2102EP-Zellen deutlich schwerer waren (2102EP: links 0,81g; rechts 0,14g) (Abb. 53B). Nach dreimonatigen Wachstum waren die linken Hoden nach TCam-2-Injektionen durchschnittlich schwerer (RPMI: links 0,11g; rechts: 0,04g / cM+F: links 0,21g; rechts 0,13g) (Abb. 53B). Zudem fiel auf, dass die Seminal-Vesikel (Samenbläschen) nach Injektion RPMI und cM+F kultivierter Zellen schwerer waren, als nach 2102EP-

Injektion (RPMI: 0,53g; cM+F: 0,5g; 2102EP: 0,32g) (Abb. 53C). Leber, Niere, Magen und Herz konnten makroskopisch als normal befundet werden.



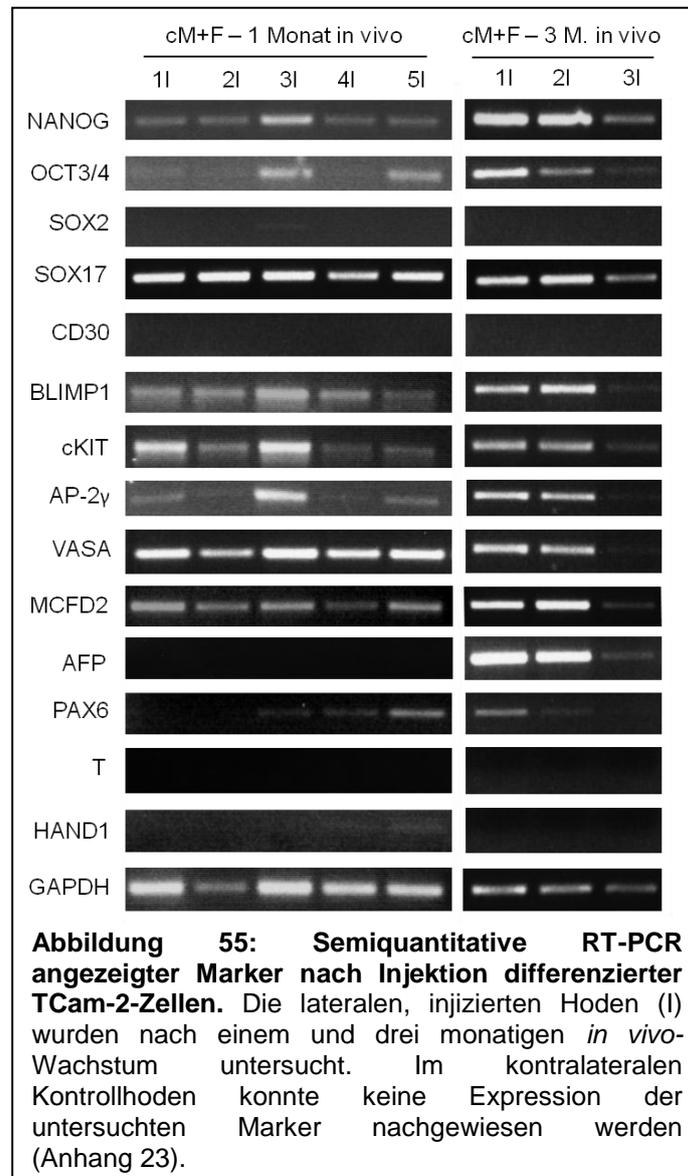
Nach dreimonatigen Wachstum konnte in Mäusen nach Injektion undifferenzierter TCam-2-Zellen Tumorwachstum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bereits einen Monat nach Injektion von 2102EP-Zellen sehr große Tumoren detektiert werden, die bereits die normale Hodenstruktur durchbrochen hatten (Anhang 22). Durch eine semiquantitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung von human spezifischen Oligonukleotiden wurden die Hodengewebe untersucht (Abb. 54). Eine Expression der Pluripotenzmarker NANOG und OCT3/4 sowie der Keimzellmarker BLIMP1, cKIT, AP-2 γ und VASA deutete auf die Präsenz humaner, undifferenzierter, keimzellähnlicher Zellen hin. Die Expression von SOX17 und MCFD2 sowie die Abwesenheit von SOX2- und CD30-Expression zeigte, dass die transplantierten Zellen den Seminom ähnlichen Charakter erhalten hatten, während die

Expressionen von AFP und PAX6 auf differenzierte nicht-seminomatöse Keimzell-tumorgewebe hindeutete.



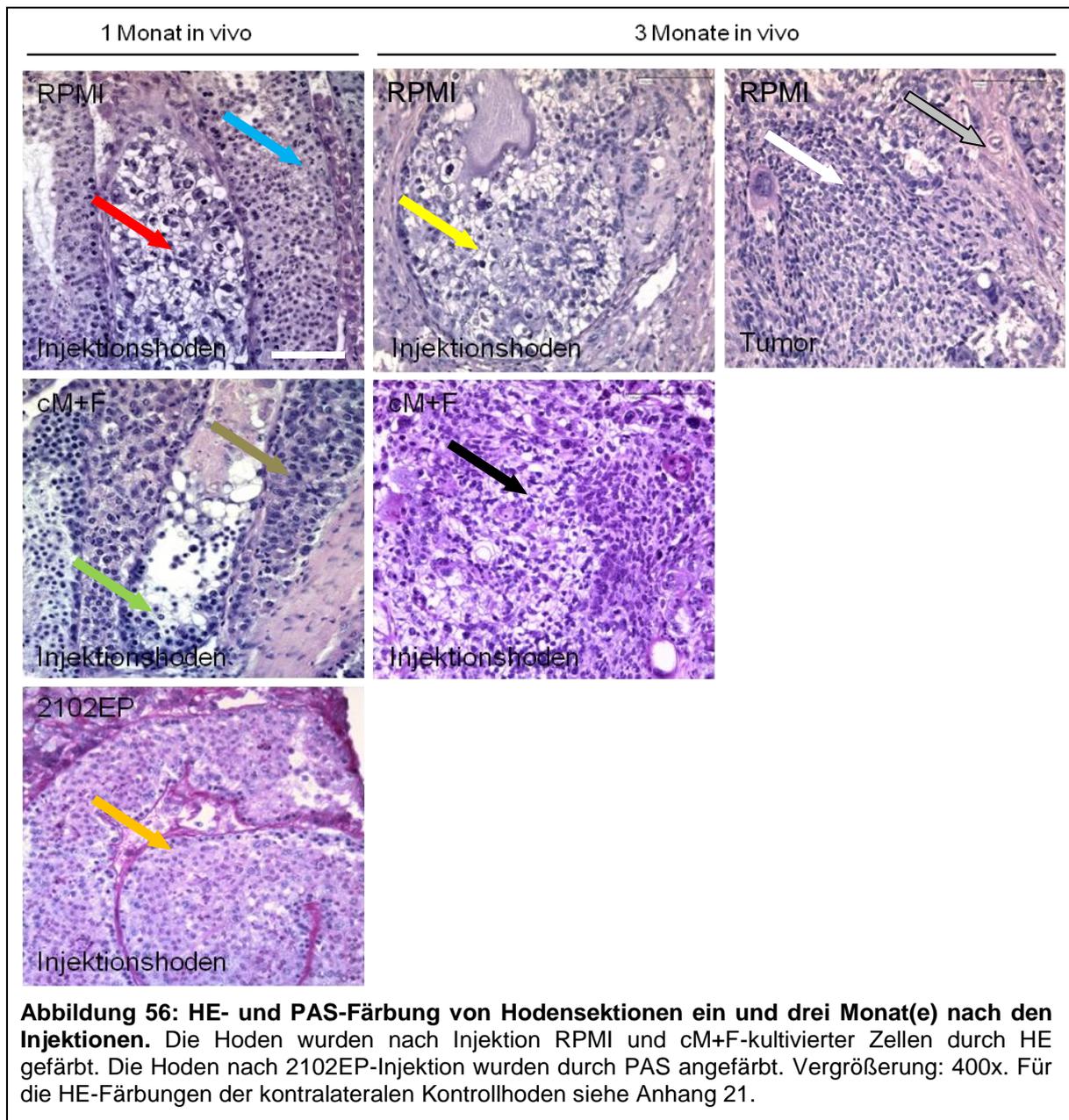
Interessanterweise war das Expressionsprofil nach Injektion differenzierter TCam-2-Zellen nahezu identisch mit dem Profil der injizierten undifferenzierten TCam-2-Zellen (Abb. 55). Die Expression ausgesuchter Marker wurde ebenfalls durch semiquantitative RT-PCR im Hodengewebe nach 2102EP-Transplantation untersucht (Anhang 24). Hier konnte die Expression von Pluripotenz- (NANOG, OCT3/4, SOX2) und Keimzellmarkern (cKIT, BLIMP1, AP-2 γ) nachgewiesen werden, während keine SOX17-Expression gefunden werden konnte. Im Tumorgewebe wurde zusätzlich die Expression der Differenzierungsmarker PAX6 (ektodermal), HAND1 (mesodermal) und AFP (endodermal) detektiert werden. Dies deutet auf einen beginnenden teratomatösen Differenzierungsprozess der Zellen hin. Durch eine HE-/PAS-Färbung

der injizierten Hoden konnten morphologische Besonderheiten hervorgehoben werden (Abb. 56).



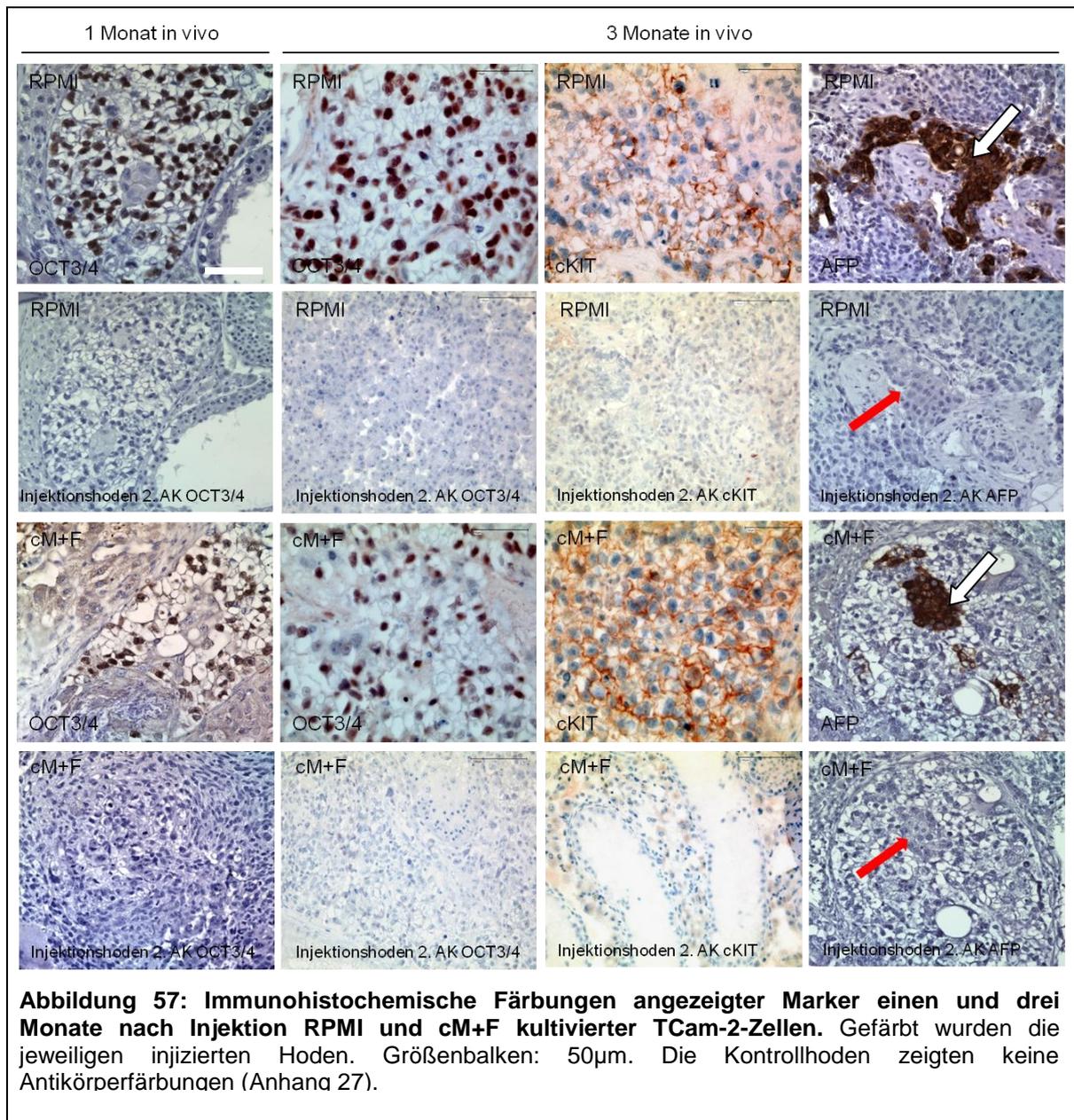
Ein interessanter Befund ergab sich bei der Analyse von RPMI kultivierten TCam-2-Zellen einen Monat nach Injektion. Es konnte in sechs Mäusen innerhalb der Tubuli seminiferi große, runde, CIS ähnliche Zellen mit klaren Zytoplasmen und runden großen Zellkernen detektiert werden (Abb. 56, roter Pfeil) (Krag Jacobsen, et al., 1989). Zusätzlich fanden sich große interstitielle Bereiche mit vielen Leydig-Zellen (Abb. 56, hellblauer Pfeil). Auch nach Injektion der differenzierten TCam-2 zeigten sich CIS ähnliche Zellen (Abb. 56, grüner Pfeil), allerdings konnten auch große Bereiche degenerierten Hodenparenchyms gefunden werden. Die Basalmembranen

der Tubuli seminiferi waren größtenteils nicht mehr intakt. Auch große interstitielle Bereiche mit vielen Leydig-Zellen konnten nachgewiesen werden (Abb. 56, brauner Pfeil). Nach Injektion von 2102EP-Zellen war das Parenchym des injizierten Hodens völlig zerstört (Abb. 56, oranger Pfeil). Drei Monate nach Injektion undifferenzierter TCam-2 konnten in sechs Hoden CIS ähnliche Zellen gefunden werden (Abb. 56, gelber Pfeil) und zusätzlich in vier von sechs Tieren Tumorwachstum festgestellt wer-



den. Diese Tumoren bestanden entweder aus sehr vielen CIS ähnlichen Zellen, die eine/n große/n, runde/n Zellform und –kern sowie ein klares Zytoplasma besaßen oder aus Zellen mit typischer TCam-2-Morphologie, die im Verbund aus vielen klei-

nen, polygonalen Zellen wuchsen (Abb. 56, weißer Pfeil). Doch auch Bereiche, die teratomatös differenzierten Geweben ähnelten, wurden gefunden (Abb. 56, grauer Pfeil). Drei Monate nach Injektion der differenzierten Zellen konnte zwar kein Tumorwachstum festgestellt werden, allerdings konnten auch große CIS ähnliche Zellen (Abb. 56, schwarzer Pfeil) und teratomatös differenzierte Bereiche nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden die kontralateralen Hoden HE gefärbt (Anhang 25). Dort zeigten sich keine CIS ähnlichen Zellen und auch kein Tumorwachstum. Nach einmonatigen *in vivo*-Wachstum konnte in den kontralatera-



len Kontrollhoden eine intakte Spermatogenese nachgewiesen werden, während in den Tubuli seminiferi nach dreimonatigen *in vivo*-Wachstum nur wenige Bereiche mit normaler Spermatogenese beobachtet werden konnten. In den CIS ähnlichen Zellen, die nach Injektion undifferenzierter und differenzierter TCam-2 auffielen, konnte OCT3/4- und cKIT-Expression durch Immunohistochemie nachgewiesen werden (Abb. 57, OCT3/4, cKIT). Die Expression dieser Proteine dient als diagnostischer Marker für CIS-Zellen (Jones et al., 2004; Jones et al., 2006; Cheng et al., 2007, Oosterhuis et al., 2005). Die OCT3/4 – und cKIT-Kontrollfärbungen befinden sich im Anhang 26 (Anhang 26). Auch nach Injektion der 2102EP-Zellen konnten OCT3/4 positive Zellen im injizierten Hoden durch Immunohistochemie detektiert werden (Anhang 27). Drei Monate nach den TCam-2-Injektionen konnten AFP positive Bereiche nachgewiesen werden (Abb. 57, AFP). Das Zytoplasma dieser AFP positiven Zellen war stark granulär und eosinophil (Abb. 57, rote Pfeile), zudem zeigten sie morphologisch keine Ähnlichkeiten zu CIS- oder Seminom-Zellen (Abb. 57, weißer Pfeil). Diese Ergebnisse zeigen, dass die differenzierten und undifferenzierten Zellen nach Transplantation in die murinen Tubuli Seminiferi zu einem Carcinoma-in-situ heranwachsen und diesen Zustand für mindestens einen Monat aufrecht erhalten können. Anschließend kann eine Differenzierung in die invasiven Keimzelltumorentitäten erfolgen.

4. Diskussion

4.1.1 Differenzielle Regulation der NANOG-Expression während der Keimzellreifung

Die Regulationsmechanismen der humanen NANOG-Expression wurden *in vitro* gefunden. Daher sollte untersucht werden, ob diese Mechanismen auch während der humanen Keimzellreifung zur Anwendung kommen. NANOG wird in fetalen Keimzellen exprimiert, doch während der Reifung zu fetalen Spermatogonien kommt es zu einer Repression der NANOG-Expression (Hoei-Hansen et al., 2005). In fetalen Keimzellen konnte eine hypomethylierte NRR detektiert werden, demnach (Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005) im direkten Widerspruch zu den NRR-Methylierungsdaten. Durch eine globale, Genom weite Promotor-DNS-Methylierungsanalyse in murinen embryonalen Stammzellen (ES), embryonalen Keimzellen (EG), Spermien, Trophoblast-Stammzellen und embryonalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass ES, EG und Spermien ein sehr ähnliches globales Promotor-DNS-Methylierungsmuster aufwiesen (Farthing et al., 2008). Interessanterweise bestand eine Ausnahme für den NANOG-Promotor. Dieser lag stark methyliert in Spermien und hypomethyliert in ES und EG Zellen vor (Farthing et al., 2008). Diese Ergebnisse passen zu den Daten der NRR-Analysen und dem globalen DNS-Methylierungsprofil der Keimzellen. Die DNS-Methylierung der NRR scheint demnach unabhängig von der globalen DNS-Methylierung etabliert zu werden. Die NRR-Hypermethylierung könnte in Spermien und adultem Hodengewebe einen Weg darstellen, die NANOG-Expression epigenetisch zu unterdrücken um das Pluripotenzprogramm zu kontrollieren. So wäre es möglich das Risiko einer Keimzellentartung zu minimieren.

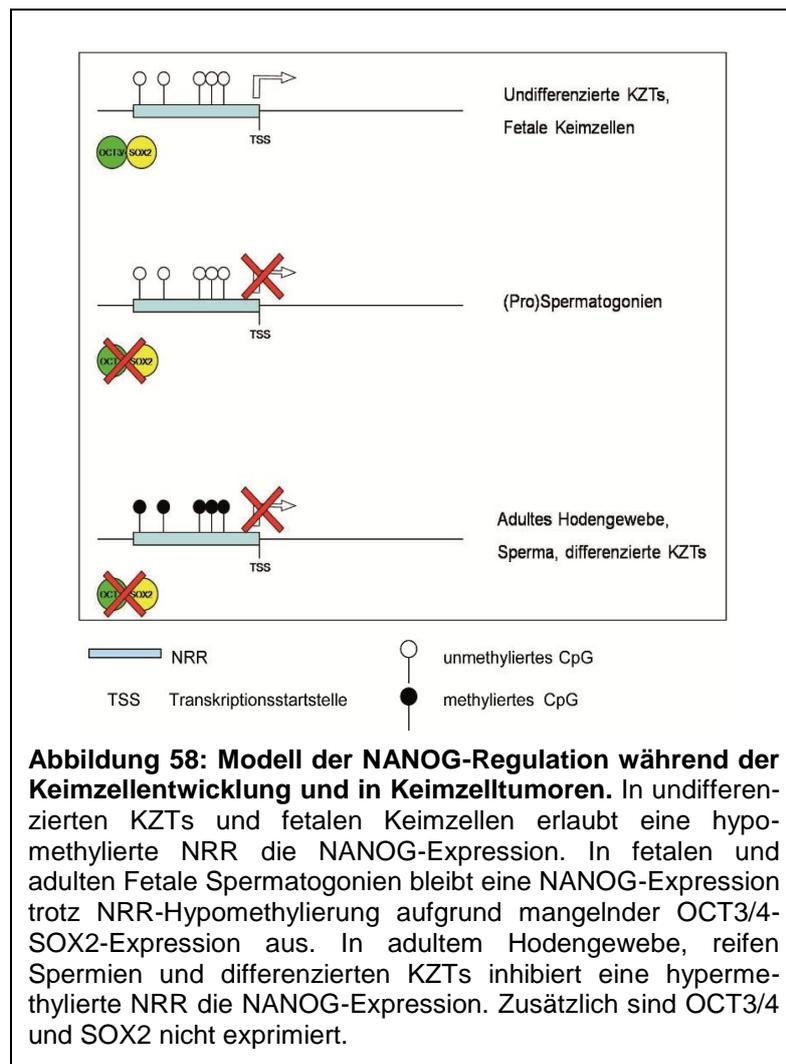
4.1.2 NRR-DNS-Methylierung in humanen Keimzelltumoren und korrespondierenden Zelllinien

Die Vorläuferläsion der Keimzelltumoren (CIS/IGCNU) soll aus einer entarteten Keimzelle entstanden sein (Smiraglia et al. 2002; Netto et al., 2008). Aufgrund dieser Beziehungen zu Keimzellen wurde die NANOG-Expressionsregulation auch in

Keimzelltumoren und deren Zelllinien untersucht. Zwei undifferenzierte KZT-Entitäten, nämlich Seminome und embryonale Karzinome (EK) zeigten beide eine hypomethylierte NRR, während die differenzierten, nicht-seminomatösen Keimzelltumoren eine starke NRR-Methylierung aufwiesen. Entsprechende Beobachtungen konnten auch in den KZT-Zelllinien gemacht werden. Allerdings zeigten zwei Zelllinien EK-Ursprungs, 833KE und NCCIT eine NRR-Hypermethylierung (Damjanov et al., 2003; Bronson et al., 1980). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Zelllinien während der Adaption der Zellen an die Zellkulturbedingungen oder während des langen Kultivierungszeitraums ihr Methylierungsmuster verändert haben. Die Zelllinie 833KE wurde zudem aus einem Tumorgewebe generiert, das aus vier verschiedenen histologischen Tumortypen besteht (Bronson et al., 1980). Somit könnte die NRR-Hypermethylierung auch durch den gemischten Tumorursprung der Zelllinie erklärt werden.

Durch diese Analysen wurde eine Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorentität und der NRR-DNS-Methylierung nachgewiesen. Das bedeutet, je differenzierter die Tumorentität desto höher die NRR-DNS-Methylierung. Die Untersuchung der NRR-DNS-Methylierung kann damit als ergänzende Methode zur Klassifizierung von KZTs und KZT-Zelllinien verwendet werden.

