

Korrelation der somatischen Isoform des Angiotensin-Konvertase Enzyms in Keimzelltumoren des Hodens zu klinischen Parametern

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Humanmedizin)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Barthel, Inken Karen
aus Bad Segeberg

Giessen (2008)

Aus dem medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Weidner
Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Gutachter: Herr PD Dr. Hans-Ulrich Schmelz

Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 29.10.2009

Eggert Schurbohm gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung.....	11
1.1 Hodentumore.....	11
1.1.1 <i>Epidemiologie der germinalen Hodentumore.....</i>	<i>11</i>
1.1.2 <i>Entwicklung des germinalen Hodentumors</i>	<i>11</i>
1.1.3 <i>Einteilung der germinalen Hodentumore</i>	<i>11</i>
1.1.4 <i>Klassifikation nach Lugano</i>	<i>13</i>
1.1.5 <i>Therapie des Seminoms im Stadium I.....</i>	<i>13</i>
1.1.6 <i>Therapie des nichtseminomatösen Hodenkeimzelltumors im Stadium I.....</i>	<i>14</i>
1.2 Prognostische Risikofaktoren	15
1.3 Das Angiotensin-Converting Enzym (ACE).....	16
1.3.1 <i>sACE in germinalen Hodentumoren</i>	<i>16</i>
1.3.2 <i>Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms: Genlokalisierung und molekularer Aufbau.....</i>	<i>16</i>
1.3.3 <i>Vorkommen der Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms.....</i>	<i>18</i>
1.3.4 <i>Enzymkinetik und Substrate der Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms.....</i>	<i>19</i>
1.3.5 <i>Funktionen der somatischen Form des Angiotensin-Converting Enzyms</i>	<i>20</i>
1.3.6 <i>Funktionen der testikulären Isoform des Angiotensin-Converting Enzyms im Hoden.....</i>	<i>22</i>
1.3.7 <i>Unterschiedliche Nachweismethoden des Angiotensin-Converting Enzyms</i>	<i>23</i>
1.4 Fragestellungen	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Patienten	25
2.1.1 <i>Datenerhebung</i>	<i>25</i>
2.1.2 <i>Fragebogen.....</i>	<i>26</i>
2.1.3 <i>Anschreiben an das Einwohnermeldeamt.....</i>	<i>28</i>
2.1.4 <i>Patienten und Keimzelltumore.....</i>	<i>29</i>
2.1.5 <i>Follow Up.....</i>	<i>29</i>
2.2 Durchführung	30
2.2.1 <i>Monoklonale Antikörper (mAK)</i>	<i>30</i>
2.2.2 <i>Gewebepräparation und Lagerung.....</i>	<i>30</i>

2.2.3	<i>Immunhistochemie (IH)</i>	30
2.2.4	<i>Vorbehandlung der Präparate</i>	31
2.2.5	<i>APAAP</i>	31
2.3	Auswertung und Statistik	33
2.3.1	<i>Immunoreactive Score (IRS)</i>	33
2.3.2	<i>Statistik</i>	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Patienten und Krankheitsverläufe	35
3.1.1	<i>Patienten</i>	35
3.1.2	<i>Histologische Entitäten und Metastasierung</i>	35
3.1.3	<i>Stadieneinteilung aller germinalen Hodentumore</i>	36
3.1.4	<i>Follow up</i>	36
3.2	Therapie	37
3.2.1	<i>Stadienabhängige Therapiestrategien bei Patienten mit Seminom</i>	37
3.2.2	<i>Stadienabhängige Therapiestrategien bei Patienten mit reinem NSKZT</i>	39
3.2.3	<i>Therapie bei Auftreten von Rezidiven</i>	40
3.3	sACE-Expression in Seminomen	42
3.3.1	<i>sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen</i>	42
3.3.2	<i>Statistische Auswertung mittels Odds ratio</i>	44
3.3.3	<i>Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei einem Patient mit Seminom im Verlauf</i>	44
3.3.4	<i>Tod und sACE-Wert</i>	44
3.4	sACE-Expression in reinen NSKZT	45
3.4.1	<i>sACE-Expression in reinen nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT</i>	45
3.4.2	<i>sACE-Expression in NSKZT unterschiedlicher Tumorentitäten</i>	47
3.4.3	<i>Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei Patienten mit NSKZT im Verlauf</i>	48
3.4.4	<i>Tod und sACE-Wert</i>	48
3.5	sACE-Expression in Seminomen und NSKZT im Vergleich	48
4.	Diskussion	50
4.1	sACE-Expression in Keimzelltumoren des Hodens	50
4.1.1	<i>Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen</i>	51
4.1.2	<i>Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT</i>	53
4.2	sACE-Expression in Tumoren und ACE-Gen-Polymorphismus	54

4.3	Vorhandensein und Funktionen von ACE in Tumoren: Mögliche Rollen und Funktionen von sACE in testikulären Keimzelltumoren	56
4.3.1	<i>Das Angiotensin-Converting Enzym und das Renin-Angiotensin-System</i>	<i>56</i>
4.3.2	<i>Das Angiotensin-Converting Enzym und das Kinin-Kallikrein-System.....</i>	<i>59</i>
4.3.3	<i>Das Angiotensin-Converting Enzym und N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin</i>	<i>60</i>
4.3.4	<i>Zusammenfassung der möglichen Wirkmechanismen von sACE in germinalen Hodentumoren</i>	<i>61</i>
4.4	sACE-Hemmung und Tumorrisiko.....	61
5.	Zusammenfassung.....	64
6.	Abstract.....	66
7.	Literaturverzeichnis	67
8.	Anhang	75
8.1	„Anleitungen, Ansätze, Reagenzien“ nach K. Pauls 2002.....	75
8.1.1	<i>Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, Färbung von Paraffinschnitten:</i>	<i>75</i>
8.1.2	<i>Period-Acid Schiff's (PAS)-Färbung:.....</i>	<i>75</i>
8.2	Ansätze der Immunhistologie	76
9.	Erklärung zur Dissertation	78
10.	Danksagung	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die WHO-Einteilung der germinalen Hodentumore 2004.....	12
Tabelle 2:	Klassifikation nach Lugano	13
Tabelle 3:	Berechnung des Immunoreactive Score (IRS).....	34
Tabelle 4:	Verteilung der Stadien bei Seminomen und NSKZT bei Erstdiagnose.....	36
Tabelle 5:	Therapie der Patienten mit germinalem Hodentumor.....	37
Tabelle 6:	Stadienabhängige Therapie der Patienten mit Seminom	38
Tabelle 7:	Stadienabhängige Chemotherapien der Patienten mit Seminom	38
Tabelle 8:	Stadienabhängige Therapie der Patienten mit reinem NSKZT.....	39
Tabelle 9:	Stadienabhängige Chemotherapien der Patienten mit reinem NSKZT	40
Tabelle 10:	Therapien der Patienten bei Auftreten von Rezidiven bzw. Metastasen	41
Tabelle 11:	sACE-Expression in Seminomen.....	42
Tabelle 12:	Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen	43
Tabelle 13:	sACE-Expression in reinen NSKZT	45
Tabelle 14:	Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten reinen NSKZT	46
Tabelle 15:	sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT bei unterschiedlichen Tumorentitäten.....	47
Tabelle 16:	Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei Patienten mit NSKZT	48
Tabelle 17:	sACE-Expression in reinen NSKZT und Seminomen.....	48
Tabelle 18:	Vergleich der sACE-Expression in Seminomen und reinen NSKZT	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fragebogen.....	27
Abbildung 2: Anschreiben an das Einwohnermeldeamt.....	28
Grafik 1: IRS-Mediane der sACE-Expression in nicht-metastasierten (links, n = 47) und metastasierten (rechts, n = 11) Seminomen	43
Grafik 2: IRS-Mediane der sACE-Expression in nicht-metastasierten (links, n = 15) und metastasierten (rechtes, n = 10) reinen NSKZT	46
Grafik 3: IRS-Mediane der sACE-Expression (links, n = 58) in Seminomen und reinen NSKZT (rechts, n = 28)	49

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin I-Converting Enzym
AcSDKP	N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin
Ak, mAk	Antikörper, monoklonaler Antikörper
AP	Alkalische Phospatase
APAAP	Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua demin.	Aqua demineralisata
Bp	Basenpaar
CD	cluster of differentiation, gefolgt von Antigen-Nummer
CS	Clinical Stage
D	Deletion
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, copi DNA
EAU	European Association of Urology
EGCCCG	European Germ Cell Center Cancer Collaborative Group
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
et al.	et alii = und andere
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
I	Insertion
IRS, mIRS	immunreaktiver Score, medianer immunreaktiver Score
ISH	in situ-Hybridisierung
kB	Kilobase
kDa	KiloDalton
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LK	Lymphknoten
mg, g	Milligramm, Gramm
min	Minute
mRNA	messenger RNA
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
µm	Mikrometer

NSKZT	nichtseminomatöse/r Keimzelltumor/e
PAS	Perjud-Acid Schiff's-Reaktion
PEB	Cisplatin, Etoposid, Bleomycin
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid
PCR	Polymerase chain reaction
PlaP	plazentare alkalische Phosphatase
PS	Pathological Stage
PT	Primärtherapie
PVB	Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin
PVBI	Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin, Ifosfamid
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radio-immunoassay
RLA	retroperitoneale Lymphadenektomie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RTR	Residualtumorresektion
sACE	somatisches Angiotensin I-Converting Enzym
sc-RT-PCR	single cell Reverse Transkription-Polymerase chain reaction
sek	Sekunde
tACE, gACE	testikuläres Angiotensin I-Converting Enzym = germinales ACE
TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan

1. Einleitung

1.1 Hodentumore

1.1.1 Epidemiologie der germinalen Hodentumore

Die weltweite Inzidenz des Auftretens von Hodentumoren hat sich in den letzten 40 Jahren verdoppelt (Huyghe et al. 2003). Hodentumore stellen etwa 1 % der männlichen Tumore und 5 % der urologischen Tumore dar. In der westlichen Gesellschaft treten jährlich 1 bis 8 neue Fälle pro 100.000 männlichen Einwohnern auf (Parkin et al. 2005). Nur 1-2 % der Fälle treten bilateral auf. Der histologische Typ variiert, der Anteil der Keimzelltumore überwiegt zu etwa 95 % klar (Garner et al. 2005). Der Altersgipfel für Seminome liegt unverändert in der 4. Lebensdekade während die nichtseminomatöse Keimzelltumore gehäuft zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auftreten (Dieckmann und Pichlmeier 2003).

1.1.2 Entwicklung des germinalen Hodentumors

Man nimmt an, dass die Keimzelltumore aus einer maligne entarteten primordiales Keimzelle über das Vorstadium einer testikulären intraepithelialen Neoplasie (TIN) entstehen. Die Bezeichnung „intraepithelial“ unterstellt nicht, dass die orthologen Keimzellen oder die neoplastischen Zellen epithelialer Herkunft sind, sie liegen aber im Kompartiment der epithelialen Sertolizellen. TIN-Zellen breiten sich zwischen und unter den Sertoli-Zellen aus und zerstören oft die orthologe Spermatogenese. Die TIN findet man in der Umgebung praktisch aller Keimzelltumoren mit Ausnahme des spermatozytären Seminoms (Wittekind 2008).

1.1.3 Einteilung der germinalen Hodentumore

Obligat ist die Differenzierung zwischen Seminomen und nichtseminomatösen Hodenkeimzelltumoren (NSKZT), weil sie vor allen anderen Faktoren die Therapiestrategie bestimmt. Die WHO-Klassifikation, die von Mostofi (Mostofi et al. 1998) entwickelt wurde, berücksichtigt die histologische Differenzierung der

Keimzelltumore und wird modifiziert zur allgemeinen Anwendung gegenwärtig empfohlen (Schmoll et al. 2004).

Tabelle 1: Die WHO-Einteilung der germinalen Hodentumore 2004

Keimzelltumore mit nur einer histologischen Art

Seminome

Spermatozytäre Seminome

Embryonal-Karzinome

Teratome

Chorionkarzinome

Dottersacktumore (endodermale Sinustumore)

Als Seminome werden nur die reinen Seminome bezeichnet. Alle anderen Tumore, auch Mischtumore mit Seminomanteilen, werden unter den nichtseminomatösen Keimzelltumoren (NSKZT) zusammengefasst.

Das Seminom ist der häufigste isoliert vorkommende Tumortyp und ist charakterisiert durch runde bis polygonale Zellen mit glykogen- und lipidhaltigem Zytoplasma und runden bis ovalen Zellkernen. Das embryonale Karzinom besteht aus teils soliden, teils drüsig-papillären Epithelverbänden, die von Nekrosen durchsetzt sind. Dottersacktumore kommen in reiner Form selten und fast ausschließlich im Kindesalter vor. Dabei handelt es sich um miteinander verbundene, durch Epithel ausgekleidete sinus- und drüsenartige Hohl- und Spalträume, die in sehr unreifes embryonales Stroma eingebettet sind. Das reine Chorionkarzinom ist gekennzeichnet durch eine innige Lagebeziehung von Zyto- und Synzytiotrophoblast. Differenzierungen verschiedener Keimblätter werden als Teratome klassifiziert, die in unterschiedlichen Reifegraden vorkommen können. Obwohl beim spermatozytären Seminom histomorphologisch eine Ähnlichkeit zum Seminom besteht, weichen die Biologie und die Histogenese dieses Tumors prinzipiell von der anderer Keimzelltumoren ab (Wittekind 2008).

1.1.4 Klassifikation nach Lugano

Am häufigsten wird in Deutschland die Klassifikation nach Lugano verwendet, insbesondere wenn es um die Festlegung von Therapiestrategien oder um eine Prognoseeinschätzung des Patienten geht (Albers 2002).

Tabelle 2: Klassifikation nach Lugano

Stadium	Klinisch	Pathologisch
I	kein klinischer oder bildgebender Metastasennachweis	negative retroperitoneale Lymphknoten
IIA	retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser < 2 cm im transversalen Durchmesser	nicht mehr als 5 Lymphknotenmetastasen, keine > 2 cm
IIB	retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser von 2 bis 5 cm im transversalen Durchmesser	mehr als 5 Lymphknotenmetastasen oder Metastasen von 2 bis 5 cm oder mikroskopische Infiltration des extranodulären Gewebes
IIC	retroperitoneale Lymphknoten mit einem Durchmesser von > 5 cm im transversalen Durchmesser	Lymphknotenmetastasen > 5 cm im größten Durchmesser oder retroperitonealer Tumor in benachbarte Strukturen eingebrochen
III	supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen oder / und hämatogene Aussaat	supradiaphragmatische Lymphknotenmetastasen oder / und hämatogene Aussaat

Durch Voranstellen eines „c“ (clinical) anstelle des „p“ (pathological) wird darauf hingewiesen, dass die Befunde nicht histologisch abgesichert sind (Clinical Stage = CS, Pathological Stage = PS, z.B. CS II B bei CT morphologisch nachgewiesenen Metastasen der Größe 2 - 5 cm, z. B. PS I bei tumorfreien Lymphknoten nach retroperitonealer Lymphadenektomie (RLA) und histologischer Aufarbeitung).

1.1.5 Therapie des Seminoms im Stadium I

Patienten mit Seminomen mit Rete testis-Infiltration und mit einer Tumorgöße über 4 cm haben ein 32 %iges Risiko für eine okkulte Metastasierung, ohne beide Risikofaktoren nur 6 % (Aparicio et al. 2005). Dennoch wird eine Heilungsrate von nahezu 100 % erzielt.

Die Heilungsrate kann nach den Richtlinien der European Association of Urology (EAU) 2005 mit folgenden Strategien erreicht werden: eine Radiatio, eine Carboplatin-Mono-Chemotherapie oder engmaschige Kontrolluntersuchungen (Surveillance) mit definitiver Therapie mittels Radiotherapie oder Chemotherapie nur bei Rezidiv. Ziel ist es, die therapie-assoziierte Morbidität so gering wie möglich zu halten. Mit der Surveillance steht eine Option zur Verfügung, die im Gegensatz zur Radiatio oder Chemotherapie das Ziel hat, möglichst vielen Patienten jede aktive Behandlung zu ersparen.

Bei Patienten mit Seminomen und Surveillance benötigen 68 bis 94 % der Patienten nach der Orchiektomie keine weitere Therapie (Aparicio et al. 2005). Im Falle eines Rezidivs ist die nachfolgende Therapie allerdings intensiver (Souchon et al. 2002). 96 % der Rezidive treten retroperitoneal oder inguinal auf (Warde et al. 2002).

Eine adjuvante Systemtherapie bei Keimzelltumoren ist definiert als Behandlungsstrategie zur Vermeidung einer Progression nach Ablatio testis bei Patienten mit hohem Risiko für okkulte Metastasen. Die Therapie wird risikoadaptiert durchgeführt. Bei Rete testis-Infiltration und einer Tumorgöße über 4 cm sollte eine Radiatio bzw. eine Carboplatin-Monotherapie erfolgen. Ohne Risikofaktoren wird eher zur Surveillance geraten (Aparicio et al. 2003, Warde et al. 2002).

Wichtig ist bei möglichst vielen Patienten die sofortige Therapie zu reduzieren, um Akut- und Langzeittoxizitäten zu vermeiden.

1.1.6 Therapie des nichtseminomatösen Hodenkeimzelltumors im Stadium I

Die Heilungsrate beträgt unabhängig vom therapeutischen Vorgehen 99 % (Schmoll et al. 2004, Albers et al. 2003). Im klinischen Stadium I der nichtseminomatösen Hodentumore, also beim Fehlen von klinischen Zeichen für eine Metastasierung, entwickeln sich bei 48 % der Patienten mit einer nachgewiesenen vaskulären Invasion (hauptsächlich retroperitoneal) Rezidive. Bei Patienten ohne vaskuläre Invasion tritt bei 14 bis 22 % der Patienten ein Rezidiv auf (Albers et al. 2003, Ondrus et al. 1998, Klepp et al. 1997).

Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei mindestens 50 % der Patienten keine Metastasen vorhanden sind und diese Patienten nach der alleinigen

Orchiektomie bereits geheilt wären. Würde man bei allen Patienten eine Behandlung wie zum Beispiel die adjuvante Chemotherapie durchführen, wären mindestens 50 % übertherapiert. Aus diesem Grunde ging man dazu über, als alternatives Verfahren die Surveillance einzuführen.

