

Genexpressionsuntersuchungen
in
Seminomen und Nichtseminomen

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

Vorgelegt von Marcus Stockinger
aus Frankfurt am Main

Gießen 2007

Aus dem medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie, Gießen

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Wolfgang Weidner

und

dem Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München

Leiter: PD Dr. med. Viktor Meineke

Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Hans U. Schmelz

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Tag der Disputation: 25. Januar 2008

Inhaltsverzeichnis

1 Ziel der Arbeit 8

2 Stand des Wissens 9

- 2.1 *Klinische Aspekte der Hodentumoren 9*
 - 2.1.1 Epidemiologie 9
 - 2.1.2 Klassifikation 9
 - 2.1.3 Diagnose, Therapie, Prognose 10
- 2.2 *Biologie der Hodentumoren 11*
- 2.3 *Zellbiologische Rolle der untersuchten Gene 12*
 - 2.3.1 Gene der Apoptoseregulation 12
 - 2.3.2 Gene der Zellzyklusregulation 15
 - 2.3.3 Reparaturgene und Gene der Stressantwort 17
 - 2.3.4 Sonstige Gene 20

3 Material und Methoden 22

- 3.1 *Geräte und Labormaterialien 22*
- 3.2 *Reagenzien und Lösungen 22*
 - 3.2.1 Verdünnungspuffer 23
 - 3.2.2 Primer-Probe-Designs für untersuchte Gene 23
 - 3.2.3 Primer-Probe-Design für DNAPK 25
- 3.3 *Probengewinnung und Klassifizierung 26*
- 3.4 *RNA-Extraktion 27*
- 3.5 *cDNA-Herstellung 28*
- 3.6 *cDNA-Quantifizierung mittels RTQ-PCR 29*
 - 3.6.1 Funktionsweise der RTQ-PCR 29
 - 3.6.2 Durchführung der RTQ-PCR 35
 - 3.6.3 Verdünnungsreihen 40
- 3.7 *Auswertung 41*
 - 3.7.1 Standardisierung 41
 - 3.7.2 Überprüfung der Standardgeraden 41
 - 3.7.3 Korrekturfaktor für unterschiedliche Verdünnungsreihen 43
 - 3.7.4 Normalisierung 44
 - 3.7.5 Differentielle Expression 44
 - 3.7.6 Schwellenwerte 46
 - 3.7.7 Ähnlichkeitsberechnungen 46

4 Ergebnisse 49

- 4.1 *Vergleich von Seminomen und Nichtseminomen 49*
 - 4.1.1 Absolute Expression 49
 - 4.1.2 Differentielle Expression 52
 - 4.1.3 Analyse der Ähnlichkeitsbeziehung von Seminomen und Nichtseminomen 57
- 4.2 *Vergleich der Embryonalen Karzinome mit den Mischtumoren 58*
 - 4.2.1 Analyse der Ähnlichkeitsbeziehung von EC und MT 58
 - 4.2.2 Analyse der quantitativen Expressionsunterschiede von EC und MT 62
- 4.3 *Zusammenhang von Patientenalter und Genexpressionsmuster 65*
 - 4.3.1 Analyse der kategorisierten Expressionsergebnisse in Abhängigkeit vom Patientenalter 65
 - 4.3.2 Analyse der quantitativen Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom Patientenalter 69
 - 4.3.3 Absolute Expressionswerte in Abhängigkeit vom Patientenalter 72
- 4.4 *Vergleich der Ergebnisse aus RTQ-PCR und Array 75*

5 Diskussion 80

- 5.1 *Seminome und Nichtseminome 80*
 - 5.1.1 Apoptoseregulation 80
 - 5.1.2 Zellzyklusregulation 83
 - 5.1.3 Reparaturgene und Gene der Stressantwort 85
 - 5.1.4 Sonstige Gene 87
- 5.2 *Embryonale Karzinome 88*
- 5.3 *Einfluss des Patientenalters 89*
- 5.4 *Die „differentielle Expression“ als beschreibende Größe für Genexpressionsänderungen 91*
- 5.5 *Bewertung der Methode und Vergleich mit Array-Daten 93*

6 Zusammenfassung 95

7 Literatur 97

8 Erklärung 115

9 Lebenslauf 116

Abkürzungsverzeichnis

AFP	alpha-Feto-Protein
APAF1	Apoptoseprotease-aktivierender Faktor 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and rad3 related
BAD	BCL2-antagonist of cell death
BAG-1	BCL-assoziertes Athanogen
BAX	BCL-2 assoziiertes X-Protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BER	Base excision repair
β-HCG	Humanes Chorion-Gonadotropin, beta
C ₀	Ausgangskonzentration
CC	Chorion – Karzinom
cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
C _E	Endkonzentration
CIS	Carcinoma in situ
CLU	Clusterin
COX-2	Cyclo-Oxygenase 2
D	Deutschland
DISC	Todessignalkomplex
dE	differentielle Expression
dmE	differentielle Expression der mittleren LER
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAPK	DNA-abhängige Proteinkinase
EC	Embryonales Karzinom
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FAST	Fas-assozierte Tyrosinkinase
GADD45A	Growth arrest and DNA damage inducible 45 alpha
GPX2	Glutathione peroxidase 2

GSTA2	Glutathione S-transferase A2
HR	Homologe Rekombination
ISEL	In situ end-labeling
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LER	Log expression ratio
MMR	Mismatch repair
mRNA	Messenger RNA
NER	Nucleotid excision repair
NFRkB	Nuclear factor related to kappaB binding protein
NHEJ	Non-homologous end-joining
NME1	Non-metastatic cells 1
NPAT	Nuclear protein, Ataxia-telangiectasia locus
NS	Nichtseminom
NSD	Neutrale Sphingomyelinase-aktivierende Domäne
NSMAF	Neutrale Sphingomyelinase-aktivierender Faktor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPD	Primer Probe Design
RAB2	Rab-Protein 2
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RTQ	Real time quantitative
SE	Seminom
SMPD3	Sphingomyelin-Phosphodiesterase III
SS	Spermatozytisches Seminom
TIA-1	T-Zell intrazelluläres Antigen 1
T _m	Schmelztemperatur
TNFL	Tumornekrosefaktor-Ligand
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
XRCC5	X-ray repair complementing 5
YS	Yolk sac tumor, Dottersack- Tumor

1 Ziel der Arbeit

In Hodenkarzinomen sollte die Expression von solchen Genen untersucht werden, die entscheidende tumorbiologische Prozesse kodieren. Hierzu gehören die Regulation von Zelltod, Zellzyklus, DNA-Reparatur und Stressantwort. Diese Arbeit sollte sich dabei in mehrerer Hinsicht von bisherigen Untersuchungen abheben: (1.) Es wurden Tumoren beider Tumorentitäten (Seminome und Nichtseminome) untersucht. (2.) Ergänzend zu zahlreichen vorherigen Expressionsuntersuchungen auf Proteinebene (Blotting und Immunhistologie) wurde hier die Expression auf der Transkriptions-Ebene untersucht. (3.) Dabei wurde das RTQ-PCR-Verfahren verwendet, das als Goldstandard der quantitativen mRNA-Mengenbestimmung gilt.

Anhand der Expressionsdaten sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Seminomen und Nichtseminomen aufgedeckt werden. Auch die Rolle der Embryonalen Karzinome innerhalb der Nichtseminome sollte unter dem Aspekt ihrer Genexpression untersucht werden. Besondere Beachtung sollte auch die Rolle des Patientenalters auf die Genregulation in Hodentumoren finden.

Die Ergebnisse einer vorherigen Untersuchungsreihe (PORT 2005) an einer anderen Patientenkohorte mittels Array-Methode sollten bestätigt und ihre Ergebnisgüte anhand der RTQ-PCR-Ergebnisse validiert werden.

2 Stand des Wissens

2.1 Klinische Aspekte der Hodentumoren

2.1.1 Epidemiologie

Die Hodenkarzinome zählen mit einem weltweiten Anteil von etwa 1-2% der Tumoren bei männlichen Patienten nicht zu den häufigsten Tumorkrankheiten. Ihre Altersverteilung ist dreigipflig mit einem Hauptgipfel bei den 30-34-Jährigen und zwei weiteren Gipfeln bei den unter 5-Jährigen und den über 60-Jährigen (meist Spermatozytische Seminome, *Abk. SS*). Es ist allerdings bei weitem die häufigste maligne Tumorerkrankung der 20-34-jährigen Männer. Weltweit war in den vergangenen dreißig Jahren eine Zunahme der Inzidenz zu beobachten (HUYGHE 2003). Die Neuerkrankungsrate unter Männern liegt in Deutschland bei 7,6 von 100.000 /Jahr und damit an elfter Stelle der jährlichen neoplastischen Neuerkrankungen. Die großartigen Erfolge in der Therapieentwicklung der letzten Jahrzehnte sind an der Entwicklung der Mortalität abzulesen. Sie lag noch in den 70er Jahren bei 2,8 Todesfällen pro 100.000 Männer /Jahr, jetzt aber nur noch bei 0,8 Todesfällen (DIECKMANN und PICHLMEIER 2003). Dabei blieb die Mortalität in der DDR bis zur Maueröffnung unverändert hoch, um anschließend rasch mit der niedrigeren Mortalität in Westdeutschland gleichzuziehen. Der unterlegenen Behandlungsweise der Hodenkarzinome in der DDR wurden für den Zeitraum 1977 – 1989 etwa 1000 zusätzliche Todesfälle zugeschrieben (BOYLE 2003), was den Stellenwert der Therapiefortschritte eindrücklich unterstreicht.

2.1.2 Klassifikation

Zur Klassifizierung der Hodentumoren existieren im wesentlichen zwei konkurrierende Systeme (DAMJANOV 1989, PARKINSON 2001, WITTEKIND und NEID 2003): zum einen ist es das WHO- oder MOSTOFI-System, zum anderen das Britische- bzw. PUGH-System. Ihnen gemeinsam ist die Unterteilung der Hodentumoren in die von multipotenten Keimzellen ausgehenden *Keimzelltumoren*, die etwa 97% der Fälle ausmachen und die *Keimstrang-Stromatumoren*, die von spezifischem und unspezifischem Stützgewebe des Hodens ausgehen. Die Keimzelltumoren lassen sich in vier Gruppen einteilen: **(1.)** Tumoren mit einer spermatozytenähnlichen Differenzierung. Darunter fallen Seminome (SE) und Spermatozytische Seminome (SS). **(2.)** Aus primitiven totipotenten Keimzellen bestehendes Tumorgewebe ohne jegliche Differenzierung. **(3.)** Tumoren mit somatischer,

intraembryonaler Differenzierung (z.B. Epithel, Knorpel, glatte Muskulatur). (4.) Tumoren mit extraembryonaler Differenzierung (z.B. Dottersackgewebe). Die in den Punkten (2.-4.) beschriebenen Tumoren werden in beiden Klassifikationssystemen unter dem Begriff der *Nichtseminome (NS)* subsummiert.

Die Klassifikationssysteme unterscheiden sich im wesentlichen bei der Definition des Teratoms: Im Britischen System werden alle Nichtseminome als Teratome aufgefasst. Tumoren wie unter (2.) beschrieben werden MTU (malignes, undifferenziertes Teratom) genannt. Die Tumoren entsprechend (3.) werden als TD (differenziertes Teratom) oder MTI (malignes Teratom vom intermediären Typ), solche wie unter (4.) als MTT (malignes trophoblastisches Teratom) bezeichnet. Im WHO-System hingegen ist die Teratomdefinition sehr eng gefasst: Ausschließlich Tumoren wie unter (3.) beschrieben zählen hierzu. Das WHO-System kennt keine (dem "MTT" des Britischen Systems analoge) zusammenfassende Bezeichnung für Tumoren entsprechend Punkt (4.). Diese werden hier explizit als Dottersacktumoren, Chorionkarzinome, etc. benannt. Strenggenommen kennt nur das WHO-System den Begriff des Embryonalen Karzinoms (EC), womit Tumoren wie unter (2.) bezeichnet werden. Um den jeweiligen Sinngehalt des Begriffes Teratom zu kennen, muss man wissen, auf welches der beiden Klassifikationssysteme sich der Autor bezieht. Die Angaben in der vorliegenden Arbeit erfolgen nach dem WHO-System.

2.1.3 Diagnose, Therapie, Prognose

Fast alle Hodentumoren fallen durch eine nicht-schmerzhaft Vergrößerung und Verhärtung der Hoden auf. Selten werden sie erst durch Rückenschmerzen, Lymphknotenschwellungen oder neurologische Defizite klinisch manifest (ALBERS und WEIBBACH 2003). Zu den obligatorischen diagnostischen Maßnahmen gehören Sonographie, Computertomographie des Abdomens und des Thorax sowie die Bestimmung der Tumormarker AFP, β -HCG und LDH. Eine präoperative Histologiegewinnung wird nicht angestrebt (ALBERS und WEIBBACH 2003). Grundsätzlich erfolgt zunächst die operative Entfernung des Primärtumors (Ausnahmen: sehr ausgedehnte Metastasierung, synchron-bilaterale Tumoren) (SOUCHON 2002). Zusammen mit der histologischen Typisierung erfolgt die postoperative Stadieneinteilung gemäß der „Lugano-Klassifikation“ (CAVALLI 1980). Für Patienten in fortgeschrittenen Stadien wird eine prognostische Einteilung gemäß der IGCCCG (International Germ Cell Cancer Collaborative Group) durchgeführt (SOUCHON 2002). Die weitere Therapie richtet sich nach der histologischen Typisierung als Seminom oder Nichtseminom und ist stadien- bzw. prognoseadaptiert. Dabei kommen in frühen Stadien bei Seminomen v.a. die Radiotherapie

und bei Nichtseminomen v.a. die Chemotherapie zum Einsatz. In fortgeschrittenen Stadien finden kombinierte (hier zum Teil auch neoadjuvante) Therapieschemata ihre Anwendung. Sogar in metastasierten Stadien sind je nach IGCCCG-Prognosegruppe 5-Jahresüberlebensraten von 50% (ungünstige Prognose) über 80% (mittlere Prognose) bis zu 90% (gute Prognose) zu erwarten. Aufgrund dieser Zahlen gilt die Hodentumorthherapie als eine „Erfolgsstory der Onkologie“ (ALBERS und BAMBERG 2003). Von der Aufdeckung der biologischen Hintergründe dieser erfreulichen Therapieerfolge bei Hodentumoren darf man sich auch wertvolle Erkenntnisse für die Behandlung anderer Tumoren versprechen.

2.2 Biologie der Hodentumoren

Hodentumoren treten familiär gehäuft auf: Brüder eines Erkrankten haben ein 10-fach höheres Risiko an Hodenkarzinomen zu erkranken als Männer mit einer diesbezüglich leeren Familienanamnese (ALBERS und WEIßBACH 2003). Man vermutet ein disponierendes Gen auf dem Chromosom Xq27, das zwar schon als „TGCT1“ (für *engl.* Testicular germ cell tumor) benannt wurde, bisher aber noch nicht identifiziert ist (RAPLEY 2003, HOLZIK 2004). Der einzige gesicherte nicht-genetische Risikofaktor für Hodentumoren ist der ipsilaterale Maldescensus testis (DIECKMANN und PICHLMEIER 2003).

Die Entstehung aller Keimzelltumoren des Hodens (außer dem Spermatozytischen Seminom) aus einer gemeinsamen präkarzinösen Vorstufe - dem CIS des Hodens - ist inzwischen allgemein anerkannt (RAJPERT-DE MEYTS 2003). Viele Autoren vermuten, dass im Rahmen der Karzinogenese aller Keimzelltumoren zunächst entweder Seminome oder Embryonale Karzinome aus dem CIS hervorgehen. Die Embryonalen Karzinome können weiter in andere Nichtseminome, z.B. in Teratome, Dottersacktumoren oder Chorionkarzinome differenzieren. Außerdem wird diskutiert, ob Embryonale Karzinome nicht auch aus Seminomen hervorgehen könnten (SKOTHEIM und LOTHE 2003, WITTEKIND und NEID 2003, OOSTERHUIS und LOOIJENGA 2003). Es ist demnach nicht sicher, dass es sich bei SE und NS um Tumoren verschiedener Entität handelt. Entsprechend den bisherigen Gepflogenheiten sind aber auch in dieser Arbeit mit den beiden Entitäten der Hodentumoren die SE und NS gemeint.

Bei den meisten (~80%) invasiven Keimzelltumoren des Hodens - aber noch nicht im CIS - findet sich das Isochromosom 12p. Es wird deshalb vermutet, dass dieses Isochromosom für Keimzelltumoren des Hodens bedeutsame Onkogene beherbergt. Allerdings gelang es bisher nicht, die pathogenetische Relevanz eines solchen Kandidatengens (darunter Cyclin D2) zu demonstrieren (LOOIJENGA 2003, ZAFARANA 2003). Vieldiskutierte Auffälligkeiten der

Hodenkarzinome umfassen z.B. eine Dysregulation des RB-Pfades und der G₁/S-Transition (BARTKOVA 2003 a/b) oder eine gestörte DNA-Reparaturfunktion (MASTERS und KÖBERLE 2003).

2.3 Zellbiologische Rolle der untersuchten Gene

2.3.1 Gene der Apoptoseregulation

Die zunächst während der Embryonalentwicklung als „programmierter Zelltod“ beschriebene Apoptose ist eine zellbiologische Prozessabfolge, die auch während des weiteren Lebens essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase – namentlich zur Bewahrung der Tumorfreiheit - ist. Der Ablauf der Apoptose wird grob in drei „Phasen“ eingeteilt: Initiation

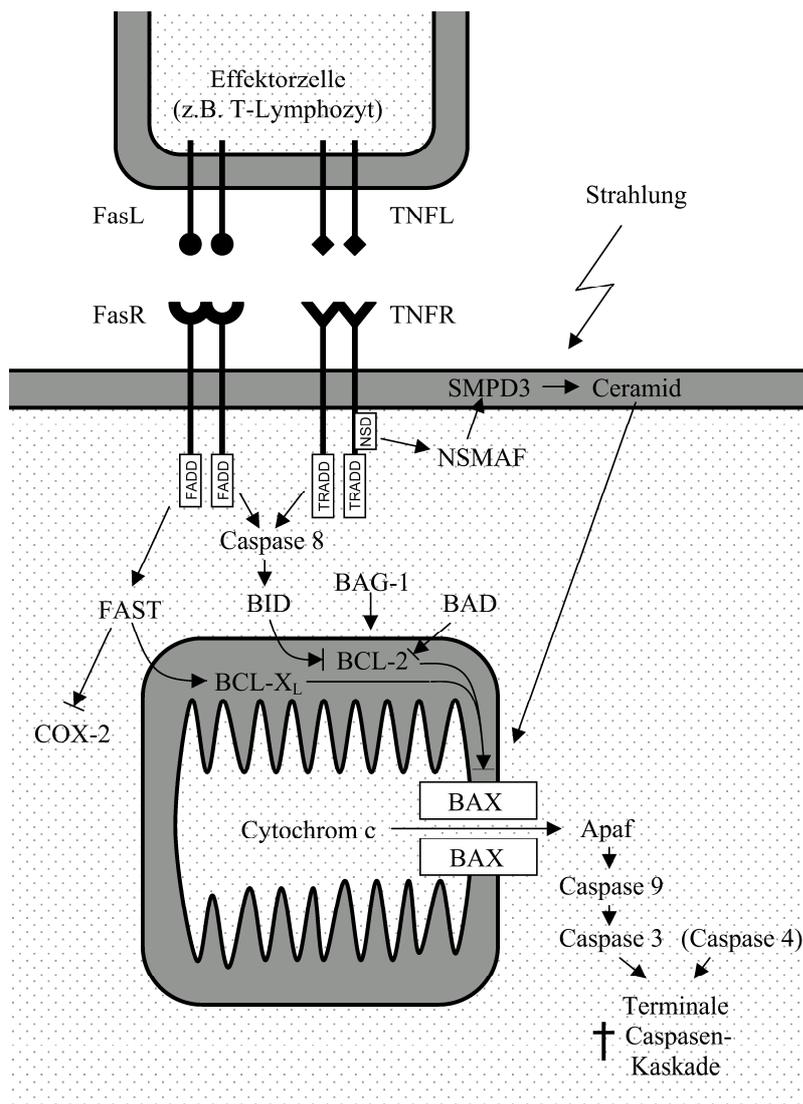


Abbildung 1: Apoptoseregulation. Dargestellt sind Membran, Cytosol und Mitochondrium einer betroffenen Zelle, sowie eine ligandenträgende Effektorzelle. Untersucht wurden die Gene für FasL, FasR, FasTK, TNFL, SMPD3 und NSMAF (Induktionsphase), BAX, BCL-2, BAG-1 und BAD (Integrationsphase) sowie Caspase 3 und Caspase 4 (Exekutionsphase).

(Einwirkung eines apoptotischen Signals), Integration (Verarbeitung von proapoptotischen und antiapoptotischen Signalen und Entscheidung über die Durchführung des Apoptoseprogramms) und Exekution (der Vollzug der geordneten Selbstzerstörung einer Zelle). Ungehemmte Aktivierung der Apoptose führt beispielsweise zu neurodegenerativen Erkrankungen. Ein Versagen der Apoptose ermöglicht das Überleben neoplastisch transformierter Zellen und damit die Entstehung von Malignomen (LEWIN 2000, DANIAL 2004).

2.3.1.1 Initiation

Viele Apoptose-initiiierende Faktoren wurden beschrieben: Beispielsweise kann die Apoptose durch Einfluss von Steroidhormonen oder durch Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden, außerdem durch extrazelluläre, rezeptorvermittelte Todessignale (extrinsische Induktion). Ebenso können ionisierende Strahlen oder DNA-Schäden (intrinsische Induktion) die Apoptose anstoßen (GULBINS 2000, LEE 2004).

Apoptoseinduktion durch Ceramide

Ionisierende Strahlen und oxidativer Stress –und damit potentiell DNA-schädigende Noxen– können auf dem Ceramid-Weg die Apoptose initiieren: Dabei steigt die Aktivität der Sphingomyelinasen, die das Phospholipid Sphingomyelin in der Zellmembran spalten. Wie auch die anderen humanen Sphingomyelinasen katalysiert die Hydrolase **SMPD3** (Sphingomyelin-Phosphodiesterase III, *Syn.* Neutrale Sphingomyelinase II) die Reaktion Sphingomyelin + H₂O zu Phosphorylcholin + Ceramid (HOFMANN 2000). Eine Aktivitätszunahme der Neutralen Sphingomyelinasen wurde nach Bestrahlung, Hitzestress und in Hungerkulturen, aber auch nach Fas-, TNF- oder CD40-Rezeptoraktivierung beobachtet (MARCHESINI 2003).

NSMAF (Neutrale Sphingomyelinase-aktivierender Faktor) ist ein Adapterprotein, dass die Neutrale Sphingomyelinase aktivieren kann. Es wird seinerseits durch Interaktion mit der NSD (Neutrale Sphingomyelinase-aktivierende Domäne) des p55 TNF-Rezeptors aktiviert (TCHERKASOWA 2002). Neben der Apoptoseinduktion sind weiterhin antiproliferative Effekte des Ceramids bekannt, darunter Induktion der Zelldifferenzierung sowie Dephosphorylierung des RB-Proteins mit nachfolgendem G₀G₁-Arrest des Zellzyklus. Deshalb wird Ceramid auch als „Tumor-Suppressor-Lipid“ bezeichnet (DBAIBO 1998).

Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion

Extrazelluläre Signale zur Apoptoseinduktion werden durch transmembranöse Rezeptoren der Tumornekroserezeptorfamilie vermittelt (siehe Abbildung 1). Hauptvertreter sind Fas (im Folgenden **FasR**, bzw. Fas-Rezeptor genannt), sowie verschiedene Rezeptoren des Tumornekrosefaktors (TNFR). Ihnen gemeinsam ist eine intrazelluläre Todesdomäne (LEWIN 2000). Die extrazelluläre Bindung eines Liganden (Fas-Ligand = **FasL**, Tumornekrosefaktor α = **TNFL**) führt zur Trimerisierung/ Oligomerisierung beteiligter Rezeptoren, die wiederum zur intrazellulären Formierung des Todessignalkomplexes (DISC) führt. Es folgt die Bindung von Adapterproteinen (Fas-Rezeptor: FADD, TNF-Rezeptor: TRADD). Diese enthalten eine Todes-Effektordomäne (DED), die zur Spaltung und Aktivierung von Caspase 8 führen. Im klassischen Fall wird durch Caspase 8 das BCL-2-Homolog BID durch Spaltung aktiviert, das schließlich das antiapoptotische BCL-2 hemmt (BUDD 2002) und somit die mitochondriale Apoptoseintegration proapoptotisch beeinflusst. In manchen Fällen kann Caspase 8 unter Umgehung der mitochondrialen Apoptoseintegration zur direkten Aktivierung weiterer Caspasen führen und damit die Apoptose-Exekution veranlassen. Ein Nebenweg der Fas-Signaltransduktion führt über die **FAST** (Fas-assoziierte Tyrosinkinase). Diese phosphoryliert und aktiviert das apoptoseassoziierte RNA-bindende Protein TIA-1 (TIAN 1995), einem posttranskriptionalen Silencerprotein. Die meisten Untersuchungen zu TIA-1-Effekten bezogen sich auf Lymphome (namensgebend: T-Zell intrazelluläres Antigen 1). Allerdings sind auch Effekte im nicht-lymphatischen Gewebe beschrieben: So wird durch TIA-1 die Expression von COX-2 (Cyclo-Oxygenase 2) gehemmt. Dieser Mechanismus wurde bei Kolon-Karzinomen als gestört beschrieben (DIXON 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass FAST an der Mitochondrienmembran von HeLa-Zellen mit dem antiapoptotischen Protein BCL-X_L interagiert und somit proapoptotischen Einfluss auf die mitochondriale Apoptoseintegration nimmt (LI 2004).

2.3.1.2 Integration

Die Apoptoseexekution wird im klassischen Fall durch cytosolische Ausschüttung mitochondrialer Caspase-Aktivatoren (v.a. Cytochrom c) ausgelöst. Die meisten extrinsischen und nahezu alle intrinsischen Apoptose signale werden auf diese Weise vermittelt. Die Mechanismen, die über das Durchlässigwerden der Mitochondrienmembran und der Cytochrom c-Ausschüttung entscheiden, stehen deshalb im Mittelpunkt der Apoptoseintegration (NOMURA 1999). Der wichtigste Vertreter der hier einflussnehmenden Moleküle ist das **BCL-2**. Es begründet die Onkogenengruppe der „Regulatoren des Zelltodes“.

Ein Vielzahl von sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkenden Homologen bildet heute die Familie der BCL-2-ähnlichen Proteine (DANIAL 2004). Proapoptotische Wirkung haben z.B. BID, BAD, BAX, BAK. Antiapoptotisch wirken BCL-2, BCL-X_L (WILLIS 2003).