Um eine Verbindung zwischen der NRR-DNS-Methylierung und der NANOG-Expression herzustellen, wurde die NANOG-Expression in Keimzelltumoren und -zelllinien nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass der NRR-DNS-Methylierungsstatus in KZTs und -zelllinien mit der NANOG-Expression korrelierte. Zwei Ausnahmen wurden jedoch beobachtet. Die Zelllinien NCCIT und 833KE zeigten eine NRR-Hypermethylierung, exprimierten allerdings NANOG vergleichbar stark wie 2102EP-Zellen. Entweder können andere NANOG-Promotorelemente die reprimierende Funktion der methylierten fünf NRR-CpG-Dinukleotide in den Zelllinien 833KE und NCCIT überwinden, oder die NANOG-Transaktivatoren OCT3/4 und SOX2 werden in 2102EP-Zellen schwach exprimiert und führen deshalb nur zu einer moderaten NANOG-Expression in dieser Zelllinie.



Die bisherigen Ergebnisse wurden genutzt, um ein Modell der NANOG-Expressionsregulation während der Keimzellentwicklung und in Keimzelltumoren zu erstellen (Abb. 58). In fetalen Keimzellen und undifferenzierten KZTs erlaubt eine NRR-Hypomethylierung die Transaktivierung der NANOG-Expression durch OCT3/4 und SOX2 (im Falle von Seminomen möglicherweise durch ein redundantes Protein, z.B. SOX17). In fetalen und adulten Spermatogonien liegt die NRR hypomethyliert vor, dennoch sind die Transaktivatoren OCT3/4 und SOX2 nicht exprimiert. Daher kommt es zu keiner NANOG-Expression. In adulten Hodengewebe, reifen Spermien und differenzierten KZTs inhibiert eine hypermethylierte NRR epigenetisch die NANOG-Expression und zusätzlich werden OCT3/4 und SOX2 nicht exprimiert.

4.2. Ein NANOG- oder AP-2 γ -siRNS-„knock-down“ induziert keine TCam-2-Differenzierung

Um eine Differenzierung in TCam-2-Zellen zu induzieren, wurde zunächst ein transienter NANOG- und AP-2 γ -„knock down“ durchgeführt. Anschließend konnte eine Heraufregulation der OCT3/4- und SOX17-Expression in den NANOG-siRNS-Ansätzen nachgewiesen werden, nicht aber bei der Transfektion von AP-2 γ -siRNS. NANOG, OCT3/4 und SOX2 bilden ein regulatorisches Netzwerk, das die Pluripotenz und die Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen und pluripotenten, undifferenzierten Zellen erhält (Pan et al., 2008). Da in klassischen Seminomen typischerweise SOX17 anstatt SOX2 exprimiert wird (de Jong et al., 2008), wäre eine Redundanz dieser beiden Proteine denkbar. SOX17 bindet an die kleine Furche der DNS und verbiegt diese um 80° (Palasingam et al., 2009). Eine vergleichbares Verhalten wurde bei SOX2/DNS-Komplexen beobachtet und legt nahe, dass der Bindungsgrad zwischen diesen Proteinen konserviert ist (Palasingam et al., 2009). Die Induktion von OCT3/4 und SOX17 könnte daher eine Kompensationsreaktion der Zellen sein, um die Pluripotenz der Zellen aufrecht zu erhalten.

DNMT3a ist eine *de novo*-Methyltransferase und DNMT3l ist ein Methyltransferase-ähnliches Enzym, dem allerdings die Aminosäuren fehlen, die für eine Methyltransferase-Aktivität wichtig sind. Es stimuliert dennoch die *de novo*-Methylierung durch DNMT3a und soll eine wichtige Rolle bei der Etablierung maternaler „genomischer Prägungsmuster“ spielen (Chedin et al., 2002). DNMT3l kann zusätzlich mit der Histondeacetylase 1 (HDAC1) interagieren und fördert somit epigenetische, transkriptionelle Repressionen (Deplus et al., 2002). NANOG-Herabregulation führte zu einer Hochregulation dieser beiden Proteine, demnach scheint NANOG die Expression dieser Moleküle zu reprimieren. Dadurch könnte eine *de novo*-Methylierung wichtiger Pluripotenz erhaltender Gene und die Bildung von Heterochromatin, dass die Expression der jeweiligen Gebabschnitte inhibieren würde unterdrückt werden. Die DNS von Seminomen und CIS-Zellen ist global hypomethyliert, während die DNS nicht-seminomatöser Keimzelltumorentitäten global stark methyliert ist (Netto et al., 2008). NANOG könnte bei der Aufrechterhaltung dieser globalen Hypomethylierung in Seminomen und CIS-Zellen mitverantwortlich sein, denn in humanen ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass NANOG die Expression von Chromatin remodelierenden- und Histon modifizierenden-Komplexen fördert (z.B.

SMARCAD1, MYST3, SET) (Boyer et al., 2005). Eine Interaktion zwischen AP-2 γ und NANOG scheint im Rahmen der DNMT3a-Regulation notwendig zu sein, denn ein kombinatorischer NANOG- und AP-2 γ - sowie ein individueller AP-2 γ -„knock down“ führten zu keiner Heraufregulation von DNMT3a. Eine Bindung von AP-2 γ an den Nanog-Promotor konnte bereits in murinen Trophoblast-Stammzellen gezeigt werden (Kuckenberget al., 2010), daher könnte auch im humanen System eine Bindung erfolgen.

Nach AP-2 γ -„knock-down“ konnte eine Heraufregulation zweier mesodermal assoziierter Gene detektiert werden, nämlich HAND1 und MyoD1. Dr. Eckert zeigte, dass AP-2 γ in murinen Keimzellen an der Unterdrückung mesodermaler Differenzierungsprozesse beteiligt ist und dass ein AP-2 γ -„knock down“ in TCam-2-Zellen zur Hochregulation von MyoD1 und HAND1 führte (Dissertation Dawid Eckert, 2009, Weber et al., 2010). Diese Ergebnisse wurden hier reproduziert und verdeutlichten erneut die Rolle von AP-2 γ innerhalb mesodermaler Differenzierungsprozesse.

Durch den siRNS basierten „knock-down“ von NANOG und AP-2 γ sollte eine Differenzierung der TCam-2-Zellen eingeleitet werden. Neben morphologischen Veränderungen sollten auch Deregulationen in der Genexpression als Indikatoren einer beginnenden Differenzierung dienen. Es wurde mit einer Repression von Pluripotenz- und Selbsterneuerungsmarkern und einer Induktion von Soma- und Keimblattmarkern gerechnet. Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht gemacht werden. Zusätzlich deutete die unveränderte Morphologie der Zellen 48h nach Transfektion auf keine beginnende Differenzierung hin.

Es wurden stabile NANOG- und AP-2 γ -„knock down“-Klone generiert, um Langzeiteffekte auf die TCam-2-Zellen zu untersuchen. Durch die Expressionsanalysen konnte eine Heraufregulation der OCT3/4- und SOX17-Expression in den stabilen NANOG-„knock down“-Klonen detektiert werden. Dies deutete darauf hin, dass TCam-2-Zellen auch längerfristig in der Lage sind, die Reduktion der NANOG-Expression zu kompensieren und ihre genomische Stabilität zu erhalten. Da in den stabilen „knock down“-Klonen die übrigen Expressionsveränderungen der transienten Transfektionsansätze nicht wiedergefunden wurden, deutet dies auf Kurzeffekte hin. Während das NANOG-shRNS-Konstrukt zu einem nahezu vollständigen Expressionsverlust führte, senkte sich die Expression von AP-2 γ in allen etablierten Klonen

nur um maximal 55%. Die verbleibende Transkriptmenge könnte daher ausreichen, um die zellulären Funktionen von AP-2 γ aufrecht zu erhalten. Desweiteren fand während der Etablierung der stabilen AP-2 γ -Klone ein hohes Zellsterben statt. Möglicherweise führt ein zu hoher AP-2 γ -Expressionsverlust zur Induktion apoptotischer Prozesse. Die Ergebnisse zeigen, dass weder eine kurz- noch eine langzeitige Reduktion der NANOG- und AP-2 γ -Expression ausreicht, um die Seminom-Zelllinie TCam-2 zu differenzieren.

Die Zellen wurden nun mit unterschiedlichen differenzierungsauslösenden chemischen Agenzien behandelt. TCam-2-Zellen wurden acht Tage lang mit dem Histondeacetylasen-Inhibitor Depsipeptid, mit dem demethylierenden Agens 5'-aza-2-Deoxycytidin und mit all-trans-Retinsäure behandelt. Morphologisch konnten während allen Versuchsreihen keine Veränderungen festgestellt werden, lediglich bei Depsipeptid-Konzentrationen von >20pM wurde ein erhöhtes Zellsterben beobachtet. Diese Experimente verdeutlichen, dass die Seminom-Zelllinie TCam-2 in der Lage ist, ihren seminomatösen Zellcharakter aufrecht zu erhalten und gegen äußere Einflüsse zu schützen.

4.3.1 cM+F-Kultivierung verändert die Zellmorphologie und Wachstumscharakteristika von TCam-2-Zellen

Die cM+F-Kultivierung von TCam-2-Zellen führte zu einer extremen Größenzunahme, welche durch das konditionierte Medium hervorgerufen wurde, denn sowohl cM- als auch cM+F-Kultivierung führte zu diesem Effekt. Die Ausbildung netzwerkartiger Strukturen wurde hingegen durch FGF4/Heparin induziert, da auch nach RPMI+F-Kultivierung Anfänge dieser Strukturen erkennbar waren. Eine fortschreitende Netzwerkbildung scheint allerdings erst durch die kombinatorische Kultivierung in cM mit FGF4/Heparin gefördert zu werden. Während der cM+F-Kultivierung sind alle Zellen zeitgleich denselben cM- und FGF4/Heparin-Konzentrationen ausgesetzt, daher stellte sich die Frage, weshalb ein großer Anteil der Zellen eine Differenzierung durchläuft und sich ein anderer Teil morphologisch nicht verändert und von der netzwerkähnlichen Struktur umschlossen wird. Es könnten polarisierte Zellverbände entstehen, in denen randständige Zellen als Antwort auf externe Stimuli differenzieren und dann die räumlich innenliegenden Zellen

umschließen. Es wäre möglich, dass diese inneren Zellen eine undifferenzierte Erhaltungspopulation darstellen.

4.3.2 Der Anstieg multinukleärer Zellzahlen deutet auf einen Chorionkarzinom ähnlichen Differenzierungsprozess hin

Innerhalb der TCam-2-Zellpopulation existiert eine geringe Anzahl multinukleärer Zellen (1%). Während der cM+F-Kultivierung stieg deren Zahl um 20%. Multinukleäre Zellen sind typisch für Muskelzellen. Eine Fluoreszenzfärbung spezifischer Muskelzellmarker verdeutlichte, dass die multinukleären Zellen weder Desmin oder Myogenin noch α -Glattesmuskelaktin exprimierten. Aus diesem Grund wurde ein Differenzierungsprozess in Richtung Muskelzellen ausgeschlossen. Auch Synzytiotrophoblastzellen sind multinukleär (Maltepe et al., 2010). Da Chorionkarzinome aus zwei Zelltypen bestehen, nämlich Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen, liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen in Richtung Chorionkarzinom differenzieren (Krag Jacobsen et al., 1989). Die morphologischen Veränderungen hin zu großen Zellen mit prominentem Zellkern unterstützen diese Theorie (Krag Jacobsen et al., 1989). Ungefähr 30% der *in vivo* diagnostizierten Seminome exprimieren hCG aufgrund von synzytiotrophoblastären Anteilen (Bjurlin et al., 2007). Die geringe Anzahl multinukleärer Zellen innerhalb der undifferenzierten TCam-2-Population könnte demnach auch auf eine Synzytiotrophoblasten-Subpopulation hindeuten, deren Wachstum im Laufe der cM+F-Kultivierung gefördert wird. In TCam-2-Zellen wurde jedoch eine homogene Expression von β -hCG nachgewiesen (siehe Abb. 38; Eckert et al., 2008). Dies spricht eher gegen eine bestehende Subpopulation, da bei einer solchen mit einer fokalen β -hCG-Expression gerechnet werden müsste. Die Expression von β -hCG und der geringe Anteil multinukleärer Zellen stellen damit eher eine Besonderheit der Zelllinie TCam-2 dar.

4.3.3 Ähnlichkeiten der differenzierten Zellen mit Dottersacktumorzellen aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der cM+F und RPMI kultivierten TCam-2-Zellen konnten ultrastrukturelle Unterschiede hervorgehoben werden. Eine

Aufnahme der Zytoplasmen zeigte, dass es während der Differenzierung zu einer deutlichen räumlichen Ausdünnung der Zellorganellen kommt, wobei dies mit der extremen Größenzunahme zusammen hängen mag. Es wurden fibrilläre Strukturen im Zytoplasma der differenzierten Zellen nachgewiesen. Nogalez-Fernandez et al. beschrieb diese „intrazytoplasmatischen Mikrofibrillen“ bereits in Dottersacktumoren (Nogalez-Fernandez et al., 1977). Zellen dieser Tumoren zeigten einen deutlich irregulären Zellkern mit zytoplasmatischen Einschnürungen. Diese Beobachtungen konnten auch nach cM+F-Kultivierung gemacht werden. Auffallend waren sehr große „Vakuolen“ artige Strukturen die in den cM+F kultivierten Zellen detektiert wurden. Diese Vesikel konnten auch in Ultrastrukturaufnahmen von Dottersacktumoren nachgewiesen werden (Nogalez-Fernandez et al., 1977). Die Ultrastrukturuntersuchung deutete demnach auf einen Dottersacktumor ähnlichen Differenzierungsprozess hin. Dies bedeutet, dass TCam-2-Zellen während der cM+F-Kultivierung in ein gemischtes Nicht-Seminom mit Chorionkarzinom- und Dottersacktumor-Anteilen differenzieren.

4.3.4 cM+F-Kultivierung führt zur Differenzierung in ein gemischtes Nicht-Seminom

Um die zuvor erarbeiteten Ergebnisse zu bestätigen, wurde das Expressionsprofil der differenzierten Zellen mit dem der undifferenzierten TCam-2-Zellen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Pluripotenz assoziierte Marker (NANOG, OCT3/4), keimzellspezifische Marker (cKIT, BLIMP1, AP-2 γ , VASA, BOULE, GDF3) sowie Seminommarker (SOX17, MCFD2, D2-40) herunterreguliert wurden, während Keimblatt- (AFP, HAND1, BRACHYURY, PAX6) und Somamarker (HOXB1) induziert wurden. NANOG, OCT3/4, cKIT und AP-2 γ wurden sowohl nach Kultivierung in cM+F als auch in cM herunter reguliert. Wachstum in RPMI und RPMI+F führte zu keiner Deregulation dieser Marker, was nun verdeutlichte, dass cM-Kultivierung für die Induktion der Differenzierung verantwortlich war. Aufgrund der verminderten Expression von VASA und BOULE wurde ein Spermatogenese ähnlicher Differenzierungsprozess ausgeschlossen. Die starke Induktion von AFP ist ein Indiz für eine Dottersacktumor ähnliche Differenzierung, da die Expression dieses Markers charakteristisch für diese Keimzelltumorentität ist. Desweiteren deutete die erhöhte Expression von Keimblattmarkern auf einen teratomatösen Differenzierungsprozess hin, da Teratome während ihres Wachstums embryonale

Entwicklungsschritte rekapitulieren. Es konnte eine Heraufregulation der MMP2-Expression in den cM+F kultivierten Zellen aufgezeigt werden. MMP2 gehört zu den Typ IV-Kollagenasen und ist für Gewebe remodelierende Prozesse in den Tubuli seminiferi des Hodens und im Zytoskelett von Sertoli-Zellen mitverantwortlich (Longin et al., 2002). Während des Differenzierungsprozesses könnte MMP2 also eine wichtige Rolle bei der Veränderung der Zellmorphologie spielen. Es zeigte sich eine Heraufregulation der TEAD1-, GATA2- und GATA6-Expression in den differenzierten Zellen. TEAD1 wird im murinen Trophektoderm exprimiert (Nishioka et al., 2008), während murines GATA2 die Trophoblast spezifische Genexpression reguliert (Ma et al., 1997) und GATA6 im frühen Trophektoderm nachgewiesen werden konnte (Koutsourakis et al., 1997). Die erhöhte Expression dieser Marker unterstützt die zuvor beschriebene These einer Trophoblast ähnlichen Differenzierung in ein Chorionkarzinom.

Die Metastasierung von Tumorzellen wird von einer EMT begleitet, die durch eine Vimentin-Induktion und eine E-Cadherin-Repression charakterisiert ist. Um eine EMT nachzuweisen, wurde die Vimentin- und E-Cadherin-Expression in undifferenzierten und differenzierten TCam-2-Zellen untersucht. Es konnten keine Unterschiede in der Expressionshöhe beider Proteine detektiert werden. Eine EMT der Zellen wurde damit ausgeschlossen.

Veränderungen im Zytokeratinexpressionsmuster können Aufschluss über die Richtung des Differenzierungsprozesses geben. Während der cM+F-Kultivierung kam es zu einer Induktion von CK7, CK18 und zu einer Heraufregulation der CK19- und CK20-Expression. Starke CK7-Expression kann in Synzytiotrophoblastzellen und Chorionkarzinomzelllinien gefunden werden (Maldonado-Estrada et al., 2004). Koi et al. wiesen nach, dass 95% ihrer isolierten, murinen Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen CK18 positiv waren (Koi et al., 2002). CK18-Expression kann auch in embryonalen Karzinomen, Chorionkarzinomen, Dottersacktumoren und Teratomen detektiert werden (Lifschitz-Mercer et al., 1991). Eine starke CK19-Expression fand sich ebenfalls in Chorionkarzinomen, Dottersacktumoren und Teratomen, während embryonale Karzinome nur sehr schwach oder gar nicht CK19 positiv waren (Lifschitz-Mercer et al., 1991). Weiterhin konnte die CK19-Expression zusätzlich an den Differenzierungsgrad von KZTs korreliert werden (Lifschitz-Mercer et al., 1991). Das heißt, je differenzierter die KZT-Entität desto höher die CK19-Expression. Demnach bestätigte die Analyse des

Zytokeratinexpressionsprofils die Annahme einer TCam-2-Differenzierung in Richtung gemischtes Nicht-Seminom.

Das Ziel weiterer Untersuchungen war es, Signalwege zu identifizieren, die bei der Induktion und Progression der Differenzierung eine wichtige Rolle spielen könnten. ERK1/2 ist eine MAP-Kinase, deren Aktivierung über extrazelluläre Signale durch Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung erfolgt und dadurch Prozesse wie Differenzierung und Proliferation reguliert. Das Mitogen FGF4 kann den MAP-Kinase-Signalweg in murinen Keimzellen aktivieren (Hirai et al., 2004) und fördert in pluripotenten, murinen, embryonalen Stammzellen über ERK1/2 die Transition von der Selbsterneuerung hin zur Zelldifferenzierung (Kunath et al., 2007). STAT3 hingegen fördert die Selbsterneuerung von murinen, embryonalen Stammzellen, transduziert Überlebenssignale und kann regulierend in den Zellzyklus eingreifen (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Die Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 und STAT3 deuteten an, dass eine Signaltransduktion innerhalb von 48 Stunden nach Kultivierungsbeginn nur noch vermindert über den MAPK- und dem STAT3-Signalweg erfolgt. Da sich die Phosphorylierungszustände nach 48 Stunden wieder auf das Ausgangslevel normalisierten, war davon auszugehen, dass eine Signaltransduktion wieder im gleichen Maße wie in undifferenzierten Zellen stattfinden konnte. Dennoch könnte die Reduktion der ERK1/2- und STAT3-Phosphorylierung an Tag 2 der TCam-2-Differenzierung als Auslöser für andere Signalmoleküle dienen deren Aktivitätszustände zu verändern.

Im untersuchten Differenzierungszeitraum konnte eine deutliche Verminderung der SMAD1/5/8-Phosphorylierung detektiert werden. Diese SMADS gehören zur Gruppe der Rezeptor-SMADS und transduzieren BMP (BMP2, BMP4) vermittelte Signale (Massagué et al., 1998). BMP2 spielt eine wichtige Rolle in der Knochen- und Bindegewebsentwicklung, in der Herzzelldifferenzierung sowie während der EMT. BMP4 ist ebenfalls in der Knochen- und Bindegewebsentwicklung sowie in der Entwicklung von Muskelgewebe involviert. Die deutliche Reduktion der SMAD 1/5/8-Phosphorylierungsgrade deutete auf eine verminderte Signaltransduktion über diese Rezeptor-SMADS während der cM+F vermittelten TCam-2-Differenzierung hin.

Der Hippo-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Organgrößenkontrolle und der Regulation proliferativer Prozesse und wird als pathogener Faktor in der Tumorentstehung diskutiert (Zeng et al., 2008; Downward et al., 2008; Camargo et al., 2007; Dong et al., 2007; Zhao et al., 2007). Durch diesen Signalweg werden zum

Beispiel antiproliferative Signale bei Erreichen zellulärer Konfluenz induziert. Durch welche Signalmoleküle der humane Hippo-Signalweg aktiviert wird, ist derzeit nicht bekannt. Dennoch phosphoryliert die Signalkaskade, bestehend aus Merlin/Expanded, MST1/2 und LATS1/2 in Säugetieren das Schlüsselmolekül YAP1 an Serin 127 (S127) (Zeng, Hong et al., 2008). Dadurch entsteht eine 14-3-3-Bindestelle (Zhao et al., 2007; Lei et al., 2008). Durch die Bindung von 14-3-3 an das phosphorylierte YAP1 wird dieses im Zytoplasma zurückgehalten und inaktiviert (Zhao et al., 2007; Lei et al., 2008, Oh et al., 2008). Ist diese Signalkaskade inaktiv, fungiert YAP1 im Nukleus als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression von TEAD4 (Nishioka et al. 2009; Nishioka et al., 2008), wodurch die zelluläre Proliferation gefördert wird (Zeng et al., 2008). Es zeigte sich, dass die YAP1-Expression während der cM+F vermittelten Differenzierung vermindert wurde und die YAP1-S127-Phosphorylierung parallel anstieg. Zusätzlich konnte eine Hochregulation von 14-3-3- σ nachgewiesen werden, welche im Einklang mit den gefundenen Resultaten steht. Die 14-3-3- σ -Expression scheint durch FGF4 und einen weiteren Faktor des konditionierten Mediums heraufreguliert zu werden, da eine erhöhte 14-3-3- σ -Transkriptmenge nach cM-, cM+F- und RPMI+F-Kultivierung aufgezeigt werden konnte. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Hippo-Signalweg während der *in vitro*-Differenzierung aktiviert wird und dadurch YAP1 inaktiviert wird. Dadurch könnte die zuvor in dieser Arbeit beschriebene Reduktion der Proliferationsrate erklärt werden.