Nach dem heutigen Standard wird auch bei den NSKZT eine risikoadaptierte Therapie durchgeführt. Bei vaskulärer Invasion sollte eine Chemotherapie mit zwei Zyklen PEB erfolgen, ohne Risikofaktor wird zur Surveillance geraten. Kommen weder Chemotherapie noch Surveillance in Frage, kann eine nervenschonende retroperitoneale Lymphknotenentfernung vorgenommen werden (Schmoll et al. 2004).

1.2 Prognostische Risikofaktoren

Eine Tumorgöße über 4 cm und eine Rete testis-Invasion haben einen wichtigen prädiktiven Wert für ein Rezidiv bei Seminomen im Stadium I in multivarianten Analysen (Warde et al. 2002).

Für nichtseminomatöse Keimzelltumore im Stadium I ist die vaskuläre Invasion des Primärtumors in Blut- oder Lymphgefäße der wichtigste prädiktive Wert für eine okkulte Metastasierung (Albers et al. 2003, Pont et al. 1990). Die Proliferationsrate sowie der Anteil eines Embryonal-Karzinoms sind zusätzliche Faktoren, welche den positiven prädiktiven Wert der vaskulären Invasion erhöhen (Albers et al. 2003, Bokemeyer et al. 1996).

Kein Faktor für eine risikoadaptierte Therapie kann eine 100 %ige Wahrscheinlichkeit für eine okkulte Metastasierung geben. Die Folge kann eine Unter- bzw. Übertherapie sein.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach einem weiteren Risikofaktor, der die Vorhersagewahrscheinlichkeit einer okkulten Metastasierung noch weiter verbessern und somit zur Therapieoptimierung beitragen könnte.

1.3 Das Angiotensin-Converting Enzym (ACE)

Das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) wurde 1956 von Skeggs und seinen Mitarbeitern entdeckt (Skeggs et al. 1956). Das Enzym ist eine Zink-Dipeptidyl-Carboxypeptidase und kommt membrangebunden vor, wobei es über eine hydrophobe Domäne am Carboxyl-Terminus in der Plasmamembran der Zellen verankert ist.

Zwei Isoformen werden in Säugetieren exprimiert, die testikuläre und die somatische Isoform. Die testikuläre Isoform (tACE, gACE) besitzt eine aktive extrazelluläre Domäne und ist wahrscheinlich für die männliche Fertilität zuständig (Hagaman et al. 1998, Sibony et al. 1993, Vanha-Perttula et al. 1985). Die somatische Isoform (sACE) verfügt über zwei aktive extrazelluläre Domänen und ist bekannterweise im Renin-Angiotensin-System und im Kinin-Kallikrein-System involviert (Sibony et al. 1993, Skeggs et al. 1956).

1.3.1 sACE in germinalen Hodentumoren

Die somatische Isoform des Angiotensin-Converting Enzyms (sACE) ließ sich Ende der 80er Jahre des vorherigen Jahrhunderts in Keimzelltumoren des Hodens, insbesondere in Seminomen, nachweisen (Saint-Andre et al. 1988, Rohmer et al. 1987). Man fand heraus, dass das sACE konstant in den intraepithelialen Keimzellneoplasien und Seminomen detektiert wird (Pauls 2002).

Interessanterweise finden sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der sACE-Expression zwischen TIN, Seminomen und NSKZT. Während die sACE-Expression in Seminomen und TIN stark ausgeprägt ist, ist die Expression in NSKZT im Vergleich zu den Seminomen niedriger bzw. ist nicht nachzuweisen (Pauls 2002, Franke et al. 2000).

1.3.2 Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms: Genlokalisierung und molekularer Aufbau

Das Angiotensin-Converting Enzym - Gen ist auf Chromosom 17q23 lokalisiert, das Gen umspannt 21 kb und enthält 26 Exons (Hubert et al. 1991).

Die somatische Isoform und die testikuläre Isoform von ACE unterscheiden sich vor allem durch ihr Molekulargewicht, durch ihre katalytischen Domänen und durch ihr Vorkommen.

Das somatische ACE, die längere Proteinvariante, hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und besteht aus 1306 Aminosäuren. Das kürzere testikuläre ACE hingegen hat ein Molekulargewicht von 100 kDa und ist aus 732 Aminosäuren zusammengesetzt (Soubrier et al. 1988, Erdos et al. 1987).

Die extrazellulären enzymatisch aktiven Domänen des sACE sind eine Carboxyl-Domäne (COOH-Domäne oder C-Domäne) und eine Amino-Domäne (NH₂-Domäne oder N-Domäne). Im Gegensatz dazu besitzt das tACE die aktive Amino-Domäne nicht (Riordan et al. 2003, Danilov et al. 1994, Jaspard et al. 1993, Sibony et al. 1993, Vanha-Perttula et al. 1985). Die COOH-Domäne der testikulären und der somatischen Isoform stimmen überein, während die NH₂-Domänen verschieden strukturiert sind. Der Grund dafür liegt in unterschiedlich aufgebauten mRNAs, die für die jeweilige Isoform kodieren. Die längere somatische mRNA entsteht aus den Exons 1-12 und 14-26, die testikuläre mRNA aus den Exons 13-26 (Testut et al. 1993, Hubert et al. 1991).

Die durch Aktivierung verschiedener Promotoren entstandenen mRNAs der beiden Isoformen sind daher am 3'-Ende identisch, am 5'-Ende unterschiedlich strukturiert. Die mRNA für die somatische Isoform enthält 4,3 kB während die mRNA für die testikuläre Form 3,0 kB besitzt (Soubrier et al. 1988).

Die plasmatischen ACE-Spiegel sind genetisch festgelegt und können interindividuell stark variieren. Einer der Gründe dafür ist das Vorliegen eines Gen-Polymorphismus (Rigat et al. 1990, Cambien et al. 1988). Danach bewirkt die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit eines 287 - Basenpaarfragmentes im 16. Intron des ACE-Gens die unterschiedlichen Spiegel (Hubert et al. 1991). Das PCR-Produkt ist ohne die zusätzliche Sequenz ein Fragment von 190 Basenpaaren. Bei Vorhandensein der Sequenz handelt es sich um ein Fragment von 490 Basenpaaren. Folglich kann jede DNA-Probe nach der Elektrophorese in eine der 3 möglichen Gruppen eingeteilt werden; Genotyp I/I mit einer 490 bp-Bande, Genotyp D/D mit einer 190 bp-Bande sowie Genotyp I/D mit beiden Banden 490 bp und 190 bp (Rigat 1990).

Individuen mit einem homozygoten Deletions (D)-Allel zeichnen sich durch eine höhere ACE-Plasmaaktivität als solche mit homozygotem Insertions (I)-Allel aus (Rigat et al. 1990). Allerdings konnten zwischen den Genotypen bezüglich der ACE-Konzentration weder in der Samenflüssigkeit noch in den Spermatozyten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Williams et al. 1995).

1.3.3 Vorkommen der Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms

sACE wird von einer Vielzahl von Zelltypen in verschiedenen Organen von Mensch, Affe, Hund, Katze und Kaninchen exprimiert (Franke et al. 1996, Danilov et al. 1994, Sibony et al. 1993, Berg et al. 1986). sACE wird endothelial (z.B. periphere Widerstandsgefäßen, kapilläres Endothel der Lungenalveolen), epithelial (proximaler Tubulus der Niere, Enterozyten des Dünndarms, Synzytiotrophoblasten der Plazenta, Gangepithel des Pankreas, Plexus choroideus und Epididymis), mesenchymal (Fibroblasten, aktivierte Makrophagen und Leydigzellen) und neuropil (Basalganglien) exprimiert (Franke et al. 1996, Sibony et al. 1993, Erdos 1990, Skidgel et al. 1984).

Während der normalen fetalen Entwicklung ist die somatische Isoform von ACE ab der neunten Schwangerschaftswoche in menschlichen Keimzellen messbar. sACE nimmt gegen Ende der Schwangerschaft und bei den Neugeborenen ab und fehlt schließlich völlig (Franke et al. 2000). Beim adulten Mann wird sACE nicht mehr im Rahmen der Spermiogenese exprimiert, jedoch findet es sich in den Leydig-Zellen und Endothelzellen des Hodengewebes (Pauls et al. 1999, Sibony et al. 1993).

Die testikuläre ACE-Isoform wurde im Hoden der Ratte entdeckt (Cushman und Cheung 1971). Weitere Studien an Mensch, Ratte und Kaninchen zeigten, dass tACE in allen untersuchten Spezies im tubulären Kompartiment des adulten Hodens lokalisiert und dort ausschließlich von den Keimzellen der fortgeschrittenen Spermatogenese exprimiert wird (Hagaman et al. 1998, Sibony et al. 1993, Vanha-Perttula et al. 1985).

Die plasmatische ACE-Form ist eine nicht membrangebundene Form des sACE, welche durch enzymatische Abspaltung der hydrophoben Anker-Region durch eine unbekanntete Sekretase entsteht. Die plasmatische ACE-Form zirkuliert

frei in Flüssigkeiten wie Blut, Urin, Lymphe und Liquor sowie in Sekreten von Prostata und Nebenhoden (Woodman et al. 2000, Hooper et al. 1997).

1.3.4 Enzymkinetik und Substrate der Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms

Sowohl die Amino- als auch die Carboxyl-Domäne des ACE sind enzymatisch aktiv. Beide Domänen verfügen über ein zentrales Zinkatom. Obwohl beide nicht vollständig identisch sind, weisen sie eine große Sequenzhomologie besonders in den Zentralregionen auf, diese beträgt 67,7 Prozent (Soubrier et al. 1988). Die Domänen sind allerdings voneinander unabhängig und haben eine unterschiedliche Substratspezifität (Danilov et al. 1994, Jaspard et al. 1993, Wei et al. 1991).

Die bekanntesten Substrate sind Bradykinin, Angiotensin I, Substanz P, luteinisierendes Hormon Releasing Hormon (LH-RH) und N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin.

Die Carboxyl-Domäne ist im Gegensatz zur Amino-Domäne einer Änderung der Chlorid-Konzentration gegenüber sehr sensibel und katalysiert schneller bei zunehmender Chlorid-Konzentration. Wenn keine Chlorid-Ionen anwesend sind, kann keine enzymatische Reaktion erfolgen, wohingegen die Amino-Domäne auch ohne Chlorid-Ionen die Fähigkeit hat, zu reagieren (Danilov et al. 1994, Jaspard et al. 1993).

Im Vergleich zur Amino-Domäne hat die Carboxyl-Domäne eine drei- bis vierfach höhere katalytische Aktivität mittels Hydrolyse gegenüber Bradykinin und Angiotensin I (Jaspard et al. 1994 und 1993). Auch Substanz P wird durch die Carboxyl-Domäne in vivo schneller hydrolysiert. Das luteinisierende Hormon Releasing Hormon (LH-RH) wird in vitro durch die Amino-Domäne schneller hydrolysiert und inaktiviert (Danilov et al. 1994, Jaspard et al. 1994 und 1993, Skidgel et al. 1984). Sowohl Substanz P als auch LH-RH wies man nach, dass sie mit daran beteiligt sind, Testosteron aus Leydig-Zellen freizusetzen (Angelowa et al. 1996, Davidoff et al. 1993).

Im Vergleich zur C-terminalen Domäne setzt die N-terminale Domäne das Tetrapeptid N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin (AcSDKP) effektiver um. AcSDKP ist ein physiologisches und spezifisches Substrat von ACE und wird im Plasma durch Abspaltung vom C-terminalen Dipeptid Lysin-Prolin deaktiviert (Rousseau et

al. 1995, Rieger et al. 1993). AcSDKP ist ein zirkulierender physiologischer Inhibitor der hämatopoetischen Stammzellproliferation und anderen normalen Vorläuferzellen (Rousseau et al. 1995, Lenfant et al. 1989). In vitro stellte sich heraus, dass AcSDKP die Keimzellproliferation ansteigen lässt und wahrscheinlich für das Überleben der Spermatogonien verantwortlich ist (Stéphan et al. 2000).

Studien zur Analyse der Bindungs- und Inhibitor-Kapazität verschiedener ACE-Inhibitoren an den einzelnen Domänen des Enzyms haben ergeben, dass größtenteils die Inhibitoren, die das C-terminale aktive Zentrum hochpotent hemmen, geringe inhibitorische Aktivität gegenüber der N-terminalen Domäne aufweisen und umgekehrt (Wei et al. 1992). Dies ist wahrscheinlich in einem strukturellen Unterschied der aktiven Zentren beider Domänen begründet (Perich et al. 1992).

1.3.5 Funktionen der somatischen Form des Angiotensin-Converting Enzyms

Die somatische Isoform des ACE ist ein multifunktionales Enzym, welches Einfluss auf verschiedene essentielle Vorgänge im Organismus hat. Mit der Entwicklung der ACE-Inhibitoren, die zur medikamentösen Therapie der primären Hypertonie eingesetzt werden, wurde aus dem Konversionsenzym ein bekanntes Protein.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

sACE nimmt eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation im Renin-Angiotensin-System (RAS) ein (Skeggs et al. 1956). Das RAS stellt eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen dar. Zuerst wird ein N-terminales Dekapeptid von dem Glykoprotein Angiotensinogen, das hauptsächlich in der Leber daneben aber auch vom Fettgewebe gebildet wird, durch Renin im Plasma zu dem Dekapeptid Angiotensin I gespalten. sACE spaltet L-Histidyl-Leucin am carboxyterminalen Ende des Angiotensin I-Proteins ab und somit entsteht der potente Vasokonstriktor Angiotensin II (Campbell et al. 1994, Ryan et al. 1975). Wegen ihrer hohen Aktivität an sACE spielen hierbei die Lunge und die Niere eine besonders wichtige Rolle.

Das Octapeptid Angiotensin II bindet an die spezifischen zellulären Angiotensin II-Rezeptoren und wird nach seiner Bildung innerhalb weniger Minuten (HWZ ca. 3 min) durch Angiotensinasen zu inaktiven Produkten abgebaut (Admiral et al. 1993).

Die beiden bekanntesten Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die über sieben transmembranöse Domänen verfügen und zu ca. 32% homolog sind (Kambayashi et al. 1993). Durch die Bindung an die Rezeptoren kommt es durch intrazelluläre Aktivierung der second messenger zum intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und zur Aktivierung der Proteinkinasen. Folglich werden Ca^{2+} -abhängige Prozesse wie die glattmuskuläre Kontraktion, Steroid- und Kathecholamin-Produktion stimuliert (Bottari et al. 1993).

Obwohl beide Rezeptoren in ähnlicher Weise in der Lage sind, Angiotensin II spezifisch zu binden, wird ein Großteil der klassischen physiologischen Angiotensin II-Effekte wie Vasokonstriktion und Aldosteronfreisetzung über den AT-1 Rezeptor vermittelt (Griendling et al. 1993). Über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des AT2-Rezeptors ist wenig bekannt. Beide Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 kommen in vielen adulten Geweben, z.B. Blutgefäßen, Herz, Brust und Gebärmutter vor (Tybitanclova et al. 2005, de Paepe et al. 2001, Chang et al. 1991, Pucell et al. 1991).

Die Entwicklung von spezifischen Angiotensin-II-Rezeptorliganden hat zur Identifizierung von weiteren Angiotensin II-Rezeptoren geführt, deren Funktion und Verteilung allerdings noch unklar ist (Eggena et al. 1996, Swanson et al. 1992).

Das Kinin-Kallikrein-System (KKS)

Es wird zwischen einem zirkulierenden und einem lokalen Kinin-Kallikrein-System (KKS) unterschieden (Ardaillou et al. 1999). Vier Hauptkomponenten spielen im KKS eine Rolle: das hochmolekulare Kininogen als Substrat, Kininogenasen (Kallikrein) als proteolytische Enzyme, Kinine (Bradykinin, Kallidin) als spezifische Effektoren dieses Systems und Kininasen unter anderem als Kinin-degradierende Enzyme. Bradykinin wird im Plasma aus Kallidin nach proteolytischer Spaltung des Kininogens durch die Serinprotease Kallikrein gebildet.

Die Wirkung von Bradykinin und Kallidin wird über G-Protein gekoppelten Bradykinin-Rezeptoren B1 und B2 übertragen und zeigt alle Facetten der inflammatorischen Reaktion - Schmerz, Hyperämie und Gewebeswellung eingeschlossen (Bhoola et al. 2001, Marceau et al. 1998). Hierbei aktivieren sie die Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren zusammen mit einer intrazellulären Ca^{2+} -Ionen Freisetzung (Parpura et al. 1994, Francel 1992).

Hauptsächlich verantwortlich für die Auswirkungen von Bradykinin ist der Bradykinin-Rezeptor B2, der sich ubiquitär an Endothelien der arteriellen Gefäße befindet (Regoli et al. 1998, Mombouli et al. 1995). Weiterhin findet sich dieser Rezeptor unter anderem an Endothelzellen, glatten Muskelzellen, afferenten Nervenendigungen, intestinalen und renalen Epithelzellen und an Keimzellen des Hodens (Wennemuth et al. 2003, Marceau et al. 1998).

sACE, auch als Kininase II bekannt, degradiert neben der Metalloendopeptidase Kininase I sehr effizient das Nonapeptid Bradykinin zu inaktiven oder weniger aktiven Produkten (Yang et al. 1970, Erdos 1966).

1.3.6 Funktionen der testikulären Isoform des Angiotensin-Converting Enzyms im Hoden

Die somatische Isoform des ACE findet sich beim adulten Mann in den Leydig-Zellen und Endothelzellen des Hodengewebes, allerdings ist über seine Funktion im gesunden Hoden nichts bekannt (Pauls et al. 1999, Sibony et al. 1993).

Das tACE ist im tubulären Kompartiment des adulten Hodens lokalisiert und wird ausschließlich von den Keimzellen der fortgeschrittenen Spermatogenese exprimiert. Es ist wahrscheinlich für die männliche Fertilität verantwortlich (Hagaman et al. 1998, Sibony et al. 1993, Vanha-Perttula et al. 1985). Hingegen konnte man beweisen, dass sACE nicht dafür verantwortlich ist (Fuchs et al. 2005, Liao et al. 2002).

Beim Menschen sind die physiologischen Funktionen vom testikulären Renin-Angiotensin-System nicht bekannt. Die biochemische Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II durch tACE in Leydig-Zellkulturen spricht für ein lokal wirksames RAS im Hoden (Pandey et al. 1984).

Im Kinin-Kallikrein-System der männlichen Reproduktionsorgane wurden Kallikrein, Bradykinin und der Bradykinin B2-Rezeptor detektiert und sind vermutlich in die Regulation der Hodenfunktionen wie z.B. der Spermatogenese involviert (Monsees et al. 2003, Atanassova 2003, Schill et al. 1992).