Man vermutet, dass die Proteine **BAX** (BCL-2 assoziiertes X-Protein) und BAK durch Oligomerisierung Poren in der Mitochondrienmembran bilden (DANIAL 2004).

Das antiapoptotische Protein **BCL-2** verdankt den Namen seiner Rolle in der Karzinogenese des B-Zell-Lymphoms. Möglicherweise durch die Verstärkung des BCL-2 wirkt das ebenso antiapoptotische (*syn.* athanogene) **BAG-1** (BCL-assoziertes Athanogen), das allerdings nicht der Familie der BCL-2-ähnlichen Proteine zugerechnet wird. Seinerseits wird es vermutlich durch das Hitzeschockprotein 70 und durch Raf-1 moduliert (TOWNSEND 2003).

Der proapoptotische **BAD** (*engl.* BCL2-antagonist of cell death) wird abhängig von Wachstumsfaktorsignalen durch Phosphorylierung ein- und ausgeschaltet (ZHA 1997) und inaktiviert BCL-2 und BCL-X_L durch Dimerisation (KELEKAR 1997).

2.3.1.3 Exekution

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirkt die Aktivierung des Apoptoseprotease-aktivierenden Faktors APAF1, der als ersten Schritt der terminalen Caspasen-Kaskade die Caspase 9 spaltet und aktiviert. Die Caspasen sind eine Familie von sich gegenseitig aktivierenden Cystin-Aspartat-Proteasen. Sie bewirken den Vollzug des apoptotischen Todesprogramms (FESIK und SHI 2001).

Die Aktivierung der **Caspase 3** findet direkt im Anschluss an die Spaltung der Caspase 9 statt. Die **Caspase 4** ist an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Sie wird in Reaktion auf ER-Stress (z.B. durch Ischämie) gespalten und aktiviert, nicht aber durch übliche Apoptosestimuli und womöglich unter Umgehung der mitochondrialen Apoptoseintegration (HITOMI 2004).

2.3.2 Gene der Zellzyklusregulation

Der Zellzyklus wird in vier distinkte Phasen eingeteilt (Abbildung 2): G₁ (gap 1) ist die Phase zwischen Mitose und DNA-Synthese. In der S (Synthese)-Phase wird durch DNA-Synthese die Zellteilung vorbereitet. Mit Abschluss der DNA-Synthese tritt die Zelle in die G₂ (gap 2)-Phase ein. In der anschließenden M-Phase vollzieht die Zelle die Mitose (LODISH 2000). Viele Feedback-Mechanismen überwachen an definierten Kontrollpunkten den regulären Abschluss

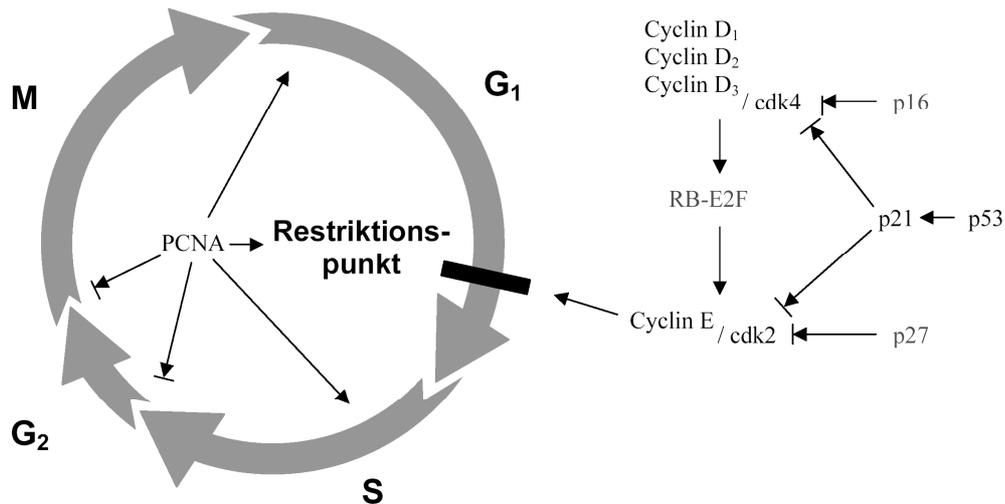


Abbildung 2: Zellzyklusphasen und Regulation der G₁/S-Transition. Der Komplex aus einem der Cycline D_{1,2,3} und cdk4 bewirkt über den RB-E2F- Pfad die Induktion/ Aktivierung von Cyclin E und cdk2. Der aktive Cyclin E/cdk2-Komplex führt zur Überwindung des Restriktionspunktes. Hemmender Einfluss auf die G₁/S-Transition wird durch die Antizykline p16, p21 und p27 vermittelt. p53 wirkt G₁/S-restriktiv. PCNA hat zyklusabhängig verschiedenartige Wirkung.

der Prozesse einer Zyklusphase, bevor sie den weiteren Fortgang des Zellzyklus zulassen: Unreplizierte DNA führt so zu S-Phase-Arrest, DNA-Schäden je nach ihrem Zeitpunkt zu G₁- oder G₂-Phase-Arrest, eine Störung des Mitose-Spindel-Apparates zu M-Phase-Arrest, etc. (LODISH 2000). Wie ein Dirigent steuert ein zentraler Apparat aus sog. Cyclinen und ihren katalytischen Untereinheiten (cdk, cyclin-abhängige Kinasen) durch Fluktuationen ihrer Konzentration und Aktivierung den Fortgang des gesamten Zellzyklus und die Passage von Kontrollpunkten. Dabei sind mit der G₁-Phase die D-Cycline, mit der S-Phase die E- und A-Cycline und mit der M-Phase die Cycline B und A assoziiert.

Die meisten Zellen des erwachsenen Organismus befinden sich in der G₁-Phase vor dem sogenannten (G₁/S-)Restriktionspunkt. Das Überschreiten dieses Punktes bezeichnet man als G₁/S-Transition. Sie wird durch die Komplexe von **D-Cyclinen** mit **cdk 4** und 6 sowie vom **Cyclin E/cdk2**-Komplex gesteuert. Defekte in der Kontrolle der G₁/S-Transition sind ein universelles Phänomen bei Tumoren (MURRAY 2004, SHERR 2000). Die **D-Cycline** und **cdk4** werden durch Wachstumsfaktoren induziert (NEVINS 2001, ALBERTS 2002). Sie führen in der mittleren/späten G₁-Phase zur Phosphorylierung des RB-Proteins, das die E2F - Transkriptionsfaktoren aktiviert. Diese veranlassen die Expression von **Cyclin E** und **cdk2**, was schließlich zur G₁/S-Transition führt. Wesentlich für die Regulation der G₁/S-Transition ist deren Hemmung (NEVINS 2001, ALBERTS 2002), namentlich durch sogenannte Anticycline: p27 (*syn.* Kip1, CDKN1B) hemmt cdk2 und damit die Cyclin E-abhängige

Transition in die S-Phase. p16 (*syn.* INK4, CDKN2A) hemmt cdk4 und damit die RB-Phosphorylierung. **p21** (*syn.* Cip1, WAF1, CDKN1A) hemmt cdk2 und cdk4. Einfluss auf die p21-Expression wird z.B. durch p53 (siehe weiter unten) ausgeübt, das hierdurch die G₁/S-Transition bremst (SHERR 2000). Das **PCNA** (Nukläres Antigen proliferierender Zellen) ist eng mit der Zellzyklusregulation verbunden. Es gehört zur Familie der *DNA sliding clamp* Proteine und ist Cofaktor verschiedener DNA-Polymerasen. Als solches ist es auch im Replisom tätig. Seine Expression korreliert stark mit der Replikationsaktivität einer Zelle (was zu der überholten Benennung „Cyclin“ führte) und ist daher ein immunhistologischer Standardmarker für die Bestimmung der Proliferationsaktivität von Geweben. In den letzten Jahren ist allerdings eine Vielzahl von weiteren Interaktionen bekannt geworden (MAGA UND HÜBSCHER 2003): PCNA ist beteiligt an der DNA-Reparatur (siehe unten), an der Apoptose- und der Zellzyklusregulation, wobei die Zahl der spezifischen Proteininteraktionen auf über 30 beziffert wird: Dazu zählen die Bindungen an **p21** als auch an **cdk2** und andere Cyclin/cdk-Komplexe. Insgesamt resultiert aus dieser Bindungsaktivität eine Begünstigung der G₁-Phasenprogression, der G₁/S-Phasen-Transition sowie der weiteren S-Phasen-Progression. Später bewirkt der PCNA-Einfluss S-Phasen-Arrest und Inhibition der G₂/M-Transition (LI 1994, MAGA UND HÜBSCHER 2003). Die PCNA Bindung an **GADD45** vermindert die Apoptosetriggerung durch **GADD45** (VAIRAPANDI 2000).

2.3.3 Reparaturgene und Gene der Stressantwort

Die Bewahrung der Integrität des Genoms ist eine wichtige Voraussetzung, um die Entstehung einer malignen Erkrankung zu vermeiden. Dieser Aufgabe gewidmet ist eine hochkomplexe Maschinerie, deren Funktionselemente sich zwei Aufgabengruppen zuordnen lassen: Zum einen dem Erkennen und Signalisieren von DNA-Schäden, zum anderen deren Reparatur. Im menschlichen Genom werden z. Zt. etwa 130 Gene diesem Aufgabenbereich zugeordnet (CHRISTMANN 2003). Viele Erkrankungen lassen sich auf Mutationen von Genen dieser Aufgabenbereiche zurückführen (Hereditäres nicht-polypöses Kolon-Karzinom, Xeroderma pigmentosum, Ataxia teleangiektasia, Fanconi-Anämie, etc).

Reparatur

Für die Reparatur verschiedenartiger DNA-Schäden (Basenmodifikation, Nukleotiddimerisierung, Einzel- und Doppelstrangbrüche, „mismatch“ = Deletion/Insertion mit resultierender Verschiebung des Leserasters) stehen jeweils spezialisierte Mechanismen zur Verfügung (siehe Abbildung 3). Die Darstellung der einzelnen DNA-

Reparaturmechanismen würde bei weitem den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Sie umfassen relativ einfache Mechanismen, wie die Direkte Reparatur (DR) durch ein einziges Enzym,

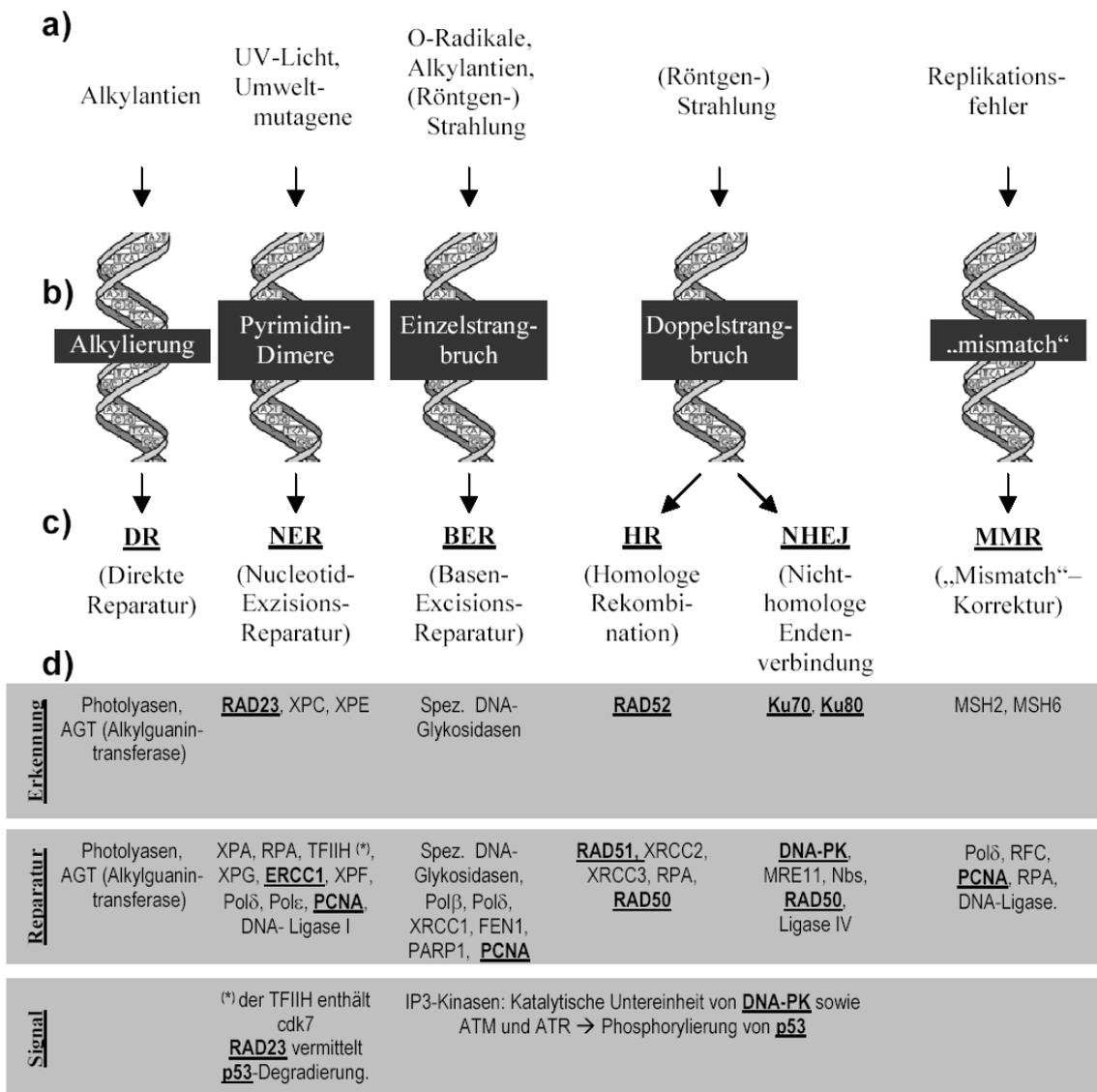


Abbildung 3: Übersicht DNA-Reparatur. (a) Die wichtigsten DNA-Noxen, sowie (b) die resultierende Form der DNA-Schädigung. (c) Spezifischer Reparaturweg und die hierin (d) involvierten Proteine (Auswahl). Erkennung: Die eine DNA-Reparatur initiiierenden Proteine sind hier getrennt aufgeführt, die übrigen unter Reparatur. Signal: Besonderheiten der weiteren Signaltransduktion (siehe Text). Die nicht für einen bestimmten Schadenstyp spezifische Signalisierung durch p53 und GADD45A ist nicht dargestellt.

reichen über komplexe und vielschrittige Kaskaden bei denen fehlerhafte oder alterierte Basen oder Nukleotide ausgeschnitten und die korrekten Bausteine eingefügt werden (Basen-Exzisions-Reparatur BER und Nucleotid-Exzisions-Reparatur NER), über diffizile Mechanismen zur Wiederverbindung von DNA-Doppelstrangbrüchen (überlappende Einzelstrang-Enden: Homologe Rekombination HR; glatte Enden: Nicht-homologe Enden-Verbindung NHEJ) bis hin zu teilweise unverstandenen Prozessen, wie der „mismatch“-

Korrektur MMR (SCHÄRER 2003). Unter diesen Reparaturmechanismen kommt der NER bei den Hodentumoren eine besonders interessante Rolle zu: Diese ist zuständig für die Behebung der im Rahmen einer Cisplatin-Therapie entstehenden DNA-Schäden (FURUTA 2002). Eine Auswahl von Proteinen, die in die Durchführung der jeweils initiierten Reparaturmechanismen involviert sind (siehe Abbildung 3), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht: ERCC1 (kreuzweise ergänzendes Exzisions-Reparatur-Enzym 1) gehört zum NER-Mechanismus. RAD51 und RAD50 (Strahleninduzierbare Proteine 51 und 50) representieren den HR-Weg, während die DNA-PK und auch RAD50 am NHEJ-Weg beteiligt sind. Als Co-Faktor ist auch PCNA (siehe 2.3.2) an vielen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. Es scheint hierin aber keine essentielle Funktion innezuhaben (CHRISTMANN 2003, NARAYAN 2004).

Erkennung und Signalisierung

Die einzelnen DNA-Läsionsformen werden spezifisch von den initial bindenden Proteinen des jeweilig zuständigen Reparaturweges erkannt (siehe Abbildung 3). Die Reparatur-initiiierenden Proteine des NHEJ-Weges sind Ku70 und Ku80 (70 und 80 kDa Schilddrüsen-Autoantigene). Für den HR-Weg ist es das RAD52 (Strahleninduzierbares Protein 52). Der Initialkomplex des NER-Weges wird durch RAD23a (Strahleninduzierbares Protein 23a) representiert. Es ist dort funktionell austauschbar zu seinem Analogon RAD23b (SUGASAWA 1997).

Ganz im Zentrum eines weniger spezifischen Detektionsmechanismus für genetische Schäden und für genotoxischen Zellstress steht das Protein p53, das deshalb auch als „Wächter des Genoms“ apostrophiert wird (ALBERTS 2002). Seine Effektivität in der Detektion genomischer Veränderungen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Mutationen des p53-Gens die häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren sind. Daraus lässt sich schließen, dass die Überwindung der p53-vermittelten Kontrolle über die genetische Integrität einen wichtigen Schritt in der Karzinogenese darstellt (NAKAMURA 2003). Viele zu einer p53-Aktivierung führende Faktoren sind bisher bekannt und werden unter „genotoxischer Stress“ subsummiert. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind allerdings bis dato unvollständig verstanden (PLUQUET und HAINAUT 2001). Die meisten der p53-Effekte werden durch seine Wirkung als Transkriptionsfaktor vermittelt. Unter den dutzenden bekannten Zielgenen finden sich p21, GADD45A, 14-3-3 σ und BAX (NAKAMURA 2003), TNFR und Caspase 8 (HAUPT 2003). Dabei kann sich das Muster der p53-induzierten

Gene je nach der Art der p53-Aktivierung unterscheiden (HAUPT 2003). Für die Vermittlung des Zellzyklus-Arrests sind sowohl p21 und PCNA (siehe oben) als auch GADD45A (DNA-Schaden-induzierbares Wachstums-Arrest-Protein 45A) verantwortlich. Es konnte demonstriert werden, dass die GADD45A-Induktion neben der p53-Aktivität auch das Vorhandensein von DNA-Schäden voraussetzt (XIAO 2000).

Bei vielen DNA-Reparaturmechanismen sind Reaktionswege bekannt, in denen p53 aktiviert wird (z.B. Phosphorylierung durch ATM, ATR oder DNAPK bei den Strangbruch-behebenden Mechanismen, CHRISTMANN 2003). Beim NER-Mechanismus liegt durch die Einbeziehung von cdk7 in den Multisubeinheitenkomplex TFIIH eine direkt inhibierende Verbindung zur Zellzyklusfunktion vor (AKOULITCHEV und REINBERG, 1998). Andererseits wurde eine vermehrte RAD23(a/b)-vermittelte Degradation von p53 beschrieben (GLOCKZIN 2003).

Stressassoziierte Gene

Die Glutathion-Peroxidase 2 GPX2 reduziert oxidative Noxen und ist in verschiedenen, vor allem gastrointestinalen Epithelien lokalisiert (KOMATSU 2001). Die Glutathion-S-Transferase A2 GSTA2 schützt vor (Lipid-)oxidation durch Konjugation mit Glutathion (RAO und SHAHA 2000).

Für das Enzym PRKR (interferon-induzierbar, durch doppelsträngige RNA aktivierte Protein-Kinase) wurde, zusätzlich zu seiner Interferon-vermittelten antiviralen Wirkung, die Induzierbarkeit durch genotoxischen Stress demonstriert (BERGERON 2000).

Der Faktor NFRkB spielt eine Rolle in der Expressionsregulation des Interleukin 2-Rezeptors in T-Lymphozyten (ADAMS 1991). Die Interleukin 2-Antwort wiederum spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptoseregulation von T-Lymphozyten (GREEN 2003). Eine Expression in nichtlymphatischem Gewebe wurde nicht berichtet.

2.3.4 Sonstige Gene

Clusterin CLU ist ein Hauptbestandteil der epididymalen Flüssigkeit, wo es suspensierte SERTOLI-Zellen agglutiniert (namensgebend). Es wird aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert. Seine biologische Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Rolle für die Membranintegrität (Schutz vor Complement-Angriff) und für die Apoptoseregulation wurde

beschrieben (BEHRENS 2001). Neuere Untersuchungen an Säugetierzellen konnten zeigen, dass sezerniertes Clusterin (sCLU) cytoprotektiv wirkt, während das durch alternatives Splicing entstandene nukleäre Clusterin (nCLU) eine proapoptische Wirkung hat (KLOKOV 2004).

RAB2 gehört zu einer Familie von membrangebundenen ATPasen, die eine wichtige Rolle bei der Sekretionsregulation spielen. In der Keimzellentwicklung sind sie in die Organellenentwicklung (Akrosombildung) der Spermatiden eingebunden (RAMALHO-SANTOS 2001).

NME1 (non-metastatic cells 1) kodiert die "A"-Isoform der Nucleosiddisphosphat-Kinase NDK. Seine Rolle als „Metastase-Suppressor“ ist bei den Mamma-Karzinomen evident (OUATAS 2003). Zusätzlich wird eine Rolle für die Spermienmotilität diskutiert (MUNIER 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Labormaterialien

- Abdeckfilm “ABI PRISM® Optical Adhesive Covers”, Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
- Kühlschrank „glass line“, Firma Heraeus, Hanau, D
- Pasteur-Pipette „pipetus®-akku“, Firma Hirschman Laborgeräte, D
- Pipetten „Research® pro“ (0,5-10 µl, 5-100 µl, 50-1000µl), Firma Eppendorf – Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 2-100 µl, 50-1000µl) mit Filtereinsatz „ep T.I.P.S.“, Qualität „PCR clean/sterile“, Firma Eppendorf – Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Reagenzglasschüttler „Reax 2000“, Firma Heidolph, D
- Reaktionsgefäße 1,0ml und 1,5ml „Safe-Lock tubes“, Qualität „PCR-clean“, Firma Eppendorf – Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Reaktionsplatten “ABI PRISM® 96-well Optical Reaction Plate”, Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
- Sequencer/ RTQ-PCR Cycler „5700 Sequence Detection System“, Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- Sterilarbeitsplatz „Template Tamer®“, Firma Q-BIOgene, Heidelberg, D
- Sterilbank „Laminair“, Firma Grässlin, D
- Thermomixer „comfort“, Firma Eppendorf – Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Tischzentrifuge „Rotilabo mini“, Firma Roth, Karlsruhe, D
- Zentrifuge „Rotana RP/4300“, Firma Hettich, Tübingen, D

3.2 Reagenzien und Lösungen

- DNA-Verdau-Set „RNase free DNase Set“, Firma Qiagen, Hilden, D
- Enzymlösung Proteinase K 20mg/ml, Firma Invitrogen, Karlsruhe, D
- Fixierlösung „RNA-later®“, Firma Qiagen, Hilden, D
- Homogenisierungslösung „Homogenizer®“, Firma Omni, Warrenton, USA
- MasterMix „TaqMan® Universal PCR Master Mix“, Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
- Primer Probe Design für 18S-Bestimmung “TaqMan® endogenous control assay 18S

- rRNA”, Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
- RNA-Präparations-Set „RNeasy Mini Kit“, Firma Qiagen, Hilden, D
 - RNase-freies Wasser, DEPC-behandelt, Qualität „ultrapure“, Firma USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA

3.2.1 Verdünnungspuffer

- 50 mM/l KCl
- 0,01 mM/l EDTA
- 10 mM/l Tris/HCl, pH 8,3
- 0,0003% Tween 20 (w/v)

3.2.2 Primer-Probe-Designs für untersuchte Gene

Von der Firma Applied Biosystems in Weiterstadt wurden gebrauchsfertig eingestellte Primer- und DNA-Sonden-Lösungen bezogen (DNA-Sonden werden im Folgenden als „Probes“ bezeichnet. *engl.* probe = Sonde). Für diese Primer-Sonden-Designs (AoD®, Assay-on-Demand ®) wird die Bindungsspezifität für die cDNA des entsprechenden RefSeq-Transskripts durch den Hersteller garantiert (RefSeq ist das Verzeichnis der Referenz-Sequenzen des Nationalen Zentrums für Biotechnologie-Information, NCBI der USA). Die expliziten Primer- und Sondensequenzen werden auf der Firmenhomepage (<http://www.appliedbiosystems.com>) bereitgehalten und sind anhand der AoD®-ID zu identifizieren. Die RefSeq – Sequenz des entsprechenden Genes ist anhand der EntrezGene-ID (zuvor LocusLink) über die Homepage des Nationalen Gesundheitsinstituts NIH der USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) einzusehen.

In Tabelle 1 sind die bezogenen Assay-on-Demand® Primer-Sonden-Designs in der Reihenfolge ihrer Besprechung in Abschnitt 2.3 aufgeführt. Zudem ist ihre chromosomale Lokalisation ersichtlich und ihre Referenzcodes für die Datenbanken EntrezGene, GenBank und SwissProt (<http://au.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-ful>) aufgeführt.