Das RNS-Bindeprotein Lin28 und Blimp1 regulieren die Entwicklung muriner, primordialer Keimzellen *in vivo* und *in vitro* (West et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass Lin28 dabei oberhalb von Blimp1 in der Signalkette steht (West et al., 2009). LIN28 unterbindet die Reifung der let7-miRNS-Familienmitglieder, die dadurch nicht mehr inhibitorisch auf BLIMP1 wirken können (Heo et al., 2008; Newman et al., 2008). Der Blimp1/Prmt5-Komplex etabliert in murinen Keimzellen eine symmetrische Dimethylierung des Arginin 3 an den Histonen H2a/H4 (H2a/H4R3me2s) und unterdrückt dadurch somatische Differenzierungsprogramme (Ancelin et al., 2006). BLIMP1/PRMT5-Expression konnte auch in humanen Seminomen und embryonalen Karzinomen nachgewiesen werden (Eckert et al., 2008). LIN28 und BLIMP1 wurden in den differenzierten TCam-2-Zellen herunterreguliert. Zusätzlich konnte auf translationaler Ebene gezeigt werden, dass neben der BLIMP1-Expression auch die H2a/H4R3me2s während der Differenzierung verloren ging. Die Folge ist eine

Induktion somatischer Differenzierungsprogramme. Die zuvor in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion von HOXB1 steht damit im Einklang. Eine siRNS basierte Reduktion der LIN28- oder BLIMP1-Expression in TCam-2-Zellen verdeutlichte, dass auch die BLIMP1-Proteinmenge nach einem LIN28-„knock down“ vermindert wurde, während im umgekehrten Fall kein Effekt auf die LIN28-Expression zu beobachten war. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass LIN28 auch im humanen System oberhalb von BLIMP1 in dieser Signalkaskade steht.

Die cM+F-Kultivierung von TCam-2-Zellen führt demnach zu einem Block der BMP-Signalkette und einer Aktivierung des Hippo-Signalwegs sowie einer Inhibition des LIN28/BLIMP1-Regulationsmechanismus.

4.3.5 Während der cM+F induzierten Differenzierung kommt es zu keiner S→EK

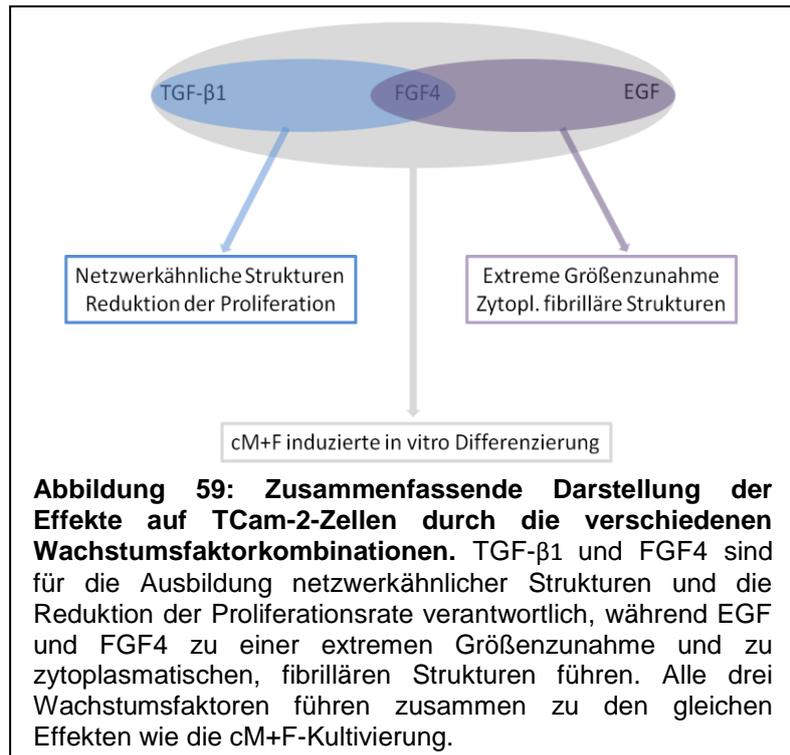
Die Analyse der SOX2- und SOX17- Expression ermöglicht es zwischen Seminomen und embryonalen Karzinomen zu unterscheiden. Klassische Seminome exprimieren kein SOX2, dafür aber SOX17, während embryonale Karzinome hingegen SOX2, aber kein SOX17 exprimieren (de Jong et al., 2008). Es konnte in TCam-2-Zellen weder eine Induktion von SOX2 noch eine Reduktion der SOX17-Expression zu frühen Zeitpunkten der cM+F induzierten Differenzierung detektiert werden. Demnach induziert die cM+F-Kultivierung also eine direkte Differenzierung der Zellen in ein gemischtes Nicht-Seminom. Ein Transitionsschritt zu einem EK wird dabei umgangen.

4.3.6 TGF- β 1, EGF und FGF4 wirken synergistisch während der TCam-2-Differenzierung

Die bisherigen Daten haben verdeutlicht, dass die Kultivierung in cM für die Reduktion der Proliferationsrate und die Initiation der Differenzierung verantwortlich ist. Daraus ergab sich die Frage, ob Wachstumsfaktoren identifiziert werden können die eine wichtige Rolle in diesen Prozessen spielen. Dabei sollte bedacht werden, dass die genaue Zusammensetzung des konditionierten Mediums nicht bekannt ist. Deshalb wurden TCam-2-Zellen im Standardkulturmedium unter Zusetzung von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren kultiviert. Die Zugabe von FGF2/Heparin ergab wie bei FGF4/Heparin-Zugabe die Initiation netzwerkartiger Strukturen.

Ersetzte man FGF4 durch FGF2 in cM, zeigten die Zellen den gleichen Phänotyp wie cM+F kultivierte Zellen. Dieses Experiment zeigte, dass hier FGF4 durch FGF2 ersetzt werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass beide Zytokine gleiche Funktionen übernehmen können, wie z.B. die Erhöhung der Proliferation in mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen sowie in der Transformation von Endothelzellen (Choi et al., 2008; Dell’Era et al., 2001).

Auf der Suche nach weiteren differenzierungsfördernden Wachstumsfaktoren wurden TCam-2-Zellen im RPMI-Medium mit TGF- β 1 und/oder EGF (+/- FGF4/Heparin) kultiviert. TGF- β 1 ist ein multifunktionales, homodimeres Zytokin, das die Zellproliferation epithelialer Zellen und von TCC (Transitional-cell-carcinoma)-Zellen inhibieren sowie die Zelldifferenzierung fördern kann (Sporn et al., 1989; de Boer et al., 1997; Siegel et al., 2003). EGF ist nach Bindung an den EGF-Rezeptor in zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung involviert (Herbst et al., 2004). Durch die Bindung von EGF an den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors wird dessen intrinsische Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität stimuliert. Dadurch wird eine Signalkaskade initiiert, die zu zahlreichen zellulären Prozessen führt, wie zum Beispiel der Glykolyse und der Proteinsynthese (Fallon et al., 1984). Auch die Expressionen wichtiger Zielgene, die zur DNS-Synthese und Zellproliferation führen, werden induziert (Fallon et al., 1984). Nach Zugabe von TGF- β 1 und FGF4/Heparin zu RPMI-Medium kam es zu einer großflächigen Ausbildung netzwerkähnlicher Strukturen, während die Zugabe von EGF und FGF4/Heparin zu einer starken Zunahme der Zellgröße führte. Eine kombinatorische Kultivierung von TCam-2-Zellen in RPMI+EGF+TGF- β 1+FGF4/Heparin führte zur gleichen Morphologie wie cM+F-Kultivierung. Diese Daten zeigten, dass EGF und TGF- β 1 zwei wichtige Wachstumsfaktoren sind, die an der Differenzierung der TCam-2-Zellen beteiligt sind (Abb. 59). Ohne zusätzliche Zugabe von FGF4/Heparin sind diese Effekte allerdings nicht zu beobachten und verdeutlicht, dass auch FGF4 eine wichtige Rolle während der Differenzierungsinduktion übernimmt (Abb. 59). TGF- β 1 und FGF4 scheinen beide synergistisch an der Ausbildung der netzwerkähnlichen Strukturen beteiligt zu sein. Die RPMI+F-Kultivierung konnte zwar die Ausbildung dieser Strukturen auslösen, allerdings wurden großflächige, geschlossene Strukturen nur nach cM+F- oder RPMI+TGF- β 1+FGF4/Heparin-Kultivierung nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass TGF- β 1 für ein progressives Wachstum dieser Strukturen nötig ist.



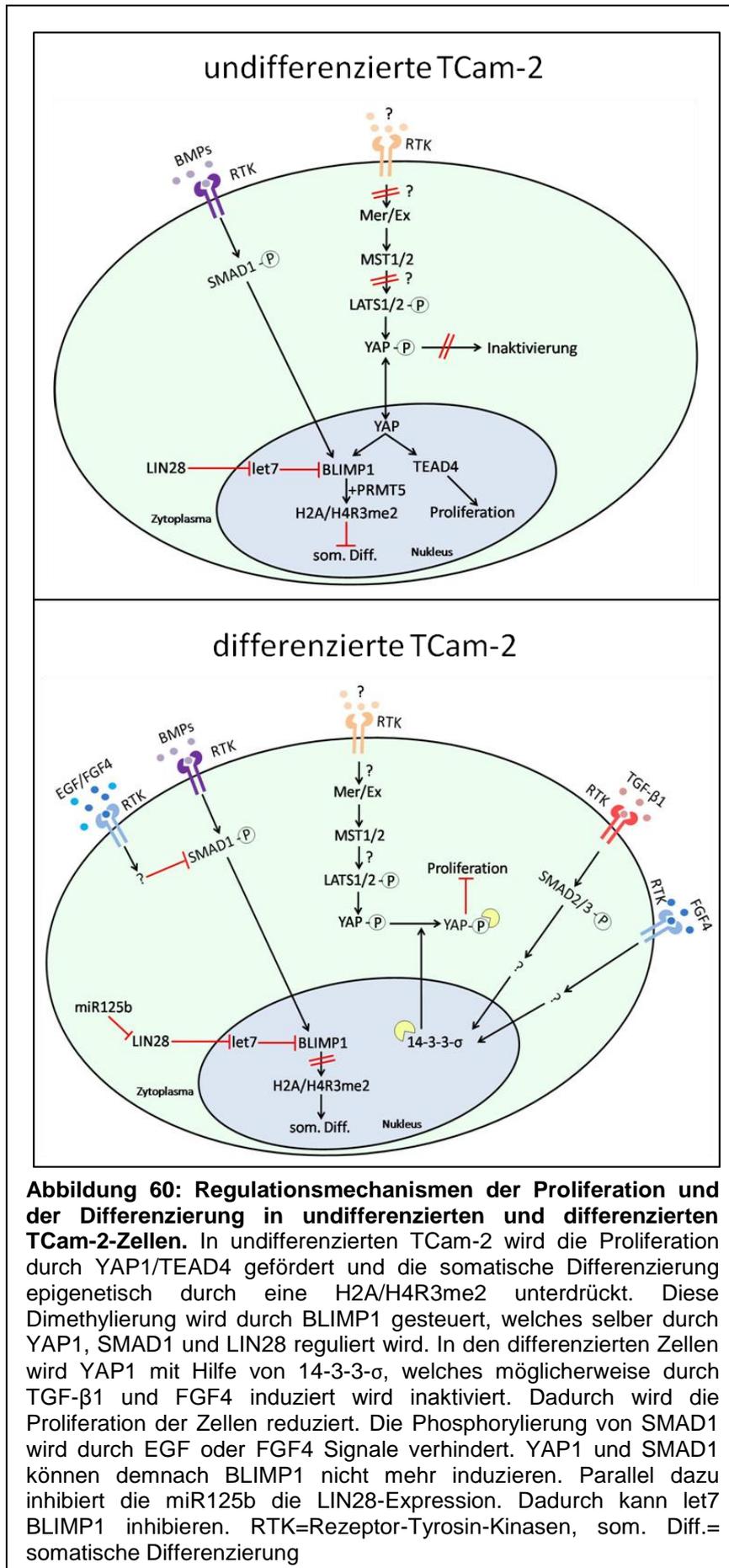
Ähnlich verhält es sich mit der Größenzunahme nach RPMI+EGF+FGF4/Heparin-Kultivierung. Diese Zunahme scheint kooperativ durch EGF und FGF4 ausgelöst zu werden, da Wachstum in RPMI+EGF zu keinen morphologischen Veränderungen führte. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass im cM sowohl TGF-β1 und EGF als auch FGF4 (oder FGF2) enthalten sind, die kooperativ zu den hier beschriebenen Effekten führen. Allerdings scheint die Ausbildung netzwerkähnlicher Strukturen erst bei höheren FGF4-Konzentrationen zu erfolgen, da nach cM-Kultivierung keine netzwerkähnlichen Zellverbände zu erkennen waren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung in RPMI-Medium mit FGF4/Heparin und TGF-β1 oder TGF-β1+EGF zu einer Reduktion der Proliferationsrate führte, die vergleichbar mit der verminderten Rate von cM+F und cM kultivierten Zellen war. Demnach scheinen TGF-β1 und FGF4 synergistisch hemmend auf die Proliferation zu wirken. Daher wird vermutet, dass das im cM enthaltene FGF4 und TGF-β1 ausreicht, um die Proliferation der TCam-2-Zellen zu reduzieren. Im Rahmen einer Tumorthherapie könnte TGF-β1 und FGF4 das schnelle *in vivo*-Wachstum von Seminomen verzögern und den zeitlichen Anwendungsrahmen weiterer Therapien (z.B. cis-Platin-Therapie) verlängern. Wenn es gelingen würde Seminome durch Zugabe von TGF-β1+EGF+FGF4 *in vivo* in den gleichen Zustand wie cM+F differenzierte Zellen zu differenzieren, wären die Seminom-Zellen nicht mehr

proliferativ oder tumorigen. Möglicherweise würden die Zellen sogar absterben, wie es nach den *in vivo*-Injektionsexperimenten zu beobachten war.

4.3.7 Mechanismen der TCam-2 *in vitro*-Differenzierung

Auf Basis der vorliegenden Daten wurden Regulationsmechanismen der TCam-2 *in vitro*-Differenzierung generiert und in Modellen zusammengefasst (Abb. 60). In den undifferenzierten TCam-2-Zellen ist die Hippo-Signalkaskade inaktiv und YAP1/TEAD4 können im Zellkern die Proliferation der Zellen aufrecht erhalten. An welcher Stelle der Hippo-Signalweg unterdrückt wird oder ob eine Aktivierung aufgrund mangelnder Bindung eines Liganden an den Rezeptor ausbleibt, ist nicht bekannt. In den undifferenzierten und den differenzierten TCam-2-Zellen konnten vergleichbare MST1/2- und LATS1/2-Transkriptmengen nachgewiesen werden. Daher erfolgt die Inaktivierung der Hippo-Signalkette in TCam-2-Zellen eher durch mangelnde Ligandenbindung an den Rezeptor oder durch Unterbindung der LATS1/2-Phosphorylierung durch MST1/2 (Chan et al., 2005). Parallel dazu induzieren BMP-Signale die Phosphorylierung von SMAD1. Während der murinen Keimzellspezifizierung konnte bereits gezeigt werden, dass Smad1 durch extra-embryonale, ektodermale BMP-Signale phosphoryliert wird und dadurch die Blimp1-Expression im proximalen Epiblasten induziert wird (Ohinata et al., 2009). YAP1 fungiert im Nukleus muriner, embryonaler Stammzellen als Co-Aktivator von SMAD1 (Alarcon et al., 2009). Daher wird behauptet, dass SMAD1 in Kombination mit YAP1 die Expression von BLIMP1 im Zellkern fördert. Murines Blimp1 etabliert in Kooperation mit Prmt5 in murinen Keimzellen eine symmetrische Dimethylierung des Arginin 3 an den Histonen H2A und H4. Dadurch werden somatische Differenzierungsprogramme unterdrückt (Ancelin et al., 2006). Auch in den undifferenzierten TCam-2-Zellen und in humanen Seminomen wurde eine BLIMP1- und PRMT5-Expression sowie die H2A/H3R3-Dimethylierung im Zellkern aufgezeigt (Eckert et al., 2008). Parallel dazu verhindert LIN28 zusätzlich die Inhibition von BLIMP1, vermutlich durch Blockierung der miRNS-let7-Reifung (Heo et al., 2008; Newman et al., 2008). Durch diese regulatorischen Mechanismen werden in TCam-2-Zellen somatische Differenzierungsprogramme unterdrückt und die zelluläre Proliferation gefördert. In den differenzierten Zellen kommt es entweder durch Ligan-



denbindung oder durch Aufhebung des hypothetischen LATS1/2-Phosphorylierungsblocks zu einer Aktivierung des Hippo-Signalwegs. FGF4 und ein weiterer Faktor des cM wurden für die Induktion von 14-3-3- σ verantwortlich gemacht. Es wird behauptet, dass dieser Faktor TGF- β 1 ist, da bereits gezeigt wurde, dass 14-3-3- σ die TGF- β 1 induzierte Inhibition des Zellwachstums vermitteln kann (Hong et al., 2010). Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass diese Inhibition über die Inaktivierung von YAP1 erreicht werden könnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass FGF4 und TGF- β 1 die Proliferationsrate der TCam-2-Zellen synergistisch reduzieren können. Dass dies durch gemeinsame Regulation von 14-3-3- σ über YAP1 geschieht, wäre demnach denkbar. Allerdings sollte bedacht werden, dass sich die Phosphorylierungsstatus von SMAD2/3 und ERK1/2 während der cM+F-Differenzierung nicht oder nur kurzzeitig veränderten. Demnach könnte die Signaltransduktion über noch unbekannte Mechanismen erfolgen oder die kurzzeitige starke Verminderung des MAP-Kinase-Signalwegs an Tag 2 der Differenzierung führt zu einer dauerhaften Induktion der 14-3-3- σ -Expression. Durch die Inaktivierung von YAP1 steht dieses SMAD1 nicht mehr als Co-Faktor zur Verfügung. Zusätzlich wird angenommen, dass eine SMAD1-Phosphorylierung durch EGF und/oder FGF4 verhindert wird. Parallel zu diesen Ereignissen wird LIN28 herunterreguliert, möglicherweise durch die miRNS-125b (Wu et al., 2005). Dadurch können die miRNS-let7-Familienmitglieder die BLIMP1-Expression inhibieren und die H2a/H3R2me2s kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es kommt zur Induktion somatischer Differenzierungsprogramme. Zusätzlich könnte durch diese Regulationsmechanismen erklärt werden, weshalb 20% der TCam-2-Zellen eine chorionkarzinomatöse Differenzierung durchlaufen (siehe Kapitel 3.4.2). TEAD4 spezifiziert das Trophektoderm während der Embryogenese von Säugetieren und ist für die Trophektblast-Stammzell-Etablierung von entscheidender Bedeutung (Yagi et al., 2007). In undifferenzierten TCam-2-Zellen fördert YAP1 die TEAD4-Expression. Dadurch könnte es auch zur Ausprägung trophektodermaler Charakteristika kommen, die die Zellen auf eine mögliche extraembryonale, trophektodermale Differenzierung vorbereiten könnten. Die Seminom untypische Expression von β -hCG in allen TCam-2-Zellen untertützt diese These. Während der cM+F-Kultivierung kommt es dann sowohl zu einer Reduktion der BLIMP1-Expression als auch zu einer Inaktivierung von YAP1, die sich wiederum negativ auf die TEAD4-Expression auswirkt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Reduktion der TEAD4-Expression zeitlich verzögert zu

der BLIMP-1-Herabregulation erfolgt. So könnten die Zellen zunächst ein Differenzierungspotential erlangen, welches durch TEAD4 noch in Richtung extraembryonale Gewebe gelenkt wird.

4.3.8 EK-Wachstum durch *in vivo*-Injektion von TCam-2-Zellen in die Flanke von Nacktmäusen

Durch die *in vivo*-Injektion von undifferenzierten und differenzierten TCam-2-Zellen in die murine Flanke sollte die Tumorigenität der Zellen überprüft werden. Darüber hinaus sollte das TCam-2-Differenzierungspotential *in vivo* untersucht und mit den *in vitro*-Differenzierungsprozessen verglichen werden. Die Analyse der *in vivo*-Tumorzellen ergab, dass es in allen Proben zum Wachstum einer EK ähnlichen Tumormasse kam. Dies wurde sowohl durch die Induktion von SOX2 sowie die Reduktion der SOX17-Expression als auch durch Veränderungen der Zellmorphologie angezeigt. Nach spätestens sechswöchigem *in vivo*-Wachstum schien die Transition der Zellen in ein EK abgeschlossen zu sein, da nur noch SOX2 positive und SOX17 negative Zellen nachgewiesen werden konnten. Neben einer starken AFP-Expression (endodermal), konnte auch eine Induktion von PAX6 (ektodermal) und BRACHYURY (mesodermal) aufgezeigt werden. Dies deutet auf einen beginnenden teratomatösen Differenzierungsprozess hin. Die Auswertungen der morphologischen Besonderheiten nach HE-Färbung, die hohe Proliferationsrate und die starke globale DNS-Methylierung sowie die zytoplasmatische Expression von BLIMP1 und PRMT5 bestätigten die Theorie einer EK-Transition (Eckert et al., 2008, Netto et al., 2008, Krag Jacobsen et al., 1989). Die Injektionsversuche verdeutlichten, dass undifferenzierte und differenzierte TCam-2-Zellen nach Injektion in die murine Flanke nicht zu unterschiedlichen Tumorentitäten auswuchsen. Das untersuchte Expressionsprofil unterschied sich in beiden Injektionsansätzen (RPMI / cM+F) nur unwesentlich. Daher wird die Theorie aufgestellt, dass die EKs nur aus den undifferenzierten Zellanteilen entstehen. *In vitro* proliferieren die differenzierten Zellen nur noch sehr schwach bis gar nicht und wären demnach nicht in der Lage, in einem vergleichbaren Zeitraum wie undifferenzierte Zellen zu einem Tumor gleicher Größe heranzuwachsen.

4.3.9 *In vitro*-Rekultivierung der EKs führt zu Reversion in einen seminomatösen Zustand

Um zu überprüfen, ob der *in vivo* durchlaufene Transitionsschritt in ein EK irreversibel ist, wurden die Tumorzellen erneut *in vitro* kultiviert. Aus drei EK-Tumoren wurden nach sechswöchigen *in vivo*-Wachstum Zelllinien generiert (TCam-2-EK). In einem morphologischen Vergleich zwischen TCam-2 und den generierten TCam-2-EK-Zellen konnten nach zehn Passagen keine Unterschiede ausgemacht werden. Das untersuchte Expressionsprofil beider Zelllinien war identisch. Das Expressionsprofil der EK-Tumorzellen war hingegen vergleichbar mit dem Profil der embryonalen Karzinomzelllinie 2102EP und bestätigt demnach den EK ähnlichen Charakter der Zellen *in vivo*. Auch der Nachweis von SOX2 und CD30 positiven Zellen fünf Stunden nach *in vitro*-Rekultivierung zeigte, dass diese Zellen EK-Charakteristika besaßen. Da die gesamte Tumormasse vollständig SOX2 positiv war und eine SOX17-Expression nicht mehr nachgewiesen werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die TCam-2-EK-Zelllinien aus seminomatösen Zellen generiert wurden sehr gering. Diese Daten deuten an, dass eine *in vivo*-Transition von TCam-2-Zellen in ein EK durch *in vitro*-Rekultivierung rückgängig gemacht werden kann. Seminome scheinen demnach eine Plastizität zu besitzen, die in Abhängigkeit vom zellulären Umfeld und den Kultivierungsbedingungen zur Ausprägung unterschiedlicher Zellcharakteristika (seminomatös, EK ähnlich) führt. Diese Transition fand zwischen zwei undifferenzierten, pluripotenten Keimzelltumorentitäten statt. Daher wird, in Anlehnung an die Waddington'sche allegorische Darstellung von Differenzierungsprozessen als eine Kugel die eine hügelige Landschaft herabrollt, postuliert, dass die Transition in ein EK plastisch und reversibel ist, solange die Zellen sich in einer „pluripotenten, undifferenzierten Zone“ befinden. Erst durch Überwindung dieses Zustands durch Differenzierung geht die Plastizität verloren und wird irreversibel. Die Beobachtung, dass cM+F differenzierte TCam-2-Zellen nicht mehr tumorigen sind sowie die Tatsache, dass eine zwölfwägige Kultivierung unter Differenzierungsbedingungen mit anschließendem zwölfwägigen Wachstum im Standardkulturmedium nicht in der Lage war, die morphologischen Veränderungen der differenzierten Zellen rückgängig zu machen unterstützen diese Behauptung.