1.3.7 Unterschiedliche Nachweismethoden des Angiotensin-Converting Enzyms

Das Vorhandensein von ACE im (Tumor-) Gewebe und im Plasma bzw. in anderen Körperflüssigkeiten lässt sich mit unterschiedlichen Nachweismethoden feststellen.

Für die Immunhistochemie können unterschiedliche (monoklonale und polyklonale) Antikörper angewendet werden. Die ACE-Isoformen können mit unselektiven polyklonalen Antikörpern immunhistochemisch nicht voneinander unterschieden werden (Steger et al. 1998, Saint-Andre et al. 1988, Berg et al. 1986, Erdos et al. 1985). Mittels monoklonalen Antikörpern kann eine Differenzierung gegen entsprechende Epitope der Isoformen durch Immunhistologie abhängig von dem Antikörper entweder an Gefrierschnitten oder an Paraffinschnitten erfolgen (Pauls et al. 2002, Danilov et al. 1994).

Als bioanalytische Nachweismethoden wurden u.a. Westernblot, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Radio-Immunoassay (RIA) und in situ-Hybridisierung (ISH) in Studien angewendet (Pauls 2002, Yoshiji et al. 2001, Danilov et al. 1994, Rohmer et al. 1986, Alhenc-Gelas et al. 1983), molekularbiologisch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Reverse Transkriptase (RT)-PCR (Tybitanclova et al. 2005, Freitas-Silva et al. 2004, Medeiros et al. 2003, Pauls et al. 1999, Rigat et al. 1990). Biochemisch lässt sich die ACE-Aktivität durch die Hydrolyse von Substraten z.B. wie von Hip-His-Leu oder Z-Phe-His-Leu in Tumoren und im Plasma feststellen (Tybitanclova et al. 2005, Rohmer et al. 1986).

1.4 Fragestellungen

In vorangegangenen Studien konnte man höhere Expressionen von sACE-Protein in testikulären intraepithelialen Neoplasien und Seminomen messen und niedrigere Expressionen des Enzyms in aggressiveren Hodentumoren wie den nichtseminomatösen Keimzelltumoren feststellen (Pauls 2002, Franke et al. 2000).

Daher wurde spekuliert, ob ebenso eine niedrigere Expression von sACE in metastasierten Seminomen im Vergleich zu den nicht-metastasierten Seminomen zu verzeichnen ist. In diesem Fall könnte die Höhe der Enzymexpression zu einer

weiteren Verbesserung bei der Prädiktion einer okkulten Metastasierung führen und somit zur Optimierung der Therapiewahl beitragen.

Diese Arbeit befasst sich mit der statistischen Auswertung der Menge/Intensität des gemessenen Enzyms sACE in Keimzelltumoren des Hodens (Seminome und NSKZT) und dem klinischen Metastastasierungsstatus bei Erstdiagnose. Die Ergebnisse der sACE-Expressionen aus Hodentumorgewebe wurden uns von Herrn Dr. Folker E. Franke, Oberarzt der Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen, zur Verfügung gestellt. Frau Dr. Katharina Pauls hatte diese Ergebnisse 2002 im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit „Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms (CD143) in Hodenentwicklung, Spermatogenese und adulten Keimzelltumoren“ ausgewertet und dargelegt. Zum Nachweis von sACE wurde ein monoklonaler Antikörper (Anti-ACE-mAK CG2) verwendet, der durch den Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) detektiert wird. Der APAAP-Komplex hat sich als geeignete Methode zum Nachweis von sACE erwiesen (Franke et al. 1991, Cordell et al. 1984).

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Datenerhebung

Die Patienten wurden zwischen 1985 und 1998 in den urologischen Abteilungen des Bundeswehrkrankenhauses Giessen (bis 1995), des Universitätsklinikums Giessen und des Allgemeinen Krankenhauses Bad Hersfeld therapiert.

Die Datensuche erfolgte 2002. Detaillierte Angaben über OP-Zeitpunkt, Biopsien des kontralateralen Hodens, Tumorstadien und Therapiestrategien wurden nach Aktenlage gesammelt. Es wurden unterschiedliche Archive abhängig vom Operationsjahr, von ambulanter Nachsorge und vom Krankenhaus aufgesucht.

Die Akten der Patienten, die in der Urologie des Universitätsklinikums operiert wurden, liessen sich wie im Folgenden aufgeführt, finden. Im Zentralarchiv, Ohlebergsweg 13 in Giessen, fanden sich die Akten über stationäre Aufenthalte einschließlich der ambulanten Nachsorgeuntersuchungen von 1992 bis 1999. Akten über stationäre Aufenthalte von 1985 bis einschließlich 1987 liessen sich ebenfalls im Zentralarchiv finden.

In dem Archiv der Chirurgie, Klinikstraße 29 in Giessen, fanden sich die Akten der Patienten mit stationärem Aufenthalt von 1988 bis 1999.

Im Sekretariat der Urologie, Feulgenstraße 2 in Giessen, wurden die Akten der Patienten mit stationären Verlauf und ambulanten Nachsorgeuntersuchungen ab 1999 gesammelt.

Weiterhin wurden die Akten der Urologie des Bundeswehrkrankenhauses aus dem Zentralarchiv der Bundeswehr in Andernach zur Verfügung gestellt.

Die Akten der Patienten aus dem Kreiskrankenhaus, Seilerweg 29 in Bad Hersfeld, wurden vor Ort eingesehen.

Zur Festlegung des Follow ups bzw. des aktuellen Gesundheitszustandes des Patienten wurde primär der betreuende Hausarzt oder Urologe mithilfe eines Fragebogens befragt. Falls die Patienten nicht mehr in deren Betreuung waren, wurden sie persönlich telefonisch kontaktiert.

Bei unklarem Aufenthalt eines Patienten, und wenn dieser nicht mehr in der aus den Akten entnommenen ärztlichen Betreuung war, erfolgte eine Nachfrage bei den zuständigen Einwohnermeldeämtern, wohin der Patient verzogen war bzw. ob dieser gestorben war.

2.1.2 Fragebogen

Dieser umfasste die Fragen bezüglich der Rezidivfreiheit, des Auftretens von Metastasen oder des Auftretens eines kontralateralen Hodentumors. Es wurde weiterhin nach dem Zeitpunkt des Auftretens des Rezidivs und der weiterbehandelnden Klinik gefragt. Falls der Patient gestorben war, wurde detailliert nach der Ursache und nach Zeitpunkt des Todes geforscht.

Abbildung 1: Fragebogen

Name, Vorname des Patienten:	_____	
Geburtsdatum:	_____	
Unser jetziger Informationsstand über den Patienten (stationär und/oder ambulant) ist vom:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Monat / Jahr
A.		
Ist der Patient poststationär in Ihrer Behandlung?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Letzte Tumornachsorge, bzw. Informationsmaterial über den Patienten:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> T T M M J J
Traten während der poststationären Betreuung		
Metastasen und/oder		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
ein kontralateraler Hodentumor auf		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
oder ist der Patient rezidivfrei geblieben?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> falls ja weiter bei C.
B.		
Wenn Metastasen aufgetreten sind, wann sind die Metastasen festgestellt worden?		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Monat / Jahr
Wenn ein kontralateraler Hodentumor aufgetreten ist, wann ist der kontralaterale Hodentumor festgestellt worden?		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Monat / Jahr
In welcher Klinik ist der Patient daraufhin behandelt worden?		
C.		
Ist der Patient zurzeit tumorfrei?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Lebt der Patient?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Falls der Patient gestorben ist, Datum des Todes		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> T T M M J J
Ist der Patient am Tumor gestorben?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Ist der Patient aufgrund einer anderen Ursache gestorben?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
Ist die Ursache des Todes unklar?		Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>

2.1.3 Anschreiben an das Einwohnermeldeamt

Der Brief an das Einwohnermeldeamt beinhaltet die Fragen bezüglich des Aufenthaltsorts beziehungsweise des Todesdatums des Patienten.

Abbildung 2: Anschreiben an das Einwohnermeldeamt

An das Einwohnermeldeamt PLZ Ort
Betreff: Datenübermittlung Herr geb. am aus
Sehr geehrte Damen und Herren,
im Rahmen einer klinischen Studie zur Verbesserung der medizinischen Diagnostik benötigen wir genaue Informationen über die Überlebenszeit bzw. das Todesdatum der Patienten.
Da die Verbesserung der medizinischen Behandlung zweifellos im öffentlichen Interesse ist, bitten wir um folgende Angaben im Sinne einer (gebührenfreien) Datenübermittlung gemäß den Meldegesetzen der Bundesländer.
Wir bitten um folgende Angaben
Der Patient ist noch unter der o.g. Adresse gemeldet. Der Patient ist am verstorben. Der Patient ist am verzogen. Die neue Adresse lautet:
Wir möchten Sie um eine vertrauliche Behandlung dieses Schreibens bitten und uns für ihre Bemühungen im Voraus bedanken. Wir bitten Sie, den Brief an die umseitig aufgedruckte Adresse in dem bereits frankierten Rückumschlag zurückzusenden.
Mit freundlichen Grüßen

2.1.4 Patienten und Keimzelltumore

Insgesamt wurden in 149 Keimzelltumoren des Hodens von Patienten die Expressionen von sACE immunhistochemisch bestimmt. Ausgewertet wurden 121 Patienten, da bei 6 Patienten die Histologie nicht eindeutig zuzuordnen war und da die Akten von 22 Patienten in den Archiven nicht aufzufinden waren.

Die 121 Patienten verteilten sich auf folgende Krankenhäuser:

Bundeswehrkrankenhaus Giessen:	41 Patienten
Universitätsklinikum Giessen:	71 Patienten
Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld:	9 Patienten

Histologisch setzen sich die 121 untersuchten Hodentumore aus 86 reinen Keimzelltumoren, aus 29 Hodenmischtumoren und aus sechs anders zu klassifizierenden Tumoren zusammen. Statistisch ausgewertet wurden ausschließlich die reinen Keimzelltumore. Innerhalb der Gruppe der 86 reinen Keimzelltumore fanden sich:

- 58 Seminome
- 20 Embryonal-Karzinome
- 5 Teratome
- 3 Chorion-Karzinome

2.1.5 Follow Up

Ein Follow up von mindestens zwei Jahren war Voraussetzung zur Auswertung der Daten. Die Daten der Patienten mit Entwicklung eines Rezidivs bzw. Metastasen innerhalb der zwei Jahre gehen nicht in die Berechnungen der Vergleiche der IR-Werte ein, sie werden gesondert betrachtet.

2.2 Durchführung

2.2.1 *Monoklonale Antikörper (mAK)*

Die ablatierten Hoden wurden in der Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen im Rahmen einer anderen Studie immunhistochemisch untersucht (Pauls 2002). Der verwendete Anti-ACE-mAK CG2 (BMA, Augst, Schweiz) bindet an die Amino-Domäne von sACE.

Im Folgenden wird der Vollständigkeit halber das immunhistochemische Prozedere und der Anhang mit „Anleitungen, Ansätze, Reagenzien“ aus der Arbeit von Katharina Pauls (2002) zitiert. Der Anhang mit „Anleitungen, Ansätze, Reagenzien“ findet sich im Kapitel 8.

2.2.2 *Gewebepräparation und Lagerung*

„Das Paraffinmaterial wurde bei Raumtemperatur verarbeitet und bei durchschnittlich 14°C abgedunkelt aufbewahrt. Zur Sicherstellung einer optimalen Gewebeanlagenität von ACE wurden Fixierungszeiten in Formalinlösung von maximal 2 Wochen nicht überschritten (Metzger et al. 1999). Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rollen-Mikrotom (Jung SM2000R, Leica, Nussloch) verarbeitet. Präparate von 2 bis 4 µm Dicke wurden angefertigt und nach Streckung im Wasserbad (Aqua dest., 45°C) auf Poly-Lysin-beschichtete (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) Superfrost®-Objektträger aufgezogen.“

2.2.3 *Immunhistochemie (IH)*

„Grundlage der mikroskopischen Auswertung aller Proben war jeweils ein Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Kontrollschnitt aus der jeweiligen Schnittsequenz. Zusätzlich wurde an jedem Präparat eine PAS-Färbung durchgeführt, die zur Standarddiagnostik der Keimzelltumore gehört (Hämatoxylin-Eosin-Färbung und PAS-Färbung siehe Anhang).“¹

¹ K. Pauls erläutert die Zusammensetzung in Ihrer Arbeit auf S. 87-89, hier unter Kapitel 8

2.2.4 Vorbehandlung der Präparate

„Die Vorbehandlung der Schnittpräparate aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben mit Mikrowellentechnik löst intermolekuläre Vernetzung der Proteine, die durch Fixierungs- und Einbettungsprozesse entstehen.“²

„Dadurch werden Antigenstrukturen demaskiert und für die Primärantikörper wieder zugänglich gemacht, was insbesondere für die verwendeten Anti-ACE-mAK gilt (Metzger et al. 1999, Cattoretti et al. 1993, Norton et al. 1993).“³

„Die Paraffinschnitte wurden zunächst 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend 10 min in Aceton nachfixiert. Dann wurden sie 10 min in einem Aceton-Tris-Waschpuffergemisch (im Verhältnis 1:1, TRIS-Waschpuffer siehe Anhang) gespült.“¹

„Anschließend wurden die Objektträger gleichmäßig auf mikrowellentaugliche, zuvor mit Citratpuffer gefüllte Kunststoffküvetten (Sigma, Deisenhofen) verteilt. Die Küvetten wurden in der Mikrowelle (SS 566H, Bosch, München) bei 600 Watt in fünf Durchgängen jeweils 5 min erhitzt. Zwischen jedem Durchgang wurde der Flüssigkeitsspiegel geprüft und ggf. mit Aqua dest. korrigiert. Danach wurden die Objektträger zum Abkühlen gebracht und in Tris-Waschpuffer gespült.“

2.2.5 APAAP

„Als immunhistochemische Detektionsmethode wurde die hochsensitive alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik gewählt und in einer leicht modifizierten Form durchgeführt (Cordell et al. 1984, Franke et al. 1991).

Bei dieser Technik wird die Amplifikation der Reaktionsstärke durch wiederholte Inkubationen der Brücken (polyklonales Kaninchen-anti-Maus-Ig; Konz 33.0 µg/ml; DAKO) - und Detektionsantikörper (APAAP; Konz 2.0 µg/ml; DAKO) erreicht.

² Cattoretti et al. 1993 und Fox et al. 1985 beschreiben, dass die Vernetzung der Proteine, die durch Fixation mit Formalin entstehen, durch Mikrowellenbehandlung getrennt werden. Das konnte man mithilfe unterschiedlicher Antikörper herausfinden, die nach Mikrowellenbehandlung vermehrt an das Gewebe binden können.

Die Vernetzung der Proteine sind entstandene Brücken zwischen Methylen (Formaldehyd) und den Amino-Gruppen (Protein) nach Puchtler et al. 1985.

³ K. Pauls untersuchte mehrere Antikörper (mAk CG1, CG2 und CG4) von ACE, allerdings detektieren CG1 und CG4 beide Isoformen des ACE, CG2 detektiert nur die somatische Isoform. Zudem untersuchte sie in Ihrer Studie Antikörper gegenüber PlaP-Untereinheiten.

Bei der anschließenden Enzymreaktion wird Neufuchsin (100 µg/ml) umgesetzt (rotes Detektionssignal). Gleichzeitig wird die endogene AP durch Laevamisol (400 µg/ml) blockiert. Für diese enzymatische Detektion wurde die Entwicklungslösung speziell hergestellt (siehe Anhang).“¹

„Hierzu wurden volumenabhängig Naphtol-AS-BI-Phosphat (Sigma, Aldrich) in N,N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) und Natriumnitrit mit Neufuchsin gelöst. Parallel dazu wurde der Entwicklungspuffer mit Propandiol und Laevamisol auf pH 9.75 eingestellt. Die Lösungen wurden gemischt und auf pH 8.8 eingestellt. Die hergestellte Entwicklungslösung wurde rasch filtriert (Rundfilter, Schleicher & Schuell, Dassel) und auf einzelne Glasküvetten verteilt. Die Schnitte wurden in der Entwicklungslösung exakt für 20 min auf dem Rüttler bei ca. 150 min⁻¹ inkubiert. Zur optimalen histologischen Orientierung wurden die Präparate 2 min in Hämalaun-Lösung gegengefärbt und abschließend in 60-80°C heißem Glycergel (Dako, Glostrup) mit Deckgläsern (Menzel-Gläser) eingedeckt. Praktische Durchführung:

1. Fixierung:

Paraffinschnitte bei Raumtemperatur in Xylol 10 Minuten entparaffinieren und für 10 Minuten in Aceton nachfixieren. Danach die Schnitte für 10 Minuten in ein Aceton-Tris-Waschpuffer-Gemisch (Verhältnis 1:1) überführen und anschließend in Tris-Waschpuffer (pH 7.6) spülen.

2. Antigendemaskierung:

Nach der Fixierung erfolgt eine physikalische Vorbehandlung. Zur Demaskierung der ACE-Antigene im Paraffinschnitt wird hier die Mikrowellenvorbehandlung (5x5 Minuten) bei 600 Watt eingesetzt (s.o.).

3. Inkubationen:

Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper werden mit RPMI auf ihre Endkonzentration bzw. -verdünnungen gebracht.“

Folgende Inkubationsschritte werden durchgeführt (Pauls 2002):

• Primärantikörper	• 30 min
• Spülen in Tris nach AK getrennt	• 3-mal für je 3 min
• Brückenantikörper (Link) 1:40	• 30 min
• Spülen in Tris	• 3-mal für je 3 min
• Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	• 30 min
• Spülen in Tris	• 3-mal für je 3 min
• Brückenantikörper (Link) 1:40	• 10 min
• Spülen in Tris	• 3-mal für je 3 min
• Detektionsantikörper (APAAP) 1:50	• 10 min
• Spülen in Tris	• 8-mal für je 3 min

2.3 Auswertung und Statistik

2.3.1 Immunoreactive Score (IRS)

Durch die Kombination der Intensität der Immunreaktion mit der Anzahl der immunreaktiven Tumorzellen wurde der Expressionsgrad von sACE ausgewertet. Dazu wurde ein bereits dokumentiertes Immunreaktions (IR)-Wertesystem (Immunoreactive score) benutzt (Krajewska et al. 1996, Remmele et al. 1986). Die Anwendung des IRS ermöglicht eine objektivere Einschätzung der Expression des untersuchten Moleküls in den Geweben und erlaubt eine semiquantitative Aussage zu der jeweils zu beurteilenden Immunreaktivität. Der prozentuale Anteil immunreaktiver Zellen am Tumorgewebe wird fünf Werten von 0 bis 4 zugeordnet:

Ein Wert von 0 bedeutet keine Expression, ein Wert von 1 bedeutet eine Expression in weniger als 10 % der Tumorzellen, ein Wert von 2 eine Expression bei 10 bis 50 %, ein Wert von 3 eine Expression bei 51 bis 80 % und ein Wert von 4 eine Expression bei über 80 % der Tumorzellen.