3 Material und Methoden

Zytogenetische					
Gen	Bande	AoD®-ID	GenBank	EntrezGene	SwissProt
NSMAF	8q12-q13	Hs00182519_m1	X96586	8439	Q92636
SMPD3	16q22.2	Hs00218713_m1	-	55512	-
TNFL	3q26	Hs00234356_m1	U57059	8743	P50591
FASL	1q23	Hs00181225_m1	D38122	356	P48023
FASR	10q24.1	Hs00163653_m1	M67454	355	P25445
FASTK	7q35	Hs00179113_m1	X86779	10922	Q14296
BCL2	18q21.3	Hs00153350_m1	M14745	596	P10415, P10416, Q16197, Q13842
BAG1	9p12	Hs00185390_m1	S83171	573	Q99933, Q14414, O75315
BAX	19q13.3-q13.4	Hs00180269_m1	L22474	581	Q07814
BAD	11q13.1	Hs00188930_m1	U66879	572	Q92934
Caspase3	4q34	Hs00263337_m1	U13737	836	P42574
Caspase4	11q22.2-q22.3	Hs00277197_m1	U28014	837	P49662, P51878
Cyclin D1	11q13	Hs00277039_m1	X59798	595	P24385
Cyclin D2	12p13	Hs00153380_m1	D13639	894	P30279, Q13955
Cyclin D3	6p21	Hs00426901_m1	M92287	896	P30281
cdk4	12q14	Hs00175935_m1	M14505	1019	P11802, O00576
Cyclin E1	19q12	Hs00233356_m1	M73812	898	P24864, Q14091, Q92501
cdk2	12q13	Hs00608082_m1	D13639	894	P30279, Q13955
PCNA	20pter-p12	Hs00427214_g1	M15796	5111	P12004
p21	6p21.2	Hs00355782_m1	U09579	1026	P38936
p53	17p13.1	Hs00153340_m1	M14694	7157	P04637
GADD45A	1p31.2-p31.1	Hs00169255_m1	M60974	1647	P24522
RAD23a	19p13.2	Hs00192541_m1	D21235	5886	P54725
ERCC1	19q13.2-q13.3	Hs00157415_m1	M13194	2067	P07992
RAD52	12p13-p12.2	Hs00172536_m1	U12134	5893	P43351, Q13205
RAD51	15q15.1	Hs00153418_m1	D13804	5888	Q06609
RAD50	5q31	Hs00194871_m1	U63139	10111	Q92878
Ku70	22q11-q13	Hs00735112_m1	-	2547	P12956
Ku80	2q35	Hs00221707_m1	M30938	7520	P13010
DNAPK	8q11	-	-	5591	P78527
GPX2	14q24.1	Hs00702173_s1	X53463	2877	P18283
GSTA2	6p12.1	Hs00747232_mH	M25627	2939	P08263, Q14750
PRKR	2p22-p21	Hs00169345_m1	M35663	5610	P19525
NFRKB	11q24-q25	Hs00196269_m1	U08191	4798	Q12869
Clusterin	8p21-p12	Hs00156548_m1	M74816	1191	P10909, P11380, P11381
RAB2	8q11.23	Hs00234094_m1	M28213	5862	P08886
NME1	17q21.3	Hs00264824_m1	X17620	4830	P15531

Tabelle 1: Liste der untersuchten Gene. Außer für DNAPK wurden alle PPD gebrauchsfertig bezogen. Ersichtlich ist die chromosomale Lokalisation der untersuchten Gene sowie die jeweiligen Referenzcodes des PPD-Herstellers (AoD®-ID) und der Datenbanken GenBank, EntrezGene und SwissProt.

3.2.3 Primer-Probe-Design für DNAPK

Zum Nachweis der für DNAPK kodierenden DNA war kein gebrauchsfertiges Design erhältlich, weshalb schon für vorherige Arbeiten bei der Firma Applied Biosystems eine Synthese (Assay-by-Design®) beauftragt wurde.

Dazu konnte die unter EntrezGene auf der Internetseite des NCBI bereitgestellte genomische Sequenz benutzt werden (ID 5591). Aus dieser wurde ein zwei Exone umfassender Sequenzabschnitt ausgewählt, und mit der Software Primer Express 2.0® bearbeitet (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Auf diese Weise wurde ein Intron-überspannendes Primer-Sonden-Design gewählt, um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden.

Die resultierenden Sequenzen waren:

Vorwärts - Primer: ATTGATTAAATTGTGCTACGATGCA
Rückwärts – Primer : CAGATATGGCGCAGTTGTATGC
Sonde : TTACAGAGAACATGGCAGGAG

Durch einen Online-Vergleich mit den Genom-Daten des National Institute of Health der USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>) wurde sichergestellt, dass das menschliche Genom keine zweite Sequenz aufweist, für die das gewählte Primer-Sonden-Design Bindungsspezifität besitzt.

Schon zuvor wurde in der Arbeitsgruppe die korrekte Synthese des Primer-Sonden-Designs sowie dessen Funktionalität und Spezifität experimentell gesichert (Ergebnisse nicht gezeigt): Zum einen geschah dies mittels Schmelzkurvenanalyse und Schmelzpunktbestimmung (T_m) des Amplikons. (Dabei wird die Temperatur bestimmt, an der die doppelsträngige DNA denaturiert. Diese wird hierzu mittels SYBR-Green I angefärbt. In der Schmelzkurve lassen sich durch einen einzigen schmalen Peak an der Position der vorbestimmten Schmelztemperatur des Amplikons größere Mengen unerwünscht entstehender Amplifikate ausschließen). Zum anderen wurde die berechnete Länge des Amplikons „klassisch“ mittels Gelelektrophorese bestätigt. (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.3 Probengewinnung und Klassifizierung

Durch die Urologische Klinik des Bundeswehrkrankenhauses Ulm (Leitender Arzt PD Dr. C. Sparwasser) wurde Hodengewebe aus den Operationsresektaten von zehn Seminom- und 10 Nichtseminompatienten asserviert. Aus diesen wurde jeweils eine Gewebeprobe direkt aus dem Tumorareal und eine weitere Gewebeprobe aus einer tumorfernen Stelle entnommen, die im weiteren als Normalgewebe bezeichnet wird.

Pat. Nr.	Initialen	Alter	Histologie	Gruppe	TNM	Stadium
1	O. B.	27,0	Seminom	SE	pT1 N0 M0	I
2	T. D.	34,6	Seminom	SE	pT1 pNx pMx R0	I
3	H. H.	38,2	Seminom	SE	pT1 N0 M0	I
4	A. K.	30,5	Seminom	SE	pT1 N0 M0	I
5	K. R.	(62,9)	<i>Seminom</i>	<i>SE</i>	<i>pT1 N0 M0 St. I</i>	<i>I</i>
6	T. T.	27,6	Seminom	SE	pT1	I
7	M. W.	43,3	Seminom	SE	pT1 pNx pMx R0	I
8	C. V.	39,6	Seminom	SE	pT3 N1 M0	IIb
9	S. K.	36,1	Seminom	SE	pT1	I
10	H. S.	33,7	Seminom	SE	pT1 N0 Mx	I
11	T. F.	23,2	Seminom mit Synzytiotrophoblast	NS	pT2 pNx pMx	I
12	B. R.	19,1	embryonales Carcinom	NS	pT1 N0 M0	I
13	A. S.	35,7	embryonales Carcinom	NS	k.A.	I
14	P. W.	32,4	Mischtumor EC + reifes Teratom	NS	pT2 pNx pMx R0	I
15	M. K.	37,5	unreifer Keimzelltumor	NS	III	III
16	T. O.	30,6	embryonales Carcinom	NS	pT2 G3 N2 L1 V1	III
17	F. S.	27,8	Seminom und EC	NS	k.A.	k.A.
18	S. H.	18,6	EC, S, YS, TD	NS	k.A.	III
19	N. S.	37,3	EC, TD, YS, CC	NS	k.A.	III
20	M. V.	39,9	S, EC	NS	M1	III

Tabelle 2: Patientenkollektiv. Seminome, **SE** (Patient Nr. 1- 10) und Nichtseminome, **NS** (Patient 11-20). **TNM**-Stadium nach UICC 1997. Klinisches **Stadium** nach Lugano-Klassifikation. Der Patient 5 wurde wegen Materialknappheit exkludiert.

In der Pathologischen Abteilung desselben Krankenhauses wurde die Tumorentität (Seminom/ Nichtseminom) bestimmt, sowie gegebenenfalls nähere Angaben zur Histologie gemacht. Von einigen Patienten waren klinische Stadien zum Operationszeitpunkt zu erfahren, die gemäß TNM-Klassifikation der UICC (Internationale Vereinigung gegen den Krebs) oder der Lugano-Klassifikation angegeben wurden. Eine Übersicht über das dieser Untersuchung zugrundeliegende Patientenkollektiv gibt Tabelle 2.

Die Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 18,6 und 43,3 Jahren alt (im Durchschnitt $33,8 \pm 9,6$ Jahre). Getrennt nach den beiden Tumorentitäten stellte sich die Altersverteilung wie folgt dar: Seminome 27,6 – 43,3 Jahre (im Durchschnitt $34,5 \pm 5,5$), Nichtseminome 18,6 – 39,9 Jahre (im Durchschnitt $30,2 \pm 7,8$). Hierbei ist Patient 5 nicht berücksichtigt, der aus der Studie exkludiert wurde.

Die Gewebeproben wurden nach ihrer Gewinnung mithilfe der RNA-later[®] Lösung (Qiagen, Hilden, Deutschland) fixiert.

3.4 RNA-Extraktion

Für zuvor gemachte Untersuchungen wurden bereits die Schritte RNA-Extraktion und cDNA-Synthese durchgeführt, weswegen die hierfür notwendigen Arbeitsschritte nur umrissen werden.

Zunächst wurde das mit RNA-later[®] fixierte Zellmaterial mit einer Homogenisierungslösung (Homogenizer, Firma Omni, Warrenton, USA) behandelt und durch Inkubation mit Proteinase K-Lösung (Firma Invitrogen, Karlsruhe, D) entsprechend den Herstellerangaben aufgeschlossen. Die Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit[®] (Firma Quiagen, Hilden, D), der nachfolgende Verdau der verbliebenen DNA wurde mit dem RNase free DNase Set[®] (Firma Quiagen, Hilden, D) jeweils entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Um Qualität und Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen, wurde diese spektrometrisch bei 260nm (vorwiegende Absorption durch RNA) und 280nm (vorwiegende Absorption durch Proteinverunreinigungen) Wellenlänge untersucht. Alle Proben wiesen einen Absorptionsquotienten (OD 260/280) von größer 1,8 auf, was einer guten Reinheit entspricht. (nicht dargestellt)

Gelelektrophoretisch wurde anhand der Banden von 28S und 18S rRNA die Integrität der RNA bestätigt. Dabei waren die 28S Banden etwa doppelt so stark wie die 18S Banden (nicht dargestellt).

Außerdem wurden Kontaminationen durch DNA mittels einer konventionellen PCR über 40 Zyklen mit β -Aktin-Primern ausgeschlossen (nicht dargestellt).

3.5 cDNA-Herstellung

Zur weiteren Untersuchung musste die RNA in cDNA überführt werden. Hierzu wurde zunächst jeweils anhand der ermittelten optischen Dichte bei 260 nm die RNA-Ausgangskonzentration bestimmt und diese durch Verdünnung mit der hieraus errechneten Menge RNase-freien Wassers auf eine Konzentration von $1\mu\text{g RNA} / 40\mu\text{l}$ eingestellt (Dichtemessungen nicht dargestellt).

Die Umschreibung in cDNA erfolgte mittels reverser Transkription, die unter Verwendung des TaqMan Gold RT-PCR Kit® der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dazu wurden jeder RNA-Lösung hinzugefügt: TaqMan® RT - Puffer, Magnesium-Ionen, ein dNTP-Mix, randomisierte Hexamere, RNase-Inhibitor und schließlich die Reverse Transkriptase. Im Thermocycler wurden diese Reaktionsgemische 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend lief über 30 min bei 48 °C die reverse Transkription ab, die schließlich durch die Inaktivierung der Reversen Transkripase mittels Inkubation bei 95°C über 5 min beendet wurde.

Das so erhaltene Produkt wurde mittels des oben beschriebenen Verdünnungspuffers auf $10\text{ ng cDNA} / \mu\text{l}$ eingestellt, aliquotiert und bei -20°C eingelagert. Diese Materialproben werden im folgenden zur klaren sprachlichen Abtrennung von den weiter oben beschriebenen DNA-Probes (*engl. für* DNA-Sonden) als Templates (*engl. für* Vorlage, Matrize) bezeichnet. Zu Beginn der Versuche wurde in allen 40 Templates die Konzentration von 18S mittels RTQ-PCR bestimmt. Dabei ergaben sich bei sämtlichen Templates regelrechte Amplifikationsplots, wodurch die erfolgreiche Umsetzung von mRNA zu cDNA in allen Fällen demonstriert wurde.

3.6 cDNA-Quantifizierung mittels RTQ-PCR

3.6.1 Funktionsweise der RTQ-PCR

Die Abkürzung RTQ-PCR steht für die Verfahrensbezeichnung „Real time quantitative polymerase chain reaction“, also für die Polymerase-Kettenreaktion mit Quantifizierung in Echtzeit.

Bei diesem Verfahren lassen sich Konzentrationen der Reaktionspartner während des Prozessablaufes - d.h. in Echtzeit - messen. Durch diese Echtzeitmessungen kann sehr genau auf eine DNA-Ausgangskonzentration c_0 zu Beginn einer PCR-Reaktion rückgeschlossen werden (MÜLHARDT 2001, PFAFFL 2001, LEUTENEGGER 2001, BROWN2002).

Konventionelle PCR

Die eigentliche Amplifikationsreaktion unterscheidet sich nicht von einer konventionellen PCR, die hier deshalb in sehr groben Zügen dargestellt werden soll: Mithilfe einer DNA-abhängigen wärmebeständigen Polymerase und mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) wird ein gewünschter DNA-Abschnitt vermehrt (amplifiziert). Ein Reaktionszyklus läuft in drei Schritten ab: (1.) Schmelzphase: Zunächst werden durch Temperaturerhöhung auf 95°C die beiden komplementären Stränge der DNA voneinander getrennt. (2.) Hybridisierungsphase: Bei 50-60°C hybridisieren die beiden Primer mit jeweils einem DNA-Strang und definieren so die Startpunkte der sich nun anschließenden (3.) Synthesephase: Bei 74 °C (bei Verwendung konventioneller Taq-Polymerase) werden hier die gewünschten DNA-Abschnitte durch die DNA-abhängige Polymerase kopiert. Der zyklische Ablauf dieser drei Phasen wird durch das sequentielle Erhitzen und Abkühlen des Reaktionsgefäßes in einem programmgesteuerten Thermostat, dem sogenannten „Cycler“ bewirkt. Im vorliegenden Fall wurde statt der konventionellen Taq-Polymerase die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase der Firma Applied Biosystems verwendet, deren Reaktionsoptimum bei 60°C liegt. Dementsprechend unterschieden sich die Phasen 2 und 3 in der Cycler-Programmierung nicht. Da die bei jedem Reaktionszyklus entstehende doppelsträngige DNA im darauffolgenden Zyklus als Matrize dient, vermehren sich die Reaktionsprodukte der PCR exponentiell zur Anzahl n der durchlaufenen Zyklen (meist $n=40$). Theoretisch ergibt sich demnach eine 2^n -fache Vermehrung der Ausgangs-DNA.

Ein Rückschluss auf die anfängliche DNA-Konzentration c_0 ist bei dieser konventionellen PCR möglich, indem man die Konzentration c_E des Endproduktes bestimmt (beispielsweise

mittels Spektralphotometrie oder mittels Fluoreszenzmessungen DNA-bindender Farbstoffe wie SYBR-Green®) und anhand eines angenommenen Amplifikationsfaktors von 2^n (n = Anzahl der Amplifikationsrunden) mit $c_0 = c_E / 2^n$ auf die Anfangskonzentration zurückrechnet. Diese sogenannte Endpunktmethode ist jedoch sehr ungenau, weil beispielsweise die DNA-Amplifikation durch die PCR-Reaktion in Wirklichkeit nicht gleichmäßig über den gesamten Reaktionsablauf erfolgt. Vor allem nähert sich die DNA-Konzentration gegen Ende der PCR einer Sättigungskonzentration. Deren Höhe ist aber neben der Ausgangskonzentration c_0 wesentlich vom Verbrauch der zur Synthese vorhandenen Nukleotidbausteine (dem Oligonukleotid-Mix) und der Erschöpfung der DNA-Polymerase bestimmt. Einen Eindruck von der geringen Präzision der Endpunktmethode gibt die breite Streuung der Fluoreszenzwerte am Ende der RTQ-PCR-Reaktion in Abbildung 5.

Unterschiede der RTQ-PCR zur konventionellen PCR

Das Charakteristikum der RTQ-PCR ist, dass die beiden Vorgänge - DNA-Amplifikation mittels PCR zum einen und Quantifikation des Reaktionsproduktes zum anderen - nicht sequentiell sondern gleichzeitig durchgeführt werden. Dazu müssen zwei elementare Voraussetzungen erfüllt sein: (1.) Man benötigt ein Gerät, das die Funktion eines konventionellen PCR-Cyclers mit der eines Spektrometers kombiniert. Diese Anforderung wird von den seit vielen Jahren üblichen automatischen DNA-Sequenzanalysegeräten („Sequenzier“) erfüllt. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Gerät „5700 Sequence Detection System“ (Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet, bei dem in die Heiz- und Kühleinheit des Cyclers eine Spektrometrieeinrichtung integriert ist. (2.) Man benötigt einen Indikator, der ausschließlich die Konzentration der spezifisch synthetisierten DNA anzeigt. Unspezifische PCR-Produkte, wie sie unvermeidbarerweise im Verlauf einer jeden PCR entstehen, dürfen nicht erfasst werden. Dies ist möglich durch die Verwendung eines Fluoreszenzindikators, der durch die spezifische Spaltung einer kovalent gebundenen DNA-Sonde aktiviert wird.

Detektion des spezifischen PCR-Reaktionsproduktes bei der RTQ-PCR

Bei der RTQ-PCR wird neben den klassischen Reaktionspartnern (Puffer, dNTP-Mix, Polymerase und spezifische Primer) eine DNA-Sonde zugegeben, die mit einem Abschnitt der zu amplifizierenden DNA (also zwischen den beiden Primern) spezifisch bindet.

Da die Taq-DNA-Polymerase neben ihrer DNA-Synthese-Funktion auch eine 5'-Exonuklease-Funktion ausübt, spaltet sie beim Ablesen einer DNA-Matrize gleichzeitig mit

der spezifischen Synthese *eines* PCR-Produktes jeweils *eine* hybridisierte DNA-Sonde (dargestellt bei (a) in Abbildung 4). Die Anzahl der auf diese Weise gespaltenen DNA-Sonden ist dadurch streng proportional zur Anzahl der durch die DNA-Polymerase spezifisch synthetisierten PCR-Produkte.

Diese DNA-Sonde ist an beiden Enden kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden. Die hier verwendeten DNA-Sonden der Firma Applied Biosystems („TaqMan®“-Sonden) werden am 5'-Ende mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) und am 3'-Ende mit dem roten TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) markiert. Durch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe zueinander wird ein als FRET (Fluoreszenzresonanz-Energietransfer) bekannter physikalischer Effekt wirksam: Dieser bewirkt, dass bei Anregung des einen Farbstoffs (hier FAM) durch Licht in dessen spezifischer Wellenlänge λ_1 Energie zum zweiten Farbstoff (hier TAMRA) übergeht, der nun Licht in seiner eigenen Wellenlänge λ_2 emittiert. Eine mit grünem Licht angeregte, intakte TaqMan®-Sonde leuchtet demnach rot (dargestellt bei (b) in Abbildung 4).

Wird die DNA-Sonde aber durch die 5'-Exonukleasefunktion der DNA-Polymerase gespalten, so werden auch die beiden Fluoreszenzfarbstoffe räumlich voneinander getrennt. Entsprechend findet auch kein Fluoreszenzresonanz-Energietransfer mehr statt, wodurch nun der direkt angeregte Fluoreszenzfarbstoff auf übliche Weise in seiner eigenen spezifischen Wellenlänge λ_1 fluoresziert (dargestellt bei (c+d) in Abbildung 4). Durch die Fluoreszenzintensität R_n der Wellenlänge λ_1 kann man nun auf die Anzahl der von der Polymerase gespaltenen DNA-Sonden schließen, die sich wiederum bekanntermaßen streng proportional zu der Menge der spezifisch synthetisierten DNA verhält. Entsprechend seiner Funktion in diesem Verfahren nennt man den λ_1 -Farbstoff „Reporter“ (*engl.* to report = berichten), den λ_2 -Farbstoff „Quencher“ (*engl.* to quench = löschen, ersticken).

Berechnung der Anfangskonzentration c_0 bei der RTQ-PCR

In Abbildung 5 ist der Verlauf der spektrometrischen Echtzeitmessungen während einer RTQ-PCR aufgetragen. Durch den Kreuzungspunkt eines Amplifikationsplots mit dem Fluoreszenzschwellenwert R_n lässt sich der zugehörige C_t -Wert (*engl.* cycle threshold) ermitteln. Der C_t -Wert ist demnach die hypothetische (da nicht-ganzzahlige) Anzahl von PCR-Zyklen, innerhalb derer der Fluoreszenzschwellenwert R_n erreicht würde.

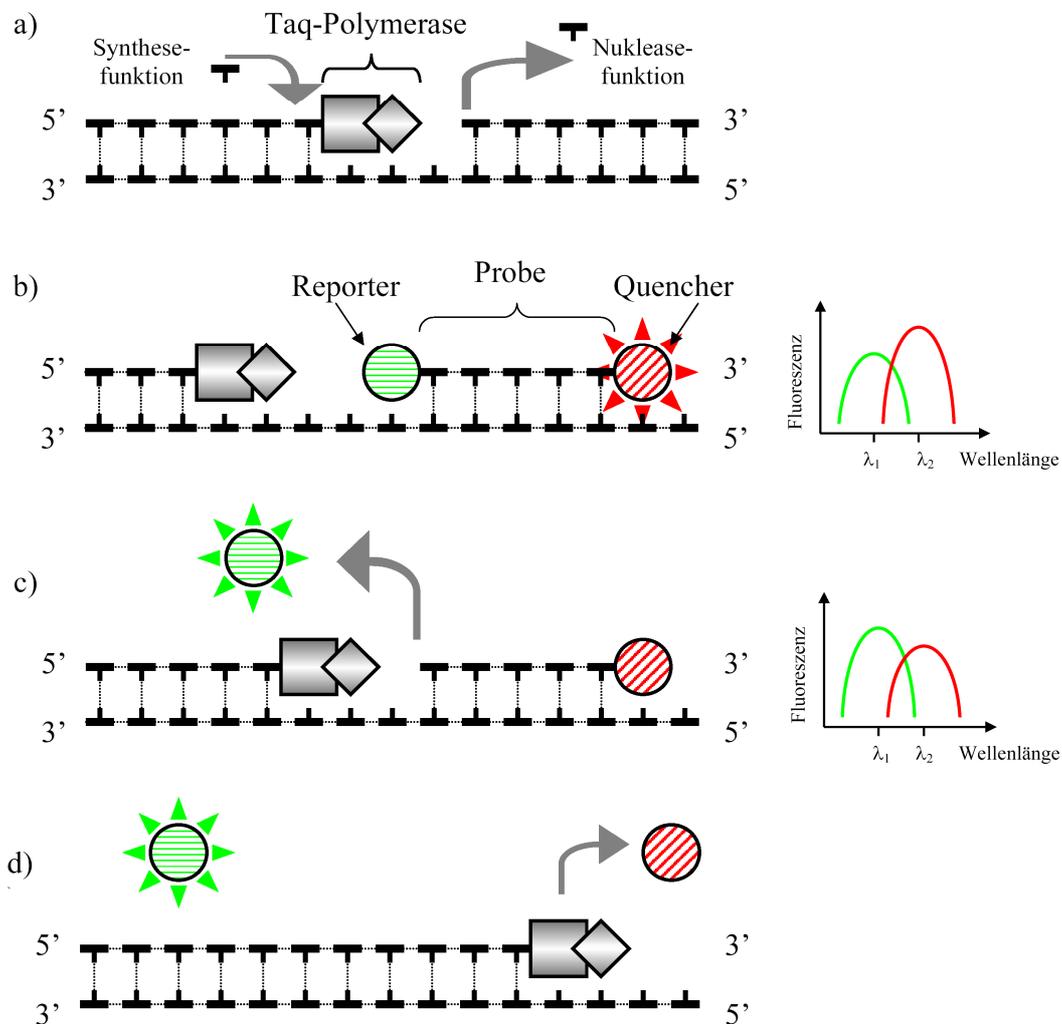


Abbildung 4: Beziehung von DNA-Synthese, Spaltung der DNA-Sonde und Veränderung des Fluoreszenzsignals bei der RTQ-PCR. **a)** Neben ihrer Synthesefunktion verfügt die Taq-Polymerase auch über eine 5'-Exonukleasefunktion. **b)** Eine Gen-Sonde (Probe) an die zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Reporter, Quencher) gebunden sind, hybridisiert an einer DNA-Matrize. Bei Anregung mit der Wellenlänge λ_1 (hier: grün) fluoresziert die Lösung in der spezifischen Wellenlänge λ_2 des Quenchers (hier: rot) **c)** Die Taq-Polymerase stößt auf die DNA-Sonde und trennt deren 5'-Ende mit dem gebundenen Reporterfarbstoff ab. Auf Anregung mit Licht der Wellenlänge λ_1 fluoresziert die Lösung nun vor allem in der Wellenlänge λ_1 , wie in den beiden schematisierten Fluoreszenzspektren am rechten Rand dargestellt. **d)** Vollständige Entfernung der DNA-Sonde. Da immer jeweils genau eine spezifisch hybridisierte Sonde bei jeder Amplifikationsreaktion gespalten wird verhält sich die Zunahme der λ_1 -Fluoreszenz proportional zur Menge der Reaktionsprodukte.

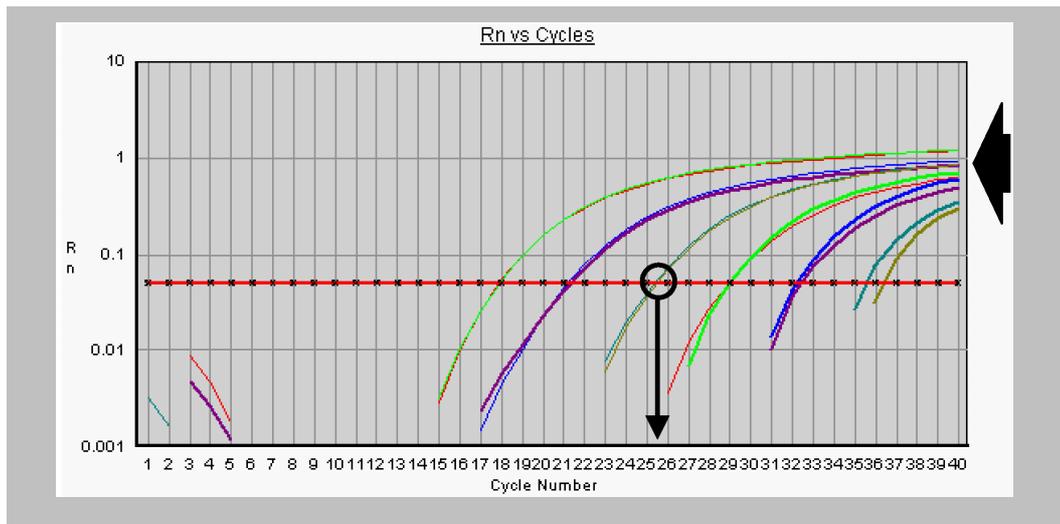


Abbildung 5 : Amplifikationsplots aus Bestimmungen von 18S in einer Verdünnungsreihe. Darstellung durch die Analysesoftware des RTQ-PCR-Cyclers. Gemessen wurden jeweils zwei Läufe aus insgesamt 6 Konzentrationsstufen. Vertikal ist die Fluoreszenzintensität (R_n) logarithmisch aufgetragen, horizontal die Anzahl der abgelaufenen PCR-Zyklen (Cycle Number). Der anfangs nahezu lineare Intensitätsanstieg wird gefolgt von einem Sättigungsniveau. Als rote Horizontale ist der gewählte Schwellenwert $R_n=0,05$ eingezeichnet, dessen Überschreiten den C_t -Wert determiniert (**Kreis/Pfeil**). An diesem Punkt sind die Schwesterkurven gut kongruent. In ihrer nach 40 Zyklen erreichten Fluoreszenzintensität unterscheiden sich die jeweiligen Schwesterkurven jedoch deutlich. Diese würden einer Konzentrationsbestimmung durch die Endpunktmethod zugrunde liegen (**großer Pfeil**).