4.3.10 Entstehung CIS ähnlicher Zellpopulationen durch *in vivo*-Injektion von TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Nacktmäusen

Durch die Injektion von undifferenzierten und differenzierten TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi von Busulfan behandelten Nacktmäusen sollte das Differenzierungspotential der Zellen in den Hoden überprüft werden. Dadurch sollte der Einfluss der Tubuli seminiferi-Wachstums Umgebung auf die Richtung des Differenzierungsprozesses näher beleuchtet werden. Nach dreimonatigen Wachstum konnte in den undifferenzierten TCam-2-Injektionstieren Tumorwachstum festgestellt werden, nach Injektion der differenzierten TCam-2-Zellen allerdings nicht. In allen untersuchten Hoden konnten humane Zellen mit primordialen Keimzell/Seminom ähnlichem Expressionsprofil (NANOG, OCT3/4, BLIMP1, cKIT, AP-2 γ , SOX17, VASA, MCFD2 positiv; SOX2, CD30 negativ) nach Injektion von TCam-2-Zellen nachgewiesen werden. Die HE-Färbungen der Hodengewebe zeigten, dass bis drei Monate nach Injektion undifferenzierter und differenzierter TCam-2-Zellen Zellen mit CIS ähnlicher Morphologie in den Tubuli seminiferi gefunden wurden (Krag Jacobsen, Talermann, 1989; Hoei-Hansen, Rajpert-De Meyts et al., 2005; Dieckmann, Skakkebaek et al., 1999). Eine humane OCT3/4- und cKIT-Expression, die spezifisch in diesen Zellen gefunden wurde bestätigt deren CIS-Charakter (Jones et al., 2004; Jones et al., 2006; Cheng et al., 2007; Oosterhuis et al., 2005). Die Beobachtung, dass drei Monate nach Injektion einige Bereiche teratomatös differenziertem Gewebe ähnelten, deutete im Zusammenhang mit der Induktion von AFP und PAX6 auf einen teratomatösen Differenzierungsprozess hin. Die Kontroll-experimente mit den 2102EP-Zellen verdeutlichten, dass diese Zellen ihren pluripotenten Status nicht aufrecht erhalten konnten, da sie innerhalb eines Monats nach Injektion teratomatöse Tumoren bildeten.

Diese Ergebnisse zeigten erneut auf, dass seminomatöse Differenzierungsprozesse vom zellulären Umfeld abhängen. Die TCam-2-Zellen nehmen in den Tubuli seminiferi einen CIS ähnlichen Zustand an, den sie für mindestens einen Monat aufrecht erhalten. Nach spätestens drei Monaten erfolgt jedoch die erneute Transition in die invasiven Keimzelltumoren. Es ist also gelungen ein CIS/Seminom-Mausmodell zu generieren, durch welches sich zahlreiche neue Möglichkeiten anbieten, die Keimzelltumorentstehung und -progression nachzuvollziehen und zu erforschen.

4.3.11 Modell seminomatöser Differenzierungsschritte

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden verwendet, um das Modell der KZT-Entstehung zu erweitern (Abb. 61). Es wurde zum ersten Mal gezeigt werden, dass TCam-2-Zellen in Abhängigkeit von der zellulären Umgebung und den Kulturbedingungen unterschiedliche Differenzierungsprozesse durchlaufen. Durch *in vitro*-Kultivierung in MEF konditioniertem Medium mit FGF4/Heparin oder in RPMI-Medium mit TGF- β 1+EGF+FGF4/Heparin konnte eine direkte Differenzierung in ein gemischtes Nicht-Seminom induziert werden. Dabei wird eine Transition zu einem embryonalen Karzinom umgangen. Im somatischen Milieu der murinen Flanke wird jedoch die Transition zu einem EK gefördert, die nach spätestens sechswöchigem *in vivo*-Wachstum abgeschlossen ist. Diese *in vivo*-Transition kann durch *in vitro*-Rekultivierung rückgängig gemacht werden. Durch die Injektion von Seminom-Zellen in die Tubuli seminiferi des Hodens, konnte gezeigt werden, dass TCam-2-Zellen einen CIS ähnlichen Zustand annehmen und aufrecht erhalten können. Nach spätestens drei Monaten kann jedoch eine Differenzierung in einen invasiven Keimzelltumor erfolgen.

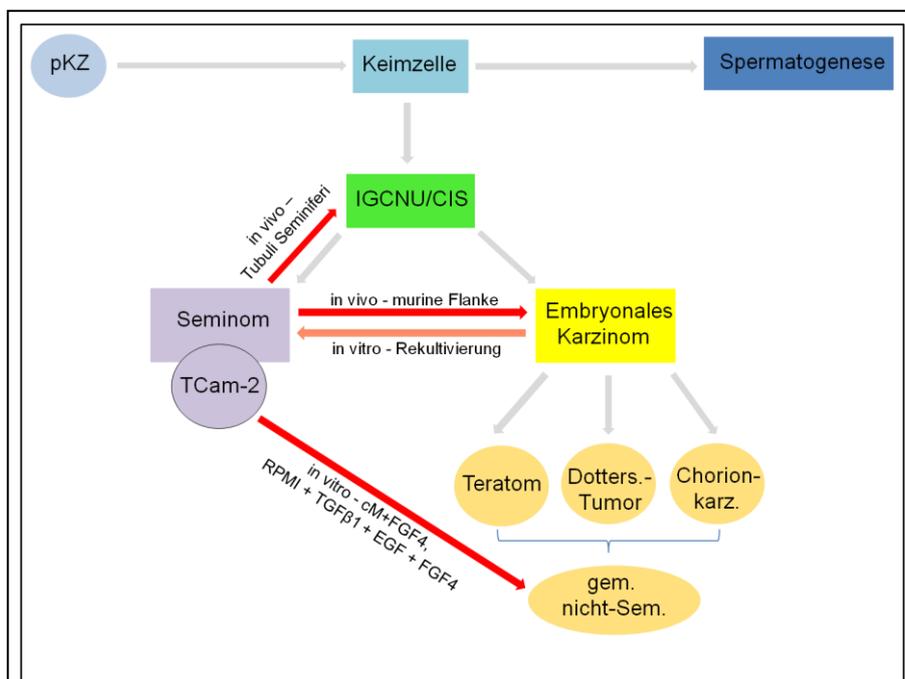


Abbildung 61: Modell seminomatöser Differenzierungsschritte in Abhängigkeit vom zellulären Umfeld und den Kultivierungsbedingungen. pKZ = primordiale Keimzelle, IGCNU/CIS= Intratubular germ cell neoplasia unclassified / Carcinoma-in-situ, Dottersack-Tumor = Dottersacktumor, Chorionkarz. = Chorionkarzinom, gem. nicht-Sem. = gemischtes Nicht-Seminom.

4.3.12 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Einblicke in die NANOG-Expressionsregulation während der humanen Keimzellreifung und in Keimzelltumoren gewonnen. Es wurde gezeigt, dass NANOG in fetalen und adulten Spermatogonien trotz NRR-Hypomethylierung aufgrund mangelnder OCT3/4-SOX2-Transaktivierung nicht exprimiert wird. Eine NRR-Hypermethylierung konnte erst im adulten Hoden und reifen Spermien nachgewiesen werden und deutet darauf hin, dass NANOG erst nach dem Entwicklungsstadium der Spermatogonien epigenetisch inaktiviert wird. Dieser Zeitpunkt könnte durch eine Natrium-Bisulfit-Sequenzierungsanalyse der NRR-DNS-Methylierung von Spermatozyten in unterschiedlichen Entwicklungsstufen näher bestimmt werden.

Im Rahmen der NANOG/AP-2 γ -siRNS-Experimente wurde eine Interaktion zwischen AP-2 γ und NANOG vermutet, die über Repression von DNMT3a und DNMT3l zum Erhalt eines hypomethylierten Genoms beitragen könnte und die Methylierung wichtiger Pluripotenzfaktoren sowie die Bildung von Heterochromatin verhindert. Diese Theorie müsste bestätigt werden. Im murinen Trophoblast-Stammzellen konnte bereits gezeigt werden, dass AP-2 γ an Nanog und an DNMT3b binden kann (Kuckenberget al., 2010, Kidder et al. 2010). Zunächst sollte daher durch eine Immunpräzipitation gezeigt werden, dass AP-2 γ auch im humanen System an den NANOG-Promotor bindet oder beide Proteine individuell an die Promotoren von DNMT3a und DNMT3l binden und diese reprimieren können. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Reduktion der NANOG- und AP-2 γ -Expressionen über DNMT3a/l zu einer Hypermethylierung des Genoms oder zur Bildung von Heterochromatin führt. Mit Hilfe eines 5-methyl-Cytidin spezifischen Antikörpers könnte die globale DNS-Methylierung untersucht werden und mit Hilfe des Histonacetylierungsstatus wäre es möglich den Zustand des Chromatins abzuschätzen.

Durch cM+F-Kultivierung differenzierten die TCam-2-Zellen in ein gemischtes Nicht-Seminom. Während dieses Prozesses reagierten nicht alle Zellen auf die veränderten Wachstumsbedingungen mit Differenzierung. Einige TCam-2-Zellen behielten ihre typische Morphologie bei und wurden von den differenzierten Zellen netzwerkartig umschlossen. Auch der Differenzierungsprozess in ein gemischtes Nicht-Semi-

nom deutet auf verschiedene Zellpopulationen hin. Es wäre sinnvoll, diese Populationen durch FACS-Sortierung voneinander zu trennen und individuell voneinander zu analysieren. Zur Sortierung stehen Marker wie D2-40, CK7, CK18, CK19, CK20 und AFP zur Verfügung. Dadurch würde sich ein detaillierteres Bild des Differenzierungsprozesses ergeben. Eine Lebend-Zellsortierung wäre ebenfalls sinnvoll, welche anhand des Oberflächenmarkers D2-40 erfolgen könnte. Durch Injektion dieser sortierten Zellen in Nacktmäuse (Flanke/Tubuli seminiferi) könnte das Wachstumsverhalten und die Tumorigenität der einzelnen Zellpopulationen *in vivo* untersucht werden. Mit den FACS sortierten Zellpopulationen könnte ein „cDNA Microarray“-Experiment durchgeführt werden, bei dem das Transkriptom auf Expressionsveränderungen untersucht und ein umfangreiches Wissen über deregulierte Signalwege und zelluläre Funktionen erlangt werden könne. Es stellte sich heraus, dass TGF- β 1, EGF und FGF4 eine wichtige Rolle während der TCam-2 *in vitro*-Differenzierung übernehmen. Inhibitor-Experimente wären in der Lage die individuellen Rollen dieser Wachstumsfaktoren in der Differenzierung weiter zu beleuchten. Weiterhin sollten Zytokine identifiziert werden, die die Transition der seminomatösen TCam-2-Zellen in ein EK fördern. Durch Injektion der TCam-2-Zellen in die Tubuli seminiferi wurde ein CIS-Mausmodell generiert, an welchem die Entstehung der invasiven Keimzelltumorentitäten näher erforscht werden könnte. So könnten Ursachen für die Differenzierungsrichtungsentscheidungen von CIS-Zellen (seminomatös oder nicht-seminomatös) näher beleuchtet werden. Ein Experiment, indem TCam-2 Zellen in die murine Flanke injiziert werden und nach Transition in ein EK in die Tubuli seminiferi transplantiert würden, könnte Aufschluss geben, ob sich diese EK-Zellen in den Tubuli seminiferi wie embryonale Karzinom-Zellen verhalten oder ob sie dort wie TCam-2-Zellen einen CIS ähnlichen Zustand einnehmen.

5. Literaturverzeichnis

- Adami, H. O., R. Bergstrom, et al. (1994). "Testicular cancer in nine northern European countries." *Int J Cancer* 59(1): 33-8.
- Ancelin, K., U. C. Lange, et al. (2006). "Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells." *Nat Cell Biol* 8(6): 623-30.
- Aubry, F., A. P. Satie, et al. (2001). "MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors." *Cancer* 92(11): 2778-85.
- Auman, H. J., T. Nottoli, et al. (2002). "Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development." *Development* 129(11): 2733-47.
- Aviezer, D., M. Safran, et al. (1999). "Heparin differentially regulates the interaction of fibroblast growth factor-4 with FGF receptors 1 and 2." *Biochem Biophys Res Commun* 263(3): 621-6.
- Battifora, H., K. Sheibani, et al. (1984). "Antikeratin antibodies in tumor diagnosis. Distinction between seminoma and embryonal carcinoma." *Cancer* 54(5): 843-8.
- Beckmann, J. „Die Gene sind nicht alles“. Verlag Edition Zukunft. (2009)
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C., and Panthier, J.J. (1996). Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development* 122(10): 3023-3033
- Berthelsen, J.G., et al., Incidence of carcinoma in situ of germ cells in contralateral testis of men with testicular tumours. *Br Med J*, (1979). 2(6186): p. 363-4.
- Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R.F. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-137.
- Biermann, K., H. Zhou, et al. (2008). "Molecular pathology of testicular germ cell tumors: an update" *Pathologe*.
- Bjurlin, M. A., C. Z. August, et al. (2007). "Histologically pure stage I seminoma with an elevated beta-hCG of 4497 IU/l." *Urology* 70(5): 1007 e13-5.
- Boer, B., J. L. Cox, et al. (2008). "Regulation of the Nanog gene by both positive and negative cis-regulatory elements in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells." *Mol Reprod Dev*.
- Bronson, D. L., P. W. Andrews, et al. (1980). "Cell line derived from a metastasis of a human testicular germ cell tumor." *Cancer Res* 40(7): 2500-6.
- Burgos, M.H., and D.W. Fawcett. (1955). "Studies on the fine structure of the mammalian testis". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1:287-300.

- Bussey, K. J. et al. "SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development". *Genes, Chromosomes and Cancer* 32, 342–352 (2001).
- Camargo, F. D., S. Gokhale, et al. (2007). "YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells." *Curr Biol* 17(23): 2054-60.
- Carrell, D. T. and S. S. Hammoud "The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development." *Mol Hum Reprod* 16(1): 37-47.
- Cavaleri, F. and H. R. Scholer (2003). "Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra." *Cell* 113(5): 551-2.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 113(5): 643-55.
- Chan, E. H., M. Nousiainen, et al. (2005). "The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1." *Oncogene* 24(12): 2076-86.
- Chedin, F., M. R. Lieber, et al. (2002). "The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16916-21.
- Cheng, L., M. T. Sung, et al. (2007). "OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia." *J Pathol* 211(1): 1-9.
- Cheville, J. C., S. Rao, et al. (2000). "Cytokeratin expression in seminoma of the human testis." *Am J Clin Pathol* 113(4): 583-8.
- Choi, S. C., S. J. Kim, et al. (2008). "Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways." *Stem Cells Dev* 17(4): 725-36.
- Czaja JT, Ulbright TM. "Evidence for the transformation of seminoma to yolk sac tumor, with histogenetic considerations." *Am J Clin Pathol* (1992); 97:468- 77.
- de Boer, W. I., A. B. Houtsmuller, et al. (1997). "Expression and functions of EGF, FGF and TGFbeta-growth-factor family members and their receptors in invasive human transitional-cell-carcinoma cells." *Int J Cancer* 71(2): 284-91.
- de Jong, J., H. Stoop, et al. (2008). "Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2." *Genes Chromosomes Cancer* 47(3): 185-96.
- de Jong, J., H. Stoop, et al. (2008). "Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications." *J Pathol* 215(1): 21-30.
- de Jong, J., H. Stoop, et al. (2007). "JKT-1 is not a human seminoma cell line." *Int J Androl* 30(4): 350-65.
- de Jong, J. and L. H. Looijenga (2006). "Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future." *Crit Rev Oncog* 12(3-4): 171-203.

- Dell'Era, P., M. Belleri, et al. (2001). "Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells." *Oncogene* 20(21): 2655-63.
- Delli-Bovi, P., A. M. Curatola, et al. (1988). "Processing, secretion, and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential." *Mol Cell Biol* 8(7): 2933-41.
- de Miguel, M.P., Cheng, L., Holland, E.C., Federspiel, M.J., and Donovan, P.J. (2002). "Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10458-10463.
- Deplus, R., C. Brenner, et al. (2002). "Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase." *Nucleic Acids Res* 30(17): 3831-8.
- de Rooij DG. "Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells". (2001). *Reproduction*. 121:347-354.
- de Sousa Lopes, S. M., K. Hayashi, et al. (2007). "Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors." *BMC Dev Biol* 7: 140.
- Dong, J., G. Feldmann, et al. (2007). "Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals." *Cell* 130(6): 1120-33.
- Downward, J. and S. Basu (2008). "YAP and p73: a complex affair." *Mol Cell* 32(6): 749-50
- Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. "Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs". Lyon: IARC Press; (2004)
- Eckert, D. "Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-2 γ in der Keimzellentwicklung", (2009)
- Eckert, D., K. Biermann, et al. (2008). "Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors." *BMC Dev Biol* 8: 106.
- Eckert, D., S. Buhl, et al. (2005). "The AP-2 family of transcription factors." *Genome Biol* 6(13): 246.
- Eckert, D., D. Nettersheim, et al. (2008). "TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture." *Cell Tissue Res* 331(2): 529-38.
- Egger, G., G. Liang, et al. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* 429(6990): 457-63.
- Fallon, J. H., K. B. Seroogy, et al. (1984). "Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development." *Science* 224(4653): 1107-9.

Farthing, C. R., G. Ficz, et al. (2008). "Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes." *PLoS Genet* 4(6): e1000116.

Fawcett, D.W., S. Ito, and D.L. Slautterback. (1959). "The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5:453-460.

Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M (2006). "Imprinted genes, placental development and fetal growth.". *Horm. Res.* 65 Suppl 3: 50–8

Ferreiro, J. A. (1994). "Ber-H2 expression in testicular germ cell tumors." *Hum Pathol* 25(5): 522-4.

Gaskell, T. L., A. Esnal, et al. (2004). "Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations." *Biol Reprod* 71(6): 2012-21.

Ghoshal, K., J. Datta, et al. (2005). "5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal." *Mol Cell Biol* 25(11): 4727-41.

Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M., and Wylie, C.C. (1991). "Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture". *Nature* 352(6338): 807-809.

Goodfellow, P. N. and R. Lovell-Badge (1993). "SRY and sex determination in mammals." *Annu Rev Genet* 27: 71-92.

Haqq, C. M., C. Y. King, et al. (1994). "Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY." *Science* 266(5190): 1494-500.

Hart, A. H., L. Hartley, et al. (2005). "The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors." *Cancer* 104(10): 2092-8.

Hayatsu, H. (2008). "The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research." *Mutat Res.*

He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* 5(7): 522-31.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". *Nature* 390 (6659): 465–71

Hemberger, M., W. Dean, et al. (2009). "Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8): 526-37.

- Hemberger, M., M. Hughes, et al. (2004). "Trophoblast stem cells differentiate *in vitro* into invasive trophoblast giant cells." *Dev Biol* 271(2): 362-71.
- Heo, I., C. Joo, et al. (2008). "Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA." *Mol Cell* 32(2): 276-84.
- Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59 (2 Suppl): 21-6.
- Hirai, K., H. Sasaki, et al. (2004). "HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition." *Exp Cell Res* 294(1): 77-85.
- Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M. "Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler". Thieme Verlag, 2000.
- Hittmair, A., H. Rogatsch, et al. (1996). "CD30 expression in seminoma." *Hum Pathol* 27(11): 1166-71.
- Hoei-Hansen, C. E., K. Almstrup, et al. (2005). "Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours." *Histopathology* 47(1): 48-56.
- Hong, H. Y., W. K. Jeon, et al. "14-3-3 sigma and 14-3-3 zeta plays an opposite role in cell growth inhibition mediated by transforming growth factor-beta 1." *Mol Cells* 29(3): 305-9.
- Hyslop, L., M. Stojkovic, et al. (2005). "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages." *Stem Cells* 23(8): 1035-43.
- Jones, T. D., T. M. Ulbright, et al. (2004). "OCT4: A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis." *Clin Cancer Res* 10(24): 8544-7.
- Jones, T. D., G. T. MacLennan, et al. (2006). "Screening for intratubular germ cell neoplasia of the testis using OCT4 immunohistochemistry." *Am J Surg Pathol* 30(11): 1427-31.
- Koi, H., J. Zhang, et al. (2002). "Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus." *Biol Reprod* 67(5): 1572-9.
- Kosaka, N., H. Sakamoto, et al. (2009). "Pleiotropic function of FGF-4: its role in development and stem cells." *Dev Dyn* 238(2): 265-76.
- Koutsourakis, M., A. Langeveld, et al. (1999). "The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development." *Development* 126(4): 723-32.
- Krabbe, S., et al. "High incidence of undetected neoplasia in maldescended testes". *Lancet*, (1979). 1(8124): p. 999-1000.
- Krag Jacobsen G., Talerma A., (1989). "Atlas of Germ Cell Tumours". Munksgaard, Kopenhagen

- Kunath, T., M. K. Saba-El-Leil, et al. (2007). "FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment." *Development* 134(16): 2895-902.
- Kurimoto, K., Y. Yabuta, et al. (2008). "Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice." *Genes Dev* 22(12): 1617-35.
- Kuroda, T., M. Tada, et al. (2005). "Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression." *Mol Cell Biol* 25(6): 2475-85.
- Lau, S. K., L. M. Weiss, et al. (2007). "D2-40 immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30." *Mod Pathol* 20(3): 320-5.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Li, J. Y., M. T. Pu, et al. (2007). "Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog." *Mol Cell Biol* 27(24): 8748-59.
- Lifschitz-Mercer, B., M. Fogel, et al. (1991). "Intermediate filament protein profiles of human testicular non-seminomatous germ cell tumors: correlation of cytokeratin synthesis to cell differentiation." *Differentiation* 48(3): 191-8.
- Lind, G. E., R. I. Skotheim, et al. (2007). "The epigenome of testicular germ cell tumors." *Apmis* 115(10): 1147-60.
- Longin, J. and B. Le Magueresse-Battistoni (2002). "Evidence that MMP-2 and TIMP-2 are at play in the FSH-induced changes in Sertoli cells." *Mol Cell Endocrinol* 189(1-2): 25-35.
- Looijenga, L. H., H. Stoop, et al. (2003). "POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors." *Cancer Res* 63(9): 2244-50.
- Looijenga, L. H., G. Zafarana, et al. (2003). "Role of gain of 12p in germ cell tumour development." *Apmis* 111(1): 161-71; discussion 172-3.
- Looijenga, L.H. and J.W. Oosterhuis, "Pathogenesis of testicular germ cell tumours". *Rev Reprod*, (1999). 4(2): p. 90-100.
- Ma, G. T., M. E. Roth, et al. (1997). "GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression *in vivo*." *Development* 124(4): 907-14.
- Maldonado-Estrada, J., E. Menu, et al. (2004). "Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry." *J Immunol Methods* 286(1-2): 21-34.