Zusätzlich bestimmt man die Intensität der Immunreaktion: schwach (+) mit einem Wert von 1, mittel (++) mit einem Wert von 2 und stark (+++) mit einem Wert von 3.

Das Endergebnis jedes einzelnen analysierten Tumors ergibt sich aus der Multiplikation dieser beiden Werte, die sich auf die Quantität und die Intensität der Immunreaktion der Tumorzellen beziehen. Daraus folgt, dass man neun Werte von

einer Skala zwischen 0 und 12 erhält. Für die Einschätzung und Charakterisierung der Markerexpression in den Tumorzellen werden IR-Werte unter 4 als eine geringgradige, IR-Werte von 4 bis 8 als eine mittelgradige und Werte von 9 und 12 als eine hochgradige Expression definiert.

Tabelle 3: Berechnung des Immunoreactive Score (IRS)

Intensität der Immunreaktion	Prozentualer Anteil immunreaktiver Zellen (%)									
	+	0	<10	10-50	51-80					
++	0		<10		10-50	51-80	80<			
+++	0			<10		10-50		51-80	>80	
IRS	0	1	2	3	4	6	8	9	12	
Expression:	keine	geringgradig			mittelgradig			höhergradig		

Werte für die Berechnung des IRS:

Intensität: + = 1; ++ = 2; +++ = 3

Anteil immunreaktiver Zellen: 0 % = 0; <10% = 1; 10-50 % = 2; 51-80 % = 3; >80 % = 4

2.3.2 Statistik

Die statistische Auswertung wurde explorativ durchgeführt, d.h. die berechneten p-Werte dienen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Als Methode wurde ein logistisches Regressionsmodell gewählt, wobei das Vorliegen einer Metastase bei Diagnose (abhängige Variable) durch die Höhe des vorliegenden IRS erklärt wurde (erklärende Variable).

Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden die Odds ratio und das 95 %-Vertrauensintervall berechnet. Die Odds Ratio, auch genannt Quotenverhältnis, verwendet man, um zwei Unterschiede zu vergleichen und damit Aussagen über die Stärke von Zusammenhängen machen zu können.

Zur Datenerfassung diente Microsoft Excel, die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms SAS Version 8.2 und wurde durch die Abteilung medizinische Statistik der Universität Giessen, Frau Marion Mann, durchgeführt.

Für die grafische Auswertung der Daten wurde das Programm SigmaPlot Version 8.0 genutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten und Krankheitsverläufe

3.1.1 Patienten

Der Altersmedian aller 86 Patienten mit einem reinen Keimzelltumor lag im vorliegenden Kollektiv bei 29 Jahren, die Altersspanne reichte von 18 bis 60 Jahren.

Der Median der 58 Patienten mit einem reinen Seminom war bei 30 Jahren (Range 20. bis 60. Lebensjahr). Der Median der 28 Patienten mit einem reinen NSKZT betrug 25 Jahre (Range 18. bis 43. Lebensjahr).

3.1.2 Histologische Entitäten und Metastasierung

Insgesamt waren bei 11 der 58 Patienten mit einem Seminom bei Erstdiagnose klinisch Metastasen erkennbar. Ein Patient entwickelte im Verlauf von 31 Monaten nach Surveillance einen Befall der retroperitonealen Lymphknoten, nachdem er primär in ein klinisches Stadium I eingeteilt worden war. Da das Follow up auf zwei Jahre festgesetzt ist, ist der IR-Wert des Patienten der nicht metastasierten Seminome zugeordnet (Intention-to-treat-Analyse).

Von den 28 Patienten mit NSKZT wurden bei Erstdiagnose in 10 Fällen Metastasen festgestellt. Diese Tumore setzten sich aus 20 Embryonal-Karzinomen (davon 6 metastasiert und 14 nicht metastasiert), 5 Teratomen (2 metastasiert) und 3 Chorionkarzinomen (2 metastasiert) zusammen.

Drei Patienten entwickelten innerhalb eines Jahres einen Befall von Lymphknoten, nachdem sie dem Stadium I zugeordnet worden waren. Die Daten der Patienten wurden nicht im Vergleich zwischen metastasierten und nicht-metastasierten NSKZT angewendet, da nicht unterschieden werden kann, ob es sich um okkulte Metastasierungen oder um Rezidive handelt. Die Daten werden ebenfalls gesondert betrachtet (s. 3.4.3).

3.1.3 Stadieneinteilung aller germinalen Hodentumore

Tabelle 4: Verteilung der Stadien bei Seminomen und NSKZT bei Erstdiagnose

	Stadium I	Stadium IIA	Stadium IIB	Stadium IIC	Stadium III	Σ
Seminom	47	4	2	3	2	58
NSKZT	18	1	3	1	5	28
Gesamt	65	5	5	4	7	86

Bei Erstdiagnose befanden sich 81,0 % (47/58) der Patienten mit Seminom und 64,3 % (18/28) der Patienten mit NSKZT im Stadium I.

Von den Patienten mit Seminom waren 15,5 % (9/58) im Stadium II und 3,5 % (2/58) im Stadium III. Jeweils ca. 17,9 % (5/28) der Patienten mit NSKZT befanden sich im Stadium II und III.

3.1.4 Follow up

Ein Follow up von mindestens zwei Jahren war Voraussetzung zur Auswertung der Daten. Der Median des Follow up bei allen reinen Keimzelltumoren (zwei Todesfälle ausgenommen) war 3539 Tage (9,7 Jahre). Das Minimum betrug 768 Tage (2,1 Jahre), das Maximum war 6035 Tage (16,5 Jahre).

Bei Seminomen betrug der Median des Follow up 3832,5 Tage (10,5 Jahre). Das Minimum war 880 Tage (2,4 Jahre), das Maximum betrug 6035 Tage (16,5 Jahre). Bei NSKZT war der Median des Follow up 3027 Tage (8,3 Jahre). Das Minimum war 768 Tage (2,1 Jahre), das Maximum war 5554 Tage (15,2 Jahre).

3.2 Therapie

Alle Patienten erhielten initial eine Ablatio testis. Die darauf folgenden Therapiemaßnahmen der Patienten mit Seminomen und der Patienten mit reinen NSKZT sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Therapie der Patienten mit germinalem Hodentumor

	Surveillance	RLA	RLA+ Chemo	Chemo + RTR	Chemo	Radiatio	andere	Σ
Seminom	5	0	0	3	4	46	0	58
NSKZT	4	11	7	0	5	0	1*	28
Gesamt	9	11	7	3	9	46	1	86

RLA = retroperitoneale Lymphknotenausräumung, ein- oder auch beidseitig

Chemo = Chemotherapie

RTR = Residualtumorresektion

* siehe Tabelle 8

79,3 % (46/58) der Patienten mit einem Seminom wurden mit einer Radiatio behandelt. Vier Patienten wurden einer Chemotherapie unterzogen, drei erhielten nach einer Chemotherapie eine Residualtumorresektion und fünf befanden sich unter Surveillance.

Im Vergleich dazu wurden 64,3 % der Patienten (18/28) mit einem reinen NSKZT retroperitoneal lymphadenektomiert. Bei sieben der 18 Patienten wurde zusätzlich zur RLA eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt.

Fünf Patienten erhielten eine primäre Chemotherapie und vier Patienten mit einem reinen NSKZT unterzogen sich einer Surveillance.

3.2.1 Stadienabhängige Therapiestrategien bei Patienten mit Seminom

Eine Aufschlüsselung der Therapiestrategien bei Patienten mit Seminom in Abhängigkeit der Stadien zeigen die Tabellen 6 und 7.

Tabelle 6: Stadienabhängige Therapie der Patienten mit Seminom

	Surveil- lance	Chemo + RTR	Chemo	Radiatio	Σ
Stadium I	5**	0	1	41	47
Stadium IIa	0	0	0	4	4
Stadium IIb	0	1	1	0	2
Stadium IIc	0	2	1	0	3
Stadium III	0	0	1 †	1*	2
Gesamt	5	3	4	46	58

Chemo = Chemotherapie

Radiatio = entweder paraaortal (12-36 Gy) oder paraaortal und ipsilateral iliakal (26-34,2 Gy)

RTR = Residualtumorsektion

* Radiatio, paraaortal und ipsilateral iliakal 40 Gy, zusätzlich Radiatio des Mediastinums und der Fossa supraclavicularis 30 Gy

** ein Patient entwickelte im späteren Verlauf (2 Jahre und 7 Monate) einen Befall der retroperitonealen Lymphknoten, siehe Tabelle 10 (von der Statistik ausgeschlossen)

† Patient verstarb, bei Erstdiagnose Befall der Leber und der retroperitonealen Lymphknoten

Tabelle 7: Stadienabhängige Chemotherapien der Patienten mit Seminom

	2 Zyklen Carboplatin mono	2 Zyklen PVB + 1 Zyklus PEB	2 Zyklen PEB	2 Zyklen PVB	4 Zyklen PEB	3 Zyklen PVB
Stadium I	1					
Stadium IIa						
Stadium IIb		1	1			
Stadium IIc				1	2	
Stadium III						1

PEB = Cisplatin, Etoposid, Bleomycin

PVB = Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin

Da die Mehrzahl der Patienten mit Seminom im CS I eine Radiatio der retroperitonealen Lymphknoten bekam, kann über die okkulte Metastasierung dieser Patienten keine Aussage getroffen werden. Alle Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Seminopatienten beziehen sich daher auf eine mit bildgebenden Verfahren erkennbare, klinische Metastasierung.

Bei Patienten mit Seminom im Stadium I wird keine RLA durchgeführt, so dass die Stadieneinteilung hier immer klinisch erfolgen muss, und es daher selten zu der Einstufung in das pathologische Stadium (PS) I kommen kann.

3.2.2 Stadienabhängige Therapiestrategien bei Patienten mit reinem NSKZT

Eine Aufschlüsselung der Therapiestrategien bei Patienten mit reinem NSKZT in den verschiedenen Stadien zeigen die Tabellen 8 und 9.

Tabelle 8: Stadienabhängige Therapie der Patienten mit reinem NSKZT

	Surveil- lance	RLA	RLA + Chemo	Chemo	andere	Σ
Stadium I	4	11	0	3	0	18***
Stadium IIa	0	0	1	0	0	1
Stadium IIb	0	0	3	0	0	3
Stadium IIc	0	0	1	0	0	1
Stadium III	0	0	2 **	2 (1 †)	1*	5
gesamt	4	11	7	5	1	28

Chemo = Chemotherapie

RLA = retroperitoneale Lymphknotenausräumung, einseitig (10 Patienten) - oder beidseitig (ein Patient)

* Feststellung von Lungenmetastasen bei Erstdiagnose: anterolaterale Thorakotomie mit atypischer Residualtumor-Resektion (keine vitalen Tumorzellverbände nachweisbar) nach Chemotherapie (vier Zyklen PEB und zwei Zyklen PEI).

** Ein Patient bei Erstdiagnose auch TIN kontralateral (Radiatio dieser Seite mit 20 Gy). (Entwicklung eines Lymphknotens am Hals 13 Monate später), siehe Tabelle 10

*** Drei Patienten entwickelten im Verlauf einen Befall von Lymphknoten, siehe Tabelle 10 (von der Statistik ausgeschlossen)

† ein Patient (Metastasen retroperitoneal, mediastinal und Leber) verstarb, er erhielt vier Zyklen PVB

Tabelle 9: Stadienabhängige Chemotherapien der Patienten mit reinem NSKZT

	2 Zyklen PEB + 2 Zyklen PEI	1 Zyklus PEB	2 Zyklen PEB	1 Zyklus PEB + 2 Zyklen PVBI	4 Zyklen PEB	3 Zyklen PVB	4 Zyklen PEB + 2 Zyklen PEI	4 Zyklen PVB	4 Zyklen PVBI
Stadium I	1				1	1			
Stadium IIa					1 *				
Stadium IIb		1 *	1 *	1 *					
Stadium IIc			1 *						
Stadium III			1 *		1		1	1	1

PEB = Cisplatin, Etoposid, Bleomycin

PVB = Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin

PVBI = Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin, Ifosfamid

* Durchführung einer retroperitonealen Lymphknotenausräumung vor Chemotherapie

3.2.3 Therapie bei Auftreten von Rezidiven

Drei Patienten mit NSKZT im Stadium I, ein Patient mit Seminom im Stadium I und ein Patient mit NSKZT im Stadium III entwickelten Rezidive bzw. Metastasen.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über Stadium, Tumorart, Rezidivart und Therapien dieser Patienten wieder.

Tabelle 10: Therapien der Patienten bei Auftreten von Rezidiven bzw. Metastasen

Erstdiagnose	Embryonal-Karzinom	Embryonal-Karzinom	Chorionkarzinom	Seminom	Teratom
Stadium	I	I	I	I	III
Primärtherapie	4 x PEB	RLA einseitig	3 x PVB	Surveillance	RLA bds. 4 x PEB
Zeitpunkt des Rezidivs bzw. Metastase nach Primärtherapie	7 Monate	9 Monate	7 Monate	31 Monate	13 Monate
Therapie des Rezidivs bzw. Metastase	RLA einseitig 2 x PEB	RLA beidseitig supracl. LK-Exstirpation → 3 x PEB	RLA beidseitig	2 x PEB, dann RTR	zerv. LK-Exstirpation → 2 x PEB
Rezidivtumor	Embryonal-Karzinom	Embryonal-Karzinom	Teratom	Regressiv veränderte LK ohne Seminomnachweis	unbekannt
Besonderheit / Follow up	Im Follow up tumorfrei	Im Follow up tumorfrei	53 Monate nach PT kontralat. Tu→Ablatio (Teratom) im Follow up tumorfrei	Im Follow up tumorfrei	Kontraterale TIN bei Erstdiagnose → Radiatio 20 Gy im Follow up tumorfrei

TIN	= testikuläre intraepitheliale Neoplasie
zerv.	= zervikale
Gy	= Gray
kontralat. Tu	= kontralateraler Tumor
LK	= Lymphknoten
PEB	= Cisplatin, Etoposid, Bleomycin
PT	= Primärtherapie
PVB	= Cisplatin, Vinblastin, Bleomycin
RLA	= retroperitoneale Lymphadenektomie
RTR	= Residualtumorresektion
supracl.	= supraclavikulär

3.3 sACE-Expression in Seminomen

3.3.1 sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen

Alle 58 Seminome wiesen eine Expression von sACE auf. 11 Seminome waren bei Erstdiagnose metastasiert. Eine Übersicht der sACE-Expression bei Seminomen geben Tabelle 11 und Tabelle 12.

Tabelle 11: sACE-Expression in Seminomen

	Σ	metastasiert	nicht metastasiert
Seminome	58	11	47
IRS = 0	0	0	0
IRS = 1	1	1	0
IRS = 2	2	0	2
IRS = 3	4	4	0
IRS = 4	3	1	2
IRS = 6	4	1	3
IRS = 8	16	3	13
IRS = 9	1	0	1
IRS = 12	27	1	26

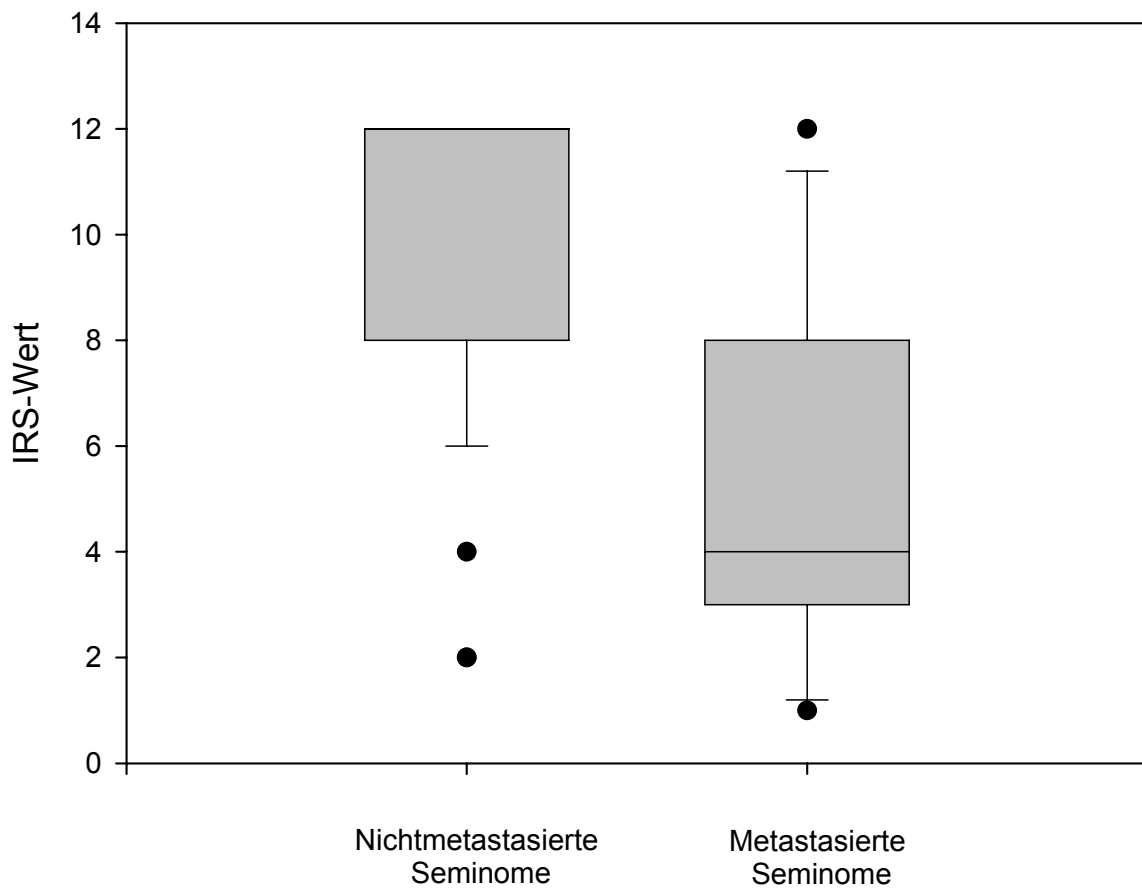
Bei metastasierten Seminomen wurden niedrigere ACE-Expressionen als bei nicht-metastasierten Seminomen gefunden.