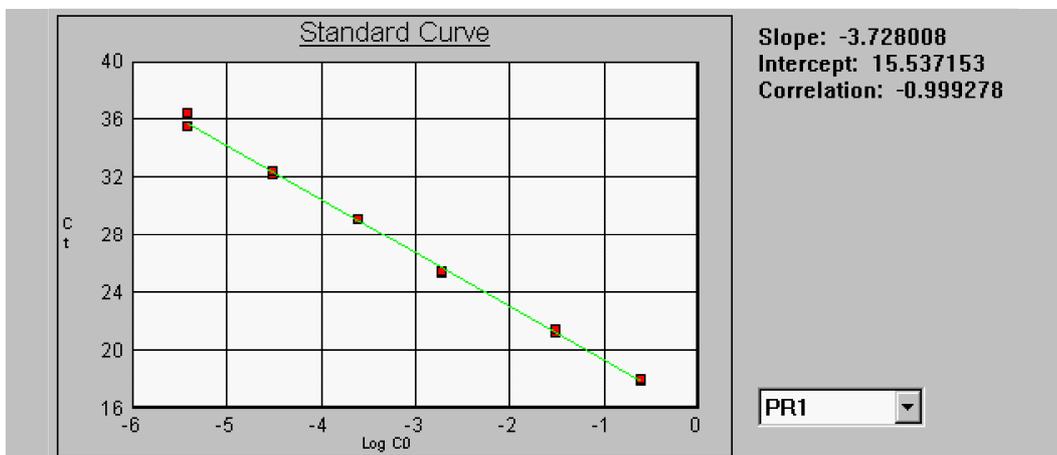


Abbildung 6 : Standardgerade. (Darstellung der Analysesoftware des RTQ-PCR-Cyclers). Die vorbekannten Konzentrationwerte sind halblogarithmisch gegen die ermittelten C_t -Werte aufgetragen. Steigung (slope), Achsverschiebung (intercept) und Regressionskoeffizient r^2 (Correlation) der Standardgeraden (standard curve) sind angegeben.

Der Fluoreszenzschwellenwert R_n muss so gewählt werden, dass er während der Phase der exponentiellen Fluoreszenz-Zunahme überschritten wird. Diese Phase stellt sich in einer halblogarithmischen Auftragung wie bei Abbildung 5 linear dar. Während vorheriger Untersuchungen hat sich in der Arbeitsgruppe ein Fluoreszenzschwellenwert R_n von 0.05

bewährt, der deshalb auch in dieser Arbeit gewählt wurde.

Trägt man die erhaltenen C_t -Werte einer Verdünnungsreihe gegen deren bekannte Konzentrationen auf, so erhält man durch Regression eine Standardgerade, wie sie als Beispiel in Abbildung 6 dargestellt ist. Sie wird beschrieben durch die Geradengleichung:

$$C_t = \log_{10}(\text{Ausgangskonzentration } c_0) * \text{Steigung} + \text{Achsverschiebung}$$

Anhand dieser Standardgeraden ist nun die Ausgangskonzentration c_0 eines Templates aus seinem C_t – Wert herleitbar. Dies wurde in Abbildung 7 am Beispiel der Bestimmung von RAD52 bei Patient 18 visualisiert. Durch Umstellung der Geradengleichung erhält man:

$$\text{Ausgangskonzentration } c_0 = 10^{(C_t - \text{Achsverschiebung}) / \text{Steigung}}$$

Weiter unten in Abschnitt 3.7.2 wird noch der Begriff *PCR-Effektivität* erläutert werden.

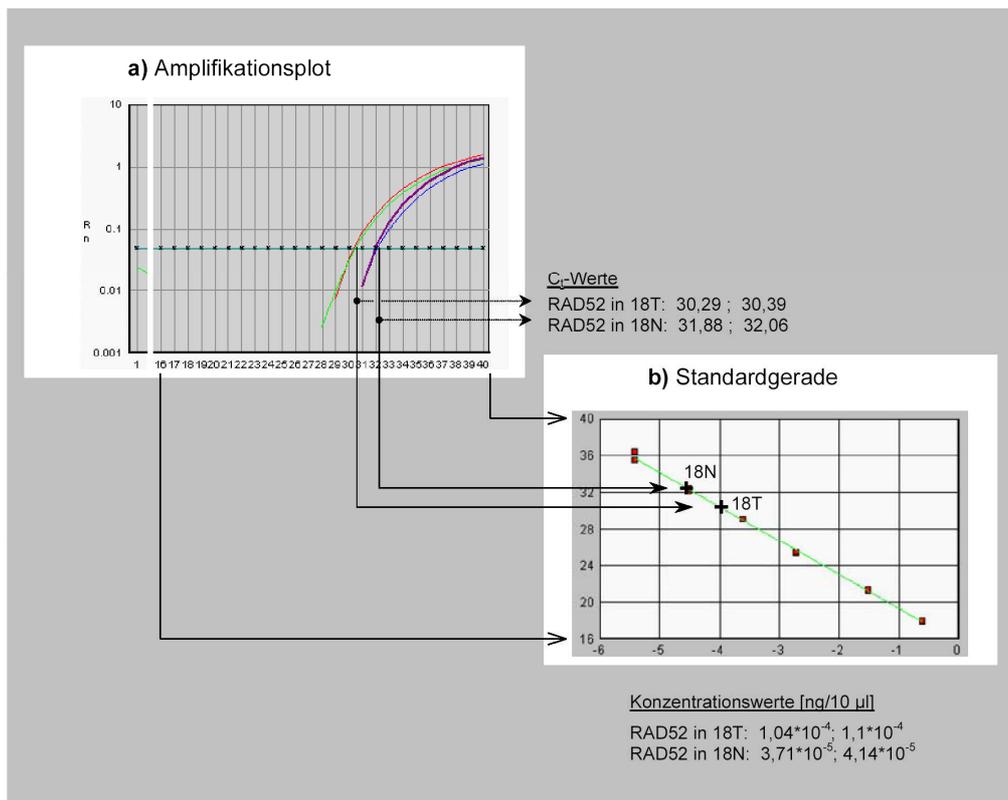


Abbildung 7: Bestimmung der Ausgangskonzentration c_0 anhand des C_t -Werts. (Beispiel: Expression des Gens RAD52 in Patient 18). **a)** jeweils zwei Amplifikationsplots aus dem Tumorgewebe (18T; grün + rot) und dem Normalgewebe (18N; violett + blau) sind dargestellt. Die jeweiligen Schwesterkurven kreuzen den Schwellenwert R_n an annähernd demselben Punkt **b)** Standardgerade aus Abbildung 6. Durch Auftragen der bei (a) ermittelten C_t -Werte auf den entsprechenden Abschnitt der Standardgerade lassen sich die unten angegebenen Konzentrationswerte ablesen.

3.6.2 Durchführung der RTQ-PCR

Die RTQ-PCR-Nachweisreaktionen wurden auf 96-Well-Platten durchgeführt. Auf jeder 96-Well-Platte wurde die Expression jeweils eines Gens im gesamten Patientenkollektiv (10 Seminome und 10 Nichtseminome = 20 Patienten) bestimmt. Für jeden Patienten wurde die Genexpression sowohl in seinem Tumorgewebe als auch in seinem Normalgewebe ermittelt (40 Expressionsbestimmungen). Jede Genexpressionsbestimmung wurde zweimal durchgeführt (80 Reaktionen). Gleichzeitig wurden zur Standardisierung auf jeder 96-Well-Platte sechs Stufen einer Verdünnungsreihe und eine Nullprobe (NTC = non-template control) in ebenfalls jeweils zwei Reaktionen mitbestimmt (14 Reaktionen). Auf diese Weise wurden bei jedem RTQ-PCR-Lauf 94 der 96 zur Verfügung stehenden Wells belegt. In Tabelle 3 ist der Reaktionsansatz für eine Reaktion (=1 Well) dargestellt.

Reagenz	Initiale		Volumen für eine Reaktion
	Konzentration	Endkonzentration	
MasterMix	2x	1x	15 µl
PPD	20x	1x	1,5 µl
Wasser			3,5 µl
Template	10 ng/ 10µl *		10 µl
			30 µl

Tabelle 3: Reaktionsansatz für eine RTQ-PCR Nachweisreaktion. Jeder Nachweis wurde im Doppelansatz geführt. Zusammen mit dem Überschuss für eine weitere Reaktion wurden die Ansätze für jeweils drei Reaktionen pipettiert. PPD= Primer-Probe-Design. (* cDNA Konzentration für 18S-Bestimmung 0,1 ng/10 µl)

Die Präparation einer 96 Well Platte erfolgte in den drei Arbeitsschritten: Vorbereitung der Templates, Herstellung der Taq-Chemien und Beschickung der 96-Well-Platte.

Vorbereitung der Templates

Das wie vorangehend in den Abschnitten 3.3 bis 3.5 vorbereitete Zellmaterial wurde über eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde es über 2 Minuten bei 95°C im Thermomixer inkubiert und danach auf Eis gelagert.

Herstellung der Taq-Chemien

Die Auftauzeit der tiefgefrorenen cDNA-Templates wurde zur Herstellung der Gesamtansätze der beiden verwendeten Taq-Chemien genutzt. Die Taq-Chemie umfasst alle Reagenzien eines Reaktionsansatzes ohne das Template. Ihre Zusammensetzung lässt sich aus den Volumenverhältnissen bei den Einzelreaktionen (in Tabelle 3 ersichtlich) herleiten.

Die Taq-Chemie für das untersuchte Gen wurde für 40 Expressionsbestimmungen benötigt. Für jede Bestimmung wurde das Volumen für drei Reaktionen à 30 µl veranschlagt, da jede Expressionsbestimmung zweifach durchgeführt wurde und noch ein weiteres Reaktionsvolumen als Überschuss notwendig war. Zur Kompensation von Benetzungsverlusten bei den nachfolgenden Pipettierarbeiten wurden nochmals 4x3 Reaktionsvolumina als Überschuss veranschlagt. Somit wurde ein Reaktionsansatz für insgesamt $40 \times 3 + 4 \times 3 = 132$ Reaktionen hergestellt. Dieser enthielt:

- 1980 µl (132 x 15 µl) MasterMix ,
- 198 µl (132 x 1,5 µl) des PPD zum Nachweis des untersuchten Gens sowie
- 462 µl (132 x 3,5 µl) Wasser.

Analog wurde die Taq-Chemie zur 18S-Bestimmung ausreichend für 24 Reaktionen angesetzt: Drei Reaktionsvolumina für je eine der sechs Stufen der Verdünnungsreihe sowie für die Nullprobe (3 x 7) und zusätzlich 3 Reaktionsvolumina im Überschuss:

- 360 µl (24 x 15 µl) MasterMix ,
- 36 µl (24 x 1,5 µl) des PPD zum Nachweis des untersuchten Gens sowie
- 84 µl (24 x 3,5 µl) Wasser.

Der MasterMix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Firma Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) und das Wasser wurden bei 4°C gelagert. Es wurde ausschließlich hochreines, RNase-freies Wasser verwendet. Die Primer-Probe-Designs wurden bei -70°C tiefgefroren aufbewahrt. Die Reagenzien wurde nun auf Eis bereitgelegt und zum Schutz vor Lichteinstrahlung abgedeckt. So wurden sie in einen RNase-freien Raum verbracht, um auch geringe Kontaminationen zu vermeiden. Weitere Maßnahmen zur Bewahrung der RNase-Freiheit beinhalteten die Benutzung von Einmalkitteln und Handschuhwechsel. Es wurden niemals von außerhalb eingebrachte Geräte oder nicht in diesem Raum entsiegelte Verbrauchsmaterialien verwendet. Die tiefgefrorenen Primer-Probe-Designs wurden langsam aufgetaut. Sämtliche Reagenzien wurden anschließend für 30 Sekunden gevortext und in einer

Tischzentrifuge abzentrifugiert. Dann wurden die Gesamtansätze der beiden Taq-Chemien unter strenger Beachtung der Regeln für steriles Arbeiten an einem Sterilarbeitsplatz (TemplateTamer®, Firma Q-BIOgene, Heidelberg, D) zusammenpipettiert.

Beschickung der 96-Well-Platte

Die folgenden Arbeiten wurden an einer Laminarstrom-Sterilbank durchgeführt. Zunächst wurden die beiden Taq-Chemie-Ansätze aliquotiert, wobei jeweils in einem 1,0 ml Reaktionsgefäß das Taq-Chemie-Volumen für 3 RTQ-PCR Reaktionen vorgelegt wurde. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, waren dies jeweils 60 µl (3 x (15 µl + 1,5 µl + 3,5 µl)). Auf diese Weise wurden 47 Reaktionsgefäße (40 Genexpressionsbestimmungen zum einen und 6 Stufen einer Verdünnungsreihe sowie eine Nullprobe zum anderen) vorbereitet, die danach auf Eis und lichtgeschützt aufbewahrt wurden. Nun wurde zu jedem dieser Reaktionsgefäße 3x10 µl Patiententemplate hinzugegeben. Dabei wurde jede Template-Lösung vor Entnahme der 30 µl für streng 30 Sekunden aufgevortext und abzentrifugiert. Die kompletten Reaktionsansätze wurden wiederum auf Eis und lichtgeschützt aufbewahrt. Jeder Reaktionsansatz wurde erneut für streng eine halbe Minute gevortext und abzentrifugiert. Danach wurden jeweils 30 µl des fertigen Reaktionsansatzes in zwei der 96 Wells eingebracht und der Rest verworfen. Nachdem die Platte vollständig beschickt war, wurde sie mit einer selbsthaftenden Folie abgedeckt und jedes Well damit luftdicht abgeschlossen. Abschließend wurde die Platte über zwei Minuten bei 1.400 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Design der RTQ-PCR-Reaktion

Die dieserart vorbereiteten 96-Well-Platten wurden in den RTQ-PCR-Cycler eingesetzt und die PCR-Reaktion nach dem in Tabelle 4 ersichtlichen Programm durchgeführt. Dabei diente die Stufe 1 (50°C über 2 Minuten) der Aktivierung der AmpErase® UNG, einer Nuklease, die Oligonukleotide abbaut. Die anschließende Stufe 2 (95°C über 10 Minuten) hatte zum einen die Deaktivierung der thermosensiblen AmpErase® UNG zum Ziel, zum anderen dient sie der Aktivierung der thermostabilen AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Diese ist durch eine Antikörperbindung blockiert, welche vor Beginn der Amplifikationszyklen durch Erhitzen gelöst werden muss (sog. „hot start“-Verfahren). So wird die Bildung von unerwünschten Polymeraseprodukten vor Durchführung der PCR verhindert. Sowohl AmpErase® Nuklease als auch AmpliTaq Gold® DNA Polymerase sind im verwendeten TaqMan® Universal MasterMix der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland enthalten.

Stufe	1	2	3	
Wiederholung	1x	1x	40 x	
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit [min]	2	10	1	1

Tabelle 4: Programmierung des RTQ-PCR Cyclers.

Gegenüber der werksseitigen Voreinstellung wurde dabei die Schmelzzeit bei 95 °C von 15 Sekunden auf das Vierfache verlängert, da so bei vorhergehenden Versuchen eine bessere PCR-Effektivität erreicht werden konnte.

Besonderheiten bei der Bestimmung von 18S und DNAPK

18S wurde in insgesamt drei Läufen in allen 40 Patienten-Templates bestimmt, um die späteren Ergebnisse normalisieren zu können. Da 18S, verglichen mit vielen anderen Genen, bekanntermaßen auf einem sehr hohem Niveau exprimiert wird, wurden die Templates zur 18S-Bestimmung mithilfe des Verdünnungspuffers (siehe 3.2.1) um den Faktor 100 verdünnt.

Für die Expressionsbestimmung von DNAPK war kein gebrauchsfertiges Primer-Probe-Design zu beziehen, weshalb ein entsprechendes Design entwickelt, bezogen und getestet wurde (siehe Abschnitt 3.2.3). Wie die üblicherweise in dieser Arbeit verwendeten gebrauchsfertigen PPD, lagen auch die Komponenten dieses PPD als 20-fache Lösung vor. Statt der 198 µl eines gebrauchsfertigen PPD für den Ansatz für 132 Reaktionen wurden jeweils 74,25 µl der Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 49,5 µl der Sonde eingesetzt.

Modifikationen des Protokolls

Alle nach dem vorangehend beschriebenen Protokoll durchgeführten Versuche wurden mit dem Suffix „SuNS“ gekennzeichnet. Aufgrund von Materialknappheit wurde im Laufe der Untersuchung entschieden, das zuvor beschriebene Protokoll hinsichtlich der eingesetzten Template-Menge zu verändern. Zunächst wurde die Template-Menge um ein Drittel reduziert; später wurde nur noch die Hälfte der Ausgangsmenge verwendet. Die mit diesen Modifikationen durchgeführten Versuche wurden mit den Suffixen „eco“ (2/3 Ursprungsmenge) und

Reagenz	Initiale Konzentration	Endkonzentration	Volumen [μ l] für			
			1	3	24	132
Reaktionen						
<u>Protokoll „SuNS“</u>						
MasterMix	2x	1x	15	45	360	1980
PPD	20x	1x	1,5	4,5	36	198
Wasser			3,5	10,5	84	462
Template	10 ng/ 10 μ l *		10	30	240	1320
			30	90	720	3960
<u>Protokoll „eco“</u>						
MasterMix	2x	1x	15	45	360	1980
PPD	20x	1x	1,5	4,5	36	198
Wasser			6,83	20,5	164	902
Template	6,67 ng/ 10 μ l *		6,67	20	160	880
			30	90	720	3960
<u>Protokoll „seco“</u>						
MasterMix	2x	1x	15	45	360	1980
PPD	20x	1x	1,5	4,5	36	198
Wasser			8,5	25,5	204	1122
Template	5 ng/ 10 μ l *		5	15	120	660
			30	90	720	3960

Tabelle 5: Zusammenschau der Reaktionsansätze und der daraus resultierenden Pipettierolumina gemäß den Versuchsprotokollen „SuNS“, „eco“ und „seco“. Unterschiede zwischen den Protokollen sind *kursiv* gesetzt. PPD= Primer-Probe-Design. (* Initiale Konzentration für 18S-Nachweis um den Faktor 100 verdünnt)

„seco“ (1/2 Ursprungsmenge) gekennzeichnet. Die Veränderungen, die sich hieraus für die oben angeführten Pipettierolumina ergaben sind aus Tabelle 5 ersichtlich. Die Pipettierolumina für die Herstellung der Taq-Chemien lassen sich hier aus den Spalten für 24 Reaktionen (Taq-Chemie für 18S-Bestimmung und Nullprobe) und für 132 Reaktionen (Taq-Chemie zur die Expressionsbestimmung des untersuchten Gens) ablesen.

Die Pipettierolumina für die Beschickung der 96-Well-Platte sind der Spalte für 3 Reaktionen zu entnehmen: Beim ursprünglichen Protokoll „SuNS“ wurden 60 µl aus dem Gesamtansatz der Taq-Chemie (entsprechend: 45 µl MasterMix + 4,5 µl Primer-Probe-Design + 10,5 µl Wasser) vorgelegt und mit 30 µl Template ergänzt. Beim Protokoll „eco“ wurden 70 µl vorgelegt und mit 20 µl Template ergänzt. Beim Protokoll „seco“ kamen 15 µl Template zu einer Vorlage von 75 µl Taq-Chemie.

3.6.3 Verdünnungsreihen

Zu Standardisierungszwecken wurde aus dem vergleichsweise reichlich vorhandenem Tumor-Template des Patienten 7 eine Verdünnungsreihe erstellt. Das Template lag wie oben beschrieben photometrisch auf 10 ng/10 µl cDNA eingestellt vor. Nach dem Auftauen wurde das gesamte Template zunächst bei 95°C über 2 Minuten denaturiert und anschließend über 30 Sekunden geschüttelt. Danach wurden 22,5 µl dieser cDNA-Lösung mit der Pipette

Stufe	cDNA [ng/10 µl]	Stufe	cDNA [ng/10 µl]
2	0,5	12	0,0004882
3	0,25	13	0,0002441
4	0,125	14	0,0001221
5	0,0625	15	0,00006104
6	0,03125	16	0,00003052
7	0,01563	17	0,00001526
8	0,007813	18	0,000007629
9	0,003906	19	0,000003815
10	0,001953	20	0,000001907
11	0,0009766		

Tabelle 6: Konzentrationsstufen der verwendeten Verdünnungsreihen. Rundung auf eine vierstellige Mantisse.

abgehoben und einer Vorlage von 427,5 µl Puffer 2 beigegeben, was einer Verdünnung um den Faktor 20 entsprach. Diese Verdünnungsstufe wurde als „Stufe 2“ bezeichnet. Entsprechend den Stufen 3-20 wurden 18 Reaktionsgefäße vorbereitet, in denen jeweils 225 µl Puffer 2 vorgelegt wurde. Fortlaufend wurde nun 250 µl aus der zuletzt hergestellten Verdünnungsstufe zu der nächsten übergehoben und über jeweils 30 Sekunden geschüttelt. Jede Stufe dieser Reihe entsprach demnach einer weiteren Verdünnung um den Faktor 2. Die solcherart hergestellten Verdünnungsreihen wurden bei -70°C aufbewahrt.

3.7 Auswertung

Sämtliche Berechnungen wurden mithilfe der Software Excel 2000 der Firma Microsoft, USA und SigmaPlot 2000 V 6.0 der Firma Systat Software GmbH, 40699 Erkrath, Deutschland (vormals SPSS Science) ausgeführt.

3.7.1 Standardisierung

Bei jedem RTQ-PCR Versuch wurden auf derselben 96-Well-Platte die Ct-Werte von jeweils 6 Stufen einer Verdünnungsreihe mitbestimmt. Es wurde jeweils ein Bereich von 16 Verdünnungsstufen (Stufen 2-18; 3-19 oder 4-20; entspricht jeweils 4,8 Log-Stufen) abgedeckt. Mithilfe der bekannten Konzentrationswerte [ng/10 µl] wurde durch die Analysesoftware des RTQ-PCR-Cyclers eine Standardgerade (Abbildung 6) errechnet.

3.7.2 Überprüfung der Standardgeraden

Um den regelrechten Ablauf aller Amplifikationsversuche sowie deren Vergleichbarkeit untereinander sicherzustellen, wurden die Kennzahlen ihrer jeweiligen Standardgeraden gegenübergestellt (Tabelle 7). Die Regressionskoeffizienten r^2 für die jeweiligen Standardgeraden lagen im Mittel bei -0,9992, wobei die geringste Korrelation mit -0,99586 bei der Expressionsbestimmung von Caspase 3 festgestellt wurde. Somit wurden die Stichprobenwerte durch die berechnete Standardkurve sehr genau wiedergegeben. Ein Regressionskoeffizient von größer 0,990 wird als ausreichend angesehen, um regelrechte Versuchsbedingungen anzuzeigen (PFAFFL 2001). Da diese gute Korrelation für eine Standardgerade ermittelt wurde, ist zugleich die Linearität für den untersuchten Konzentrationsbereich gezeigt.

3 Material und Methoden

Versuch	Protokoll, Faktor * Verdünnungsreihe	Steigung	Achsverschiebung	r ²
18S_in_9-H	SuNS, 1 * Std-MCF7-alt	-3,726	18,780	-0,99918
18S_in_K-R	SuNS, 1 * Std-MCF7-alt	-3,474	18,830	-0,99888
18S_in_S-W	SuNS, 1 * Std-MCF7-alt	-3,387	18,849	-0,99909
		Mittelwert:	18,820	
		(Stdabw.:	0,0356)	
BAX	seco, 1/2 * Std-7T	-3,627	16,237	-0,99936
ERCC1	seco, 1/2 * Std-7T	-3,655	16,110	-0,99909
Last_bus	seco, 1/2 * Std-7T	-3,641	16,350	-0,99921
NME1	seco, 1/2 * Std-7T	-3,457	16,655	-0,99754
PCNA	seco, 1/2 * Std-7T	-3,508	16,465	-0,99966
		Mittelwert:	16,363	
		(Stdabw.:	0,210)	
CASP3	eco, 2/3 * Std-7T	-3,481	16,033	-0,99586
CASP4	eco, 2/3 * Std-7T	-3,414	15,998	-0,99716
CDK2	eco, 2/3 * Std-7T	-3,637	15,776	-0,99964
CDKN1A	eco, 2/3 * Std-7T	-3,690	15,508	-0,99879
CLU	eco, 2/3 * Std-7T	-3,540	15,869	-0,99948
FASTK	eco, 2/3 * Std-7T	-3,682	15,818	-0,99907
GADD45A	eco, 2/3 * Std-7T	-3,517	16,012	-0,99962
GSTA2	eco, 2/3 * Std-7T	-3,714	15,567	-0,99888
NFRKB	eco, 2/3 * Std-7T	-3,5710	15,964	-0,99965
RAD23a	eco, 2/3 * Std-7T	-3,567	15,995	-0,99966
RAD50	eco, 2/3 * Std-7T	-3,712	15,728	-0,99966
TNFRSF6	eco, 2/3 * Std-7T	-3,421	15,896	-0,99901
TNFSF10	eco, 2/3 * Std-7T	-3,570	15,836	-0,99985
TNFSF6	eco, 2/3 * Std-7T	-3,635	15,535	-0,99982
TP53ii	eco, 2/3 * Std-7T	-3,675	15,999	-0,99984
XRCC5	eco, 2/3 * Std-7T	-3,596	15,762	-0,99970
		Mittelwert:	15,831	
		(Stdabw.:	0,175)	
BAD_Nseminome	SuNS, 1 * Std-7T	-3,551	15,259	-0,99965
BAD_Seminome	SuNS, 1 * Std-7T	-3,513	15,386	-0,99983
CCND1	SuNS, 1 * Std-7T	-3,533	15,399	-0,99967
CCND2	SuNS, 1 * Std-7T	-3,506	15,286	-0,99939
CCND3	SuNS, 1 * Std-7T	-3,636	15,362	-0,99935
CDK4	SuNS, 1 * Std-7T	-3,669	15,254	-0,99985
		Mittelwert:	15,324	
		(Stdabw.:	0,066)	
		Mittelwerte, alle:	-3,577 ;	-0,99918
		(Stdabw.:	0,096 ;	8,83E-04)

Tabelle 7: Steigung (slope) und Achsenverschiebung (intercept) der Standardkurven aus sämtlichen Versuchen. Angewendetes Versuchsprotokoll und resultierender Verdünnungsfaktor (Abschnitt 3.6.2), verwendete Verdünnungsreihe (Abschnitt 3.7.3).