Maltepe, E., A. I. Bakardjiev, et al. "The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development." *J Clin Invest* 120(4): 1016-25.(2010)

Massague, J. (2003). "Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited." *Genes Dev* 17(24): 2993-7.

Massagué J (1998). "TGF-beta signal transduction". *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753–91.

Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353(6346): 750-752.

Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, et al. (1996). "Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (7): 3026–30.

Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* 113(5): 631-42.

Miyagawa, K., H. Sakamoto, et al. (1988). "hst-1 transforming protein: expression in silkworm cells and characterization as a novel heparin-binding growth factor." *Oncogene* 3(4): 383-9

Mizuno, Y., A. Gotoh, et al. (1993). "Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)." *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 84(7): 1211-8.

Mongan, N. P. and L. J. Gudas (2007). "Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment." *Differentiation* 75(9): 853-70.

Mostofi, F. K. and I. A. Sesterhenn (1985). "Pathology of germ cell tumors of testes." *Prog Clin Biol Res* 203: 1-34.

Motzer R. et al., "Blood Group-related Antigens in Human Germ Cell Tumors". *Cancer Research* 48, 5342-5347, September 15, (1988)

Netto, G. J., Y. Nakai, et al. (2008). "Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors." *Mod Pathol* 21(11): 1337-44.

Nishioka, N., K. Inoue, et al. (2009). "The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass." *Dev Cell* 16(3): 398-410.

Nishioka, N., S. Yamamoto, et al. (2008). "Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos." *Mech Dev* 125(3-4): 270-83.

Newman, M. A., J. M. Thomson, et al. (2008). "Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing." *Rna* 14(8): 1539-49.

Nogales-Fernandez, F., S. G. Silverberg, et al. (1977). "Yolk sac carcinoma (endodermal sinus tumor): ultrastructure and histogenesis of gonadal and

extragonadal tumors in comparison with normal human yolk sac." *Cancer* 39(4): 1462-74.

Oh, H. and K. D. Irvine (2008). "*In vivo* regulation of Yorkie phosphorylation and localization." *Development* 135(6): 1081-8.

Ohinata, Y., H. Ohta, et al. (2009). "A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice." *Cell* 137(3): 571-84.

Oosterhuis, J. W. and L. H. Looijenga (2005). "Testicular germ-cell tumours in a broader perspective." *Nat Rev Cancer* 5(3): 210-22.

Palasingam, P., R. Jauch, et al. (2009). "The structure of Sox17 bound to DNA reveals a conserved bending topology but selective protein interaction platforms." *J Mol Biol* 388(3): 619-30.

Pan, G. and J. A. Thomson (2007). "Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency." *Cell Res* 17(1): 42-9.

Pauls, K., R. Jager, et al. (2005). "Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors." *Int J Cancer* 115(3): 470-7.

Pauls, K., H. Schorle, et al. (2006). "Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study." *Hum Reprod* 21(2): 397-404.

Peters, I., K. Rehmet, et al. (2007). "RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis." *Mol Cancer* 6: 49

Rajpert-De Meyts, E. „Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects“. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No.3 pp. 303–323, (2006)

Rodda, D. J., J. L. Chew, et al. (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." *J Biol Chem* 280(26): 24731-7.

Rosenberg, C., et al. "Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas". *Oncogene*, (2000). 19(51): p. 5858-62.

Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., and Wylie, C. (2006). "Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration". *Development* 133(24): 4861-4869.

Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. "Histological and Histopathological Evaluation of Testis". Clearwater, USA: Cache River Press; (1990):120-161.

Saitou, M., B. Payer, et al. (2005). "Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse." *Cell Cycle* 4(12): 1736-40.

Salem, C. E., I. D. Markl, et al. (2000). "PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells." *Int J Cancer* 87(2): 179-85.

Sasaki, H. and Y. Matsui (2008). "Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond." *Nat Rev Genet* 9(2): 129-40.

Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. "Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice". *Dev Biol* (2005);278:440–458

Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 807–821

Silva, J., I. Chambers, et al. (2006). "Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion." *Nature* 441(7096): 997-1001.

Skakkebaek, N. E., J. G. Berthelsen, et al. (1987). "Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma." *Int J Androl* 10(1): 19-28.

Skakkebaek, N.E., et al. "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): p. 1-9; discussion 9-11.

Skinner, M. K., J. N. Norton, et al. (1991). "Cell-cell interactions and the regulation of testis function." *Ann N Y Acad Sci* 637: 354-63.

Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, et al. "Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors". *Oncogene* (2002); 21:3909–3916.

Sonne, S. B., K. Almstrup, et al. (2009). "Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte." *Cancer Res* 69(12): 5241-50.

Sonne, S. B., R. M. Perrett, et al. "Analysis of SOX2 expression in developing human testis and germ cell neoplasia." *Int J Dev Biol* 54(4): 755-60.

Sporn, M. B. and A. B. Roberts (1989). "Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications." *Jama* 262(7): 938-41

Strigley, J. R., B. Mackay, et al. (1988). "The ultrastructure and histogenesis of male germ neoplasia with emphasis on seminoma with early carcinomatous features." *Ultrastruct Pathol* 12(1): 67-86.

Staun-Ram, E., S. Goldman, et al. (2009). "p53 Mediates epidermal growth factor (EGF) induction of MMP-2 transcription and trophoblast invasion." *Placenta* 30(12): 1029-36.

Steinhardt, A. A., M. F. Gayyed, et al. (2008). "Expression of Yes-associated protein in common solid tumors." *Hum Pathol* 39(11): 1582-9.

Surani, M. A., Barton, S. C. & Norris, M. L. "Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome". *Cell* 45, 127–136 (1986).

Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-72.

Teilum, G. (1953). "Classification and interpretation of testicular tumors." *Acta Unio Int Contra Cancrum* 9(4): 872-4.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

Waddington, C. H. "The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology". Alen & Unwin, (1957).

Weber, S., D. Eckert, et al. "Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance." *Biol Reprod* 82(1): 214-23.

West, J. A., S. R. Viswanathan, et al. (2009). "A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy." *Nature* 460(7257): 909-13.

Wu L., Belasco J. „Micro-RNA Regulation of the Mammalian lin-28 Gene during Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells". *Molecular and Cellular Biology*, November (2005), p. 9198-9208, Vol. 25, No. 21

Wu, X. Z. (2008). "Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation." *Ann Surg Oncol* 15(2): 407-14.

Yang, A. S., M. R. Estecio, et al. (2004). "A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements." *Nucleic Acids Res* 32(3): e38.

Zamudio, N., S. Chong, et al. (2008). "Epigenetic Regulation in Male Germ Cells." *Reproduction*.

Zeng, Q. and W. Hong (2008). "The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals." *Cancer Cell* 13(3): 188-92.

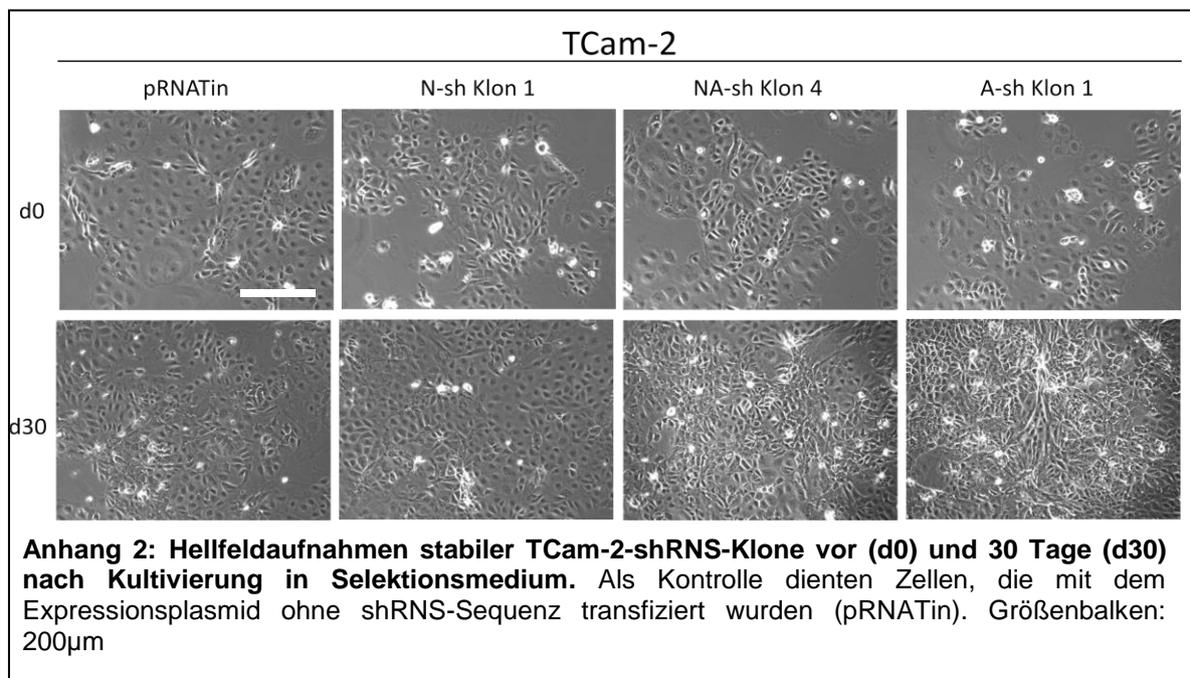
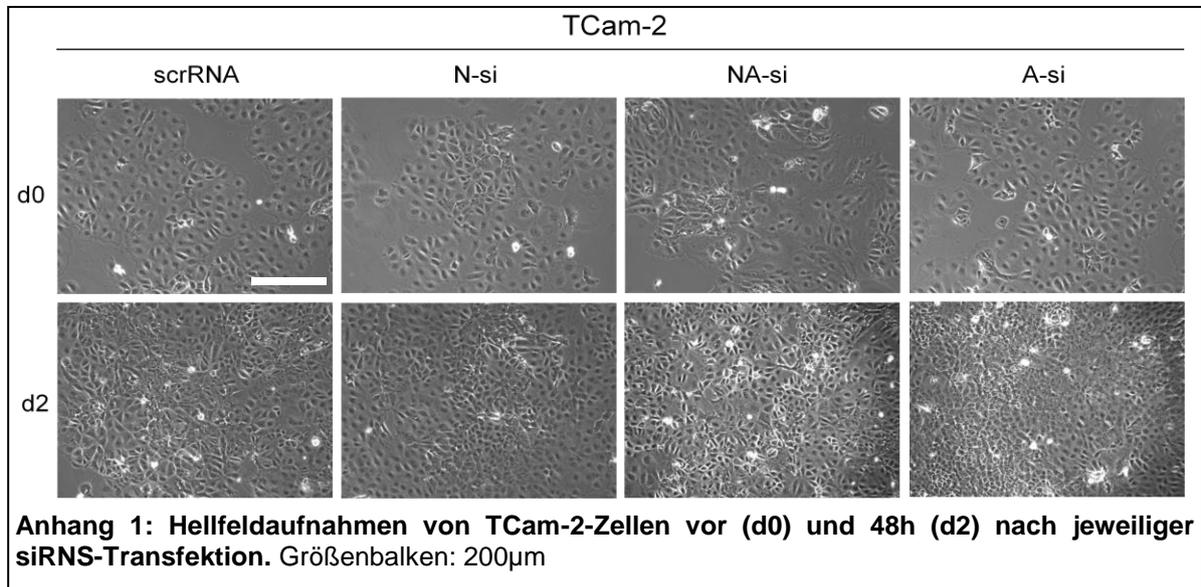
Zhao, B., Q. Y. Lei, et al. (2008). "The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer." *Curr Opin Cell Biol* 20(6): 638-46.

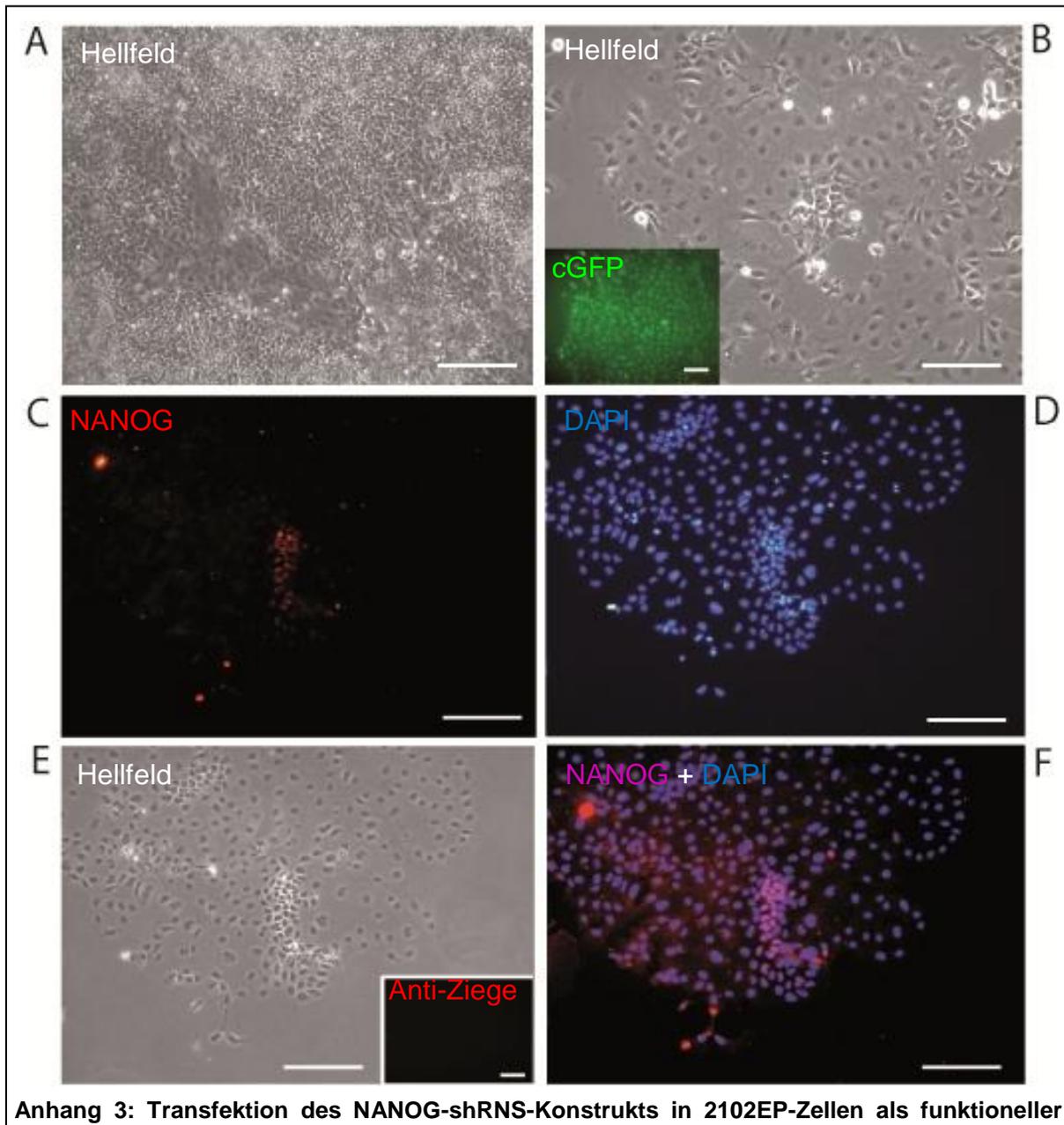
Zhao, B., L. Li, et al. "The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version." *Genes Dev* 24(9): 862-74.

Zhao, B., X. Wei, et al. (2007). "Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control." *Genes Dev* 21(21): 2747-61.