So hatten 85,1 % (40/47) aller nicht-metastasierten Seminome und nur 36,4 % (4/11) aller metastasierten Seminome IR-Werte gleich oder über 8. Nur ein metastasiertes Seminom hatte einen Wert über 8 (IRS = 12). Bei einem IR-Wert gleich oder über 8 hatten nur 9,1 % (4/44) der Seminome Metastasen gebildet. Bei einem Wert unter 8 waren es 50 % (7/14) und bei einem Wert unter 4 waren es 71,4 % (5/7).

Tabelle 12: Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen

	Σ	Minim.- IRS	1.Quart.- IRS	Median- IRS	3.Quart.- IRS	Maxim.- IRS
Seminom ohne Metastasen	47	2	8	12	12	12
Seminom mit Metastasen	11	1	3	4	8	12

Grafik 1: IRS-Mediane der sACE-Expression in nicht-metastasierten (links, n = 47) und metastasierten (rechts, n = 11) Seminomen



3.3.2 Statistische Auswertung mittels Odds ratio

Es stellte sich die Frage, ob der IR-Wert von sACE bezüglich des Vorliegens einer Metastasierung bei Patienten mit reinem Seminom eine prognostische Relevanz hat. Der IR-Wert wurde am Median der Seminompatienten (IR-Wert: 8) dichotomisiert.

Es zeigte sich, dass die Höhe des IR-Wertes einen erklärenden Beitrag für das Vorhandensein von einer oder mehreren Metastasen bei Diagnosestellung liefert ($p=0,0021$). Dies entspricht einer Odds ratio von 9,999 mit einem 95 %-Vertrauensintervall von [2,305; 43,384]. Damit ergab sich, dass Patienten mit Seminom mit IR-Werten unter 8 ein zehnfach erhöhtes Risiko für eine klinisch manifeste Metastasierung haben.

3.3.3 Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei einem Patient mit Seminom im Verlauf

Bei einem von 48 Patienten mit Seminom im Stadium I traten 31 Monate nach Semikastratio und unter Surveillance ein Befall retroperitonealer Lymphknoten auf. Bei Erstdiagnose war ein IR-Wert von 8 gemessen worden.

3.3.4 Tod und sACE-Wert

Der verstorbene Patient mit Seminom im Stadium III hatte einen IR-Wert von 8.

3.4 sACE-Expression in reinen NSKZT

3.4.1 sACE-Expression in reinen nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT

Drei Patienten von 28 entwickelten im Verlauf von zwei Jahren Metastasen, ihre IR-Werte werden gesondert betrachtet (s. 3.4.3). Daher erscheinen bei dem folgenden Vergleich 25 NSKZT.

Auffällig ist, dass sieben der 25 reinen NSKZT kein sACE exprimierten. 13 NSKZT hatten einen Wert unter 4. Bei fünf NSKZT ließen sich Werte von 4 bis 8 ermitteln. Es zeigte sich, dass kein NSKZT eine Expression über 8 hatte.

Tabelle 13: sACE-Expression in reinen NSKZT

	Σ	metastasiert	nicht metastasiert
NSKZT	25	10	15
IRS = 0	7	4	3
$1 \leq \text{IRS} \leq 3$	13	6	7
$4 \leq \text{IRS} \leq 8$	5	0	5
$9 \leq \text{IRS} \leq 12$	0	0	0

IR-Werte der sACE-Expression von 0 bis 8 ließen sich bei den 15 nicht-metastasierten reinen NSKZT ermitteln. Im ersten Quartil betrug der IR-Wert 2, im dritten Quartil 6.

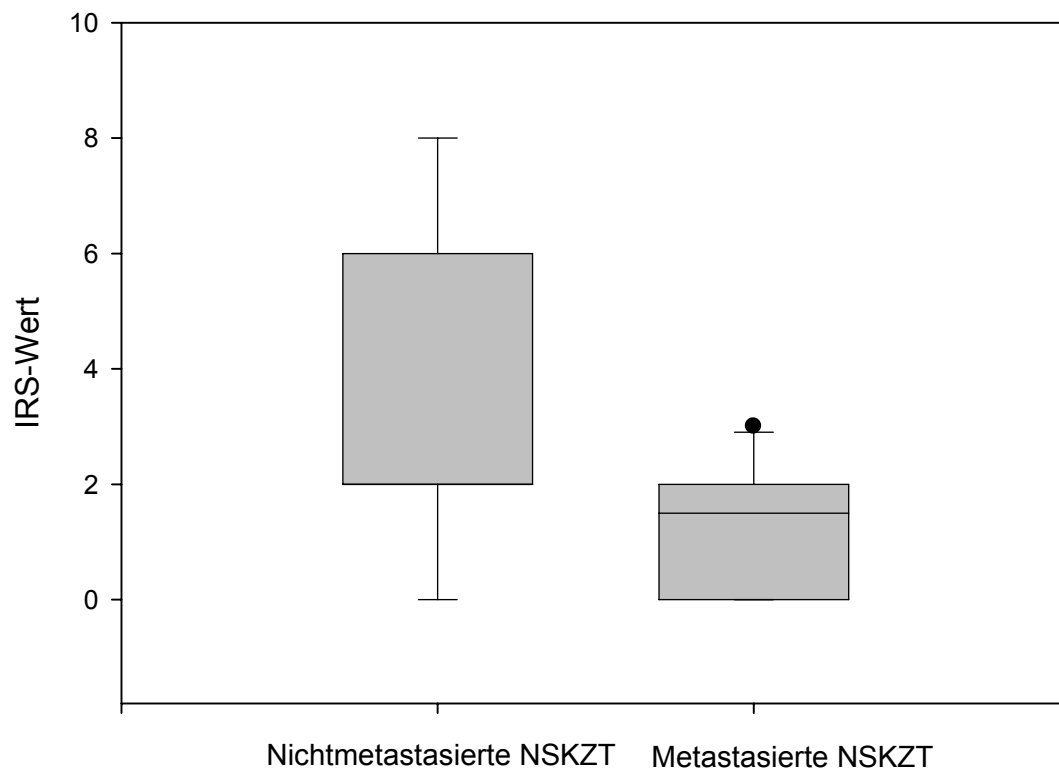
Die Werte der sACE-Expression bei den 10 metastasierten reinen NSKZT betragen unter 4. Davon hatten vier NSKZT keine sACE-Expression (40 % der metastasierten NSKZT). Im ersten Quartil betrug der IR-Wert 0, im dritten Quartil 2.

Die Mediane der beiden Gruppen unterschieden sich nicht stark voneinander (nicht metastasiert 2 versus metastasiert 1,5).

Tabelle 14: Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten reinen NSKZT

	Σ	Minim.- IRS	1.Quart.- -IRS	Median- IRS	3.Quart.- -IRS	Maxim.- IRS
NSKZT ohne Metastasen	15	0	2	2	6	8
NSKZT mit Metastasen	10	0	0	1,5	2	3

Grafik 2: IRS-Mediane der sACE-Expression in nicht-metastasierten (links, n = 15) und metastasierten (rechtes, n = 10) reinen NSKZT



Um eine valide Schätzung der Odds ratio bzw. des Konfidenzintervalls zu erhalten, war der Stichprobenumfang zu klein.

3.4.2 sACE-Expression in NSKZT unterschiedlicher Tumorentitäten

Tabelle 15: sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT bei unterschiedlichen Tumorentitäten

	Σ	metastasiert	nicht metastasiert
Embryonalkarzinom	18	6	12
IRS = 0	3	0	3
$1 \leq \text{IRS} \leq 3$	10	6	4
$4 \leq \text{IRS} \leq 8$	5	0	5
$9 \leq \text{IRS} \leq 12$	0	0	0
Chorionkarzinom	2	2	0
IRS = 0	2	2	0
$1 \leq \text{IRS} \leq 3$	0	0	0
$4 \leq \text{IRS} \leq 8$	0	0	0
$9 \leq \text{IRS} \leq 12$	0	0	0
Teratom	5	2	3
IRS = 0	2	2	0
$1 \leq \text{IRS} \leq 3$	3	0	3
$4 \leq \text{IRS} \leq 8$	0	0	0
$9 \leq \text{IRS} \leq 12$	0	0	0

Die 25 NSKZT setzten sich aus 18 Embryonal-Karzinomen (6 metastasiert, 12 nicht-metastasiert), zwei Chorionkarzinomen (metastasiert) und fünf Teratomen (2 metastasiert) zusammen.

Es fiel auf, dass ein Teil der nicht-metastasierten Embryonal-Karzinome IR-Werte von 4 bis 8 exprimierten. Alle übrigen NSKZT wiesen Werte unter 4 auf.

3.4.3 Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei Patienten mit NSKZT im Verlauf

Tabelle 16: Rezidiv bzw. Metastasen und sACE-Expression bei Patienten mit NSKZT

Tumor bei Erstdiagnose	Embryonal-Karzinom	Embryonal-Karzinom	Chorionkarzinom	Teratom
Stadium	I	I	I	III
IRS	6	6	2	0
Zeitpunkt nach Primärtherapie	7 Monate	9 Monate	7 Monate	13 Monate

3.4.4 Tod und sACE-Wert

Ein Patient mit unreifem Teratom im Stadium III mit einem IR-Wert von 0 verstarb.

3.5 sACE-Expression in Seminomen und NSKZT im Vergleich

Alle 58 Seminome wiesen eine Expression von sACE auf, im Vergleich dazu ist auffällig, dass 7 der 28 reinen NSKZT keine sACE-Expression aufweisen.

Tabelle 17: sACE-Expression in reinen NSKZT und Seminomen

	NSKZT	Seminome
Σ	28	58
IRS = 0	7	0
$1 \leq \text{IRS} \leq 3$	14	7
$4 \leq \text{IRS} \leq 8$	7	23
$9 \leq \text{IRS} \leq 12$	0	28

Unabhängig von Vorhandensein von Metastasen ergaben sich bei einem Vergleich zwischen Seminomen und reinen NSKZT deutliche Unterschiede bezüglich der Verteilung der IR-Werte des sACE.

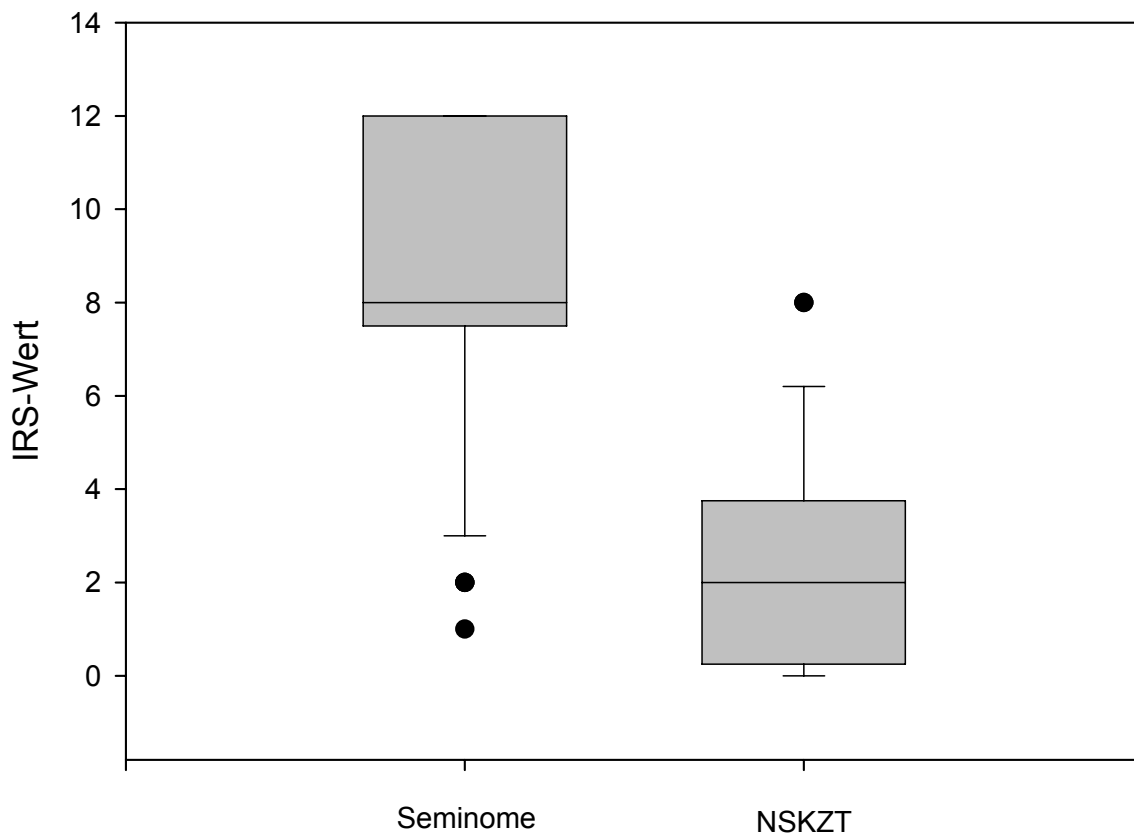
48 % der Seminome hatten einen Wert über 8, wohingegen keiner der NSKZT einen Wert über 8 aufwies. 39,7 % aller Seminome hatten Werte von 4 bis 8, im

Vergleich dazu exprimierten 25 % der NSKZT diese Werte. 12,1 % der Seminome und 75 % der NSKZT hatten IR-Werte unter 4.

Tabelle 18: Vergleich der sACE-Expression in Seminomen und reinen NSKZT

	Σ	Minim.- IRS	1.Quart. -IRS	Median- IRS	3.Quart. -IRS	Maxim.- IRS
Seminom	58	1	7,5	8	12	12
NSKZT	28	0	0,75	2	3,25	8

Grafik 3: IRS-Mediane der sACE-Expression (links, n = 58) in Seminomen und reinen NSKZT (rechts, n = 28)



Insgesamt zeigten Seminome eine höhere Expression von sACE als NSKZT. Der Median lag bei den Seminomen bei 8, es wurden IR-Werte von 1 bis 12 gemessen. Im Vergleich zu den Seminomen war der Median bei den NSKZT 2, die Werte reichten von 0 bis 8.

4. Diskussion

4.1 sACE-Expression in Keimzelltumoren des Hodens

Erstmalig wurde 1987 beschrieben, dass die somatische Isoform des ACE bei Erwachsenen in Keimzellen und Keimzelltumoren (Seminome und nichtseminomatöse Keimzelltumore) entdeckt wurde (Saint-Andre et al. 1988, Rohmer et al. 1987).

Es fand sich in der Dissertationsarbeit von Frau Dr. K. Pauls eine Korrelation zwischen der sACE-Expression und der histologischen Differenzierung in menschlichen testikulären Tumoren. Das sACE-Protein, welches durch Immunhistochemie mittels CG2-Antikörper ermittelt wird, ist in testikulären intraepithelialen Neoplasien und Seminomen stark ausgeprägt, in nichtseminomatösen Keimzelltumoren (NSKZT) ist es niedrig bzw. nicht nachzuweisen (Pauls 2002, Franke et al. 2000).

Ein Teil der Ergebnisse, die das Vorhandensein von sACE mittels CG2-Antikörper in Keimzelltumoren umfassen, wurde uns aus der Dissertationsarbeit von Frau Dr. K. Pauls zur Verfügung gestellt.

Ziel dieser Arbeit ist, eine Gegenüberstellung der sACE-Ergebnisse zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Seminomen und metastasierten und nicht-metastasierten nichtseminomatösen Keimzelltumoren herzustellen.

Denn derzeit existiert kein Marker, mit dem eine okkulte Metastasierung mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann. Die Folge kann daher eine Unter- bzw. Übertherapie sein. Durch die Vielfalt der therapeutischen Optionen ist die Entscheidung für die optimale Behandlung der Patienten komplizierter geworden. Dies betrifft vor allem Patienten in frühen Tumorstadien, die oftmals bereits durch einen relativ kleinen Eingriff geheilt werden könnten (Schmoll et al. 2004).

Ziel der Therapeuten ist, jene Methode zur Anwendung kommen zu lassen, die gleichermaßen die beste Methode für die Heilung ist, aber auch die geringste Belastung für den Patienten darstellt. Von besonderer Bedeutung ist dabei auch, Prädiktoren für eine okkulte Metastasierung zu finden und zu nutzen. Das hat zur

Folge, dass Patienten im klinischen Stadium I eine noch bessere Risikostratifizierung zukommt als mit den bisherigen Markern möglich.

4.1.1 Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten Seminomen

Bei metastasierten Seminomen wurden niedrigere ACE-Expressionen als bei nicht-metastasierten Seminomen gefunden. Es ließ sich feststellen, dass 50 % aller Seminome mit einem IR-Wert unter 8 metastasiert waren. Bei einem Wert gleich oder größer 8 waren nur 9,1 % aller Seminome metastasiert. Von den Patienten mit Werten unter 4 hatten 71,4 % Metastasen. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Ergebnisse zu einer Optimierung der Therapieentscheidung beitragen können.

Akute Nebenwirkungen und Langzeitnebenwirkungen der adjuvanten Therapien sind bekannt.

Bei der Chemotherapie können durch die platinhaltige Chemotherapie Nierenfunktionsstörung sowie Abgeschlagenheit, Infektionsgefahr (Leukopenie), Blutungsgefahr (Thrombopenie), Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall auftreten. Unmittelbar nach einer platinhaltigen Chemotherapie sind nahezu alle Patienten infertil (Souchon et al. 2002).

Akute Toxizitäten der paraaortalen Bestrahlung betreffen vor allem den Gastrointestinaltrakt wie Übelkeit und Erbrechen. Desweiteren sind eine radiogene Induktion von Zweitmalignomen und Kardiotoxizität zu nennen (Heidenreich 2004).

Die Therapie bei Patienten mit Seminomen und Surveillance-Strategie ist im Falle des Rezidives aufwändiger, denn drei Viertel der Patienten benötigen eine höher dosierte und ausgedehntere Strahlentherapie und ein Viertel eine Chemotherapie (Souchon et al. 2002).