Die Steigung (slope) einer Standardgeraden ist Ausdruck der Effektivität der PCR-Reaktion. Ihr Betrag gibt an, wie viele Amplifikationszyklen benötigt werden, um die Kopienanzahl eines Templates zu verzehnfachen. Die Steigungen der Standardkurven der vorliegenden Versuche lagen im Durchschnitt bei -3,577 und variierten dabei untereinander kaum (Standardabweichung $8,8 * 10^{-4}$). Bei einer idealen Reaktion würde die Kopienanzahl in jeder Amplifikationrunde verdoppelt und die Kopienzahl nähme mit $2^{\text{Anzahl der Zyklen}}$ zu. Für diesen Fall wäre die Steigung mit $-3,322$ zu berechnen ($= -1/\log_{10} 2$). Tatsächlich wurde die Kopienanzahl nicht vollständig verdoppelt, was einer Effizienz von 100% entspräche. Die cDNA vermehrte sich pro Zyklus durchschnittlich um das 1,904-fache ($= 10^{-1/\text{slope}}$). Im Laufe der PCR-Reaktion nahm die Kopienanzahl also entsprechend dem Faktor $1,904^{\text{Anzahl der Zyklen}}$ zu. Die RTQ-PCR-Effizienz der vorliegenden Untersuchungen betrug demnach 90,4%, was einem normalen Reaktionsablauf entspricht (PFAFFL 2001). Durch die sehr hohe Konstanz der Steigungswerte sind die konstanten Reaktionsbedingungen für die einzelnen Versuche sichergestellt.

3.7.3 Korrekturfaktor für unterschiedliche Verdünnungsreihen

Als Referenz zur Standardisierung der 18S-Bestimmungen wurde zunächst eine vorbestehende cDNA Verdünnungsreihe herangezogen, die aus einer MCF-7 – Fibromzelllinie hergestellt wurde (Bezeichnung „Std-MCF-7-alt“).

Zur Standardisierung der im Verlauf der weiteren Untersuchung bestimmten Genexpressionswerte musste eine andere Verdünnungsreihe verwendet werden, die aus der cDNA der Tumor-Templates des Patienten 7 hergestellt wurde (Bezeichnung „Std-7T“).

Anhand der differierenden y-Achsenverschiebungen der Standardkurven aus den Versuchen nach den Protokollen „SuNS“, „eco“ und „seco“ (siehe 3.6) lässt sich auf die unterschiedliche cDNA-Kopienanzahl in den eingesetzten Verdünnungsreihen schliessen. So liegen zwischen den korrespondierenden Konzentrationsmessungen mit dem Protokoll eco und dem Protokoll SuNS 0,5067 PCR-Zyklen ($=$ Differenz der „intercept“-Werte), zwischen den Konzentrationsmessungen mit dem Protokoll seco und dem Protokoll SuNS 1,0391 PCR-Zyklen, was mit den zu erwartenden Unterschieden durch die Verdünnung übereinstimmt. Zwischen den y-Achsenverschiebungen der Standardkurven aus den Verdünnungsreihen Std-MCF-alt und Std-7T nach dem Protokoll SuNS besteht ein Unterschied von 3,4956 PCR-Zyklen. Damit ist das Verhältnis korrespondierender 18S – Konzentrationen

$c_{\text{Std-MCF7-alt}} / c_{\text{Std-7T}} = 0,1054$ ($= 10^{\Delta_{\text{intercept}} / \text{slope}}$). Mit dem Kehrwert aus diesem Quotienten wurden deshalb alle mithilfe der Verdünnungsreihe Std-MCF7-alt ermittelten Konzentrationswerte multipliziert, um sie mit den übrigen Konzentrationswerten vergleichbar zu machen.

3.7.4 Normalisierung

In sämtlichen Patienten-Templates wurde die Expression von 18S bestimmt und zur Ergebnisnormalisierung (als externer Standard) verwendet. So wurden sämtliche cDNA-Konzentrationswerte durch die 18S-Konzentration desselben Templates geteilt. Die hieraus hervorgehenden Werte werden als *Absolute Expression* bezeichnet und sind dimensionslos.

Beispielsweise beträgt die Absolute Expression von RAD52 bei Patient 18

$$\begin{aligned} \text{im Tumorgewebe: } & 1,10 * 10^{-4} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} / 7,97 * 10^{-2} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} = \underline{1,38 * 10^{-3}}, \text{ bzw.} \\ & 1,04 * 10^{-4} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} / 7,97 * 10^{-2} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} = \underline{1,30 * 10^{-3}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{im Normalgewebe: } & 3,71 * 10^{-5} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} / 9,33 * 10^{-2} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} = \underline{3,98 * 10^{-4}}, \text{ bzw.} \\ & 4,14 * 10^{-5} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} / 9,33 * 10^{-2} \text{ [ng/10 } \mu\text{l]} = \underline{4,44 * 10^{-4}} \end{aligned}$$

3.7.5 Differentielle Expression

Um zu untersuchen, wie sich der Expressionszustand eines Gens änderte, abhängig davon ob man das Normal- oder das Tumorgewebe betrachtete, wurde die *Differentielle Expression* (*dE*) berechnet. Die wie oben beschrieben bereits standardisierten und normalisierten *absoluten Expressionswerte* eines Gens sowohl im Tumorgewebe als auch im Normalgewebe eines Patienten wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. Es wurden immer beide Absoluten Expressionswerte im Tumorgewebe einzeln durch den Mittelwert aus beiden Absoluten Expressionswerten im Normalgewebe geteilt. So erhielt man beispielsweise für das Gen RAD52 in Patient 18 die Differentielle Expression:

$$\begin{aligned} 1,38 * 10^{-3} / 4,21 * 10^{-4} &= \underline{3,28} \\ 1,30 * 10^{-3} / 4,21 * 10^{-4} &= \underline{3,10} \end{aligned}$$

Bei Patient 18 wurde das Gen RAD52 im Tumorgewebe um mehr als das dreifache stärker exprimiert als im Normalgewebe.

Die *Differentielle Expression* ist eine gängige Maßzahl zur Beschreibung von Expressionsänderungen. Bei graphischen Darstellungen muss sie allerdings logarithmisch aufgetragen werden, um beispielsweise eine Hochregulation um das Fünffache (entspricht dE von 5,0) und eine Herunterregulation auf ein Fünftel (entspricht einer dE von 0,2) gleich groß abzubilden. Eine alternative Möglichkeit Expressionsverhältnisse darzustellen ist der Logarithmus der differentiellen Expression (LER, *engl.* log expression ratio). Die LER kann linear aufgetragen werden, ohne die oben beschriebenen Verzerrungen aufzuweisen.

Sämtliche weiteren Berechnungen (Standardabweichung, Signifikanz, Mittelwerte) wurden mit der LER durchgeführt und die Ergebnisse anschließend wieder in die differentielle Expression umgerechnet (siehe Abbildung 8).

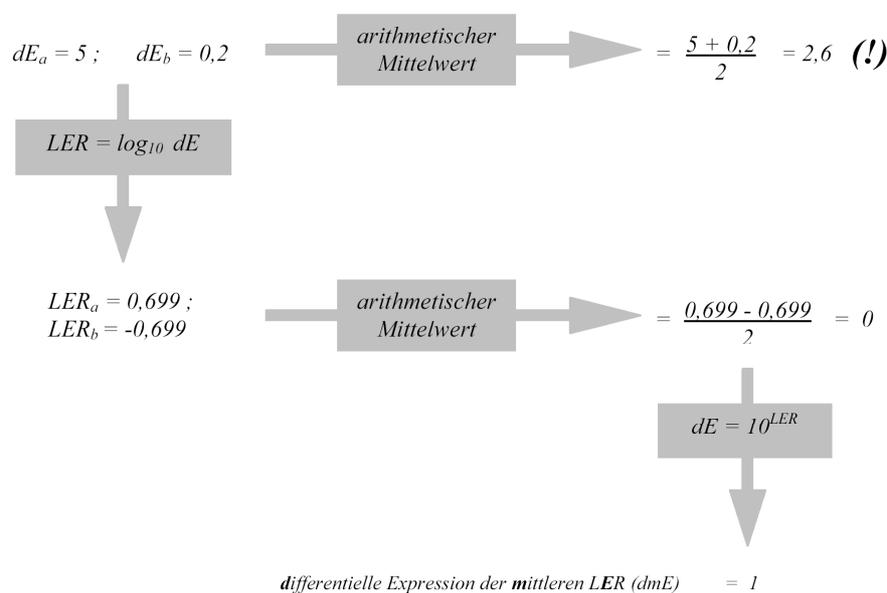


Abbildung 8: Rechenweg für die Berechnung der „differentiellen Expression der mittleren LER“ (dmE). Das arithmetische Mittel aus differentiellen Expressionswerten ergibt keine sinnvollen Ergebnisse. Deshalb wurden für weitere Berechnungen die dE stets in die LER umgerechnet.

Anderenfalls würde es zu ungewünschten Verzerrungen kommen. So wäre der Mittelwert aus beiden oben genannten differentiellen Expressionswerten 2,6. Dieses Ergebnis spiegelt die Tatsache, dass es sich um gegensätzliche aber gleichstarke Expressionsänderungen handelt nicht wider. Der Mittelwert, der auf dem Umweg über die LER berechnet wird, soll deshalb im Folgenden *dmE*, *differentielle Expression der mittleren LER* genannt werden. Mit ihr erhält man im gleichen Fall ein sinnvolles Ergebnis von $dmE = 1$. Analoge Effekte ergäben sich auch bei den Errechnungen von Standardabweichung, Signifikanz, etc.

3.7.6 Schwellenwerte

Eine differentielle Expression von $< 0,5$ wurde als „herunterreguliert“ bezeichnet und gewertet; analog eine differentielle Expression von $> 2,0$ als „hochreguliert“. Der Bereich der differentiellen Expression zwischen diesen beiden Schwellenwerten (*engl.* threshold levels) wurde als „Kontrollbereich“ bezeichnet.

Die Expression von RAD52 durch Patient 18 wurde bei einer differentiellen Expression von mehr als 3 daher als *hochreguliert* gewertet.

3.7.7 Ähnlichkeitsberechnungen

Ausgehend von den untersuchten 37 Genen wurde bei jedem untersuchten Patienten ein Maß der Ähnlichkeit (Proximität) zu jedem anderen untersuchten Patienten bestimmt, was für 19 Patienten ($n=19$; $\frac{n(n-1)}{2} = 171$) 171 Einzelwerte ergab. Diese Berechnungen wurden nach den bei Backhaus (BACKHAUS 2003) beschriebenen Methoden durchgeführt.

	<u>Binäres Merkmal:</u>	
	„auf“	„ab“
<u>Eigenschaft:</u>		
hochreguliert	<i>wahr</i>	<i>falsch</i>
im Kontrollbereich	<i>falsch</i>	<i>falsch</i>
herunterreguliert	<i>falsch</i>	<i>wahr</i>

Tabelle 8: Kodierung der drei möglichen Eigenschaften der Genexpression durch zwei binäre Merkmale.

Den Proximitätsberechnungen lagen die gemäß Abschnitt 3.7.4 bewerteten Daten zugrunde, was zu einer Datenmatrix von 19 Objekten (Patienten) mit 37 verschiedenen Eigenschaften (Genen), die drei verschiedene Zustände annehmen können (hochreguliert, im Kontrollbereich, herunterreguliert) führte. Diese drei Zustände wurden durch zwei binäre Merkmale („auf“ und „ab“) abgebildet (Tabelle 8).

Diese aus 37 Eigenschaften hervorgehenden 74 binären Merkmale jedes Patienten wurden jeweils für ein Patientenpaar miteinander verglichen. Für jedes verglichene Merkmal resultierte einer der vier Fälle a, b, c oder d, die in Tabelle 9 erläutert sind.

		Patient j :	
		Merkmal wahr	Merkmal falsch
Patient i:	Merkmal wahr	<i>a</i>	<i>c</i>
	Merkmal falsch	<i>b</i>	<i>d</i>

Tabelle 9: Vierfeldertafel für den Vergleich eines binären Merkmals.

Der Ähnlichkeitskoeffizient S_{ij} für das Patientenpaar wurde dann nach der „simple – matching“ – Methode

$$S_{ij} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

errechnet. Die Summe der resultierenden Fälle $a + b + c + d$ war dabei immer 74, da die beiden Eigenschaften „herunterreguliert“ und „hochreguliert“ 37mal verglichen wurden. Der nach dieser Methode bestimmte Ähnlichkeitskoeffizient wird auch als M – Koeffizient bezeichnet. Er ist der Quotient aus der Anzahl der Merkmalsvergleiche mit dem Ergebnis a (= übereinstimmend wahr) und d (= übereinstimmend falsch) zu der Gesamtzahl der verglichenen Merkmale. Der Ähnlichkeitskoeffizient nimmt einen Wert zwischen 1 (vollkommene Übereinstimmung aller Merkmale) und 0 (kein Merkmal stimmt überein) an.

Dabei wurde folgende Gewichtung vorgenommen (siehe Tabelle 10): Das Übereinstimmen von zwei Expressionseigenschaften – etwa wenn beide Patienten das verglichene Gen im Kontrollbereich exprimierten – ging mit dem Wert 2 in den Zähler für die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten ein, da beide binären Merkmale des Gens übereinstimmten. War jedoch beispielsweise bei Patient_i ein Gen hochreguliert, während dieses Gen von Patient_j im Kontrollbereich exprimiert wurde, so ging dies nur mit einer 1 in den Zähler ein. Das resultierte aus der Tatsache, dass die beiden Patienten das binäre Merkmal „ab“ des verglichenen Genes übereinstimmend nicht aufwiesen, was dem Fall „d“ entsprach.

		Patient j					
		hoch-reguliert		im Kontrollbereich		herunter-reguliert	
binär		„auf“ =1	„ab“ =0	„auf“ =0	„ab“ =0	„auf“ =0	„ab“ =1
Patient i	hoch-reguliert	„auf“=1 <u>a</u>	„ab“=0 <u>d</u>	„auf“=0 c	„ab“=0 <u>d</u>	„auf“=0 c	„ab“=1 b
	im Kontrollbereich	„auf“=0 b	„ab“=0 <u>d</u>	„auf“=0 <u>d</u>	„ab“=0 <u>d</u>	„auf“=0 <u>d</u>	„ab“=1 b
herunter-reguliert	„auf“=0 b	„ab“=0 c	„auf“=0 <u>d</u>	„ab“=0 c	„auf“=0 <u>d</u>	„ab“=1 <u>a</u>	

Tabelle 10: Vergleich der Expressionseigenschaften eines Gens zweier Patienten miteinander. Die drei möglichen Eigenschaften sind als zwei binäre Merkmale „auf“ und „ab“ kodiert. Für jeden Vergleich einer Eigenschaft resultieren so zweimal die Fälle a, b, c oder d (siehe Tabelle 9). Nur die Fälle a und d (unterstrichen) gehen in den Zähler für die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten ein (unterstrichen).

Entsprechend wurde die Hoch- oder Herunterregulation eines Gens des Patienten_i im Vergleich mit der Expression dieses Gens „im Kontrollbereich“ durch Patient_j als ähnlicher gewertet als eine gegensätzliche Expression (z.B: Patient_i hoch- und Patient_j herunterreguliert), aber als weniger ähnlich als ein Übereinstimmen (z.B: Patient_i hochreguliert sowie Patient_j hochreguliert) beider Eigenschaften. Auf diese Weise ging der ordinale Zusammenhang der drei Expressionszustände (herunterreguliert < im Kontrollbereich < hochreguliert) mit in die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten ein.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich von Seminomen und Nichtseminomen

4.1.1 Absolute Expression

Die durchschnittliche absolute Expression in Tumorgewebe und Normalgewebe, unterteilt nach Seminomen und Nichtseminomen ist in Tabelle 11 dargestellt.

Variabilität der absoluten Expression

Die absolute Expression der untersuchten Gene im Tumor- und Normalgewebe von Seminomen und Nichtseminomen variierte mit einer relativen Standardabweichung von durchschnittlich 64% (SD 27%). Sie reichte von 27% (BCL-2 im Tumorgewebe der Seminome) bis 235% (Cyclin E1 im Normalgewebe der Seminome). Die relative Standardabweichung der absoluten Expression im Tumorgewebe war im Mittel mit 68% (SD 27%) signifikant höher als mit 60% (SD 27%) im Normalgewebe ($p=0,021$). Im Normalgewebe war die durchschnittliche relative Standardabweichung bei den Seminomen mit 58% (SD 33%) kaum anders als bei den Nichtseminomen mit 61% (SD 20%) ($p=0,27$). Anders im Tumorgewebe, wo die Standardabweichung der Nichtseminome im Durchschnitt mit 77% (SD 26%) hochsignifikant höher war als mit 59% (SD 25%) bei den Seminomen ($p=0,00012$).

Unterschiede der absoluten Genexpression

Im Normalgewebe wurde für jedes Gen eine Ratio (siehe Tabelle 11) der durchschnittlichen absoluten Expression in Seminomen und in Nichtseminomen gebildet. Diese lag zwischen 0,4 (GPX 2, NME1 und BAX) und 2,7 (Cyclin E1). Im Mittel war die absolute Expression im Normalgewebe der Nichtseminome um den Faktor 0,88 (SD 55%) niedriger als bei den Seminomen. Der Unterschied war mit $p=0,25$ nicht signifikant. Signifikant war ein solcher Unterschied in 14 Fällen bei der Betrachtung der einzelnen Gene (siehe Tabelle 11). Dabei wurden 3 Gene vermehrt im Normalgewebe der Seminome exprimiert (Ratio 1,7: BAG1; 1,6: TNFL ; 1,5: FasR) und 11 Gene vermehrt im Normalgewebe der Nichtseminome exprimiert (Ratio 0,4: GPX2, NME1, BAX; 0,5: Cyclin D3, RAD52; 0,6: Cyclin D1, cdk4, cdk2; 0,7: GADD45A).

	Tumorgewebe			Normalgewebe			T/N
	Seminome	Nichtseminome	Ratio, p-Wert	Seminome	Nichtseminome	Ratio, p-Wert	
NSMAF	8,1E-04 (± 56%)	5,5E-04 (± 63%)	1,5 0,055	2,8E-04 (± 67%)	3,7E-04 (± 69%)	0,8 0,23	0,2
SMPD3	4,1E-05 (± 49%)	3,1E-05 (± 60%)	1,3 0,12	2,1E-04 (± 60%)	2,0E-04 (± 77%)	1,1 0,81	0,1
TNFR	5,5E-04 (± 46%)	2,9E-04 (± 72%)	1,9 * 0,0013	2,2E-04 (± 72%)	1,4E-04 (± 59%)	1,6 * 0,05	0,1
FasL	6,1E-05 (± 52%)	3,3E-05 (± 77%)	1,9 ** 0,0039	1,8E-05 (± 94%)	9,6E-06 (± 110%)	1,9 0,067	0
FasR	3,4E-04 (± 43%)	2,8E-04 (± 34%)	1,2 0,2	4,7E-04 (± 50%)	3,1E-04 (± 28%)	1,5 ** 0,0093	-0,1
FasTK	1,1E-04 (± 88%)	8,9E-05 (± 69%)	1,3 0,4	1,3E-04 (± 53%)	1,2E-04 (± 56%)	1,1 0,71	0,1
BCL2	2,0E-04 (± 27%)	2,6E-04 (± 75%)	0,8 0,2	3,4E-04 (± 39%)	3,8E-04 (± 44%)	0,9 0,39	0,1
BAG1	3,5E-04 (± 30%)	4,1E-04 (± 37%)	0,9 0,18	2,0E-03 (± 58%)	1,2E-03 (± 59%)	1,7 * 0,012	-0,2
BAX	4,6E-03 (± 57%)	7,1E-03 (± 103%)	0,6 0,18	1,8E-03 (± 48%)	4,3E-03 (± 84%)	0,4 ** 0,0066	-0,2
BAD	9,6E-05 (± 48%)	9,5E-05 (± 59%)	1,0 0,95	3,4E-04 (± 60%)	2,4E-04 (± 49%)	1,5 0,055	-0,2
CASP3	1,9E-04 (± 41%)	2,8E-04 (± 57%)	0,7 * 0,039	1,5E-04 (± 34%)	1,8E-04 (± 72%)	0,8 0,31	0,1
CASP4	9,0E-06 (± 51%)	9,8E-06 (± 85%)	0,9 0,71	2,3E-06 (± 82%)	2,7E-06 (± 109%)	0,9 0,65	0
CyclinD1	2,8E-04 (± 33%)	2,4E-03 (± 113%)	0,1 ** 0,0021	5,5E-04 (± 45%)	9,3E-04 (± 62%)	0,6 * 0,013	0,7
CyclinD2	6,2E-03 (± 131%)	8,7E-03 (± 170%)	0,7 0,54	1,2E-03 (± 71%)	1,7E-03 (± 99%)	0,7 0,26	0
CyclinD3	6,3E-04 (± 45%)	1,8E-03 (± 71%)	0,3 *** 0,0005	7,2E-04 (± 45%)	1,4E-03 (± 56%)	0,5 ** 0,0012	0,2
cdk4	7,1E-03 (± 41%)	1,2E-02 (± 76%)	0,6 * 0,045	4,7E-03 (± 49%)	7,9E-03 (± 66%)	0,6 * 0,023	0
CyclinE1	7,5E-04 (± 78%)	1,4E-03 (± 92%)	0,5 0,066	2,5E-03 (± 235%)	9,4E-04 (± 57%)	2,7 0,24	-0,2
cdk2	2,9E-04 (± 59%)	3,7E-04 (± 79%)	0,8 0,33	2,3E-04 (± 56%)	3,7E-04 (± 50%)	0,6 * 0,012	-0,1
PCNA	2,0E-03 (± 43%)	2,5E-03 (± 71%)	0,8 0,34	1,9E-03 (± 46%)	1,7E-03 (± 47%)	1,2 0,33	0
p21	7,5E-04 (± 68%)	1,7E-03 (± 89%)	0,4 * 0,015	1,8E-03 (± 49%)	2,8E-03 (± 57%)	0,6 * 0,027	0,2
p53	3,3E-03 (± 59%)	7,2E-03 (± 100%)	0,5 * 0,032	3,6E-03 (± 57%)	5,8E-03 (± 67%)	0,6 * 0,044	0,1
GADD45A	2,0E-04 (± 40%)	9,7E-04 (± 79%)	0,2 *** 0,0001	4,2E-04 (± 39%)	6,2E-04 (± 52%)	0,7 * 0,026	0,5
RAD23a	1,5E-03 (± 58%)	1,7E-03 (± 69%)	0,9 0,49	2,6E-03 (± 54%)	2,5E-03 (± 43%)	1,0 0,91	0,1
ERCC1	2,2E-03 (± 79%)	4,7E-03 (± 111%)	0,5 0,059	4,4E-03 (± 61%)	7,5E-03 (± 79%)	0,6 0,053	0,1
RAD52	2,3E-04 (± 96%)	3,1E-04 (± 125%)	0,7 0,43	1,1E-04 (± 39%)	2,1E-04 (± 61%)	0,5 ** 0,0031	-0,2
RAD51	1,1E-03 (± 68%)	5,4E-04 (± 74%)	2,1 * 0,0049	7,9E-04 (± 70%)	6,1E-04 (± 58%)	1,3 0,25	0,2
RAD50	5,1E-04 (± 31%)	7,1E-04 (± 43%)	0,7 * 0,016	1,1E-03 (± 34%)	1,1E-03 (± 30%)	1,0 0,94	0,1
Ku70	4,6E-05 (± 48%)	4,2E-05 (± 71%)	1,1 0,64	6,1E-05 (± 56%)	6,6E-05 (± 51%)	0,9 0,66	0
Ku80	5,8E-03 (± 50%)	6,5E-03 (± 78%)	0,9 0,62	4,5E-03 (± 45%)	5,6E-03 (± 47%)	0,8 0,14	-0,1
DNAPK	3,4E-03 (± 44%)	4,5E-03 (± 79%)	0,8 0,24	2,7E-03 (± 35%)	3,3E-03 (± 49%)	0,8 0,18	0
GPX2	5,5E-04 (± 71%)	4,4E-04 (± 85%)	1,3 0,34	2,1E-04 (± 43%)	5,2E-04 (± 104%)	0,4 * 0,021	-0,3
GSTA2	6,9E-05 (± 132%)	1,5E-04 (± 89%)	0,5 * 0,041	1,2E-03 (± 45%)	1,7E-03 (± 56%)	0,7 0,059	0,2
PRKR	2,4E-03 (± 71%)	1,6E-03 (± 62%)	1,5 0,084	1,2E-03 (± 65%)	1,3E-03 (± 57%)	1,0 0,81	0,2
NFRkappaB	1,2E-04 (± 49%)	1,1E-04 (± 53%)	1,1 0,75	3,2E-04 (± 60%)	2,7E-04 (± 44%)	1,2 0,34	-0,1
Clusterin	2,4E-03 (± 107%)	3,2E-03 (± 41%)	0,7 0,22	5,6E-02 (± 52%)	5,1E-02 (± 44%)	1,1 0,55	0,1
RAB2	1,5E-03 (± 52%)	1,4E-03 (± 65%)	1,1 0,62	2,4E-03 (± 53%)	2,0E-03 (± 44%)	1,2 0,27	0,1
NME1	2,3E-03 (± 60%)	4,0E-03 (± 87%)	0,6 0,056	9,2E-04 (± 28%)	2,1E-03 (± 67%)	0,4 * 0,0011	0,1

Tabelle 11: Absolute Expressionswerte in Tumor- und Normalgewebe. Durchschnittswerte für Seminome und Nichtseminome sind getrennt aufgeführt. Ratio, p-Wert: Verhältnis der durchschnittlichen absoluten Expression in Seminomen zu Nichtseminomen und dessen Signifikanz (t-Test für unabhängige Variablen). T/N: positiv, wenn der Unterschied der absoluten Expression von Seminomen und Nichtseminomen im Tumorgewebe größer als im Normalgewebe ist. (siehe Text)
 * p < 0,5 ** p < 0,01 *** p < 0,001

Im Tumorgewebe lag die Ratio der durchschnittlichen absoluten Expression bei Seminomen und Nichtseminomen zwischen 0,1 (Cyclin D1) und 2,1 (RAD51). Im Mittel war sie 0,78 (SD 79%). Dieser Unterschied war mit $p=0,0017$ signifikant. Im einzelnen war die absolute Expression bei 12 Genen signifikant unterschiedlich: Von ihnen wurden drei Gene im Tumorgewebe der Seminome höher exprimiert als im Tumorgewebe der Nichtseminome (Ratio 2,1: RAD51; 1,9: TNFR und FasL) während 9 Gene im Tumorgewebe der Nichtseminome stärker exprimiert wurden (Ratio 0,1: Cyclin D1; 0,2: GADD45A; 0,4: p21; 0,3: Cyclin D3; 0,5: p53, GSTA2; 0,6: cdk4; 0,7: Caspase3, RAD50). Die absolute Expression von BAD im Tumorgewebe in Seminomen und Nichtseminomen war signifikant gleich (Ratio=1, $p=0,95$)

Einfluss von Tumor- und von Normalgewebe auf die differentielle Expression

Wie oben beschrieben ist die differentielle Expression der Quotient aus absoluter Expression im Tumorgewebe zu absoluter Expression im Normalgewebe. Unterschiede in der differentiellen Expression eines Gens können deshalb zum einen auf eine unterschiedliche absolute Expression im Tumorgewebe zurückgeführt werden. Zum anderen rührt sie möglicherweise aber auch von einer unterschiedliche absolute Expression im Normalgewebe her. In Tabelle 11 ist in der letzten Spalte die Zahl „T/N“ angegeben. Sie zeigt an, ob die größeren Unterschiede zwischen der durchschnittlichen absoluten Expression im Tumorgewebe (positiv) oder im Normalgewebe (negativ) vorlagen. Sie errechnet sich nach:

$$\text{„T/N“} = | \log(\text{Ratio}_{\text{Tumorgewebe}}) | - | \log(\text{Ratio}_{\text{Normalgewebe}}) |$$

(Zu Besonderheiten beim Rechnen mit Verhältniszahlen siehe auch die Erläuterungen zur differentiellen Expression in Abschnitt 3.7.5) Die Zahl „T/N“ ist positiv, wenn der Unterschied der Absoluten Expression im Tumorgewebe ($\text{Ratio}_{\text{Tumorgewebe}}$) vor dem Unterschied der Absoluten Expression im Normalgewebe ($\text{Ratio}_{\text{Normalgewebe}}$) überwiegt. Bei 9 der 37 Gene war der relative Unterschied zwischen der absoluten Expression der Seminome und der Nichtseminome im Normalgewebe größer als im Tumorgewebe (FasR, BAG1, BAX, BAD, Cyclin E1, cdk2, RAD52, Ku80, GPX2 und NFRkB). In keinem dieser Fälle war die Ratio für Tumorgewebe und für Normalgewebe gleichzeitig signifikant. Bei 7 Genen war der relative Unterschied gleich („T/N“= 0, gerundet auf 1. Nachkommastelle: FasL, Caspase4, Cyclin D2, cdk4, PCNA, Ku70 und DNAPK)

4.1.2 Differentielle Expression

Die entsprechend dem Abschnitt 3.7.6 einem der drei Expressionszustände (Herunterregulation, Hochregulation und Expression im Kontrollbereich) zugeordneten Expressionsergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt und werden als kategorisierte Expressionsergebnisse erläutert. Die quantitativen Expressionsergebnisse sind in Tabelle 12 abzulesen und in Abbildung 10 dargestellt.