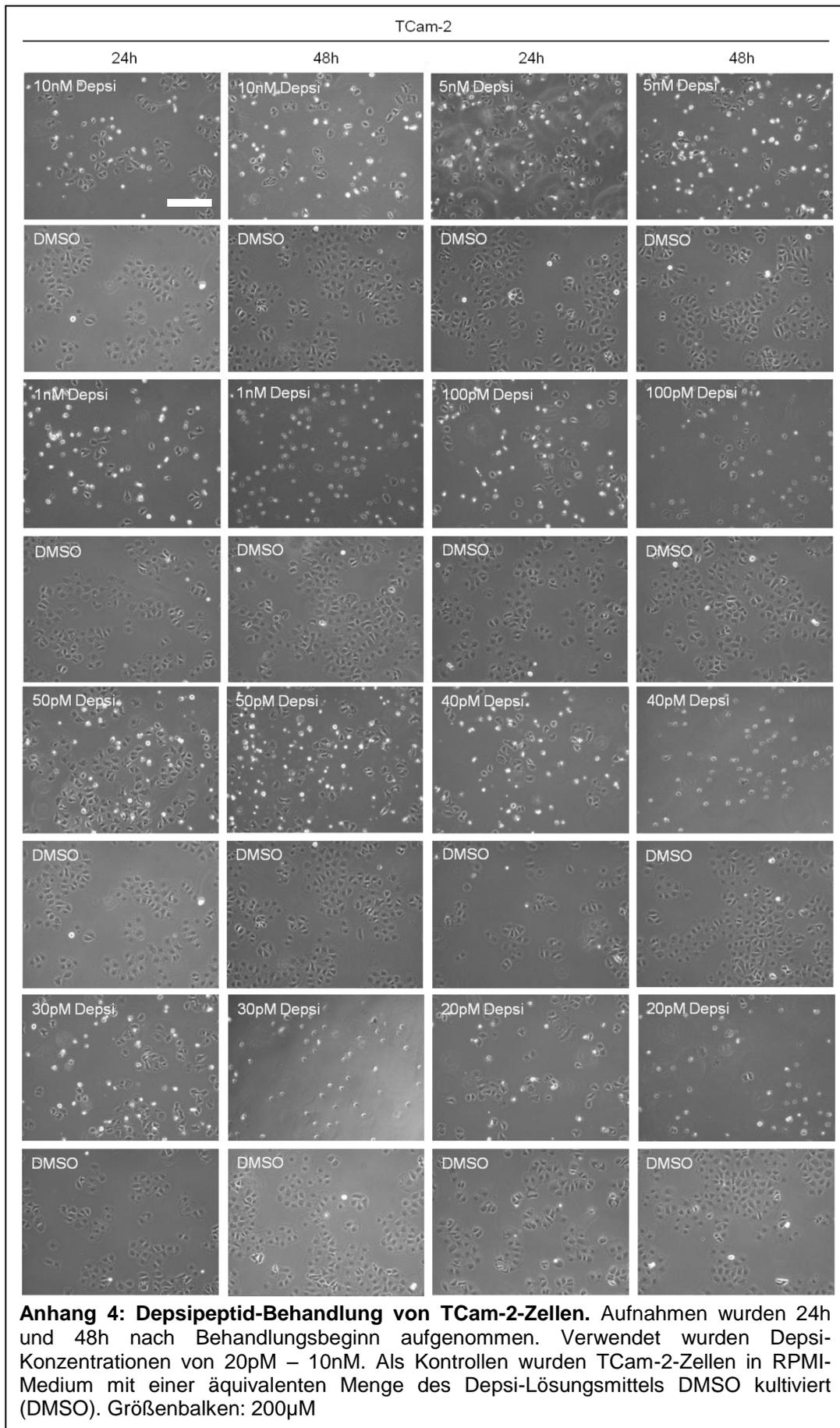
6. Anhang

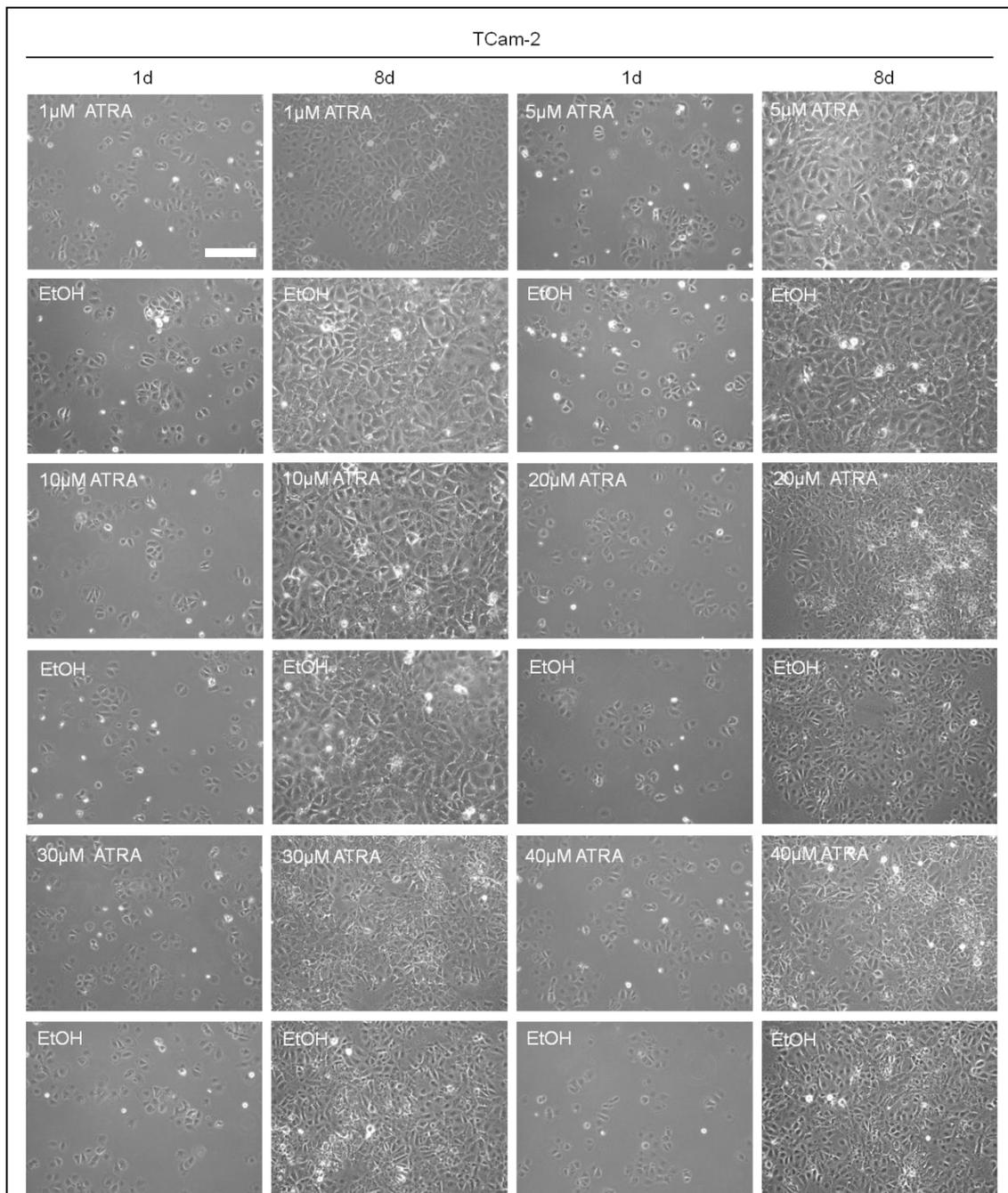
6.1 Bilderanhang



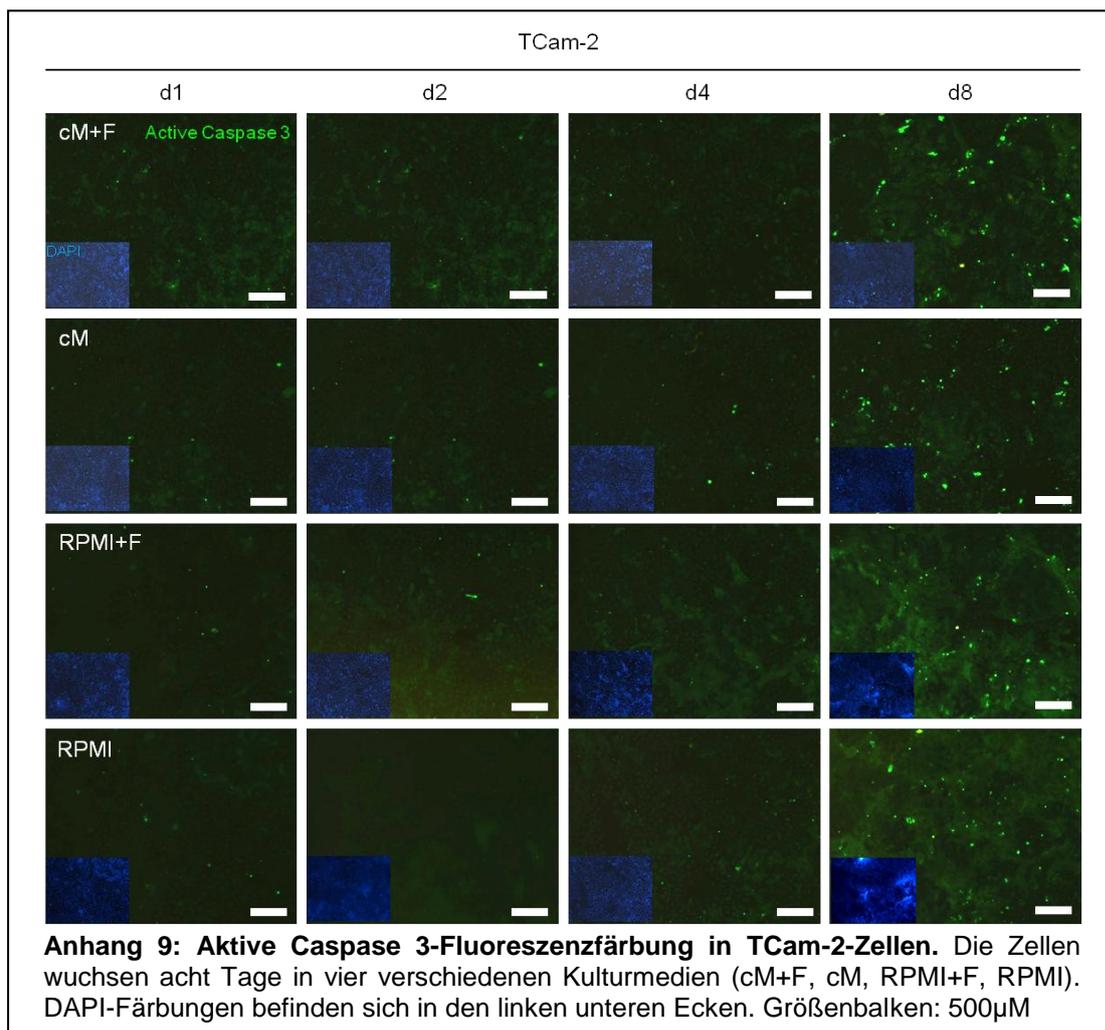
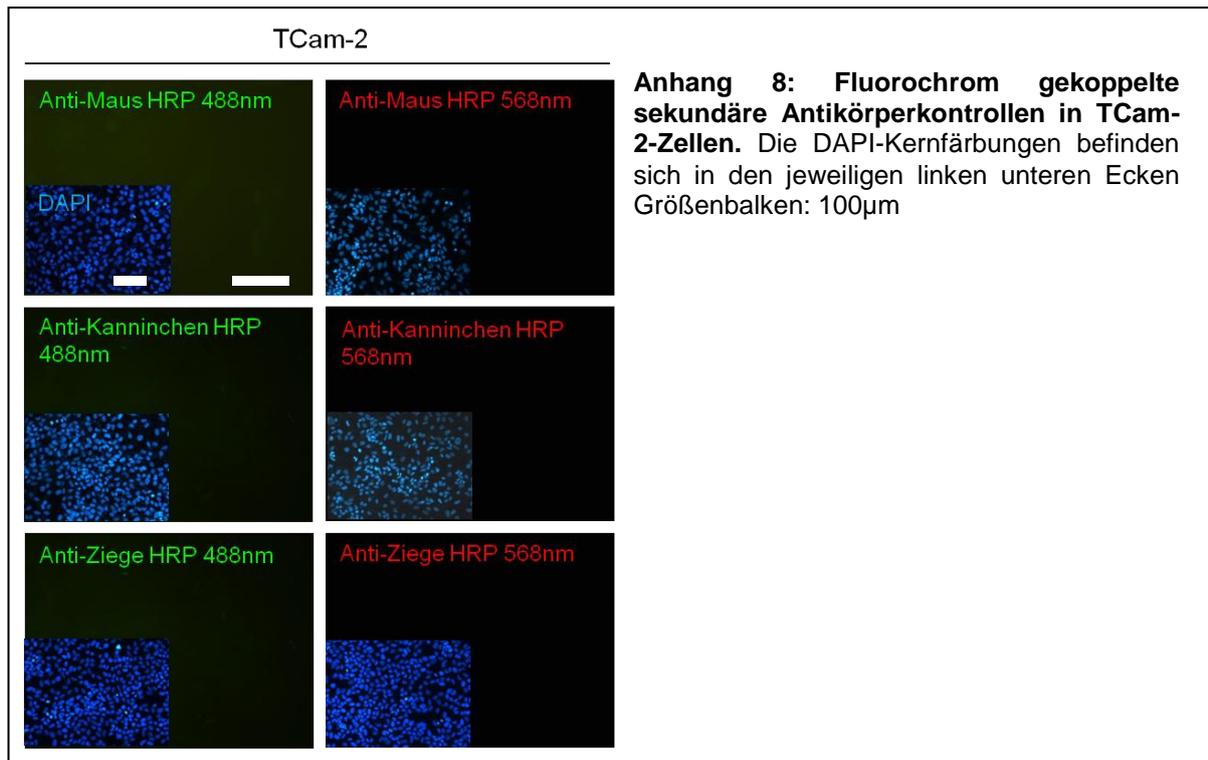


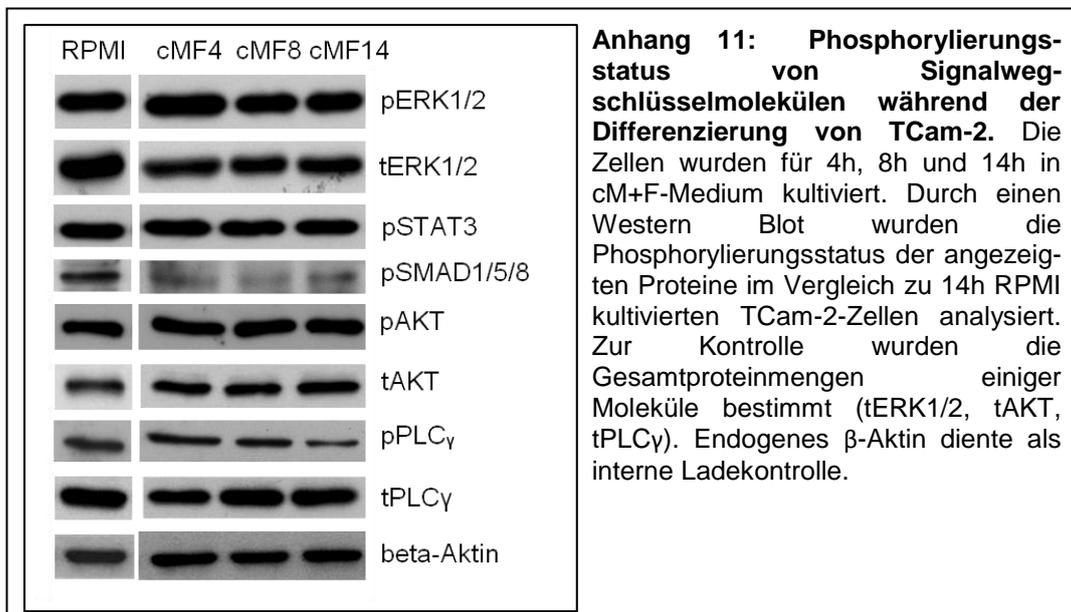
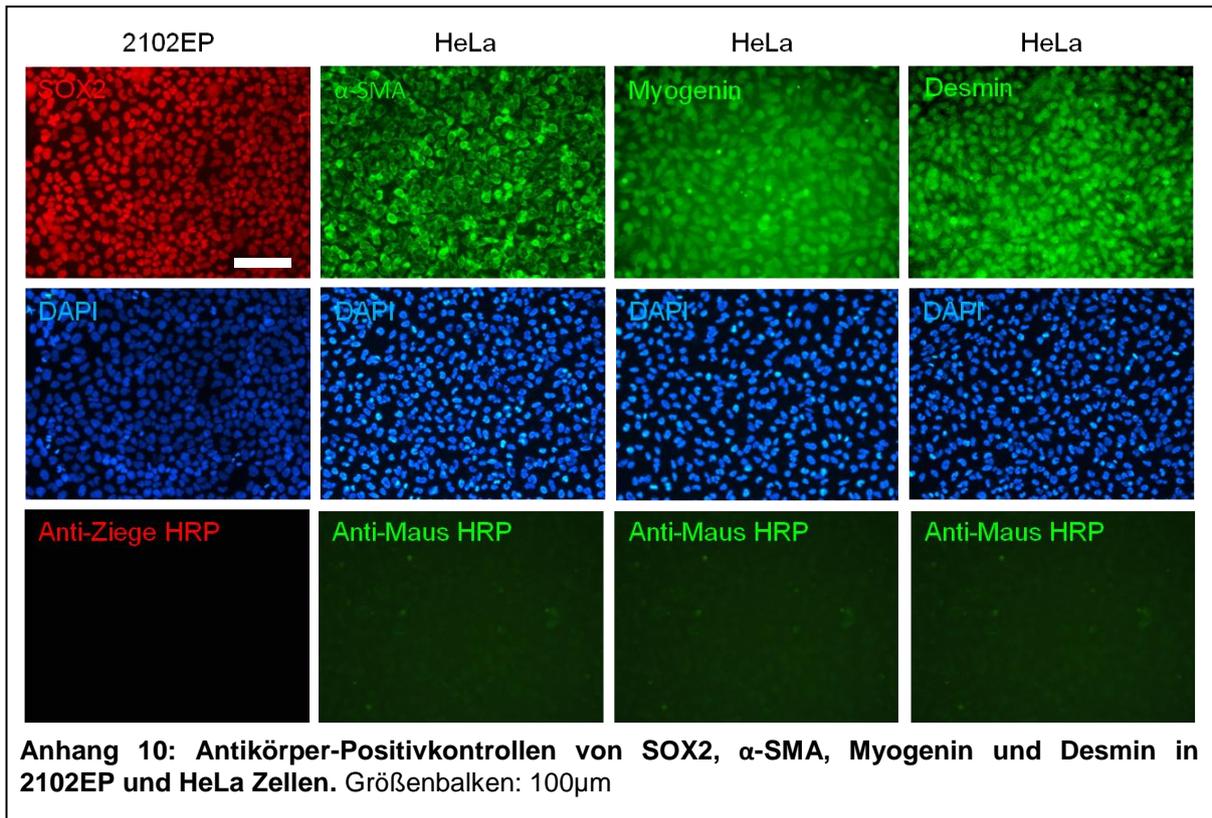
Anhang 3: Transfektion des NANOG-shRNS-Konstrukts in 2102EP-Zellen als funktioneller Nachweis A) Hellfeldaufnahme von untransfizierten 2102EP-Zellen nach acht Tagen in Kultur B) Acht Tage nach NANOG-shRNS-Transfektion und Kultivierung unter Selektionsbedingungen zeigten die Zellen morphologische Anzeichen einer Differenzierung. Die kleine Box zeigt cGFP exprimierende Zellen C) NANOG-Immunfluoreszenzfärbung acht Tage nach shRNS-Transfektion D) Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt E) Hellfeldaufnahme der NANOG fluoreszenzgefärbten Zellen. Kleine Box zeigt die sekundäre Antikörperkontrolle F) Graphische Überlagerung der Bilder C) und D) Größenbalken: 200µm

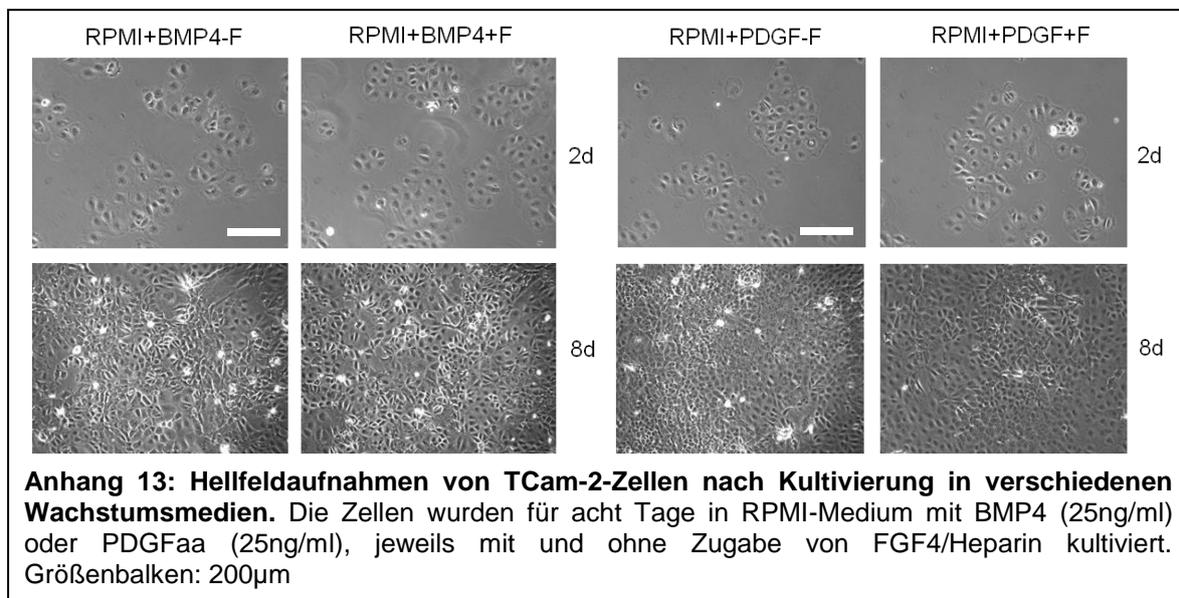
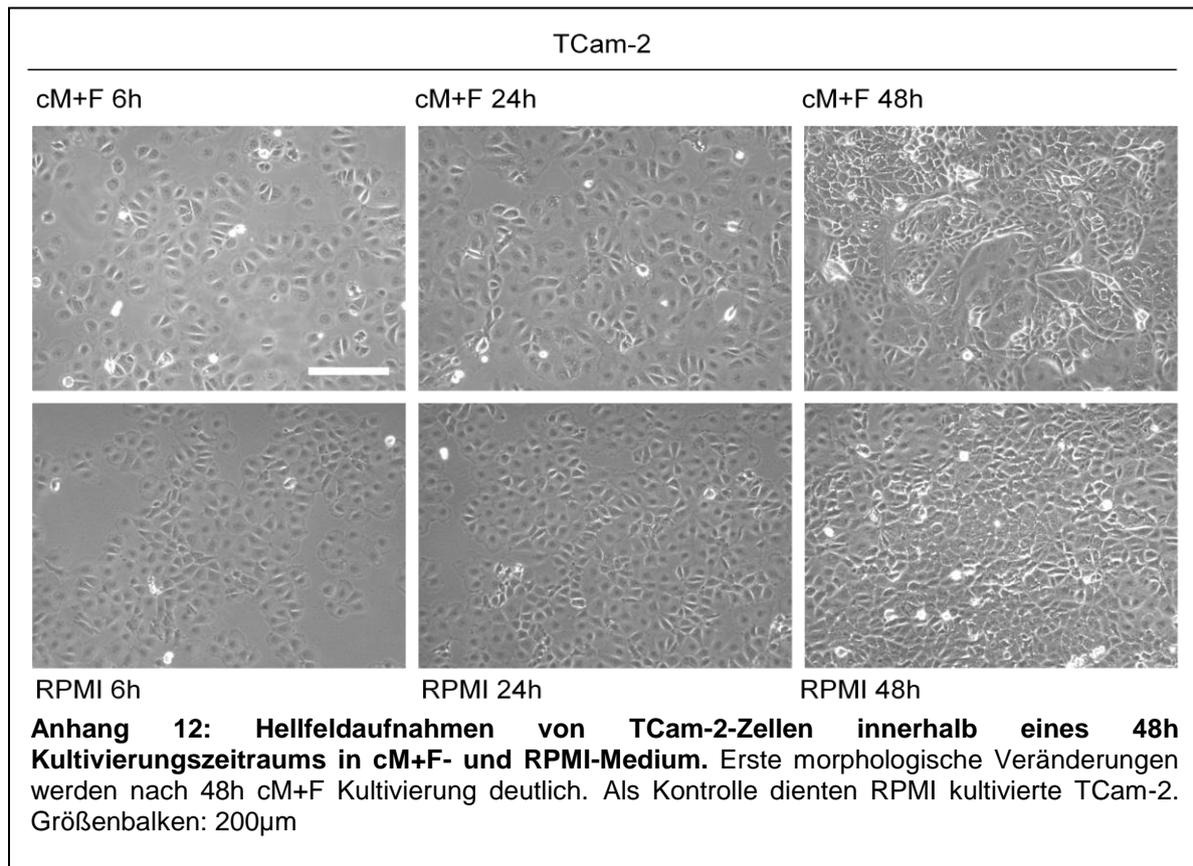


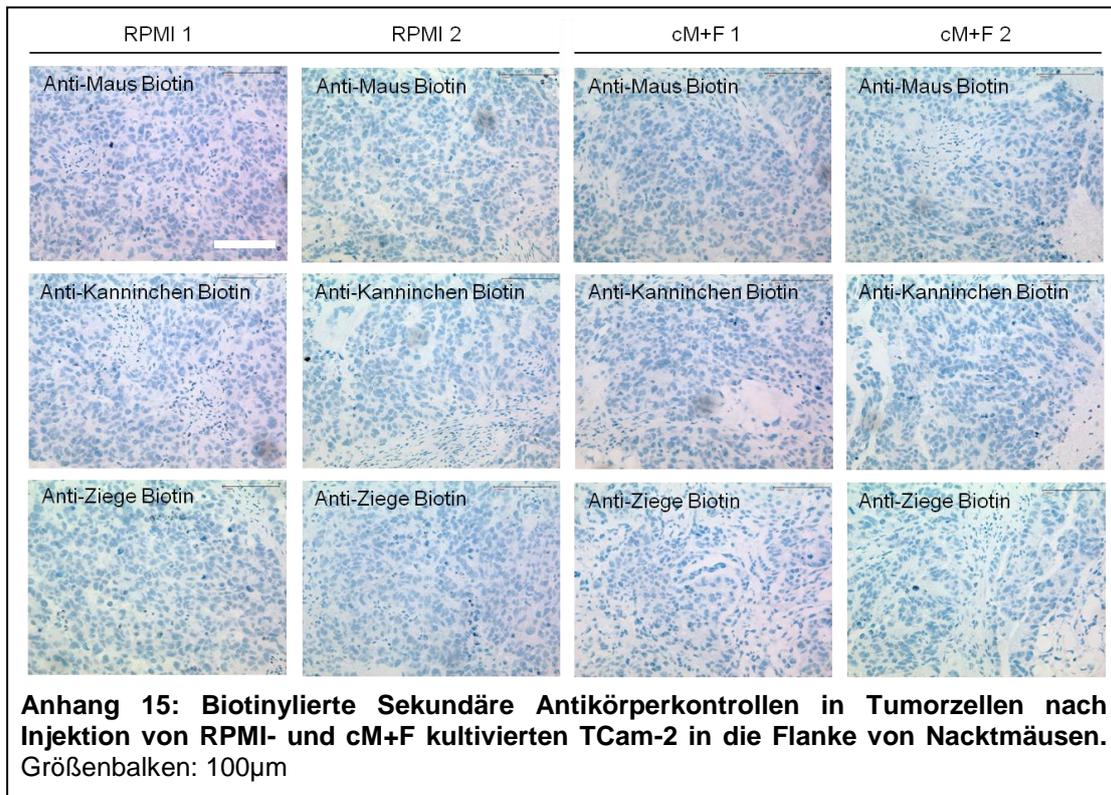
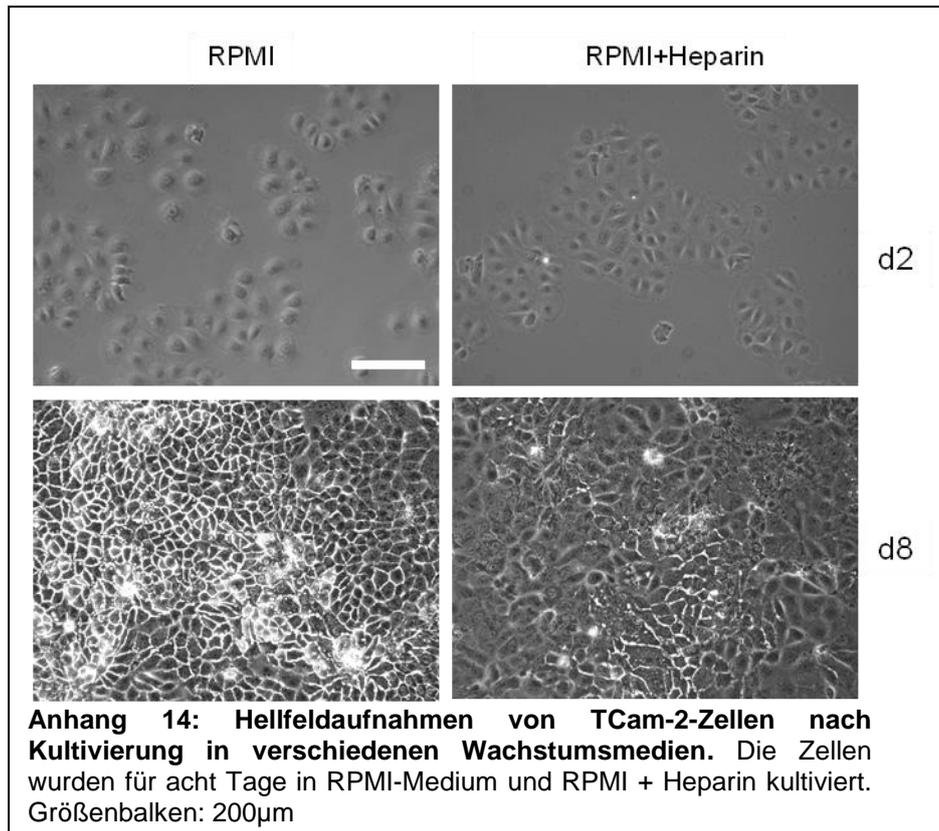