Zu den bedeutsamsten prognostischen Indikatoren für eine okkulte Metastasierung bei Seminomen zählen die Rete testis-Infiltration und die Größe des Tumors. Patienten mit Seminomen mit Rete testis-Infiltration und einer Tumorgöße über 4 cm haben ein 32 %iges Risiko für eine okkulte Metastasierung, ohne beide Risikofaktoren nur 6 % (Aparicio et al. 2005). Bei Seminomen ohne Risikofaktoren ist in 94 Prozent der Fälle eine weitergehende Therapie, über die Orchiektomie hinaus, nicht erforderlich. Diese Patienten können als potentiell geheilt betrachtet werden.

Eine Chemotherapie oder Radiatio erfolgen dann, wenn eine Rete testis-Infiltration und eine Tumorgöße über 4 cm vorliegen (Aparicio et al. 2003, Warde et al. 2002).

Die Radiotherapie und die Carboplatin-Monotherapie bedeuten demnach auch für diese sogenannten Hochrisikopatienten in ca. 68 % der Fälle eine Übertherapie, da diese auch ohne Therapie rezidivfrei bleiben.

Um die Sicherheit der Prognose bei der Einteilung zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Seminomen zu erhöhen, muss nach weiteren prädiktiven Faktoren für die okkulte Metastasierung bzw. für deren Ausschluss gesucht werden.

Hätten nun die gewonnenen Daten einen Einfluß auf die Wahl der Therapie und würde man sich nur anhand des IR-Wertes orientieren, so könnte man für Patienten mit einem IR-Wert über 6 mit über 90 %iger Wahrscheinlichkeit Metastasen ausschliessen. Daher würde man sich für eine Surveillance entscheiden. In diesem Fall würde man 9,1 % untertherapieren.

Würde man Patienten mit Werten unter 8 mit Verdacht auf okkulte Metastasen mittels Chemo- oder Radiotherapie behandeln, wären 50 % übertherapiert. Bei Werten unter 4 wären 28,6 % (2/7) übertherapiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten zum ersten Mal, dass ein Patient mit Seminom und einem IR-Wert unter 8 ein fast zehnfach höheres Risiko hatte, bei Erstdiagnose Metastasen zu haben.

Das Ergebnis hätte zur Folge, dass die Sicherheit der Prognose zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Seminomen noch weiter erhöht werden kann, so dass sowohl Übertherapien als auch Untertherapien und daraus folgende Rezidivtherapien vermieden werden können.

sACE scheint ein viel versprechender Marker einer Metastasierung bei Patienten mit Seminomen zu sein, um das Risikoprofil noch weiter eingrenzen zu können. Größere Studien sind angezeigt, in denen z.B. eine Kombination von klassischen Risikofaktoren (Rete testis-Infiltration und Tumorgöße) und sACE-Expression untersucht wird.

Allerdings muß berücksichtigt werden, dass sich alle Unterschiede zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Seminompatienten auf eine mit bildgebenden Verfahren erkennbare Metastasierung beziehen. Da die Mehrzahl der Patienten mit Seminom im klinischen Stadium I eine Radiatio der retroperitonealen Lymphknoten erhielt, konnte eine eventuell vorhandene Metastasierung nicht

vollständig ausgeschlossen werden. In folgenden Studien sollten daher nur Patienten im klinischen Stadium I eingebunden sein, die sich einer Surveillance unterziehen.

4.1.2 Vergleich der sACE-Expression in nicht-metastasierten und metastasierten NSKZT

40 % aller NSKZT waren initial metastasiert, diese wiesen IR-Werte unter 4 auf. Bei den nicht-metastasierten NSKZT wurden Maximalwerte bis 8 erreicht. Die Mediane unterschieden sich zwischen den nicht-metastasierten und den metastasierten NSKZT nicht stark voneinander (IR-Wert 2 versus 1,5).

Bei 48 % der NSKZT mit vaskulärer Invasion und bei 14 bis 22 % der NSKZT ohne nachgewiesene vaskuläre Invasion werden trotz negativer Bildgebung im Stadium I okkulte Metastasen übersehen (Albers et al. 2003, Ondrus et al. 1998, Klepp et al. 1997). Diese manifestieren sich meist in Form retroperitonealer Lymphknotenmetastasen. Würde man alle Patienten dieses Tumorstadiums mittels Chemotherapie oder retroperitonealer Lymphadenektomie primär behandeln, wären folglich 52-86 % übertherapiert. Diese Patienten wären also nur durch eine Orchiektomie geheilt (Spermon et al. 2002).

Für NSKZT ist im Stadium I die Invasion des Primärtumors in Blut- oder Lymphgefäße der wichtigste prädiktive Wert einer okkulten Metastasierung (Albers et al. 2003, Pont et al. 1990). Die Proliferationsrate sowie der Anteil eines Embryonal-Karzinoms sind zusätzliche Faktoren, welche den positiven prädiktiven Wert der vaskulären Invasion erhöhen (Albers et al. 2003, Bokemeyer 1996). Nach dem heutigen Standard wird die Therapie risikoadaptiert durchgeführt. Bei vaskulärer Invasion erfolgt eine Chemotherapie mit zwei Zyklen PEB, ggf. erfolgt bei Kontraindikation einer Chemotherapie eine beidseitige RLA, ohne Risikofaktoren erfolgt die Surveillance (Schmoll et al. 2004). Die adjuvanten Therapien gehen mit einer nicht zu vernachlässigenden Rate an Nebenwirkungen und Langzeit-Toxizitäten einher. So findet sich bei der RLA die Gefahr des Ejakulationsverlusts sowie operativer Risiken u.a. Infektionen, Blutungen, Revisions-OP und Anästhesierisiko (Spermon et al. 2002, Souchon et al. 2002).

Bei der Chemotherapie können als Nebenwirkungen eine Nierenfunktionsstörung durch die platinhaltige Chemotherapie, eine Schädigung der

Lunge durch Bleomycin sowie Abgeschlagenheit, Infektionsgefahr (Leukopenie), Blutungsgefahr (Thrombopenie), Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall auftreten (Pottek et al. 2005, Souchon et al. 2002). Eine aktuelle Studie ergab, dass zirkulierende Plasmaspiegel von Cisplatin noch bis zu 20 Jahre nach der Behandlung nachweisbar sind (Chaudhary et al. 2003).

Es fiel auf, dass lediglich ein Anteil von etwa 42 % der nicht-metastasierten Embryonal-Karzinome IR-Werte zwischen 4 und 8 aufwiesen. Alle übrigen metastasierten und nicht-metastasierten NSKZT zeigten Werte zwischen 0 und 3. Allerdings lassen die Ergebnisse über sACE-Expression in NSKZT noch keinen konkreten Rückschluss auf einen Zusammenhang zwischen sACE-Expression und Metastasierung zu, da die Fallzahlen zu klein sind.

Falls eine mögliche Korrelation zwischen sACE-Expression und klinischem Status bei NSKZT hergestellt werden könnte, könnte es auch hier zu einer Verbesserung der Therapiewahl führen. Hierzu wären Studien an größeren Kollektiven angebracht, die zudem die histologischen Differenzierungen der NSKZT berücksichtigen. Auch die Kombination von sACE-Expression mit möglichen Risikofaktoren wie vaskuläre Invasion und Anteile eines Embryonal-Karzinoms könnten ebenfalls untersucht werden.

4.2 sACE-Expression in Tumoren und ACE-Gen-Polymorphismus

Bisher wurden noch keine ACE-Expressionen bei Keimzelltumoren des Hodens abhängig vom klinischen Status untersucht. Auch existieren bislang keine Studien über ACE-Genotypen bei Keimzelltumoren des Hodens.

Erstmalig wurde sACE mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in den Tumorzellen bei Nierenzellkarzinomen (Takada et al. 1985 und 1983) detektiert. Erst in der jüngeren Vergangenheit wurden vermehrt Untersuchungen über das Vorhandensein von sACE in anderen Tumoren durchgeführt.

Es existieren die II-, ID- und DD-Genotypen von sACE. Die D- oder I-Allele werden durch Anwesenheit von 190-bp- oder 490-bp-Fragmenten identifiziert.

Es gibt Hinweise darauf, dass spezifische Genotypen mit dem Aggressivitätsgrad der Tumoren korrelieren. Es existieren wie im Folgenden

beschrieben keine einheitlichen Ergebnisse über das Vorhandensein von sACE und Genotypen in malignen Tumoren.

In menschlichen Magenkarzinomen zeigte sich mittels monoklonaler Antikörper immunhistochemisch eine Expression von sACE in Endothel- und Tumorzellen. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten korrelierte mit dem Genotyp von sACE im peripheren Blut. Es zeigte sich, dass die Patienten mit Genotyp II im Vergleich zu den Patienten mit Genotyp DD eine geringere Anzahl von Lymphknotenmetastasen und ein geringeres Tumorstadium bei Erstdiagnose haben (es bestand keine Korrelation zwischen Genotyp und Inzidenz, Prävalenz, Lokalisation, Tumortyp, Tumorwachstum und Distanz zu den Metastasen). Das Ergebnis unterstützte die Hypothese, dass ACE-Aktivität die Tumorprogression beeinflusst (Röcken et al. 2005).

In einer ähnlichen Studie an Männern mit Prostata-Karzinom zeigte sich, dass bei Trägern des DD-Genotyps eine höhere ACE-Aktivität im peripheren Blut messbar ist und sie ein 2-fach erhöhtes Risiko haben, an ein Prostata-Karzinom zu erkranken (Medeiros et al. 2004).

Im Gegensatz dazu stellte sich dar, dass Frauen mit normalem Blutdruck unter 63 Jahren, die mittels PCR-Analyse im peripheren Blut Genotyp II oder Genotyp ID-Trägerinnen sind, ein höheres Risiko haben, ein Endometrium-Karzinom zu entwickeln (Freitas-Silva et al. 2004).

Im Unterschied zu diesen Ergebnissen zeigte sich, dass weder die Expression von sACE noch das Vorhandensein unterschiedlicher Genotypen einen Einfluss auf das Risiko von Brustkrebs bei Frauen haben (Haiman et al. 2003).

Diese Ergebnisse weisen unterschiedliche Dominanz der ACE-Genotypen in Karzinomen auf. Scheinbar existiert kein einheitlicher Genotyp, der Voraussagen bezüglich eines Malignitätsrisikos machen kann. Demnach scheint sACE kein einheitlicher Regulator in der Genese bei unterschiedlichen Tumoren zu sein. Auch über die Funktionen von sACE in den malignen Tumoren ist noch wenig bekannt.

Studien über ACE-Genotypen abhängig von ACE-Expressionen bei Keimzelltumoren des Hodens existieren nicht. Diesbezüglich erscheinen Untersuchungen interessant, und die Ergebnisse könnten unter Umständen auch zu einer Optimierung bei der Wahl der Therapie beitragen.

4.3 Vorhandensein und Funktionen von ACE in Tumoren: Mögliche Rollen und Funktionen von sACE in testikulären Keimzelltumoren

sACE könnte im Hodentumor durch Aktivierung anderer Enzyme oder Rezeptoren Einfluss auf unterschiedliche Funktionen wie z.B. Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen oder Angiogenese haben. Möglich sind nach derzeitigem Kenntnisstand Einflüsse des sACE auf das Renin-Angiotensin-System, das Kinin-Kallikrein-System und auf das Tetrapeptid N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin im Hodentumor.

4.3.1 *Das Angiotensin-Converting Enzym und das Renin-Angiotensin-System*

ACE spielt eine wichtige Rolle im Renin-Angiotensin-System durch Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Angiotensin II übt seine Wirkung durch Bindung an spezifische Zellmembranrezeptoren aus (Peach et al. 1990). Man unterscheidet zwei Haupttypen der Angiotensin II-Rezeptoren, den AT1- und den AT2-Rezeptor. Beide Rezeptortypen kommen physiologisch in vielen adulten Geweben, z.B. Blutgefäßen, Nebenniere, Herz und Gebärmutter vor (Tybitanclova et al. 2005, Paepe et al. 2001, Chang et al. 1991, Pucell et al. 1991).

Es wird angenommen, dass die Synthese von ATII-Rezeptoren im Gewebe von der lokalen ACE-Konzentration abhängig ist (Ardaillou et al. 1999).

Ebenso wird vermutet, dass die Anwesenheit der ATII-Rezeptoren einen Einfluss auf die Tumorgenese besitzt. Das Vorhandensein von ATII-Rezeptoren in Hodentumoren wurde bis jetzt nicht untersucht, allerdings existieren Studien über ATII-Rezeptoren in anderen Tumoren u.a. Prostata-, Ovarial- und Zervix-Karzinomen (Suganuma et al. 2005, Medeiros et al. 2004).

Aussagen in der Literatur über das Verhalten sowohl der AT1-Rezeptoren als auch der AT2-Rezeptoren in der Tumorgenese sind widersprüchlich.

Funktionen des AT1-Rezeptors in Tumoren:

In den meisten Studien lassen sich überwiegend eine Induktion des Tumorwachstums und die Förderung der Angiogenese durch AT1-Rezeptoren in Tumoren nachweisen.

Sowohl ACE-mRNA als auch AT1-Rezeptoren-mRNA fand man in der normalen Brustdrüse von weiblichen Ratten. Im Adenokarzinom der weiblichen Rattenbrust stiegen ACE-mRNA und AT1-Rezeptoren-mRNA an. Daher wurde postuliert, dass sACE in der Karzinogenese involviert ist (Tybitanclova et al. 2005). Diese Theorie wird auch von de Paepe vorgeschlagen; AT1-Rezeptoren ließen sich mittels Immunhistochemie in der Brustdrüse und in „Carcinoma in situ der Brust“ beim Menschen nachweisen, allerdings verschwand die Expression der AT1-Rezeptoren in Mamma-Karzinomen. Es wurde daraus gefolgert, dass die Expression von AT1-Rezeptoren eine wichtige Stufe in der Pathogenese der Hyperplasie darstellt (de Paepe et al. 2001).

Der AT1-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei Tumorzellinvasion und Angiogenese der Ovarialzell-Karzinome in vitro (Suganuma et al. 2005). AT1-Rezeptoren wurden mittels Immunhistochemie in Lungenmetastasen von Nierenzellkarzinomen bei Mäusen gemessen. Durch die Verabreichung des AT1-Rezeptorantagonisten Candesartan war eine Verlangsamung des Tumorwachstums, ein antiangiogenetischer und ein antimetastatischer Effekt der Lungenmetastasen bei Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen zu verzeichnen (Miyajima et al. 2002). Auch durch die Verabreichung von AT1-Rezeptorantagonisten (TCV 116) bei Mäusen mit Sarkomen und Fibrosarkomen wurden eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Erniedrigung der Anzahl von Lungenmetastasen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe festgestellt. Daneben wurde auch eine Erniedrigung der AT1-Rezeptoren-mRNA in den Tumoren gemessen (Fujita et al. 2002). Weiterhin werden durch eine AT1-Blockade mit Candesartan eine Suppression der Angiogenese und eine Erniedrigung einer peritonealen Dissemination bei Mäusen mit Ovarialkarzinomen hervorgerufen (Suganuma et al. 2005).

In einer Studie von Fujimoto hat man sowohl AT1-Rezeptoren mRNA als auch das AT1-Protein in menschlichen Pankreaskrebszellen in höheren Konzentrationen als im normalen menschlichen Pankreasgewebe gemessen. Durch eine AT1-Blockade

verzeichnete man eine Verlangsamung des Wachstums der Tumorzellen in vitro (Fujimoto et al. 2001). Bei Rattengliomen wurde durch eine AT1-Blockade mit Losartan eine Apoptose der Krebszellen in vivo und in vitro hervorgerufen (Arrieta et al. 2005).

Neben der Induktion des Tumorwachstums und der Förderung der Angiogenese lassen sich für AT1-Rezeptoren auch gegenteilige Wirkungen nachweisen. In alveolären epithelialen Zellen konnte sowohl vom Mensch als auch von der Ratte in vitro eine Apoptose durch Gabe von AT1-Rezeptoren induziert werden. Diese Apoptose kann bei Zugabe von selektiven AT1-Rezeptorantagonisten (Losartan, L-158809) gehemmt werden (Papp et al. 2002). Eine weitere Studie bewies in vivo bei menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen, die bei Mäusen implantiert wurden, einen antiangiogenetischen Effekt durch AT1-Rezeptoren (Walther et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich überwiegend eine Tumorinduktion durch das Vorhandensein von AT1-Rezeptoren feststellen. Allerdings lässt sich eben auch in bestimmten Tumoren eine Suppression ableiten. Diese Eigenschaften scheinen abhängig vom Tumorgewebe zu sein.

Funktionen des AT2-Rezeptors in Tumoren:

Auch über das Verhalten der AT2-Rezeptoren in Tumorgewebe gibt es unterschiedliche Studienergebnisse.

So scheint auch der AT2-Rezeptor gewebeabhängig eine Stimulierung des Tumorwachstums und der Angiogenese zu bedingen.

Eine Stimulierung der Angiogenese durch die AT2-Rezeptoren stellte sich bei menschlichen MCF-7-Brustkrebszellen, die bei Mäusen implantiert wurden, dar (Walther et al. 2003). Tagaki et al. konnten zeigen, dass die Prognose bei Mäusen mit Azoxymethan-induzierten Colon-Karzinomen durch Anwesenheit von AT2-Rezeptoren in der Leber im Vergleich zu Mäusen, die keine AT2-Rezeptoren aufweisen, schlechter ist. Man verglich Tumolvolumen und -menge in den beiden Gruppen und stellte fest, dass das Vorhandensein von AT2-Rezeptoren einen onkogenen Einfluss auf die Tumorgenese hat (Tagaki et al. 2002).

Der tumorfördernden Wirkung durch Aktivierung der AT2-Rezeptoren steht in einigen Studien eine tumorhemmende Wirkung durch Aktivierung der AT2-

Rezeptoren entgegen. Möglicherweise wirken AT₂-Rezeptoren durch Dephosphorylierung von verschiedenen Zellproteinen antiproliferativ und führen zu Apoptose (Horiuchi et al. 1997, Nakajima et al. 1995). Ein antiangiogener Effekt durch AT₂-Rezeptoren konnte in vitro an menschlichen Gefäßendothelzellen nachgewiesen werden (Benndorf et al. 2003).

Bislang existieren keine Untersuchungen über Anwesenheit und mögliche Funktionen von ATII-Rezeptoren in germinalen Hodentumoren.