Bei der Betrachtung der **kategorisierten Expressionsergebnisse** fällt die Ähnlichkeit der Häufigkeitsverteilung der drei Expressionszustände bei den Seminomen und den Nichtseminomen auf (siehe Abbildung 9).

Ausnahmen hiervon: **BAX** wurde in 67% der Seminomen hochreguliert, aber in 70% der Nichtseminome im Kontrollbereich exprimiert sowie in einem Falle sogar herunterreguliert. Das **Cyclin D1**-Gen wurde bei den Seminomen in 44% der Fälle herunterreguliert und niemals hochreguliert, hingegen bei den Nichtseminomen zu 10% herunterreguliert und zu 50% hochreguliert. Das **GADD45A** Gen fand sich bei 56% der Seminome herunterreguliert, bei 44% im Kontrollbereich. Bei den Nichtseminomen wurde es von 60% im Kontrollbereich exprimiert, von 30% wurde es hochreguliert. **GPX2** wurde von 67% der Seminome hochreguliert, während es von allen Nichtseminomen im Kontrollbereich exprimiert wurde.

Bei den übrigen 33 Genen hingegen ließ sich kein deutlicher Unterschied in der Verteilung der kategorisierten Expressionszustände feststellen.

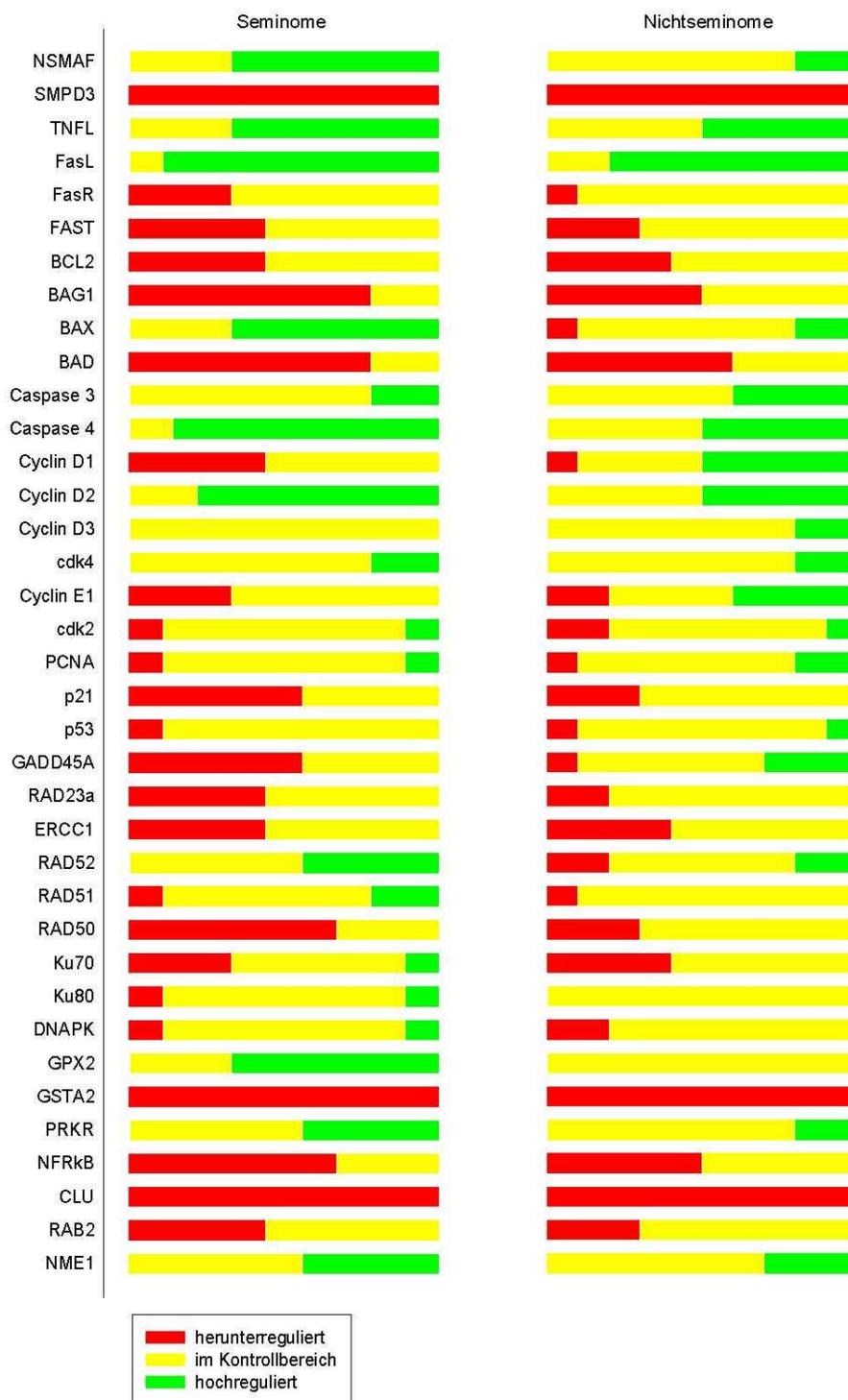


Abbildung 9: Verteilung der kategorisierten Expressionsergebnisse bei Seminomen und Nichtseminomen. NSMAF wird beispielsweise von 33% der Seminom-Patienten im Kontrollbereich exprimiert und von 67% der Seminom-Patienten hochreguliert. Auffällig ist die grundsätzliche Ähnlichkeit im Expressionsverhalten von Seminomen und Nichtseminomen. Ausnahme hiervon ist die Expression der Gene BAX, Cyclin D1, GADD45A und GPX2.

Bei der Betrachtung der **quantitativen Expressionsergebnisse** (Tabelle 12 und Abbildung 10) fanden sich kaum signifikante Unterschiede im Expressionsverhalten von Seminomen und Nichtseminomen. Im Durchschnitt lag die Differentielle Expression aller Seminome bei 0,836 (SD 217%), bei den Nichtseminomen fast identisch bei 0,835 (SD 148%). Der Durchschnitt des Verhältnisses der dmE der Seminome zur dmE der Nichtseminome war 1,001 (SD 60%).

Von den 37 untersuchten Genen wurden 22 Gene (59%) bei den Seminomen und 18 Gene (49%) bei den Nichtseminomen signifikant differentiell exprimiert ($p < 0,05$ im t-Test für abhängige Variablen bei der Gegenüberstellung der jeweiligen absoluten Expression im Tumorgewebe und im Normalgewebe).

Nur bei vier Genen wurde ein signifikanter Unterschied der dmE in Seminomen und in Nichtseminomen entdeckt ($p < 0,05$, t-Test für unabhängige Variablen):

Cyclin D1 wurde von den Seminomen mit einer dmE von 0,54 (SD 44%), von den Nichtseminomen jedoch mit einer dmE von 1,62 (SD 156%) exprimiert ($p = 0,004$).

GADD45A zeigte bei den Seminomen eine dmE von 0,48, bei den Nichtseminomen eine dmE von 1,27 ($p = 0,003$).

Bei **GPX2** fand sich bei den Seminomen eine dmE von 2,3 und bei den Nichtseminomen eine dmE von 0,83 ($p = 0,00004$).

Obwohl **Clusterin** sowohl in Seminomen als auch in Nichtseminomen stark herunterreguliert wurde (SE: dmE= 0,03 (SD 110%); NS: dmE= 0,07 (SD 51%)), war seine Expression in beiden Tumorentitäten doch signifikant unterschiedlich ($p = 0,015$).

Obwohl unter den 33 übrigen Genen in 18 Fällen eine signifikante Differentielle Expression bei Seminomen und/oder Nichtseminomen festgestellt wurde, fanden sich keine weiteren signifikanten Unterschiede der Differentiellen Expression zwischen Seminomen und Nichtseminomen. Die Differentielle Expression in Seminomen und Nichtseminomen unterschied sich demnach bei der großen Mehrheit der Gene (89%) nicht signifikant.

Gen	Seminome (SE)			Nichtseminome (NS)			SE/NS	p-Wert
	dmE	SD(%)	p-Wert	dmE	SD(%)	p-Wert		
NSMAF	3,02	87	** 0,0019	1,55	123	0,13	1,95	0,061
SMPD3	0,19	59	** 0,0016	0,17	66	** 0,0048	1,17	0,5
TNFR	2,85	79	** 0,0012	2,15	112	* 0,025	1,32	0,38
FasL	5,93	254	*** 0,0009	3,82	186	** 0,0072	1,55	0,42
FasR	0,70	86	0,14	0,89	45	0,45	0,79	0,33
FASTK	0,71	96	0,45	0,63	90	0,053	1,13	0,69
BCL2	0,62	44	** 0,0068	0,60	53	* 0,025	1,02	0,92
BAG1	0,21	170	** 0,0033	0,39	103	** 0,0088	0,55	0,14
BAX	2,35	75	** 0,0049	1,38	82	0,064	1,71	0,062
BAD	0,31	106	** 0,0045	0,39	61	** 0,0012	0,80	0,44
CASP3	1,25	63	0,13	1,66	112	0,11	0,76	0,36
CASP4	8,91	434	** 0,001	6,99	624	** 0,0078	1,27	0,78
CyclinD1	0,54	44	** 0,0035	1,62	156	0,09	0,33	** 0,0042
CyclinD2	3,41	129	0,084	2,42	187	0,14	1,41	0,44
CyclinD3	0,90	40	0,18	1,15	58	0,22	0,79	0,21
cdk4	1,50	45	** 0,011	1,32	65	* 0,037	1,13	0,55
CyclinE1	0,50	361	0,27	1,06	146	0,26	0,47	0,2
cdk2	1,22	78	0,31	0,81	89	0,96	1,50	0,16
PCNA	1,05	97	0,76	1,34	76	0,1	0,79	0,41
p21	0,37	85	** 0,0031	0,48	137	* 0,047	0,79	0,5
p53	0,89	56	0,33	0,93	85	0,32	0,95	0,85
GADD45A	0,48	46	*** 0,0007	1,27	116	0,14	0,37	** 0,003
RAD23a	0,60	80	* 0,025	0,63	64	* 0,033	0,95	0,83
ERCC1	0,46	52	** 0,0014	0,51	65	* 0,029	0,91	0,65
RAD52	1,60	90	0,1	1,00	115	0,35	1,59	0,17
RAD51	1,38	103	0,058	0,78	84	0,5	1,78	0,074
RAD50	0,45	60	** 0,0013	0,60	49	** 0,002	0,75	0,17
Ku70	0,83	176	0,34	0,59	71	* 0,036	1,42	0,35
Ku80	1,21	74	0,096	0,97	51	0,37	1,25	0,34
DNAPK	1,19	70	0,15	1,09	75	0,17	1,09	0,75
GPX2	2,30	68	* 0,016	0,83	31	0,24	2,76	*** 0
GSTA2	0,04	214	*** 0,0003	0,07	197	*** 0,0006	0,54	0,25
PRKR	1,93	69	0,017	1,26	59	0,19	1,54	0,074
NFRkB	0,41	89	** 0,0083	0,43	72	*** 0,0009	0,96	0,89
Clusterin	0,03	110	*** 0,0004	0,07	51	*** 0,0001	0,48	* 0,015
RAB2	0,63	63	* 0,017	0,62	46	** 0,0014	1,02	0,94
NME1	2,12	66	* 0,011	1,54	67	* 0,028	1,38	0,19

Tabelle 12: Differentielle Expression der **Seminome** und der **Nichtseminome**: **dmE** differentielle Expression der mittleren LER, **SD(%)** relative Standardabweichung von der dmE in Prozent. **SE/NS**: Verhältnis der dmE der Seminome zur dmE der Nichtseminome.

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

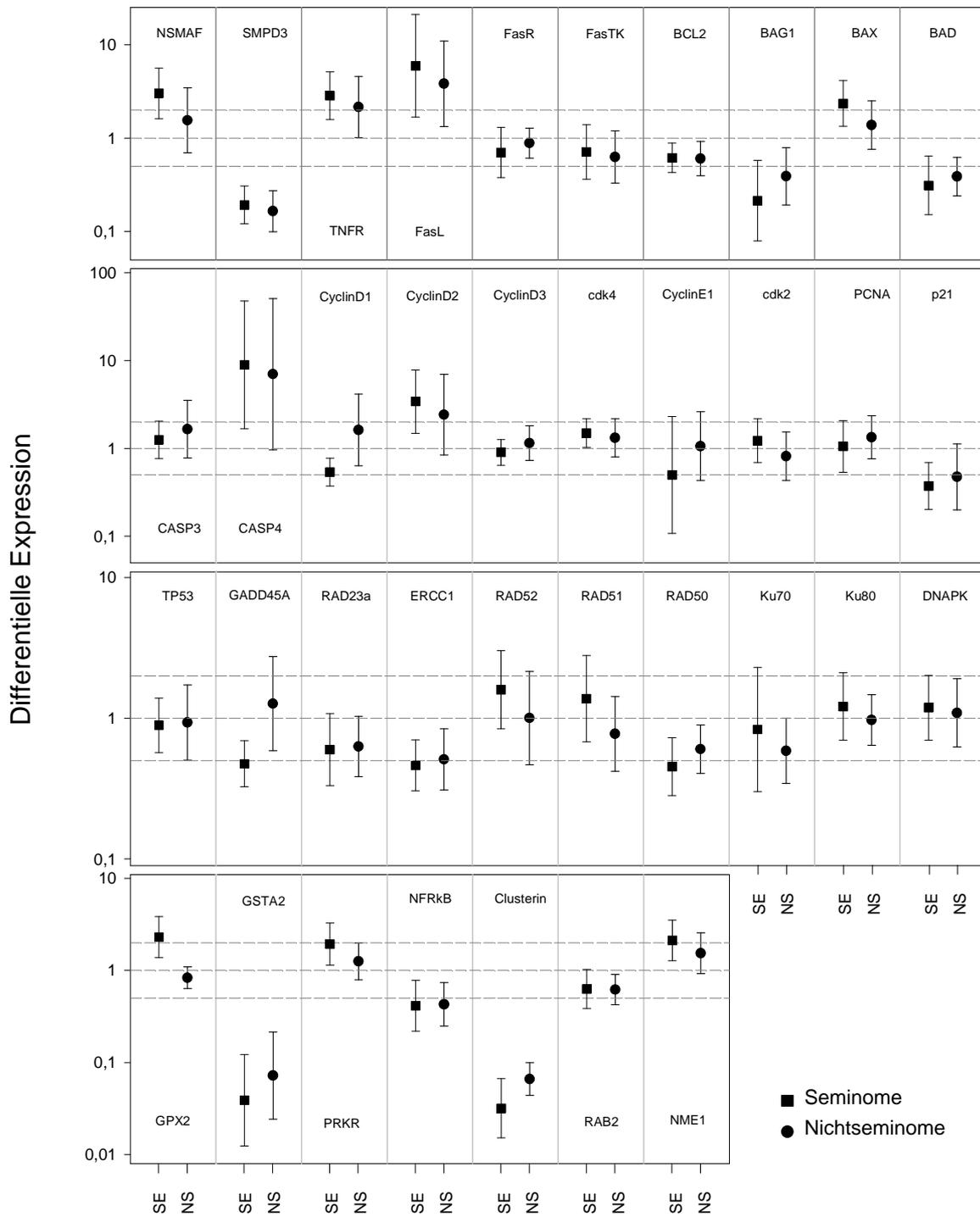


Abbildung 10: Differenzielle Expression in Seminomen (SE) und Nichtseminomen (NS) (dmE und Standardabweichung wie in Tabelle 12 aufgeführt). Gestrichelte Linien bei den Differenziellen Expressionswerten 0,5, 1 und 2.

4.1.3 Analyse der Ähnlichkeitsbeziehung von Seminomen und Nichtseminomen

Die durchschnittliche Ähnlichkeit der Seminome untereinander („SE vs. SE“; $n=9$; $\frac{n(n-1)}{2} = 36$ Vergleichspaare), der Nichtseminome untereinander („NS v. NS“; $n=10$; $\frac{n(n-1)}{2} = 45$ Vergleichspaare) und der Seminome zu den Nichtseminomen („SE vs. NS“; $9 \cdot 10 = 90$ Vergleichspaare) wurde aus den entsprechenden Ähnlichkeitskoeffizienten bestimmt. Der Ähnlichkeitskoeffizient ist ein quantitativer Ausdruck der Ähnlichkeit des differentiellen Genexpressionsmusters zweier Patienten zueinander (Abschnitt 3.7.7). Die Vorzüge dieser Darstellungsweise lassen sich am prägnantesten anhand des Vergleichs von Embryonalen Karzinomen mit Mischtumoren (Abschnitt 4.2) demonstrieren und wird deshalb dort erfolgen.

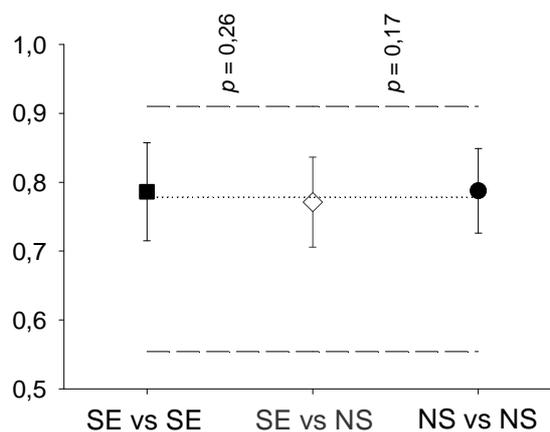


Abbildung 11. Mittlere Ähnlichkeiten beim Vergleich innerhalb jeweils der Seminom- und der Nichtseminomgruppe (SE vs SE bzw. NS vs NS) sowie beim Vergleich der Seminome mit den Nichtseminomen (SE vs NS). Kleinster und größter Ähnlichkeitskoeffizient sind als gestrichelte Linie, der mittlere Ähnlichkeitskoeffizient aller Vergleiche als gepunktete Linie dargestellt. Die mittlere Ähnlichkeit innerhalb der Seminom- und Nichtseminomgruppen war kaum größer als die mittlere Ähnlichkeit aus dem Vergleich der Seminome und der Nichtseminome, die Unterschiede waren nicht signifikant.

Am unähnlichsten wurde das Vergleichspaar {Patient 4; Patient 8} mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,55 bestimmt. In allen drei Vergleichsgruppen fand sich jeweils ein Patientenpaar, das den höchsten Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,91 erreichte: {Pat. 1; Pat. 9}, {Pat. 6; Pat. 16} und {Pat. 12; Pat. 18}. Der Vergleich der Seminome untereinander ergab eine mittlere Ähnlichkeit von 0,79 (SD 0,071). Auch die mittlere Ähnlichkeit der Nichtseminome untereinander lag bei 0,79 (SD 0,061). Damit lag die mittlere Ähnlichkeit jeweils innerhalb dieser beiden Tumorgruppen etwas über der mittleren

Ähnlichkeit aller 19 Tumorpatienten untereinander (0,78 ; SD 0,066). Nochmals etwas geringer war der Durchschnitt der Ähnlichkeitskoeffizienten bei der Gegenüberstellung von Seminomen und Nichtseminomen: 0,77 (SD 0,065). Weder die Ähnlichkeit der Seminome untereinander noch die Ähnlichkeit der Nichtseminome untereinander war signifikant größer als die Ähnlichkeit der Seminome zu den Nichtseminomen (p-Wert 0,26 bzw. 0,17).

4.2 Vergleich der Embryonalen Karzinome mit den Mischtumoren

Im Patientenkollektiv der Nichtseminome (10 Patienten) fanden sich drei reine Embryonale Karzinome (Patienten 12, 13 und 16). Es stellte sich daher die Frage, ob diese histologisch klar von den anderen Nichtseminomen zu diskriminierende Subgruppe sich auch durch ihr Genexpressionsmuster von diesen unterschied.

4.2.1 Analyse der Ähnlichkeitsbeziehung von EC und MT

Hierzu wurden in Abbildung 12 die reinen Embryonalen Karzinome den 7 anderen Nichtseminomen gegenübergestellt. Sechs dieser sieben Nichtseminome waren Mischtumoren, für die unterschiedliche Tumoranteile im Pathologischen Befund beschrieben wurden. Ausschließlich Patient 15 wurde als „unreifer Keimzelltumor“ beschrieben. Aus klassifikatorischen Gründen (vergl. Abschnitt 2.1.2) wurde dieser daher von den Mischtumoren abgesetzt. Bei der Betrachtung von Abbildung 12 war keine augenfällige Ähnlichkeit der Expressionsmuster der reinen Embryonalen Karzinome untereinander feststellbar, die über die Ähnlichkeit zu den Mischtumoren hinausging. Auch die Mischtumoren ließen keine Ähnlichkeiten untereinander erkennen, die ihre Abgrenzung von den reinen Embryonalen Karzinomen hätte begründen können.

Betrachtet man beispielsweise die Gruppe der für die Apoptoseintegration zuständigen Gene (BCL2, BAG1, BAX, BAD), so konnte man zwischen reinen EC und MT einige Gemeinsamkeiten feststellen, ohne dass es gelingen mochte, ein beide Patientengruppen unterscheidendes Merkmal zu formulieren: Neben jeweils einem Patienten ohne Veränderungen der differentiellen Expression in den betrachteten Genen (reine EC: Nr. 12, MT: Nr. 18), fand sich jeweils in beiden Patientengruppen ein Patient mit alleiniger

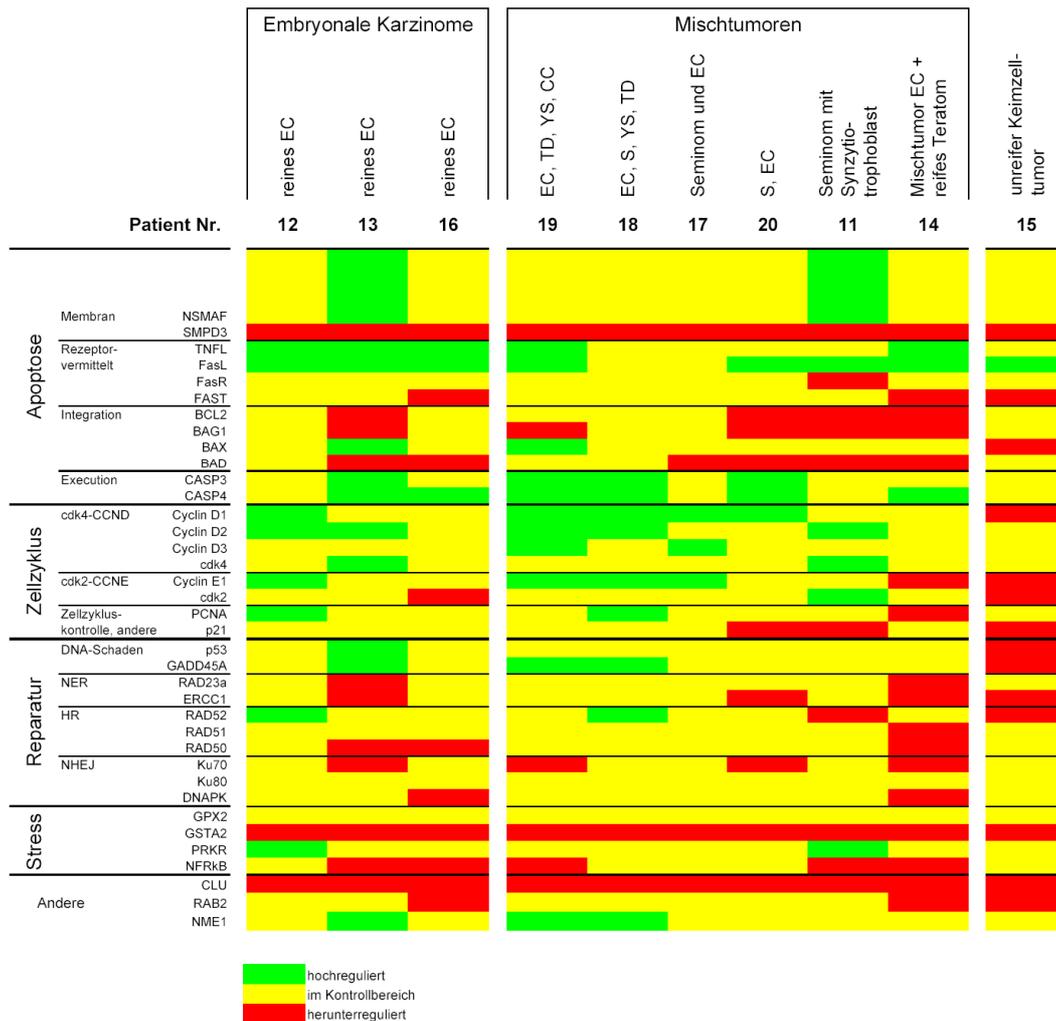


Abbildung 12: Gegenüberstellung des Expressionsmusters der reinen Embryonalen Karzinome (EC) und der Mischtumoren (MT). Ein unreifer Keimzelltumor (Patient 15) wurde von den Mischtumoren separiert dargestellt. Die histologische Tumorklassifikation ist für jeden Patienten mit angegeben. Die differentielle Expression aller untersuchten Gene durch die 10 Nichtseminome ist durch Farbfelder dargestellt (rot = Herunterregulation, gelb = Expression im Kontrollbereich, grün = Hochregulation.)