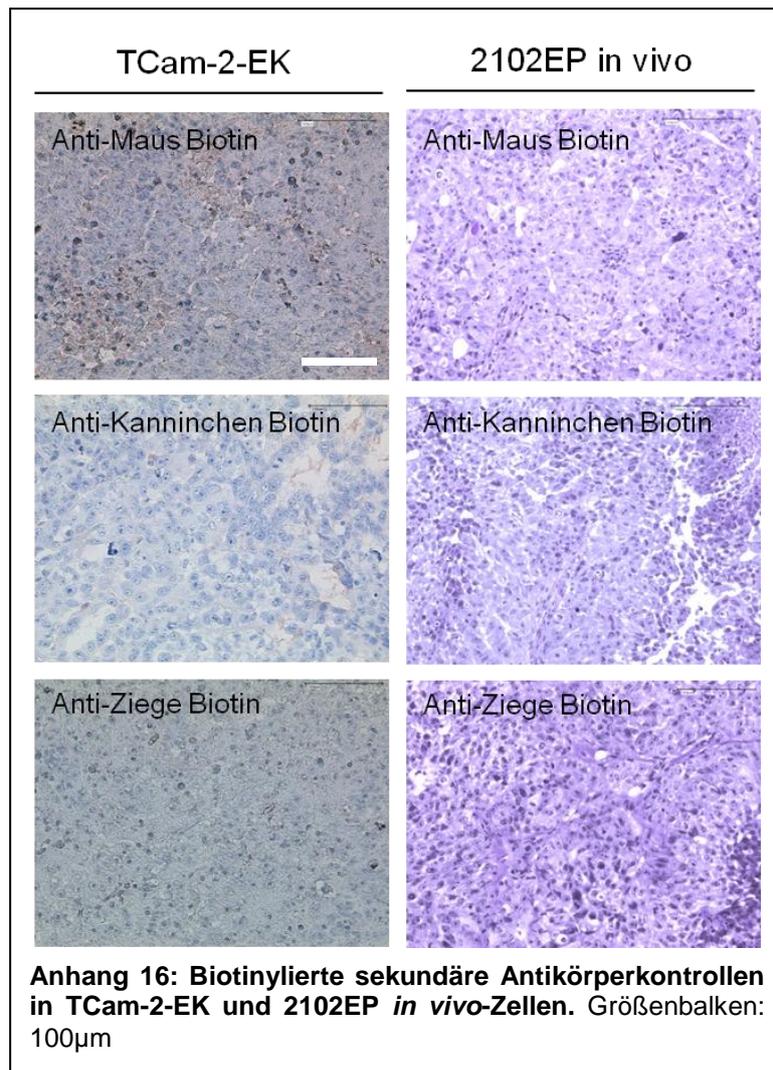
Anhang 5: All-trans-Retinsäure-Behandlung von TCam-2-Zellen. Aufnahmen wurden ein (1d) und acht (8d) Tage nach Behandlungsbeginn aufgenommen. Dabei wurden ATRA-Konzentrationen von 1 μ M – 40 μ M verwendet. Als Kontrollen wurden TCam-2-Zellen in RPMI-Medium mit einer äquivalenten Menge des ATRA-Lösungsmittels Ethanol kultiviert (EtOH). Größenbalken: 200 μ M

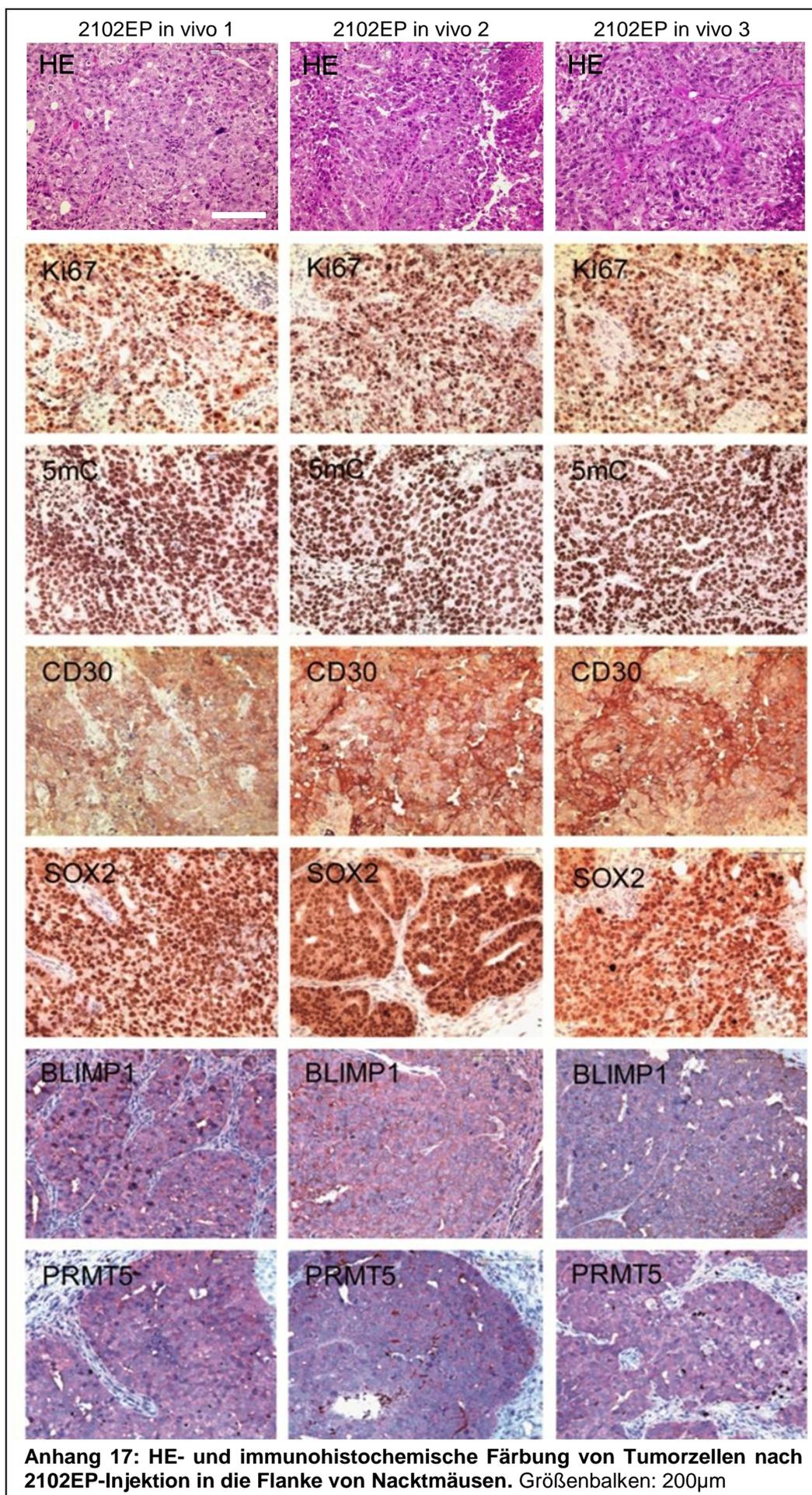


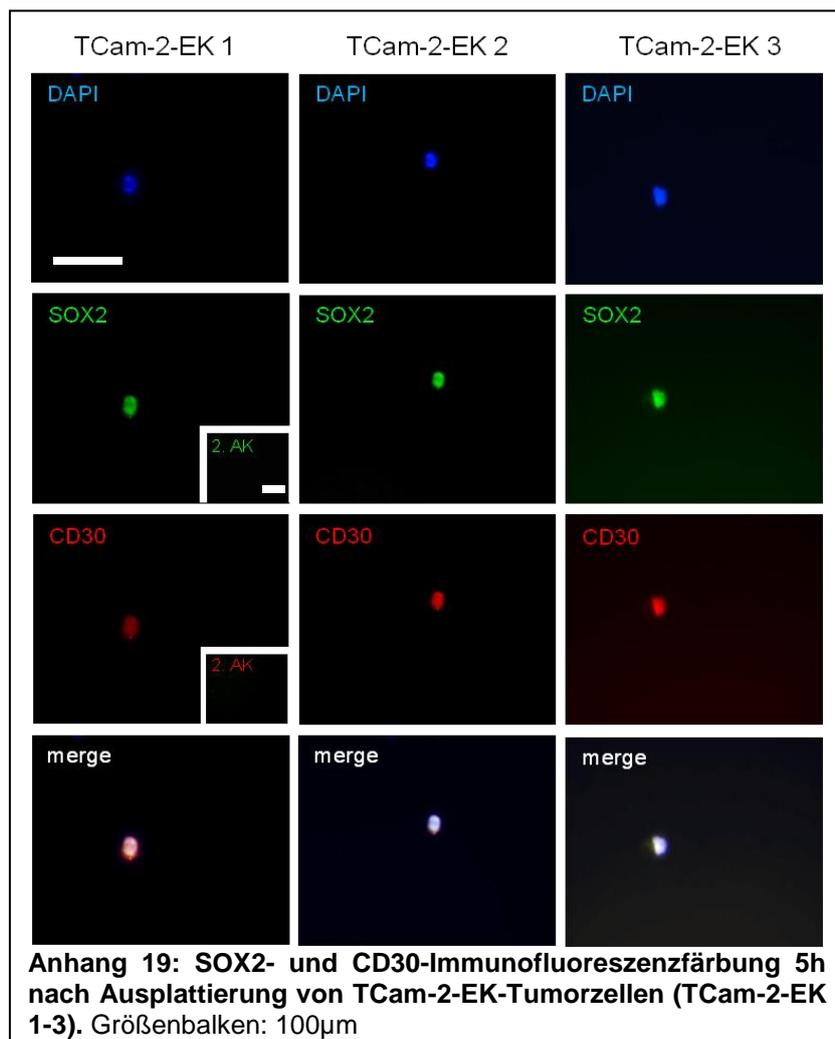
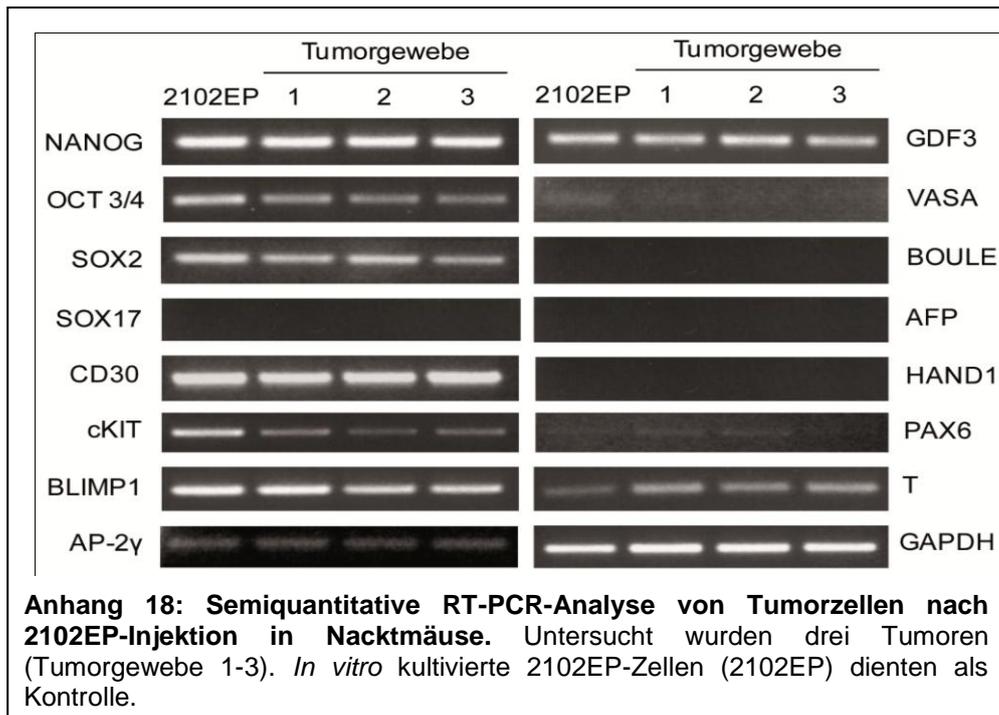


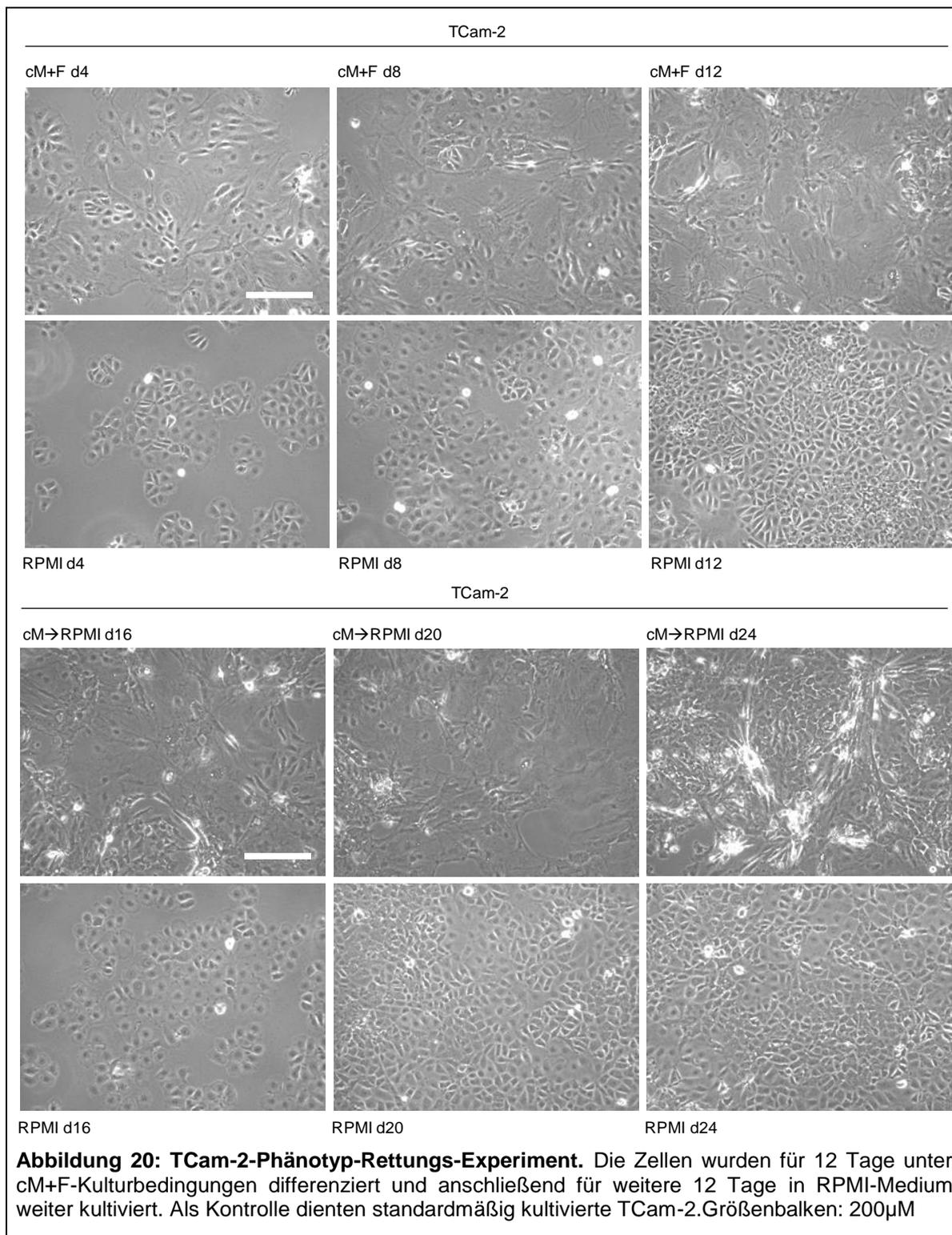


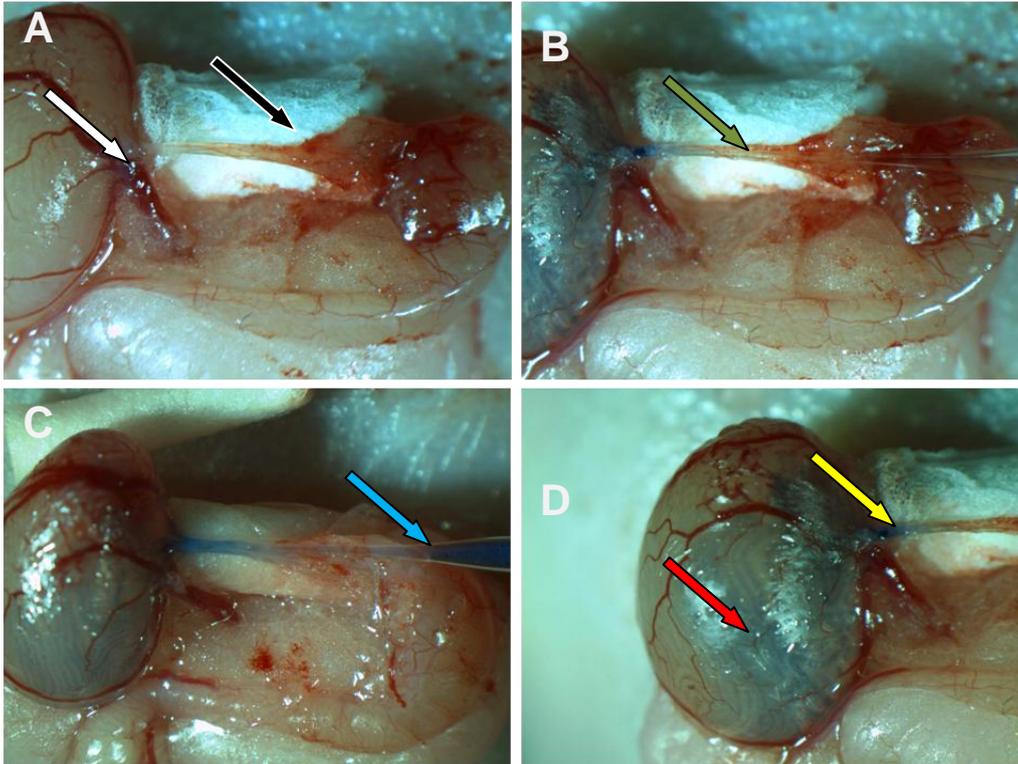






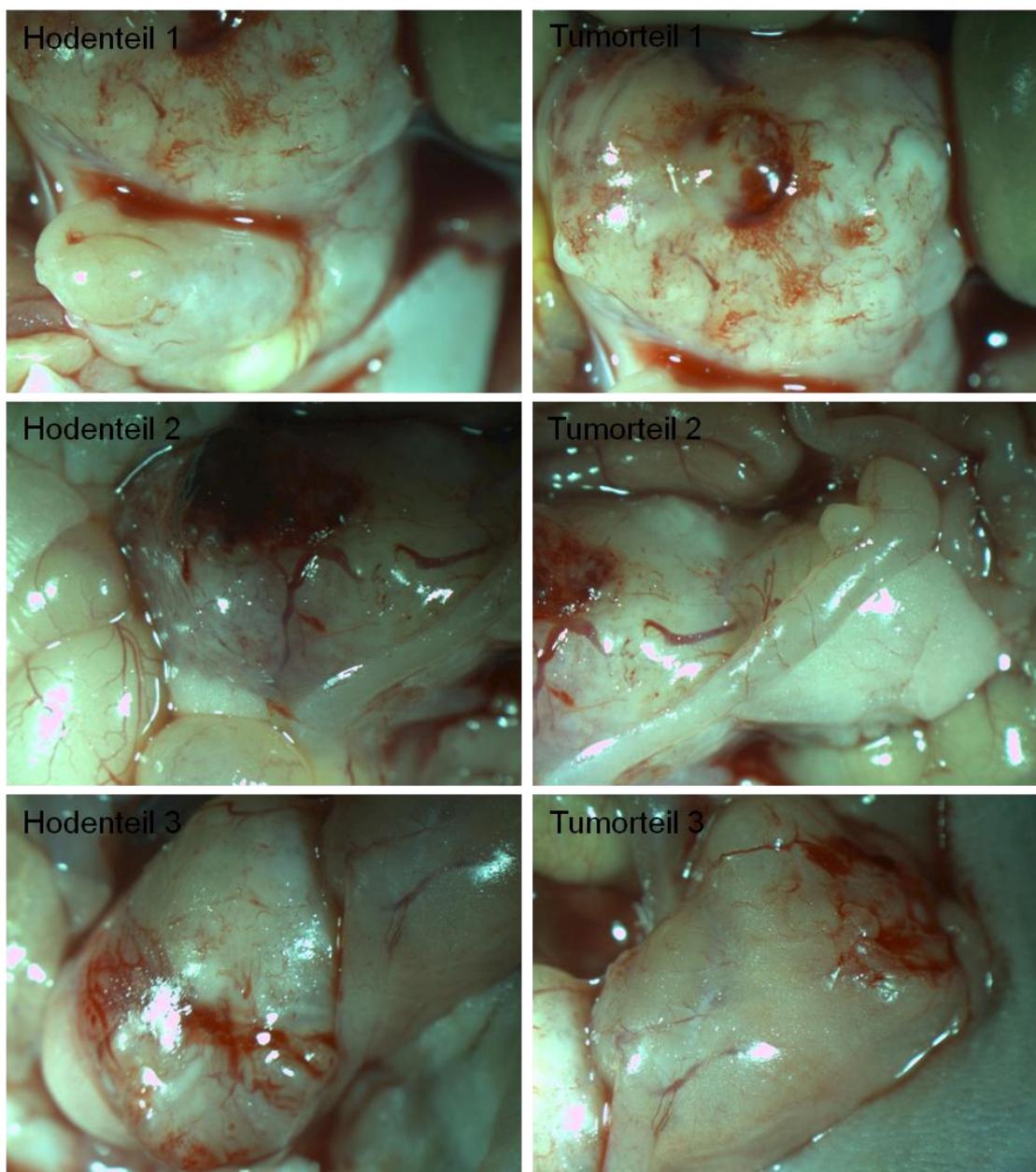




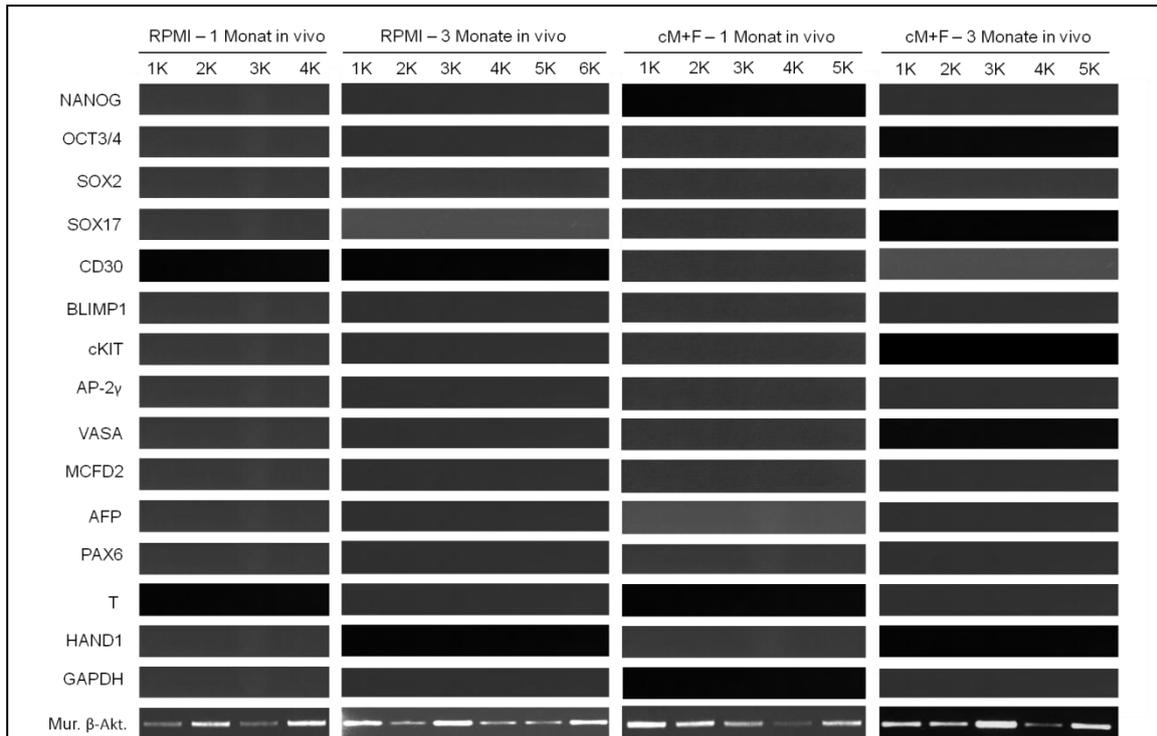


Anhang 21: Erfolgreiche Injektion von TCam-2-Zellen in murine Tubuli seminiferi über den Ductus efferens. A) Der Ductus efferens des linken Hodens wurde frei von Fettgewebe präpariert (weißer Pfeil) und mit sterilem Zellstoff stabilisiert (schwarzer Pfeil). B) Einführung der Injektionskanüle in den Ductus efferens (dunkelgrüner Pfeil). C) Injizierte Zellen wurden durch Trypan-Blau angefärbt (blauer Pfeil) und durch Druckerzeugung in den Ductus efferens gepumpt. D) Die Zellen verbreiten sich durch das Rete testis (gelber Pfeil) in die Tubuli seminiferi (roter Pfeil).