Da laut Ardaillou et al. die Synthese der ATII-Rezeptoren von der lokalen ACE-Konzentration abhängig ist (Ardaillou et al. 1999), kämen diese Rezeptoren vermutlich in Seminomen mit einem hohen IRS verstärkt vor. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, bilden Seminome mit einer erhöhten sACE-Expression weniger oft Metastasen. Diese Tatsache könnte sich durch einen antiproliferativen Effekt der ATII-Rezeptoren auf das Tumorwachstum (der Seminome) erklären lassen.

Es ist angezeigt, in Hodentumoren auch das Vorhandensein bzw. die Dichte sowohl der AT₁- als auch der AT₂-Rezeptoren zu messen und die Funktionen dieser Rezeptoren zu überprüfen.

4.3.2 Das Angiotensin-Converting Enzym und das Kinin-Kallikrein-System

Bradykinin wird im Plasma aus Kallidin nach proteolytischer Spaltung des Kininogens durch die Serinprotease Kallikrein gebildet (Yang et al. 1970, Erdos 1966).

Die Kinine (Bradykinin, Kallidin) vermitteln ihre zellulären Aktionen über die zwei Bradykinin-Rezeptoren B₁ und B₂, welche in Tumoren wie renale Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus ansteigen (Bhoola et al. 2001, Dlamini et al. 1999). Typische Funktionen von Bradykinin werden hauptsächlich durch den B₂-Rezeptor vermittelt. Der B₂-Rezeptor kommt physiologisch ubiquitär an Endothelien der arteriellen Gefäße vor (Regoli et al. 1998, Mombouli et al. 1995).

Der B₂-Rezeptor wird in menschlichen Tumoren (Adenokarzinome der Lunge und des Magens, Plattenepithelkarzinom der Lunge, Lymphome des Lymphknotens und Karzinoide des Duodenums) und in Tumoren von Mäusen (Adenokarzinome des Colons, Sarkome) exprimiert (Wu et al. 2002).

Beide Rezeptoren sind mit G-Protein gekoppelten second messengers verbunden (Bhoola et al. 1992). Wenn Bradykinin an diesen Rezeptor bindet, werden typische G Protein vermittelte Signalübertragungen verstärkt. Daher wird Bradykinin eine potentielle Rolle zur Induktion der pathologischen Signaltransduktion in Tumorwachstum und Angiogenese in Tumoren zugeschrieben (Wu et al. 2002).

Während der Tumorgenese stimulieren die Kinine durch noch unbekannte Mechanismen die Tumorzellproliferation und die Angiogenese (George et al. 2002). Durch die Gabe von Bradykinin B1- und B2-Antagonisten gelang es, Tumorzellproliferation und die Angiogenese in vitro zu hemmen (Wolf et al. 2001).

ACE degradiert durch seine Carboxyl-Domäne das Bradykinin zu inaktiven oder weniger aktiven Produkten (Jaspard et al. 1994 und 1993, Yang et al. 1970, Erdos 1966). Es ist denkbar, dass eine hohe sACE-Konzentration auf diesem Weg einen antiproliferativen Effekt auf das Tumorgewebe haben kann. Dieser Effekt würde sich mit den Befunden in Keimzelltumoren des Hodens decken. Weniger aggressive Tumore mit einer höheren Expression von sACE könnten Ausdruck dieses Wirkmechanismus sein. Allerdings kann Bradykinin auch durch andere Kininasen u.a. Kininase I gespalten werden (Erdos et al. 1985), so dass eventuell die Spaltung von Bradykinin durch ACE keine Relevanz hat.

Diesbezüglich sind auch hier weitere Studien angezeigt und sollten die Funktionen des Kinin-Kallikrein-Systems in Hodentumoren untersuchen.

4.3.3 Das Angiotensin-Converting Enzym und N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin

Das Tetrapeptid N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin (AcSDKP) ist ein physiologisches Substrat von ACE (Azizi et al. 1996, Rousseau et al. 1995). sACE bewirkt durch seine enzymatisch aktive Amino-Seite eine Inaktivierung des Tetrapeptids AcSDKP (Rieger et al. 1993).

Zuerst wurde AcSDKP aus fetalem Kalbsknochenmark gewonnen (Lenfant et al. 1989). Später ließ sich AcSDKP auch in Leydigzellen und in testikulären Makrophagen von Rattenhoden nachweisen (Stéphan et al. 2000, Li et al. 1997). In vitro läßt AcSDKP die Keimzellproliferation ansteigen (Stéphan et al. 2000).

Erstmalig konnte gezeigt werden, dass AcSDKP für die Angiogenese in vitro und in vivo verantwortlich ist. AcSDKP erzeugte in vivo in der Chorionallantois-

Membran in Hühnerembryonen die Angiogenese und in vitro wurde die Bildung der Endothellzellen der Blutgefäße nachgewiesen (Liu et al. 2003).

AcSDKP könnte demnach auf unterschiedlichen Wegen zur Tumorförderung beitragen, zum einen durch Anstieg der Keimzellproliferation (Stéphan et al. 2000) und zum anderen durch Anregung der Angiogenese (Liu et al. 2003).

sACE wiederum könnte durch Inaktivierung des AcSDKP zu einer Wachstumsverlangsamung und zu einer Hemmung der Angiogenese in germinalen Hodentumoren führen.

Diesbezüglich sind nicht nur Messungen über sACE in den Keimzelltumoren interessant, sondern es sollten auch Messungen von AcSDKP in den Keimzelltumoren des Hodens besonders in Seminomen durchgeführt werden.

4.3.4 Zusammenfassung der möglichen Wirkmechanismen von sACE in germinalen Hodentumoren

Zusammenfassend existieren mehrere Mechanismen, über die das sACE tumorhemmend wirken könnte, d.h. sACE könnte Einfluss auf die Proliferation des Tumors durch das Renin-Angiotensin-System, durch das Kinin-Kallikrein-System oder / und durch das Tetrapeptid AcSDKP im Hodentumor nehmen.

Diese möglichen Mechanismen erschließen einen interessanten Bereich für weitere molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Es wird eine Herausforderung sein, biologische Funktionen dieser Enzyme und ihre physiologischen Substrate zu erforschen und Zusammenhänge der Über- bzw. Unterexpression in den Tumoren herzustellen.

4.4 sACE-Hemmung und Tumorrisiko

Die bereits gezeigten Daten und Wirkmechanismen von sACE lassen einen Zusammenhang zwischen Höhe von sACE und einem Malignitätsrisiko in den Keimzelltumoren des Hodens vermuten.

ACE-Hemmer werden zur Blutdrucksenkung eingesetzt. Es stellt sich die Frage, ob diese einen Einfluss auf das sACE im Hoden bzw. im Hodentumor haben können, so dass mögliche Nebenwirkungen bzw. auch positive Effekte in Betracht gezogen

werden sollten. Inwieweit die Gabe von ACE-Hemmern die Entwicklung von Keimzelltumoren fördern oder hemmen kann bzw. ob die Gabe bei Patienten mit Keimzelltumoren Nutzen oder weiteren Schaden anrichten kann, ist bis jetzt unbekannt.

Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die gegenteilige Effekte bezüglich eines Malignitätsrisikos nach Einnahmen von ACE-Hemmern aufwiesen. Die Einnahme von ACE-Hemmern scheint nicht mit einem erhöhten Malignitätsrisiko assoziiert zu sein (Grossmann et al. 2001).

ACE-Hemmer sollen sogar das Krebsrisiko senken können. In einer retrospektiven Kohortenstudie, bei denen 5207 Patienten ACE-Hemmer oder andere Antihypertensiva über 10 Jahre einnahmen, wurde gezeigt, dass ACE-Hemmer die Inzidenz von Karzinomen bei Frauen und Männern senken könnten (Lever et al. 1998). Ein möglicher Grund des Einflusses der ACE-Hemmer ist die Hemmung der Angiogenese, von der Tumorwachstum und Metastasierung abhängen. Demnach scheint die Angiogenese von der ACE-Konzentration abhängig zu sein, die durch die Gabe von ACE-Hemmern verringert werden kann. Durch den ACE-Hemmer Perindopril wurden Tumorwachstum und Angiogenese bei Ratten mit Carcinoma hepatocellulare unterdrückt. Zudem konnten an denselben Proben eine Erniedrigung von ACE gemessen werden (Yoshiji et al. 2001). Auch für den sowohl oral als auch lokal verabreichten ACE-Hemmer Captopril ließ sich ein inhibitorischer Effekt auf die Neovaskularisation an der Rattencornea nachweisen (Volpert et al. 1996).

Der verminderten Angiogenese durch ACE-Hemmer steht das Ergebnis einer Studie entgegen, in der nach Entfernung einer Femoralarterie bei Kaninchen eine gesteigerte Angiogenese durch die subkutane Injektion des ACE-Hemmers Quinaprilat im Hinterbein zu verzeichnen ist. Bei den Kaninchen war zudem eine Verminderung der ACE-Aktivität im Gewebe feststellbar (Fabre et al. 1999).

Eine andere Studie in Dänemark über die Krebsinzidenz bei 17897 Patienten mit ACE-Hemmer-Einnahme und mit einem Follow up von 3,7 Jahren, die mit der landesspezifischen Krebsinzidenz über acht Jahre verglichen wurde, zeigte allerdings keine Senkung des Krebsrisikos bezüglich Brust, weiblichen Reproduktionsorganen, Ösophagus, Magen und Leber (Friis et al. 2001).

Die genannten Studien zeigen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Gabe von ACE-Hemmern und es ist noch wenig über das Verhalten der sACE-Konzentrationen im Tumorgewebe nach Verabreichung von ACE-Hemmern bekannt.

Fest steht, dass beim gesunden Mann die Blut-Hoden-Schranke durch ACE-Hemmer nicht überwunden wird, dieses erbrachten Untersuchungen über Anwendungen von ACE-Hemmern bezüglich der Spermafunktion (Jackson et al. 1988 a und b). Die Bedingungen bei Diagnose eines Keimzelltumors können allerdings verändert (Blut-Hoden-Schranke unterbrochen) sein, so dass die orale Einnahme eines ACE-Hemmers am Tumor eine Wirkung erzielen könnte. Weitere Studien können hierüber Aufschluß geben.

5. Zusammenfassung

Die somatische Isoform des Angiotensin I Konvertase Enzyms (sACE) ist ein Marker in humanen testikulären Keimzelltumoren. sACE zeigt eine erhöhte Expression in Seminomen im Vergleich zu den reinen nichtseminomatösen Keimzelltumoren. Es stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen klinischem Metastasierungsstatus und der sACE-Expression besteht.

sACE-Expressionen wurden an insgesamt 83 testikulären Tumoren statistisch ausgewertet. Diese teilen sich in 58 reine Seminome und in 25 reine nichtseminomatöse Keimzelltumore ein.

sACE-Protein wurde immunhistochemisch semiquantitativ bestimmt. Das Ausmaß der Expression wurde mit „immunoreactive“-Werten zwischen 0 und 12 quantifiziert. Diese Werte wurden mit den klinischen Daten einer Metastasierung bei Erstdiagnose des Hodenkarzinoms verglichen.

Bei Patienten mit Seminomen konnte ein Zusammenhang zwischen sACE-Expression und Metastasierungsstatus hergestellt werden. Bei reinen Seminomen sagt ein immunoreactive score < 8 das Vorhandensein von Metastasen bei Erstdiagnose voraus ($p=0,0021$), die Odds ratio beträgt 9,999 (95 %-Konfidenzintervall [2,305; 43,384]). Patienten mit Seminomen mit einem immunoreactive score unter 8 haben ein 10faches Risiko für eine klinisch manifeste Metastasierung.

Insgesamt haben nichtseminomatöse Keimzelltumore eine niedrigere sACE-Expression. Um eine valide Schätzung der Odds ratio bzw. des Konfidenzintervalls zu erhalten, war der Stichprobenumfang bei den nichtseminomatösen Keimzelltumoren zu klein. Unterschiedliche Werte bei metastasierten (Median 1,5; immunoreactive score von 0 bis 3) und nicht-metastasierten (Median 2; immunoreactive score von 0 bis 8) nichtseminomatösen Keimzelltumoren ließen sich feststellen.

sACE repräsentiert einen Marker, der durch seine Expression am Seminom eine Aussage über das Vorhandensein von Metastasen bei Erstdiagnose machen kann. Es gilt die Ergebnisse dieser Pilotuntersuchung an Patienten mit Seminom

eines größeren Kollektivs zu überprüfen, um so zu einer Verbesserung der risikoadaptierten Therapie beizutragen.

6. Abstract

The somatic isozyme of angiotensin I converting enzyme (sACE) is a well defined marker in human testicular germ tumors. It shows a high expression in seminomas compared to non-seminomatous germ cell tumors. However, up to now the correlation between the marker and the clinical features such as metastatic spread is not known.

sACE expression was statistically investigated in 83 testicular tumors (58 seminomatous tumors, 25 pure non-seminomatous germ cell tumors).

sACE protein levels (detected by monoclonal antibody CG2) were determined by immunohistochemistry (immunoreactive score; possible values from 0 to 12). The immunoreactive score was correlated with clinical features of metastatic spread.

A correlation between sACE-expression and metastatic spread in seminomas was found. In classical seminomas an immunoreactive score < 8 predicted a 10-fold higher risk for an existing metastasis at diagnosis (Odds ratio of 9.999; 95 %-confidence interval [2,305; 43,384]).

In the non-seminomatous germ cell tumor group the sample size was too small to calculate the Odds ratio. Comparing the median immunoreactive score a small difference could be found for metastasised non-seminomatous germ cell tumors (median immunoreactive score = 1,5; immunoreactive score from 0 to 3) and non-metastasised non-seminomatous germ cell tumors (median immunoreactive score = 2; immunoreactive score from 0 to 8).

sACE represents a promising new molecular marker which might improve the prediction rate of occult metastatic spread, leading to a better risk adapted therapy in human testicular cancer patients with seminoma.

7. Literaturverzeichnis

- Admiral PJ, Danser AHJ, Sjoukje-Jong M, Pieterman H, Derkx FHM. Regional angiotensin II production in essential hypertension and renal artery stenosis. *Hypertension* 1993; 21: 173-84
- Albers P. Diagnostik und Therapie von Hodentumoren. *Urologe A* 2002; 41: 374-87
- Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Horwich A, Klepp O, Laguna MP, Pizzocaro G. Guidelines on testicular cancer 2005, 1-52
- Albers P, Siener R, Kliesch S, Weissbach L, Krege S, Sparwasser C, Schulze H, Heidenreich A, de Riese W, Loy V, Bierhoff E, Wittekind C, Fimmers R, Hartmann M. German Testicular Cancer Study Group. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1505-12
- Alhenc-Gelas F, Weare JA, Johnson RL, Erdos EG. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 83-96
- Angelowa P, Davidoff MS, Bakalska M, Kanchev L. In vitro effects of substance P and arginine-vasopression on testosterone production in Leydig cells of short and long photoperiodic hamsters. *Andrologia* 1996; 28: 321-6
- Aparicio J, Garcia del Muro X, Maroto P, Paz-Ares L, Alba E, Saenz A, Terrasa J, Barnadas A, Almenar D, Arranz JA, Sanchez M, Fernandez A, Sastre J, Carles J, Dorca J, Guma J, Yuste AL, Germa JR. Spanish Germ Cell Cancer Cooperative Group. Multicenter study evaluating a dual policy of postorchietomy surveillance and selective adjuvant single-agent carboplatin for patients with clinical stage I seminoma. *Ann Oncol* 2003; 14: 867-72
- Aparicio J, Germa JR, Garcia del Muro X, Maroto P, Arranz JA, Saenz A, Barnadas A, Dorca J, Guma J, Olmos D, Bastus R, Carles J, Almenar D, Sanchez M, Paz-Ares L, Satrustegui JJ, Mellado B, Balil A, Lopez-Brea M, Sanchez A. Risk-adapted management for patients with clinical stage I seminoma: The Second Spanish Germ Cell Cancer Cooperative Group Study 2005; 23: 8717-23
- Ardailou R, Michel JB. The relative roles of circulation and tissue renin-angiotensin systems. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14, 283-6
- Arieta O, Guevara P, Escobar E, García-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *British Journal of Cancer* 2005; 92: 1247-52
- Atanassova NN. B₂ bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation in vitro. *Andrologia* 2003; 35: 13-6
- Azizi M, Rousseau A, Ezan E, Guyene TT, Michelet S, Grognet JM, Lenfant M, Corvol P, Menard J. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline. *J Clin Invest* 1996; 97: 839-44
- Benndorf RA, Böger RH, Ergün S, Wieland T. Angiotensin II hemmt die VEGF-induzierte Migration und in vitro-Kapillarröhrenbildung humaner Endothelzellen über den AT₂-Rezeptor. *Presstext DGK* 04/2003
- Berg T, Sulner J, Lai CY, Soffer RL. Immunohistochemical localization of two angiotensin-converting enzyme isoenzymes in the reproductive tract of the male rabbit. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 753-60

- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 1-80
- Bhoola KD, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, Dlamini Z, Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem* 2001; 382: 77-89
- Bokemeyer C, Schmoll HJ. Treatment of clinical stage I testicular cancer and a possible role for new biological prognostic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 575-84
- Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Frontiers Neuroendocrinol* 1993; 14: 123-71
- Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herberth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin I-converting enzyme level: the NANCY study. *Am J Hum Gen* 1988; 43: 774-80
- Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *Clin Invest* 1994; 79: 1-6
- Cattoretti P, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 83-98
- Chang RSL, Lotti V. Two distinct angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci* 1991; 49: 1485-90
- Chaudhary UB, Haldas JR. Long-term complications of chemotherapy for germ cell tumors. *Drugs* 2003; 63: 1565-77
- Cushman DW, Cheung HS: Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochem Biophys Acta* 1971; 250: 261-7
- Danilov S, Jaspard E, Churakova T, Towbin H, Savoie F, Wei L, Alhenc-Gelas F. Structurefunction analysis of angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. Selective inhibition of the amino-terminal active site. *J Biol Chem* 1994; 269: 26806-14
- Davidoff MS, Schulze W, Middendorf R, Holstein AF. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell tissue Res* 1993; 271: 429-39
- De Paepe B, Verstraeten V, De Potter C, Vakaet L, Bullock G. Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 247-54
- Dieckmann KP, Pichlmeier U. Epidemiologie der testikulären Keimzelltumoren. *Onkologe* 2003; 9: 943-54
- Dlamini Z, Raidoo D, Bhoola K. Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in oesophageal carcinoma. *Immunopharmacol* 1999; 43, 303-10
- Eggena P, Zhu JH, Sereevinyayut S, Giordani M, Clegg K, Andersen PC, Hyun P, Barrett JD. Hepatic angiotensin II nuclear receptors and transcription of growth-related factors. *J Hypertension* 1996; 14: 961-8
- Erdos EG. Release and inactivation of kinins. *Gastroenterology* 1966; 51: 893-900
- Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987; 56: 345-8
- Erdos EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R. Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. *Lab Invest* 1985; 52: 437-47
- Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting-enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 1999; 99: 3043-9
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1985; 33: 845-53