Herunterregulation des proapoptotischen BAD (reine EC: Nr. 16, Mischtumoren: Nr. 17). Diese beiden waren die einzigen der neun dargestellten Patienten, bei denen sich eine eindeutig antiapoptotische Expressionslage der Apoptoseintegration fand. Unter den 6 Mischtumoren fanden sich 3 mit jeweils herunterreguliertem BCL2, BAG1 und BAD-Gen (Patienten Nr. 11, 14, 20) und somit sowohl pro- als auch antiapoptotischen Expressionsveränderungen. Dem stand als eines von drei reinen Embryonalen Karzinomen Patient 13 gegenüber. Bei diesem, wie auch beim Mischtumour-Patient Nr. 19, wurde die Hochregulation von BAX von einer Herunterregulation von BAG1 begleitet. Patient Nr. 19 war der einzige der 9 untersuchten Patienten, bei dem sich eine proapoptotische Regulation der Apoptoseintegration fand. Nicht nur die Gesamtfunktion der Apoptoseintegration war in

beiden Patientengruppen vergleichbar (meist unveränderte bzw. uneinheitlich veränderte Expression), sondern auch die Expression der einzelnen Gene: BCL2 und BAG1 war entweder im Kontrollbereich oder herunterreguliert. Dies traf außer für Patient 19 immer für beide Gene gleichzeitig zu. BAX wurde im Kontrollbereich (reine EC: 2 von 3 Patienten, MT: 5 von 6 Patienten) exprimiert oder war in jeweils einem Fall (Patienten 13 und 19) hochreguliert. BAD wurde grundsätzlich bei beiden Patientengruppen herunterreguliert. BAD war aber auch bei einem der drei reinen EC sowie bei 2 aus 6 Mischtumoren im Kontrollbereich exprimiert.

Es ist offensichtlich, dass eine weitere Beschreibung von Ähnlichkeiten oder Unterschieden zwischen und innerhalb der beiden Patientengruppen auf die obige Weise jedes praktikable Maß sprengen würde. Vor allem aber wäre eine derartige Darstellung durch die Auswahl der beschriebenen Aspekte trotzdem immer subjektiv. Deshalb wurde der zuvor während der Betrachtung der Expressionsmuster in Abbildung 12 gewonnenen Eindruck, dass die Embryonalen Karzinome sich bezüglich ihrer differentiellen Expression nicht als eine von den Mischtumoren zu unterscheidende Gruppe verhalten, im Folgenden objektiviert: Dazu wurde für jede mögliche Paarung zwischen zwei der untersuchten 9 Nichtseminome ($n=9$; $\frac{n(n-1)}{2} = 36$ Paarungen) ein Maß der Ähnlichkeit ihrer Expressionsmuster (*Proximität*) bestimmt (vergleiche Abschnitt 3.7.7). Die Ähnlichkeit zwischen zwei Tumoren wurde jeweils durch einen Koeffizienten beschrieben, der Werte von 0 (keine Ähnlichkeit) bis 1 (Identität des verglichenen Paares) annehmen konnte. Die Ähnlichkeitskoeffizienten lagen dabei zwischen 0,68 (Patient 14 zu Patient 18) und 0,91 (Patient 12 zu Patient 18). Somit wurden die Patienten-Paare 14/18 bzw. 12/18 als diejenigen mit der geringsten bzw. der größten Ähnlichkeit zueinander identifiziert. Es fiel auf, dass das Paar mit der größten Ähnlichkeit aus einem reinem Embryonalen Karzinom und einem Mischtumor gebildet wird, wohingegen das Paar mit der geringsten Ähnlichkeit aus zwei Mischtumoren bestand. Im weiteren wurden die 36 Vergleichspaare drei Gruppen zugeordnet, wie sie in Abbildung 13 dargestellt sind. Die Gruppe „EC vs. EC“ bei a) enthielt die Ähnlichkeitskoeffizienten der reinen Embryonalen Karzinome untereinander ({Pat. 12, Pat.13}, {Pat. 13, Pat.16}, {Pat. 12, Pat.16}). Die Mittlere Ähnlichkeit der EC untereinander wurde mit 0,766 (SD 0,047) bestimmt. Die Gruppe „EC vs. MT“ bei b) enthielt alle 18 Ähnlichkeitswerte zwischen reinen Embryonalen Karzinomen zum einen und Mischtumoren zum anderen. Die Mittlere Ähnlichkeit betrug hier 0,81 (SD 0,054). Für die Gruppe „MT vs. MT“ bei c) wurden die

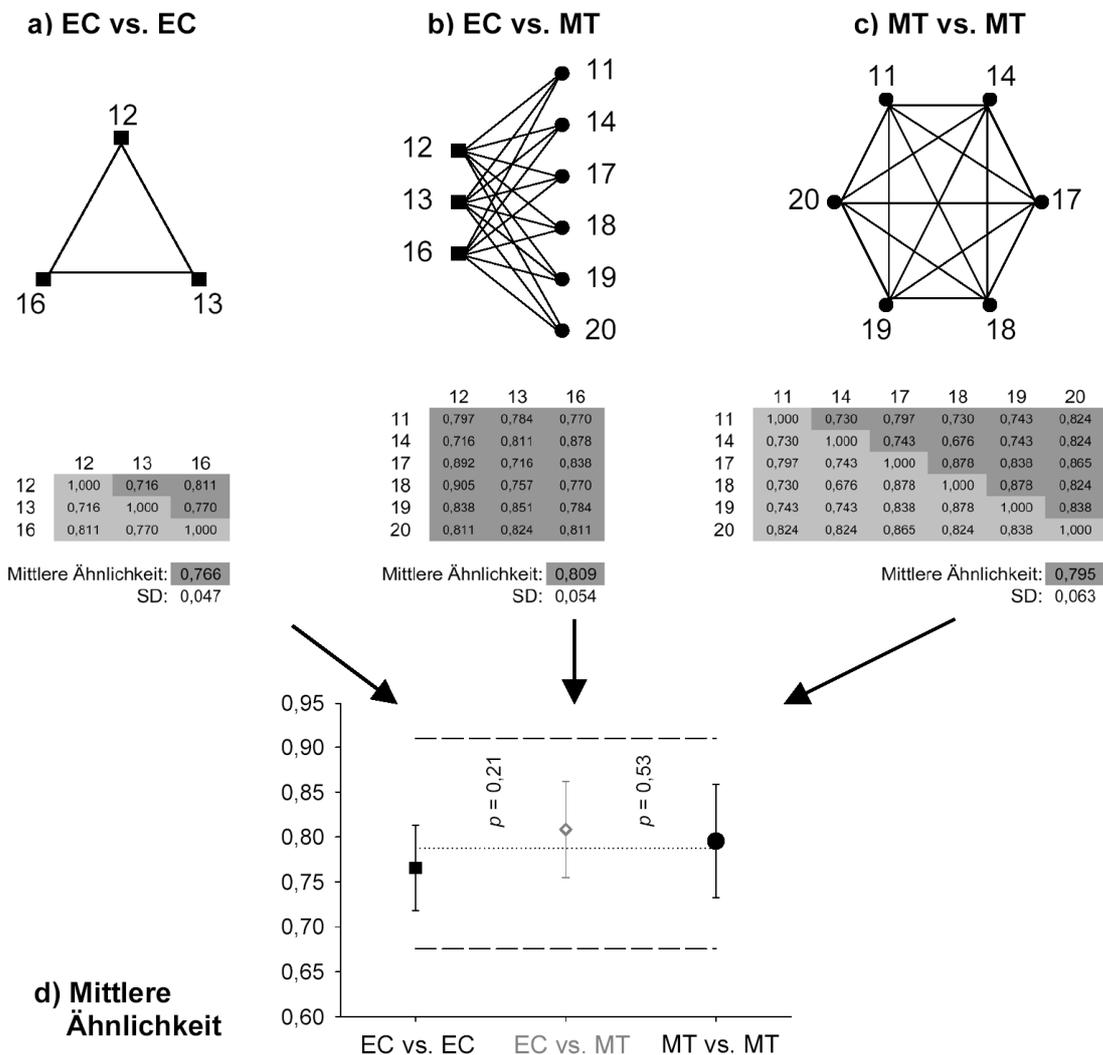


Abbildung 13. Oben, a, b, c): Zusammensetzung der drei Vergleichsgruppen „EC vs. EC“, „EC vs. MT“ und „MT vs. MT“. Embryonale Karzinome (EC; Patienten 12, 13, 16) werden durch Quadrate, Mischtumoren (MT; Patienten 11, 14, 17, 18, 19, 20) werden durch Kreise dargestellt. Ein Vergleichspaar von zwei Tumoren wird durch eine Linie symbolisiert. **a)** „EC vs. EC“ enthält sämtliche Vergleichspaare der 3 EC untereinander; analog bestehen bei **c)** innerhalb der 6 Mischtumoren 18 Vergleichspaare. **b)** „EC vs. MT“: Die Gegenüberstellung von 3 reinen EC und 6 MT ergibt 15 Vergleichspaare. **Mitte:** Tabellarische Darstellung der ermittelten Ähnlichkeitskoeffizienten. Doppelnennungen und Selbstvergleiche sind hell unterlegt und gehen in die Bestimmung der mittleren Ähnlichkeit nicht ein. **Unten, d)** Lineare Auftragung der mittleren Ähnlichkeiten der drei Vergleichsgruppen. Kleinster und größter Ähnlichkeitskoeffizient sowie die mittlere Ähnlichkeit aller verglichenen Patienten zueinander sind als gestrichelte Linien dargestellt.

mittlere Ähnlichkeit der Mischtumoren untereinander aus 15 ($n=6$; $\frac{n(n-1)}{2} = 15$) Vergleichspaarungen mit 0,80 (SD 0,063) bestimmt. Die Ähnlichkeit der Embryonalen Karzinome zu den Mischtumoren wurde somit sogar als größer als die Ähnlichkeiten der Embryonalen Karzinome oder der Mischtumoren jeweils untereinander quantifiziert.

Analog wurden auch die Ähnlichkeitsbeziehungen der reinen EC zu den MT einschließlich des Patienten 15 („nonEC“) bestimmt, wobei sich keine relevanten Veränderungen ergaben (nicht gezeigt): Die mittlere Ähnlichkeit „EC vs. nonEC“ war 0,80 (SD 0,063) die mittlere Ähnlichkeit „nonEC vs. non EC“ 0,78 (SD 0,062).

4.2.2 Analyse der quantitativen Expressionsunterschiede von EC und MT

In Tabelle 13 und in Abbildung 14 sind die quantitativen Expressionsdaten von EC und MT dargestellt. Die durchschnittliche dE der reinen Embryonalen Karzinome lag bei 0,88 (SD 200%), die der Mischtumoren bei 0,87 (SD 143%). Bei den EC wurden nur zwei der 37 Gene (NFRkB und Clusterin), bei den MT wurden 10 der 37 Gene signifikant differentiell exprimiert ($p < 0,05$ im t-Test für abhängige Variablen bei der Gegenüberstellung der jeweiligen absoluten Expression im Tumorgewebe und im Normalgewebe). Es fand sich kein Unterschied beim Vergleich der durchschnittlichen differentiellen Expression der EC und der MT. EC wiesen im Durchschnitt eine differentielle Expression von 0,88 (SD 200%), MT eine durchschnittliche differentielle Expression von 0,87 (SD 143%) auf. Der Durchschnitt der Ratio $dmE(EC)/dmE(MT)$ für alle 37 Gene lag bei 1,01 (SD 42%).

Nur bei zwei Genen fand sich ein signifikanter Unterschied ihres quantitativen Expressionsverhaltens in EC und MT:

Das Gen für den **Fas-Rezeptor** wurde im Tumorgewebe der reinen Embryonalen Karzinome mit einer dmE von 1,28 (SD 30%) höher exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe. Der umgekehrte Fall traf bei den Mischtumoren zu, deren dmE von 0,71 (SD 29%) sich signifikant von der dmE der EC unterschied ($p=0,013$).

Für **Clusterin** wurde bei den EC eine dmE von 0,04 (SD 18%), bei den MT eine dmE von 0,08 (SD 33%) bestimmt. Die im Vergleich mit den MT doppelt so starke Herunterregulation von Clusterin bei den reinen Embryonalen Karzinomen war signifikant ($p=0,0075$).

Gen	Embryonale Karzinome (EC)			Mischtumoren (MT)			EC/MT	p-Wert
	dmE	SD(%)	p-Wert	dmE	SD(%)	p-Wert		
NSMAF	1,32	209	0,76	1,63	120	0,15	0,81	0,75
SMPD3	0,18	149	0,12	0,15	37	0,056	1,18	0,69
TNFL	4,10	102	0,12	1,69	97	0,087	2,43	0,11
FasL	4,80	147	0,14	3,09	242	0,12	1,55	0,6
FasR	1,28	30	0,28	0,71	29	* 0,019	1,81	* 0,013
FAST	0,55	175	0,42	0,71	71	0,15	0,78	0,64
BCL2	0,63	74	0,46	0,51	13	** 0,0039	1,23	0,38
BAG1	0,40	88	0,23	0,35	121	* 0,041	1,15	0,8
BAX	1,73	69	0,17	1,56	33	0,17	1,11	0,71
BAD	0,34	95	0,16	0,40	57	** 0,004	0,87	0,71
Caspase 3	1,34	181	0,89	1,79	110	0,078	0,75	0,64
Caspase 4	12,95	1141	0,18	6,81	588	* 0,046	1,90	0,68
Cyclin D1	1,86	170	0,41	2,02	102	0,13	0,92	0,89
Cyclin D2	2,75	140	0,23	2,66	239	0,24	1,03	0,97
Cyclin D3	1,27	43	0,35	1,19	67	0,38	1,07	0,85
cdk4	1,28	101	0,41	1,53	38	0,051	0,84	0,6
Cyclin E1	1,00	87	0,82	1,38	147	0,28	0,73	0,61
cdk2	0,84	140	0,97	0,93	63	0,84	0,90	0,82
PCNA	1,23	105	0,66	1,45	80	0,14	0,84	0,72
p21	0,82	35	0,61	0,50	83	0,06	1,63	0,24
p53	1,18	67	0,52	1,05	45	0,32	1,12	0,71
GADD45A	1,77	145	0,35	1,35	71	0,18	1,31	0,58
RAD23a	0,57	25	0,061	0,69	88	0,27	0,83	0,65
ERCC1	0,60	92	0,52	0,54	42	0,084	1,10	0,78
RAD52	1,28	109	0,6	1,06	114	0,44	1,21	0,73
RAD51	0,75	60	0,43	0,83	111	0,78	0,91	0,85
RAD50	0,56	34	0,072	0,59	59	* 0,025	0,96	0,88
Ku70	0,55	19	* 0,032	0,57	99	0,18	0,96	0,93
Ku80	0,85	42	0,62	1,12	54	0,22	0,75	0,36
DNAPK	1,06	94	0,68	1,23	71	0,18	0,86	0,72
GPX2	0,97	6	1	0,84	29	0,35	1,16	0,37
GSTA2	0,03	404	0,076	0,10	118	* 0,011	0,35	0,21
PRKR	1,50	93	0,52	1,24	47	0,17	1,21	0,58
NFRkB	0,36	62	* 0,045	0,41	73	* 0,012	0,86	0,69
Clusterin	0,04	18	** 0,0083	0,08	33	* 0,012	0,51	** 0,0075
RAB2	0,60	51	0,14	0,66	50	* 0,031	0,91	0,75
NME1	1,90	84	0,19	1,64	32	0,1	1,16	0,62

Tabelle 13: Differentielle Expression der **Embryonalen Karzinome** und der **Mischtumoren**: dmE differentielle Expression der mittleren LER, SD(%) relative Standardabweichung von der dmE in Prozent. **EC/MT**: Verhältnis der dmE der Embryonalen Karzinome zur dmE der Mischstumoren.

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

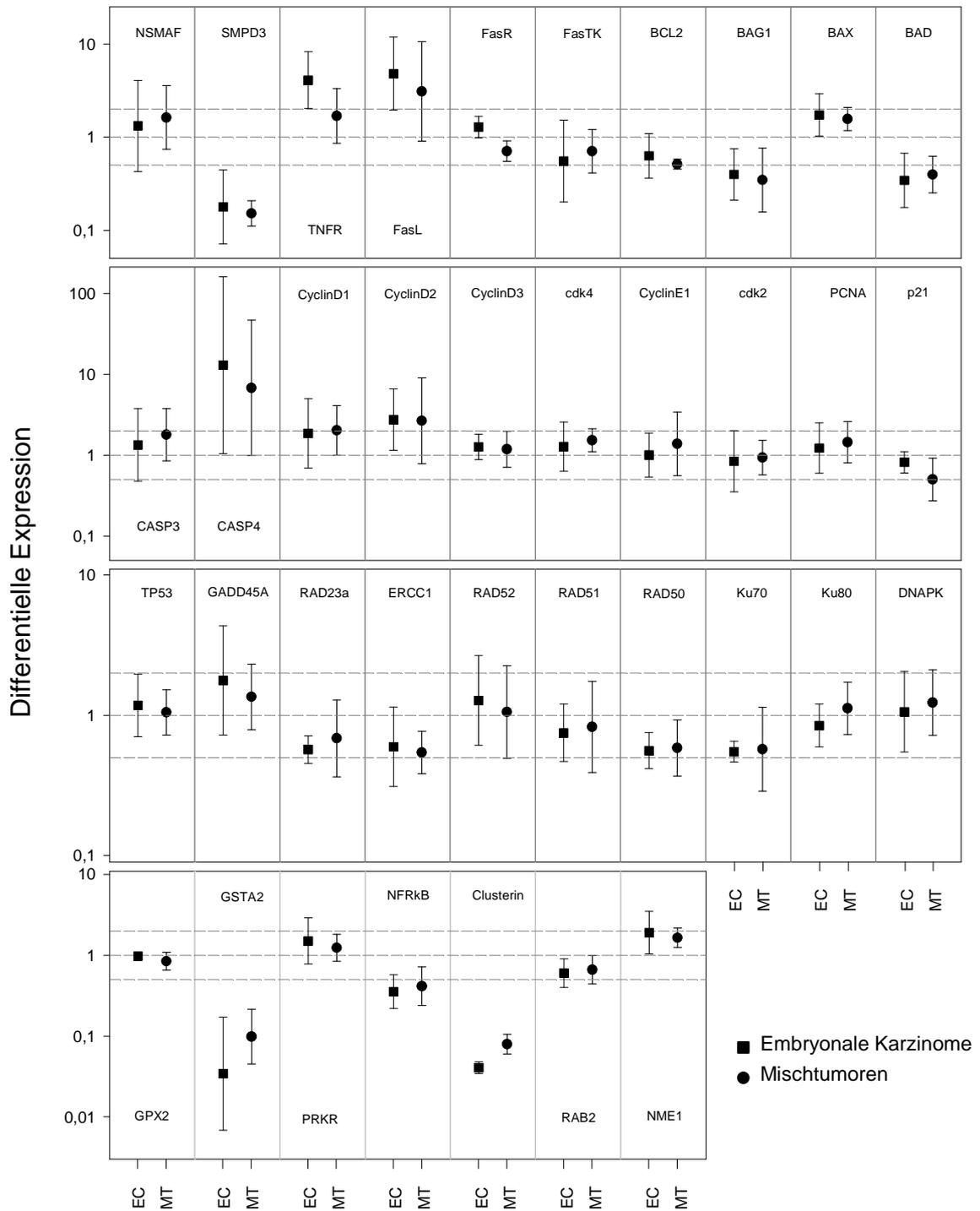


Abbildung 14: Differenzielle Expression in Embryonalen Karzinomen (EC) und Mischtumoren (MT) (dmE und Standardabweichung wie in Tabelle 13 aufgeführt). Gestrichelte Linien bei den Differenziellen Expressionswerten 0,5, 1 und 2.

4.3 Zusammenhang von Patientenalter und Genexpressionsmuster

Im Laufe der Suche nach Ähnlichkeiten im Expressionsmuster der Tumorpatienten wurden alle 19 Patienten entsprechend ihrem Alter angeordnet, wie in Abbildung 15 zu sehen. Die jeweilige Tumorentität wurde nicht berücksichtigt. Dabei stellte sich der Eindruck eines Zusammenhangs des Expressionsmusters der einzelnen Tumorpatienten zu ihrem jeweiligen Lebensalter ein, der im folgenden näher untersucht werden sollte. Die 19 Patienten wurden hierzu in drei Altersgruppen eingeteilt. Dabei umfasste die Gruppe der Patienten unter 30 Jahre 6 Patienten (Nr. 18, 12, 11, 1, 17 und 6), die Gruppe von 30-37 Jahre 7 Patienten (Nr. 4, 16, 10, 14, 13, 9, 2) und die Gruppe der über 37-Jährigen 6 Patienten (Nr. 19, 15, 3, 8, 20, 7)

4.3.1 Analyse der kategorisierten Expressionsergebnisse in Abhängigkeit vom Patientenalter

Generell war die Anzahl der herunterregulierten Gene bei den älteren Patienten erhöht, wie sich aus Abbildung 16 ersehen lässt: Bei den unter 30-Jährigen wurden im Durchschnitt 6,2 (SD 2,3) Gene hochreguliert und 5,5 (SD 3,1) Gene herunterreguliert, wobei 25,3 (SD 4,1) Gene im Kontrollbereich exprimiert wurden. Bei den 30-37-jährigen Patienten waren im Durchschnitt 7,7 (SD 5,5) Gene hochreguliert und 11,4 (4,0) Gene herunterreguliert. 17,9 (SD 3,1) Gene verblieben hier im Kontrollbereich. Die durchschnittlichen Unterschiede von 5,9 herunterregulierten Genen ($p=0,014$) und 7,4 Genen mit Expression im Kontrollbereich waren signifikant (t -Test $p=0,014$; $p=0,0034$). Bei den über 37-jährigen Patienten waren im Durchschnitt 6,2 (SD 4,0) hochreguliert und 12,7 (SD 6,3) Gene herunterreguliert, wobei hier noch 18,2 (SD 5,4) Gene im Kontrollbereich verblieben. Die Unterschiede im Vergleich zur mittleren Altersgruppe waren nicht signifikant.

Wurde ein Gen nicht im Kontrollbereich exprimiert, so überwog meist die Herunterregulation vor der Hochregulation. Nur bei den Patienten 12 und 18 (beide <30 Jahre), Nr. 4 (30-37 Jahre), 7 und 19 (beide > 37 Jahre) überwog die Anzahl der hochregulierten Gene. Im Durchschnitt wurden in jedem Tumor um das 1,6-fache mehr Gene herunterreguliert als hochreguliert, wobei diese Ungleichverteilung vor allem im zunehmenden Alter auftrat (<30 Jahre: Faktor 0,84, 30-37 Jahre Faktor 1,4 und >37 Jahre Faktor 2,4).

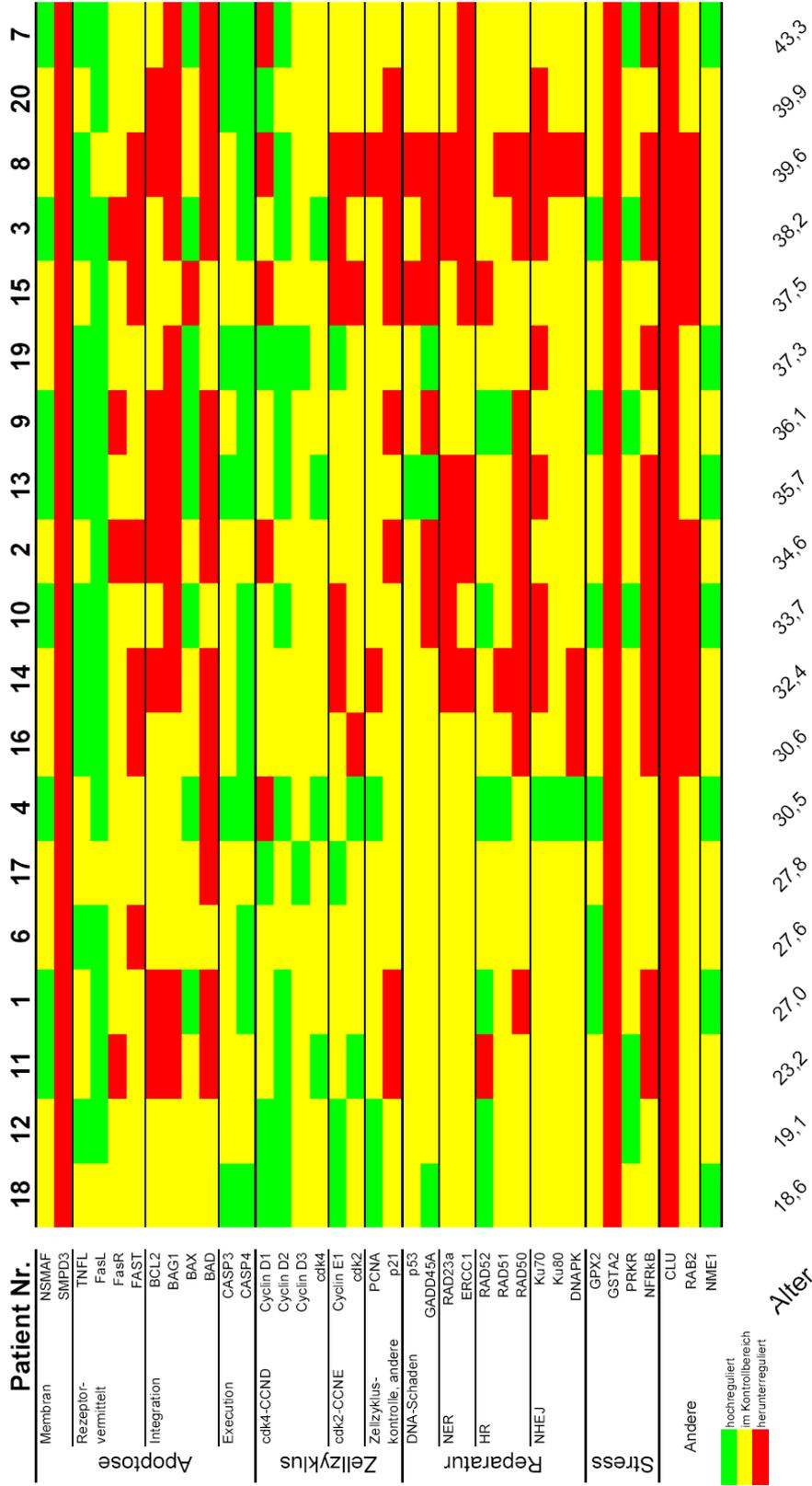


Abbildung 15: Differentielle Expression aller untersuchten Hodentumoren (Seminome sowie Nichtseminome) nach dem Patientenalter angeordnet. Darstellung der differentiellen Expression aller Gene im jeweiligen Tumor durch Farbfelder (rot = Herunterregulation, gelb = Expression im Kontrollbereich, grün = Hochregulation).