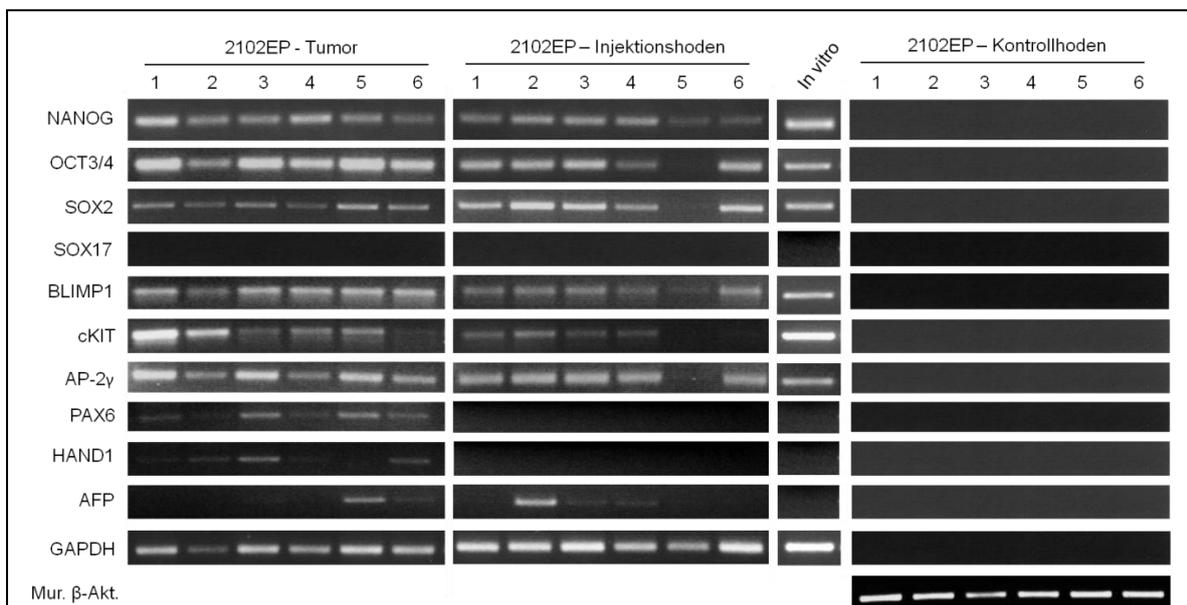
2102EP Injektionen



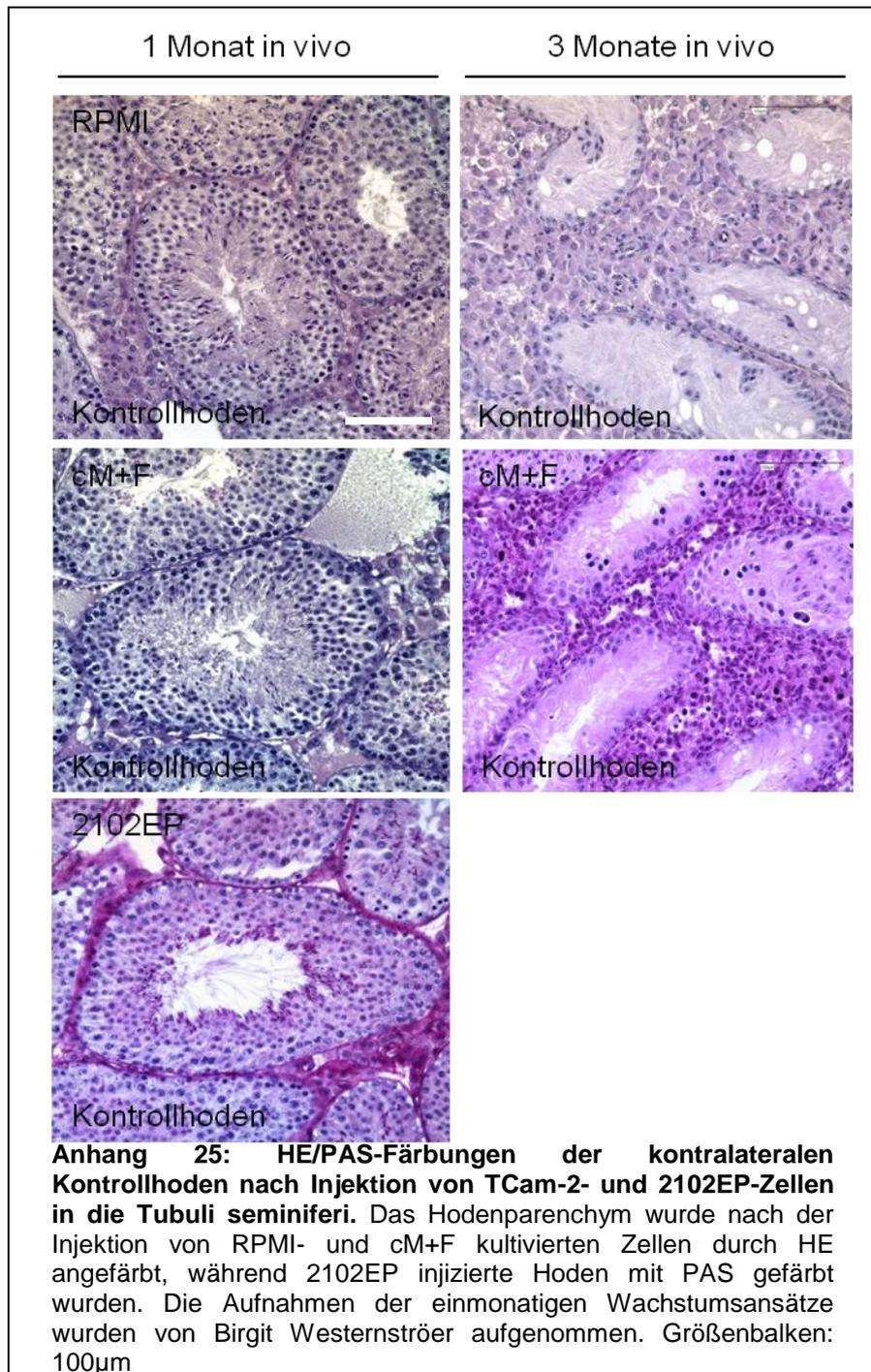
Anhang 22: Makroskopische Aufnahmen der Injektionshodentestis und Tumormassen von Busulfan behandelten Nacktmäusen nach Injektion von 2102EP-Zellen in die Tubuli seminiferi. Auf der linken Seite sind jeweils die Hodenteile und auf der rechten Seite die angrenzenden Tumorteile gezeigt.

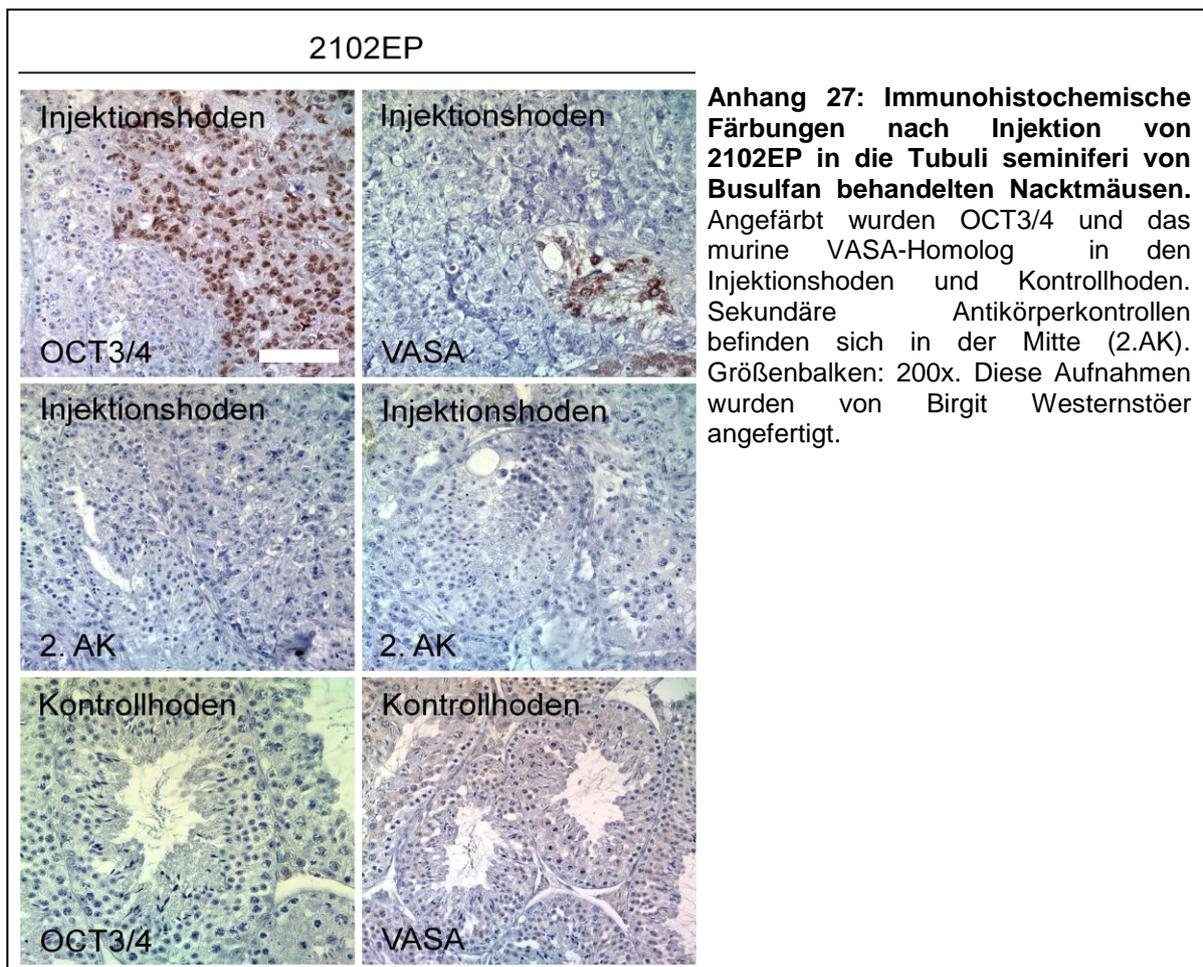
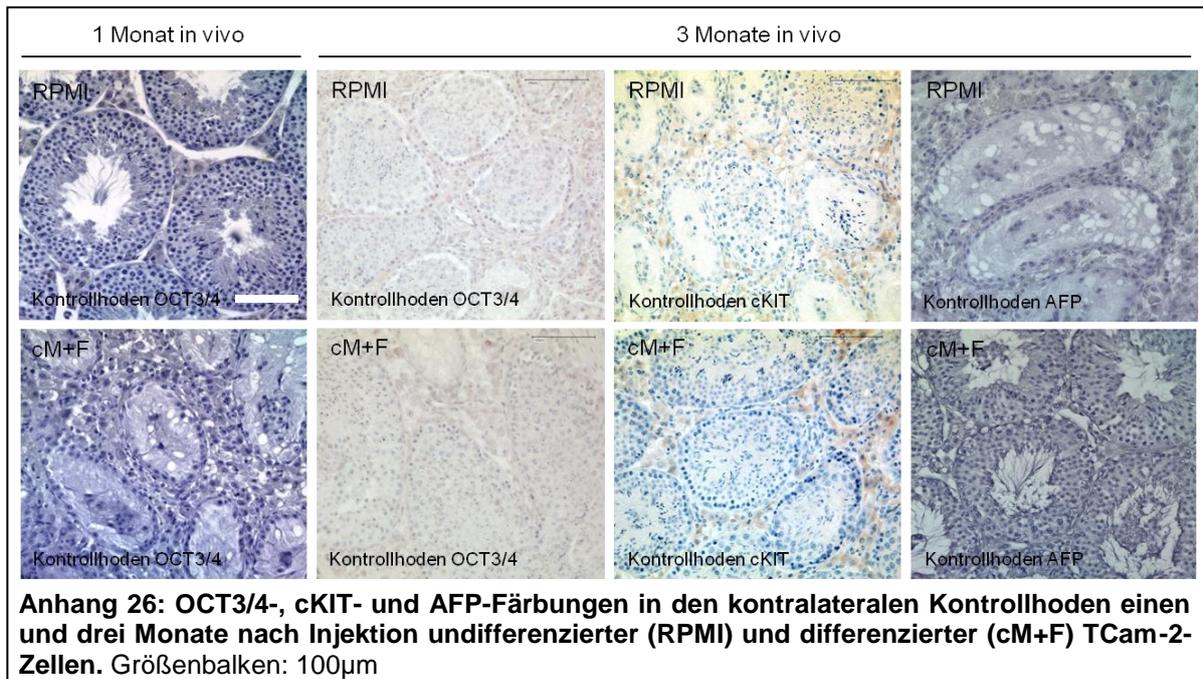


Anhang 23: Semiquantitative RT-PCR angezeigter Marker in den kontralateralen Kontrollhoden ein und drei Monate nach Injektion undifferenzierter (RPMI) und differenzierter (cM+F) Tcam-2 in die Tubuli seminiferi von Busulfan behandelten Nacktmäusen. GAPDH und murines β-Aktin dienten als interne Ladekontrollen.



Anhang 24: Semiquantitative RT-PCR angezeigter Marker einen Monat nach Injektion von 2102EP-Zellen in die Tubuli seminiferi von Busulfan behandelten Nacktmäusen. Untersucht wurden die Tumormassen (2102EP – Tumor), der laterale Injektionshoden (2102EP – Injektionshoden) und der kontralaterale Hoden (2102EP – Kontrollhoden). Als zusätzliche Kontrolle dienten in vitro kultivierte 2102EP (in vitro). GAPDH und murines β-Aktin dienten als interne Ladekontrollen.





6.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Nettersheim

Anschrift: Aachener Straße 9-13

53359 Rheinbach

Telefon: 02226/157548

Mobiltelefon: 0177/2583506

E-Mail: Daniel_Nettersheim@web.de

Geburtsdatum, -ort: 23.5.1980, Mechernich

Familienstand: ledig

Eltern: Egon Nettersheim, Studiendirektor i.K.

Gabriele Nettersheim, Grund- und Hauptschullehrerin

Geschwister: Verena Nettersheim, Ärztin

Schulische Ausbildung

1986 – 1990: Grundschule Bad Münstereifel

1990 – 1999: Erzbischöfliches St. Angela Gymnasium, Bad Münstereifel

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Wehrdienst

1999 – 2000: 6./- Wachbataillon des Bundesministeriums für Verteidigung, Siegburg

Fachhochschulstudium

10.2000 – 05.2005: Studium des Bioingenieurwesens an der FH Aachen, Abt. Jülich

Studienschwerpunkt: Biologische Verfahrenstechnik

Abschluss: Dipl. Ing. (FH)

Diplomarbeit: „Vergleichende Proteomanalyse humaner

Ovarialkarzinombiopsien mittels 2D-Elektrophorese –

Etablierung von Methodik und erste Anwendungsbeispiele“

Angefertigt in der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach

Betreut durch Prof. Dr. Manfred Biselli, Prof. Dr. Maria Paz-

Weißhaar

Hochschulstudium

Seit 10.2006: Promotionsarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-

Universität, Bonn

Promotionsfach: Molekulare Biomedizin

Promotionsthema: „Die Regulation der NANOG-Expression während der Keimzellreifung und in Keimzelltumoren sowie die Untersuchungen zu Differenzierungsprozessen von Seminomen *in vivo* und *in vitro*“

Betreut durch Prof. Dr. Hubert Schorle, Institut für Pathologie,

Abteilung Entwicklungspathologie

Wissenschaftliche Präsentationen

11. 2004 Projektausstellung „2D-Elektrophorese humaner Ovarialkarzinombiopsien mittels 2D-Elektrophorese“, Bonner Wissenschaftsnacht, Bonn

-
08. 2005 Projektausstellung „Vergleichende Proteomanalyse humaner Ovarialkarzinombiopsien mittels 2D-Elektrophorese – Etablierung von Methodik und erste Anwendungsbeispiele“, Biotechnika 2005, Hannover
11. 2006 Projektausstellung „SWITCH-Assay“, Medica 2006, Düsseldorf
- 03.2007 Posterpräsentation „TCam-2 but not JKT-1 resemble seminoma in cell culture and might be an “*in vitro*” model for PGC’s”, Semestermeeting Bonner Forum Biomedizin, Bad Breisig
03. 2008 Posterpräsentation „Determination of the NANOG Promotor Methylation pattern in Human Germ Cell Tumours”, Semestermeeting Bonner Forum Biomedizin, Bad Breisig
- 07.2008 Posterpräsentation „TCam-2 but not JKT-.1 resemble seminoma in cell culture and might be an “*in vitro*” model for PGC’s”, 3rd Mildred Scheel Cancer Conference der Deutschen Krebshilfe, Königswinter
02. 2009 Posterpräsentation “The seminoma cell line TCam-2 gains differentiation potential upon cultivation in MEF conditioned medium supplemented with FGF4/Heparin independent of a seminoma to embryonal carcinoma transition”, Semestermeeting Bonner Forum Biomedizin, Bad Breisig
04. 2009 Posterpräsentation “The seminoma-like cell line TCam-2 gains differentiation potential upon FGF4 treatment independent of a seminoma to embryonal carcinoma transition”, Stem Cell Meeting, Aachen
09. 2009 Posterpräsentation “The seminoma cell line TCam-2 gains differentiation potential upon cultivation in MEF conditioned medium supplemented with FGF4-Heparin independent of a seminoma to embryonal carcinoma transition”, Stem cells and Bioinformatic Meeting, Edinburgh
- 10.2009 Posterpräsentation “Investigation of the NANOG promoter DNA methylation pattern and its connection to gene expression and differentiation during germ cell maturation and in germ cell tumors”, Epiphany, Aachen

-
03. 2010 Posterpräsentation "The seminoma cell line TCam-2 gains differentiation potential upon cultivation in MEF conditioned medium supplemented with FGF4-Heparin independent of a seminoma to embryonal carcinoma transition", Semestermeeting Bonner Forum Biomedizin, Bonn
05. 2010 Posterpräsentation "Investigation of the NANOG promoter DNA methylation pattern and its connection to gene expression and differentiation during germ cell maturation and in germ cell tumors". 4th Mildred Scheel Cancer Conference der deutschen Krebshilfe, Königswinter
-

Wissenschaftliche Publikationen

"c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and downregulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma". Biermann K, Göke F, Nettersheim D, Eckert D, Zhou H, Kahl P, Gashaw I, Schorle H, Büttner R. J Pathol. 2007 Nov; 213(3):311-8.

"Embryonal germ cells and germ cell tumors". Biermann K, Heukamp LC, Nettersheim D, Steger K, Zhou H, Franke FE, Guetgemann I, Sonnack V, Brehm R, Berg J, Bastian PJ, Müller SC, Wang-Eckert L, Schorle H, Büttner R. Verh Dtsch Ges Pathol. 2007;91:39-48.

"TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture". Eckert D, Nettersheim D, Heukamp LC, Kitazawa S, Biermann K, Schorle H. Cell Tissue Res. 2008 Feb; 331(2):529-38. Epub 2007 Nov 15.

"Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors". Eckert D, Biermann K, Nettersheim D, Gillis AJ, Steger K, Jäck HM, Müller AM, Looijenga LH, Schorle H. BMC Dev Biol. 2008 Nov 7;8:106

"Critical Function of AP-2gamma/TCFAP2C in Mouse Embryonic Germ Cell Maintenance" Susanne Weber, Dawid Eckert, Daniel Nettersheim, Ad J.M. Gillis, Sabine Schäfer, Peter Kuckenberger, Julia Ehlermann, Uwe Werling, Katharina Biermann, Leendert H.J. Looijenga and Hubert Schorle. Biol Reprod 82(1): 214-23.

"NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development". Nettersheim D, Biermann K, Gillis A, Looijenga LHJ, Schorle H. Eingereicht („submitted“)

“TGF- β 1, EGF and FGF4 synergistically induce differentiation of the seminoma cell line TCam-2 into a mixed non-seminoma”. Nettersheim D, Gillis A, Looijenga LHJ, Schorle H. In Vorbereitung

„The *in vivo* differentiation abilities of the seminoma cell line TCam-2 depend on the cellular microenvironment and growth conditions”. Nettersheim D, Westernstroer B, Schlatt S, Schorle H. In Vorbereitung

Betreuung von Praktika und Tutorien

Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Reinbach

SS 2004: Laborpraktikum „Genetic Engineering“

SS 2004: Laborpraktikum „Human Genetics“

WS 2004/05: Laborpraktikum „Biochemistry“

SS 2005: Laborpraktikum „Genetic Engineering“

SS 2005: Laborpraktikum „Human Genetics“

SS 2005: Biochemie-Tutorium

WS 2005/06: Laborpraktikum „Biochemistry“

SS 2006: Laborpraktikum „Genetic Engineering“

SS 2006: Laborpraktikum „Human Genetics“

SS 2006: Laborpraktikum “Virology”

WS 2006/07: Laborpraktikum Aylin Gürseler

Pathologie der Universitätskliniken Bonn

WS 2006/07: Laborpraktikum Volker Böhnert

SS 2007: Studentenpraktikum „Entwicklungs- und Tumorphathologie“

WS 2007/08: Studentenpraktikum „Entwicklungs- und Tumorphathologie“

SS 2008: Studentenpraktikum „Entwicklungs- und Tumorphathologie“

SS 2008: Laborpraktikum Robert Hardt

WS 2008/09: Studentenpraktikum „Entwicklungs- und Tumorphathologie“

SS 2009: Laborpraktikum Sabine Gogolok

WS 2009/10: Laborpraktikum Charlotte Bäuml