- Franke FE, Pauls K, Kerkman L, Steger K, Klonisch T, Metzger R, Alhenc-Gelas F, Burkhardt E, Bergmann M, Danilov SM. Somatic isoform of angiotensin-converting enzyme in the pathology of testicular germ cell tumours. *Hum Pathol* 2000; 31: 1466-76
- Francel PC. Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 27-45
- Franke FE, Pauls K, Metzger R, Danilov SM. Angiotensin I-converting enzyme and potential substrates in human testis and testicular tumors. Review article, *APMIS* 2003; 111: 234-44
- Franke FE, Reuter SS, Metzger R, Towbin H, Danilov SM, Bohle RM. Cellular localization of angiotensin-converting enzyme. *Tissue Antigens* 1996; 48: 416
- Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M. Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol* 1991; 139: 67-79
- Freitas-Silva M, Pereira D, Coelho C, Bicho M, Lopes C, Medeiros R. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2004; 155: 42-6
- Friis S, Sørensen HT, Mellekjær L, McLaughlin JK, Nielsen GL, Blot WJ, Olsen JH. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of cancer. A population-based cohort study in Denmark. *Cancer* 2001; 92: 2462-70
- Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Shur BD, Bernstein KE. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nature Medicine* 2005; 11: 1140-42
- Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Letters* 2001; 495: 197-200
- Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 294: 441-7
- Garner MJ, Turner Michelle C, Ghadirian P, Krewski D. Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int J Cancer* 2005; 116: 331-9
- Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-28
- Grossmann E, Messerli FH, Goldbourt U. Antihypertensive therapy and the risk of malignancies. *Eur Heart J* 2001; 22: 1343-52
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2552-7
- Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE. Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme and breast cancer risk: The Multiethnic Cohort Cancer Research 2003; 63: 6984-7
- Heidenreich A. Therapieoptionen des Seminoms im klinischen Stadium I-IIA/B. *Urologe A* 2004; 43: 1435-45
- Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J* 1997; 321: 265-79
- Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 19022-6

- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-81
- Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 2003; 170: 5-11
- Jackson B, Cubela RB, Johnston CI. Effects of perindopril in tissues of the rat. *J Hypertension Suppl* 1988 (a); 6: 51-4
- Jackson B, Cubela RB, Sakaguchi K. Characterization of angiotensin converting enzyme the testis and assessment of the in vivo effects of the ACE inhibitor perindopril. *Endocrinology* 1988 (b); 123: 50-5
- Jaspard E, Alhenc-Gelas F. Catalytic properties of the two J active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 211: 528-34
- Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 9496-503
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Imagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993; 268: 24543-6
- Klepp O, Dahl O, Flodgren P, Stierner U, Olsson AM, Oldbring J, Nilsson S, Daehlin L, Tornblom M, Smaland R, Starkhammar H, Abramsson L, Wist E, Raabe N, Edekling T, Cavallin-Stahl E. Risk-adapted treatment of clinical stage 1 non-seminoma testis cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1038-44
- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1567-76
- Lenfant M, Widzeczak-Bakala J, Guittet E, Prome JC, Scotty D, Frindel E. Inhibitor of hemapoietic pluripotent stem cell proliferation: Purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86, 779-82
- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacInnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JW. Do inhibitors of angiotensin I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; 352: 179-84
- Li J, Volkov L, Comte L, Hervé P, Praloran V and Charbord P. Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of hematopoietic stem cells, by hematopoietic microenvironmental cells. *Exp Hematol* 1997; 25: 140-6
- Liao WX, Roy CR. Lack of association between polymorphisms in the testis-specific angiotensin converting enzyme gene and male fertility in an Asian population. *Molecular Human Reproduction* 2002; 8: 299-303
- Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y, Wdzieczak-Bakala J. The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Blood*. 2003; 101: 3014-20
- Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16: 385-401
- Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C. Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *J Pathol* 2004; 202: 330-5
- Metzger R, Bohle RM, Pauls K, Eichner G, Alhenc-Gelas F, Danilov SM, Franke FE. Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int* 1999; 56: 1442-54

- Miyajima A, Kosaka T, Asano Tomohiko, Asano Takako, Seta K, Kawai T Hayakawa M. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer research* 2002; 62: 4176–9
- Mostofi FK, Sesterhenn IA. *Histological typing of testis tumours. WHO International Classification of Tumours*, Springer 1998, 2nd edition. Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo
- Monsees TK, Blöcher S, Loddo C, Steger K, Schill WB. Tissue kallikrein and bradykinin B₂ receptors in the reproductive tract of the male rat. *Andrologia* 2003, 35: 24-31
- Mombouli, JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35, 679–705
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W. The angiotensin II type 2 receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10663-7
- Norton AJ. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 79-80
- Oliver RT, Mason M, von der Maase H. A randomised comparison of single agent carboplatin with radiotherapy in the adjuvant treatment of stage I seminoma of the testis, following orchidectomy: MRC TE19/EORTC 30982. *J Clin Onc* 2004; 23: 385
- Ondrus D, Matoska J, Belan V. Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors: rationale for different risk-adapted treatment. *Eur Urol* 1998; 33: 562-6
- Pandey KN, Misono KS, Inagami T. Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1337-41
- Papp M, Li X, Zhuang J, Wang R, Uhal BD. Angiotensin receptor subtype AT1 mediates alveolar epithelial cell apoptosis in response to Angiotensin II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: 713-8
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global Cancer Statistics, 2002*. *Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 1994; 369: 744-47
- Pauls K. Isoformen des Angiotensin-Converting Enzyms (CD143) in Hodenentwicklung, Spermatogenese und adulten Keimzelltumoren. Justus-Liebig-Universität. *Dissertationsarbeit* 2002
- Pauls K, Fink L, Franke FE. Angiotensin-converting enzyme (CD 143) in neoplastic germ cells. *Lab Invest* 1999; 79: 1425-35
- Peach MJ, Dostal DE. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J Card Pharmacol* 1990; 16: 525-30
- Perich RB, Jackson B, Rogerson F, Mendelsohn FA, Paxton D, Johnston CI. Two binding sites on angiotensin-converting enzyme: evidence from radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 286-93
- Pont J, Höftl W, Kosak D. Risk-adapted treatment choice in stage I non-seminomatous testicular germ cell cancer by regarding vascular invasion in the primary tumor: a prospective trial. *J Clin Oncol* 1990; 8: 16-20
- Pottek TS, Hartmann M, Bokemeyer C. Nachsorge und Spättoxizitäten bei Hodentumoren. *Dtsch Arztebl* 2005; 102: 3342-48
- Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2 angiotensin receptor. *Endocrinology* 1991; 128: 1947-59

- Puchtler H, Meioan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 1985; 82: 201-4
- Regoli D, Nsa AS, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348: 1-10, 1998
- Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA. Comparative histological, histochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 409: 127-47
- Rieger KJ, Saez-Servent N, Papet MP, Wdzieczak-Bakala J, Morgat JL, Thierry J, Voelter W, Lenfant M. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline. *Biochem J* 1993; 296: 373-8
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol F, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86, 1343-6
- Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology* 2003, 4: 225-30
- Röcken C, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, Krüger S, Malfertheiner P, Roessner A, Ebert M. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin Cancer Res* 2005; 11, 2526-30
- Rohmer V, Saint-Andre JP, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Bigorgne JC. Angiotensin I-converting enzyme in a suprasellar germinoma. *J Clin Path* 1987; 87: 281-4
- Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1995; 270: 3656-61
- Ryan JW, Ryan US, Schultz DR, Whitaker C, Chung A. Subcellular localisation of pulmonary ACE (Kininase II). *Biochem J* 1975; 146, 497-99
- Saint-Andre JP, Alhenc-Gelas F, Rohmer V, Chretien MF, Bigorgne JC, Corvol P. Angiotensin-I-converting enzyme in germinomas. *Hum Pathol* 1988; 19, 208-13
- Schill WB, Miska W. Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 1992; 24: 69-75
- Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, Fossa SD, Skakkebaek NE, de Wit R, Fizazi K, Droz JP, Pizzocaro G, Daugaard G, de Mulder PH, Horwich A, Oliver T, Huddart R, Rosti G, Paz Ares L, Pont O, Hartmann JT, Aass N, Algaba F, Bamberg M, Bodrogi I, Bokemeyer C, Classen J, Clemm S, Culine S, de Wit M, Derigs HG, Dieckmann KP, Flasshove M, Garcia del Muro X, Gerl A, Germa-Lluch JR, Hartmann M, Heidenreich A, Hoeltl W, Joffe J, Jones W, Kaiser G, Klepp O, Kliesch S, Kisbenedek L, Koehrmann KU, Kuczyk M, Laguna MP, Leiva O, Loy V, Mason MD, Mead GM, Mueller RP, Nicolai N, Oosterhof GO, Pottek T, Rick O, Schmidberger H, Sedlmayer F, Siegert W, Studer U, Tjulandin S, von der Maase H, Walz P, Weinknecht S, Weissbach L, Winter E, Wittekind C. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol.* 2004; 15: 1377-99
- Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 737-42
- Shahidi M, Normann AR, Dearnaley DP, Nicolls J, Horwich A, Huddart RA. Late recurrence in 1263 men with testicular germ cell tumors: multivariate analysis of risk factors and implications for management. *Cancer* 2002; 95: 520-30

- Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1993; 21: 827-35
- Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; 103: 295-99
- Skidgel R, Engelbrecht S, Johnson A, Erdos EG. Hydrolysis of substance P and Neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 1984; 5: 769
- Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9386-90
- Soubrier F, Wei L, Hubert C, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of angiotensin I-converting enzyme: Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J Hypertens* 1993; 11: 599-604
- Souchon R, Schmoll HJ, Krege S. Deutsche Krebsgesellschaft: Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren auf Grundlage evidenz-basierter Medizin (EBM). Qualitätssicherung in der Onkologie. First Edition. München, Bern, Wien, New York. Zuckschwerdt 2002
- Spermon JR, Roeleveld TA, van der Poel HG, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ten Bokkel Huinink WW, van de Vijver M, Witjes JA, Horenblas S. Comparison of surveillance and retroperitoneal lymph node dissection in Stage I nonseminomatous germ cell tumors. *Urology* 2002; 59: 923-9
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 939-45
- Stéphan J, Melaine N, Ézan E, Hakovirta H, Maddocks S, Toppari J, Garnier DH, Wdzieczak-Bakala J, Jégou B. Source, catabolism and role of the tetrapeptide N-acetylser-asp-lys-Pro within the testis. *J Cell Sci* 2000; 113: 113-21
- Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Functional expression of the Angiotensin II Type1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis and peritoneal dissemination. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 2686-94
- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller WA, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, et al: Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Reg Pept* 1992; 40: 409-19
- Takada Y, Hiwada K, Kokubu T. Characterization and immunohistologic demonstration of angiotensin-converting enzyme in human renal cell carcinoma. *Oncodev Biol Med* 1983; 4: 327-34
- Takada Y, Hiwada K, Yokoyama M, Ochi K, Takeuchi M, Kokubu T. Angiotensin converting enzyme. A possible histologic indicator for human renal cell carcinoma. *Cancer* 1985; 56: 130-133
- Takagi T, Nakano Y, Takekoshi S, Inagami T, Tamura M. Hemizygous mice for the angiotensin II type 2 receptor gene have attenuated susceptibility to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1235-41
- Testut P, Soubrier F, Corvol P, Hubert C: Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem J* 1993; 293: 843-8
- Travis LB, Fossa SD, Schonfeld JR, McMaster ML, Lynch CF, Storm H. Second cancers among 40 576 testicular cancer patients: focus on long term survivors. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1354-65

- Tybitanclova K, Macejova D, Liska J, Brtko J, Zorad S. AT1-receptor and ACE mRNA are increased in chemically induced carcinoma of rat mammary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 244: 42-6
- Vanha-Perttula T, Mather JP, Bardin GW, Moss SB, Bellve AR. Localization of the angiotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 1985; 33: 870-7
- Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, Molteni A, Polverini PJ, Bouck NP. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *Clin Invest* 1996; 98: 671-9
- Walther T, Menrad A, Orzechowski HD, Siemeitster G, Paul M, Schirmer M. Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors *The FASEB Journal* 2003; 17: 2061-7
- Warde P, Specht L, Horwich A, Oliver T, Panzarella T, Gospodarowicz M, von der Maase H. Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4448-52
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clausner E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* 1991; 266: 9002-8
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clausner E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J Biol Chem* 1992; 267: 13398-405
- Williams TA, Villard E, Prigent Y, Dadoune JP, Soubrier F. A genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1995; 107: 215-219
- Wittekind C. Biologie und Pathologie von Keimzelltumoren des Hodens. *Onkologe* 2008; 14: 602-10
- Wolf WC, Evans MA, Chao L, Chao J. Synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *American Journal of Pathology* 2001; 159, 1797-1805
- Woodman ZL, Oppong SY, Cook S, Hooper NM, Schwager SL, Brandt WF, Ehlers MR, Sturrock ED. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme is inefficient with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem J* 2000; 347: 711-8
- Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto T, Nakagawa, Miyakawa K, Müller-Esterl W, Maeda H. Identification of Bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int J Cancer* 2002; 98, 29-35
- Yang HYT, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem Biophys Acta* 1970; 214: 374-6
- Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor Perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: Possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1073-8

8. Anhang

8.1 „Anleitungen, Ansätze, Reagenzien“ nach K. Pauls 2002

8.1.1 *Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, Färbung von Paraffinschnitten:*

- Entparaffinisierung mittels Xylol • 10 min
- 100 %-iger Alkohol • 3 min
- Absteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen:
96 %, 70 %, 50 %, 30 % Alkohol, Aqua destillata • je 3 min
- Kernfärbung: Hämalaun nach Mayer • 7 min
- Leitungswasser • 10 min
- Eosin-Gegenfärbung: 1 % Eosin; 0,2 % Eisessig • 4 min
- Aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen:
30 %, 50 %, 70 %, 96 % Alkohol • je 3 min
- Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex • 3 min

8.1.2 *Perjod-Acid Schiff's (PAS)-Färbung:*

- Entparaffinisierung in Xylol • 20 min
- Absteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen:
30 %, 50 %, 70 %, 96 % Alkohol, Aqua destillata • je 3 min
- 1 %-ige Perjodsäure aus Na-Perjodat • 10 min
- in Leitungswasser spülen • 2 min
- Aqua destillata • 3 min
- Schiff'sches Reagenz • 18 min
- Na-Sulfid-Spülung • 3 x 5 min
- Aqua destillata • 10 min
- Hämalaun nach Mayer • 5 min
- Leitungswasser • 5 min
- aufsteigende Alkoholreihe in folgenden Stufen:
30 %, 50 %, 70 %, 96 % Alkohol • je 3 min
- Xylol und Eindecken der Präparate in Diatex • 3 min

8.2 Ansätze der Immunhistologie

Zitratpuffer (pH 6.0; 10 mM):

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g in 1000 ml Aqua destillata)

Stammlösung B: 0,1 M Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (29,41 g in 1000 ml Aqua destillata)

Die Stammlösungen werden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor Verwendung des Zitratpuffers werden 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua destillata auf 500 ml aufgefüllt (reicht etwa für 10 MW-Küvetten).

Tris-Waschpuffer (pH 7.4 -7.6):

Stammlösung für 20l :	Tris-Base	18 g	+
	Tris-HCl	137 g	+
	NaCl	175,5 g	+
	Aqua demin.	2,5 l	

Die Stammlösung wird in Kanister gefüllt und mit Aqua demin. auf 20 l aufgefüllt.

RPMI (pH 7.4-7.6):	RPMI-Konzentrat	50 ml	+
	Aqua demin.	450 ml	+
	inaktiviertes Rinderserum	50 ml	+
	Natriumazid	0,5 g	

Entwicklungspuffer :	NaCl	87 g	+
	Tris-HCl	15 g	+
	Tris-Base	49 g	+
	Aqua demin.	1750 ml	

Der Entwicklungspuffer wird in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Propandiol:	Propandiol	21 g	+
	Aqua demin.	1000 ml	
Neufuchsin:	Neufuchsin	5 g	+
	2N HCl	100 ml	

Entwicklerlösung:

Verhältnistabelle für die Entwicklerlösung der APAAP-Färbung

Anzahl der Küvetten		1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklungspuffer	ml	35	70	105	140	175	210	245	280
Propandiol	ml	12,5	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
Laevamisol	mg	20	40	60	80	100	120	140	160
Natriumnitrit	mg	10	20	30	40	50	60	70	80
Aqua destillata	µl	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
Naphtol*	mg	25	50	75	100	125	150	175	200
Dimethylformamid	µl	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400
Neufuchsin	µl	100	200	300	400	500	600	700	800

*Naphtol-As-Bi-Phosphat

9. Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

10. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Hans Ulrich Schmelz für die Überlassung des Themas, die Anregungen, die viele Arbeit, Geduld und Zeit, für das offene Ohr, dass er für meine Fragen und Probleme hatte.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. med. Folker E. Franke und Frau Dr. med. Katharina Pauls für die Bereitstellung der ACE-Ergebnisse.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weidner, Direktor der Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Giessen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Volker Rohde, Oberarzt der Urologie des Universitätsklinikums Giessen bedanken

Bei Herrn Dr. med. Schulze-Brüggemann, Chefarzt der Urologie des Klinikums Bad Hersfeld, bedanke ich mich für die Überlassung der Daten und für die zuvorkommende und nette Unterstützung.

Ich danke Herrn Sedak, Leiter des Zentralen Archivs, Ohlebergsweg 13 in Giessen, und seinen Mitarbeitern.

Frau Marion Mann und Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann danke ich für die Beratung und die Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Bei Matthias Meininger bedanke ich mich herzlich für die Hilfe und Beratung bezüglich der Gestaltung dieser Arbeit sowie das Korrekturlesen. Diese Arbeit wäre ohne Deine moralische Unterstützung und ohne Deine Geduld und die vielen Anregungen nicht zustande gekommen. Hierfür möchte ich Dir von Herzen danken.