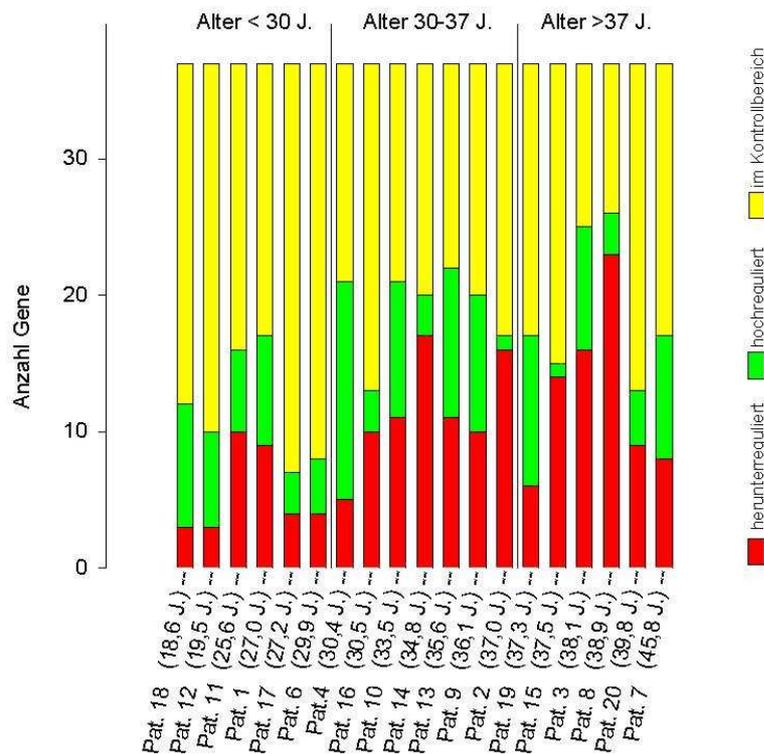


Abbildung 16: Anzahl der herunter (rot)- oder hochregulierten (grün) Gene, sowie die Anzahl der Gene mit einer differentiellen Expression im Kontrollbereich (gelb). Anordnung der Patienten (SE und NS) nach aufstiegenderm Alter.

Betrachtete man die Abbildung 15 genauer, so schien die Zunahme von herunterregulierten Genen vor allem in der Gruppe der für die DNA-Reparatur zuständigen Gene stattzufinden. Insbesondere schienen bei den Genen für den NER- und für den NHEJ- Mechanismus mit zunehmendem Patientenalter herunterregulierte Gene zu kumulieren. Aus diesen Gruppen wurden die Gene RAD23a und ERCC1 (NER-Mechanismus) sowie Ku70, Ku80 und DNAPK (NHEJ-Mechanismus) untersucht. Die Anzahl der Hoch- und Herunterregulationen in dieser Auswahl von Genen ist in Abbildung 17 dargestellt: Keines dieser Gene war bei den unter 30-jährigen Patienten hoch- oder herunterreguliert. Ansonsten traten ausschließlich Herunterregulationen auf, außer bei Patient 4, wo alle drei Gene des NHEJ-Mechanismus hochreguliert waren. In der Altersgruppe der 30-37 Jährigen wurden im Durchschnitt 1,7 (SD 1,5) von 5 Genen herunterreguliert, bei der Gruppe der über 37-Jährigen waren es 2,2 (SD 1,6). Dieser Unterschied war nicht signifikant.

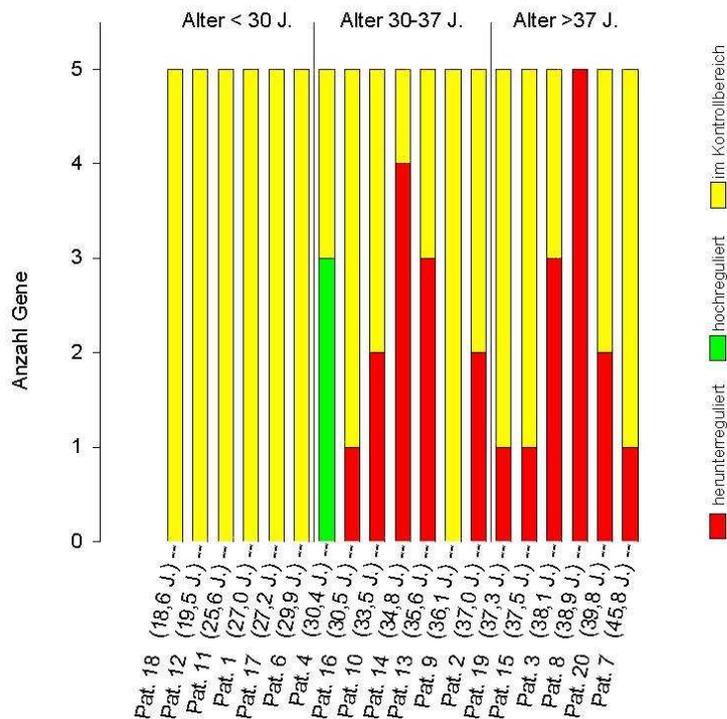


Abbildung 17: Regulation der Gene aus NER-Weg (RAD23a, ERCC1) und NHEJ-Weg (Ku70, Ku80, DNAPK) der DNA-Reparatur. (Anzahl der herunter (rot)- oder hochregulierten (grün) Gene, sowie die Anzahl der Gene mit einer differentiellen Expression im Kontrollbereich (gelb). Anordnung der Patienten (SE und NS) nach aufstiegenderem Alter.

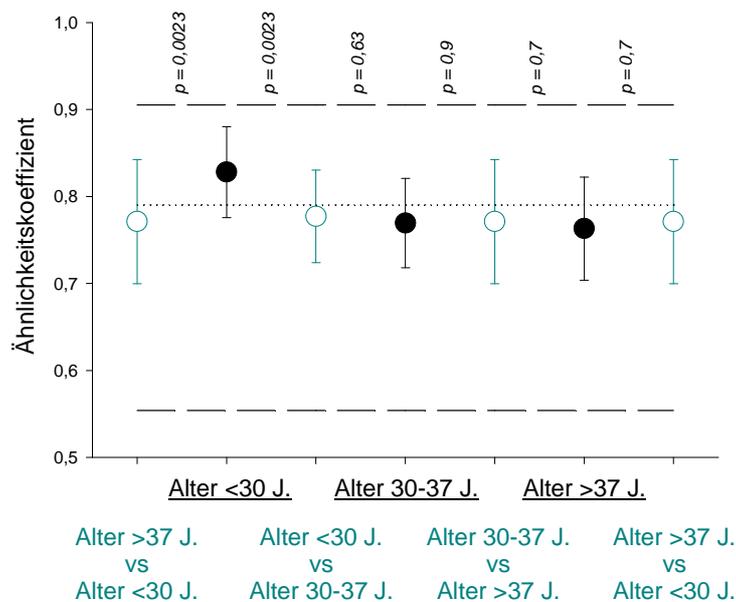


Abbildung 18: **volle Kreise:** Durchschnitt der Ähnlichkeitskoeffizienten aus dem Vergleich der Tumoren innerhalb einer Altersgruppe. **leere Kreise:** Durchschnitt der Ähnlichkeitskoeffizienten aus dem Vergleich der Tumoren zweier Altersgruppen miteinander. Minimaler, maximaler und mittlerer Ähnlichkeitskoeffizient sind als **gestrichelte Linie** eingezeichnet.

Auch die drei Altersklassen von Patienten wurden hinsichtlich ihrer Ähnlichkeitsbeziehungen untersucht (Abbildung 18). Nur die Tumoren der Altersgruppe der unter 30-Jährigen waren mit einem durchschnittlichen Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,83 (SD 0,051) untereinander ähnlicher als es sämtliche 19 Patienten im Durchschnitt waren (0,77; SD 0,066). Der Unterschied zur durchschnittlichen Ähnlichkeit mit den 30-37-jährigen Patienten einerseits (0,78; SD 0,053) und mit den über 37-jährigen Patienten andererseits (0,77; SD 0,073) war signifikant (jeweils $p=0,0023$). Die Ähnlichkeiten jeweils innerhalb der 30-37-jährigen Patienten und der über 37-jährigen Patienten waren nicht größer als die Ähnlichkeiten beim Vergleich mit einer anderen Gruppe.

4.3.2 Analyse der quantitativen Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom Patientenalter

In Tabelle 14 und in Abbildung 19 sind die quantitativen Expressionsdaten in den drei Altersgruppen zusammengefasst. 4 von 37 Genen (SMPD3, RAD23a, GSTA2 und Clusterin) wurden in der Altersgruppe der unter 30-Jährigen signifikant differentiell exprimiert ($p<0,05$ im t-Test für abhängige Variablen bei der Gegenüberstellung der jeweiligen absoluten Expression im Tumorgewebe und im Normalgewebe). Bei den 30-37-Jährigen traf dies für 17 von 37 Genen, bei den über 37-Jährigen bei 14 von 37 Genen zu.

Zwischen den Altersgruppen der unter 30-Jährigen und der 30-37-Jährigen fanden sich signifikante Unterschiede der dmE für folgende 6 Gene: Cyclin D1 (1,75; 0,65 [dmE(<30 J.); dmE(30-37 J.)]; $p=0,044$); Cyclin E1 (1,74 ; 0,65; $p=0,0088$); ERCC1 (0,69; 0,46; $p=0,042$); RAD50 (0,7; 0,4; $p=0,018$); GSTA2 (0,16; 0,03; $p=0,001$) und Clusterin (0,07; 0,03; $p=0,014$). In allen 6 Fällen war die Genexpression bei den älteren Patienten geringer als bei den jüngeren. Zwischen den Altersgruppen der 30-37-Jährigen und der über 37-Jährigen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Die durchschnittliche differentielle Expression aller Gene einer Altersgruppe war bei den unter 30-Jährigen 0,99 (SD 123%), bei den 30-37-Jährigen 0,80 (SD 217%) und bei den über 37-Jährigen 0,74 (SD 202%). Dabei war der Unterschied der dmE aller Gene zwischen den unter 30-Jährigen und den 30-37-Jährigen signifikant ($p=0,021$), nicht aber zwischen den 30-37-Jährigen und den über 37-Jährigen ($p=0,1$).

4 Ergebnisse

Gen	Alter<30.....			↔		Alter 30-37.....			↔		Alter>37.....		
	dmE	SD (%)	p-Wert	$\frac{30-37}{<30}$	p-Wert	dmE	SD (%)	p-Wert	$\frac{>37}{30-37}$	p-Wert	dmE	SD (%)	p-Wert
NSMAF	1,60	154	0,19	1,72	0,3	2,75	133	* 0,018	0,76	0,51	2,09	69	* 0,038
SMPD3	0,16	58	* 0,028	1,22	0,54	0,19	88	** 0,0025	1,00	1	0,19	40	** 0,003
TNFL	1,64	68	0,12	1,98	0,064	3,26	93	** 0,0071	0,81	0,6	2,65	109	* 0,045
FasL	3,04	255	0,14	1,38	0,62	4,18	178	** 0,0049	2,00	0,27	8,36	203	** 0,0052
FasR	0,83	68	0,58	0,86	0,65	0,71	92	0,23	1,22	0,51	0,87	39	0,32
FAST	0,90	74	0,53	0,59	0,19	0,53	118	0,089	1,21	0,62	0,64	67	0,13
BCL2	0,64	48	0,15	0,79	0,18	0,51	19	*** 0,0004	1,41	0,13	0,72	67	0,16
BAG1	0,48	157	0,16	0,47	0,15	0,23	128	** 0,007	1,07	0,88	0,24	130	* 0,03
BAX	1,65	34	0,097	1,31	0,33	2,17	80	* 0,026	0,70	0,41	1,52	148	0,15
BAD	0,48	55	0,078	0,66	0,23	0,32	101	** 0,01	0,91	0,8	0,29	78	* 0,019
CASP3	1,42	46	0,13	0,87	0,68	1,23	113	0,73	1,47	0,37	1,81	110	0,08
CASP4	3,16	93	0,073	4,27	0,16	13,47	845	** 0,0051	0,77	0,83	10,38	569	* 0,029
CyclinD1	1,75	161	0,18	0,37	* 0,044	0,65	80	0,37	1,26	0,61	0,82	164	0,51
CyclinD2	3,88	212	0,11	0,70	0,57	2,70	194	* 0,039	0,82	0,69	2,21	79	0,14
CyclinD3	1,21	42	0,2	0,74	0,11	0,90	30	0,53	1,11	0,68	1,00	79	0,57
cdk4	1,47	40	0,063	0,99	0,96	1,45	67	0,14	0,88	0,67	1,28	64	0,091
CyclinE1	1,74	68	0,19	0,37	** 0,0088	0,65	80	0,063	0,57	0,47	0,37	563	0,37
cdk2	1,17	59	0,24	0,89	0,75	1,04	116	0,89	0,75	0,47	0,78	85	0,31
PCNA	1,76	43	0,064	0,59	0,11	1,04	92	0,84	0,93	0,84	0,96	97	0,76
p21	0,53	106	0,15	0,89	0,75	0,47	74	** 0,0075	0,64	0,32	0,30	157	0,054
p53	0,98	43	0,41	1,06	0,75	1,05	39	0,56	0,69	0,28	0,72	123	0,6
GADD45A	1,02	82	0,36	0,76	0,53	0,77	145	0,93	0,84	0,72	0,65	139	0,89
RAD23a	0,79	15	* 0,022	0,69	0,17	0,55	80	* 0,024	0,99	0,97	0,54	96	0,18
ERCC1	0,69	33	0,31	0,67	* 0,042	0,46	40	* 0,019	0,81	0,4	0,37	72	* 0,013
RAD52	1,55	129	0,17	0,92	0,84	1,42	109	0,26	0,61	0,22	0,87	79	0,96
RAD51	1,27	18	0,075	0,82	0,66	1,05	183	0,59	0,76	0,57	0,79	76	0,76
RAD50	0,70	35	0,051	0,57	* 0,018	0,40	51	** 0,0011	1,36	0,23	0,54	59	* 0,025
Ku70	1,06	66	0,53	0,62	0,32	0,66	173	0,17	0,74	0,55	0,49	94	* 0,034
Ku80	1,29	30	0,087	0,88	0,63	1,13	83	0,48	0,75	0,37	0,85	62	0,88
DNAPK	1,39	40	0,083	0,81	0,49	1,13	89	0,47	0,83	0,6	0,94	76	0,63
GPX2	1,25	89	0,89	1,33	0,47	1,66	106	0,11	0,69	0,35	1,14	90	0,59
GSTA2	0,16	78	** 0,01	0,18	** 0,001	0,03	119	** 0,0079	1,23	0,7	0,04	214	*** 0,0009
PRKR	1,53	61	0,078	1,06	0,84	1,62	70	0,18	0,90	0,75	1,46	93	0,19
NFRkB	0,58	54	0,088	0,60	0,14	0,34	96	** 0,0076	1,14	0,71	0,39	68	0,017
Clusterin	0,07	41	* 0,02	0,46	* 0,014	0,03	77	*** 0,0001	1,21	0,65	0,04	140	*** 0,0005
RAB2	0,85	25	0,17	0,64	0,068	0,54	63	* 0,021	0,99	0,96	0,54	45	* 0,014
NME1	1,78	40	0,088	1,11	0,71	1,98	79	0,06	0,81	0,56	1,61	92	* 0,049

Tabelle 14: Differentielle Expression der Hodentumoren in den Altersgruppen <30, 30-37 und >37 Jahre: dmE differentielle Expression der mittleren LER, SD(%) relative Standardabweichung von der dmE in Prozent. **Spalten** ↔ Verhältnis zwischen den dmE der jeweiligen Altersgruppen.

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

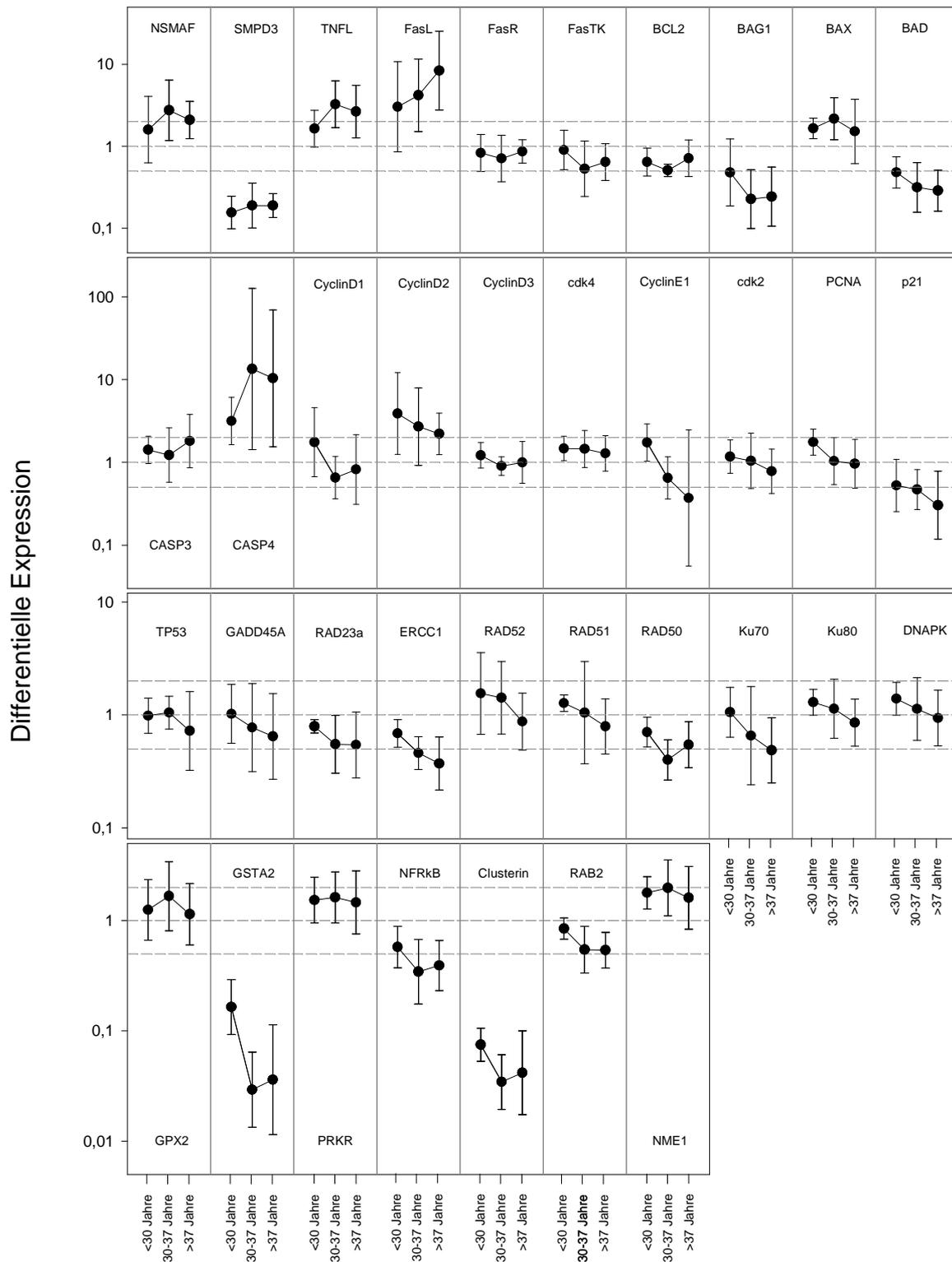


Abbildung 19: Differenzielle Expression in den Altersgruppen <30 Jahre, 30-37 Jahre und >37 Jahre. (dmE und Standardabweichung wie in Tabelle 14 aufgeführt). Gestrichelte Linien bei den Differenziellen Expressionswerten 0,5, 1 und 2.

Lineare Regressionsanalysen der differentiellen Expression der untersuchten Gene in Auftragung gegen das jeweilige Patientenalter (nicht gezeigt) ergaben Steigungswerte m zwischen -0,027 (Cyclin D1) und 0,028 (Fas-Ligand). Im Mittel lag die Steigung bei $m = -0,0058$ (SD 202%) für die Regressionsgleichung $dE = m * \text{Patientenalter}[\text{Jahre}] + b$. Dies würde einer durchschnittlichen Abnahme der differentiellen Expression um mehr als ein halbes Prozent pro Jahr bedeuten. Allerdings konnte bei keinem der untersuchten Gene ein Korrelationskoeffizient von $> 0,35$ (ERCC1) ermittelt werden. Eine lineare Abhängigkeit wurde somit in keinem Fall nachgewiesen. Auch die getrennte Betrachtung von Seminomen und Nichtseminomen führte nicht zu relevant anderen Ergebnissen bei der Regressionsanalyse.

4.3.3 Absolute Expressionswerte in Abhängigkeit vom Patientenalter

Die zuvor dargestellten deutlichen Unterschiede der differentiellen Expression zwischen unter 30-Jährigen und 30-37-Jährigen veranlassten dazu, die hier zugrundeliegenden absoluten Expressionswerte in Normalgewebe und Tumorgewebe zu betrachten. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die Unterschiede der differentiellen Expression vor allem auf Expressionsänderungen im Tumor- oder im Normalgewebe zurückzuführen waren.

Variabilität der absoluten Expression

Unter 30-Jährige und 30-37-Jährige (Abbildung 15): Die absolute Expression variierte im Tumorgewebe der unter 30-Jährigen mit 78% ($\pm 22\%$) aber im Tumorgewebe der 30-37-Jährigen nur mit 54% ($\pm 19\%$), wobei der Unterschied hochsignifikant war ($p = 1,5 * 10^{-10}$). Im Normalgewebe der unter 30-Jährigen variierte sie mit 70% ($\pm 18\%$), im Normalgewebe der 30-37-Jährigen nur mit 50% ($\pm 20\%$). Auch hier war der Unterschied signifikant ($p = 0,00011$).

30-37-Jährige und über 37-Jährige (Tabelle 16): Die absolute Expression variierte im Tumorgewebe der über 37-Jährigen mit 62% ($\pm 25\%$), im Normalgewebe der über 37-Jährigen mit 54% ($\pm 34\%$). Die Unterschiede zu den 30-37-Jährigen waren in keinem Fall signifikant.

	Tumorgewebe				Normalgewebe				T/N
	<30 Jahre		30-37 Jahre		<30 Jahre		30-37 Jahre		
	Ratio, p-Wert		Ratio, p-Wert		Ratio, p-Wert		Ratio, p-Wert		
NSMAF	7,8E-04 (± 78%)	6,1E-04 (± 35%)	0,8	0,34	4,3E-04 (± 52%)	2,3E-04 (± 52%)	0,5	** 0,0093	-0,2
SMPD3	3,7E-05 (± 59%)	4,2E-05 (± 56%)	1,2	0,54	2,8E-04 (± 77%)	2,0E-04 (± 45%)	0,7	0,23	-0,1
TNFL	3,8E-04 (± 77%)	5,1E-04 (± 60%)	1,3	0,29	2,0E-04 (± 56%)	2,0E-04 (± 86%)	1,0	0,94	0,1
FasL	2,7E-05 (± 88%)	5,5E-05 (± 72%)	2,0	* 0,042	1,0E-05 (± 84%)	2,1E-05 (± 95%)	2,1	0,093	0,0
FasR	3,1E-04 (± 47%)	3,1E-04 (± 48%)	1,0	0,96	3,6E-04 (± 31%)	4,4E-04 (± 63%)	1,2	0,36	-0,1
FAST	1,3E-04 (± 91%)	7,3E-05 (± 52%)	0,6	0,096	1,2E-04 (± 80%)	1,2E-04 (± 35%)	1,0	0,91	0,2
BCL2	2,8E-04 (± 82%)	1,8E-04 (± 40%)	0,6	0,12	3,8E-04 (± 51%)	3,4E-04 (± 34%)	0,9	0,51	0,2
BAG1	4,5E-04 (± 39%)	3,6E-04 (± 26%)	0,8	0,084	1,4E-03 (± 96%)	1,7E-03 (± 49%)	1,3	0,36	0,0
BAX	8,7E-03 (± 105%)	5,0E-03 (± 51%)	0,6	0,16	4,7E-03 (± 98%)	2,3E-03 (± 59%)	0,5	0,078	-0,1
BAD	1,2E-04 (± 55%)	7,4E-05 (± 39%)	0,6	* 0,019	2,8E-04 (± 77%)	2,5E-04 (± 48%)	0,9	0,64	0,2
CASP3	2,5E-04 (± 54%)	2,1E-04 (± 39%)	0,9	0,41	1,6E-04 (± 30%)	1,9E-04 (± 72%)	1,2	0,5	0,0
CASP4	7,8E-06 (± 83%)	1,1E-05 (± 68%)	1,4	0,23	2,3E-06 (± 67%)	3,4E-06 (± 111%)	1,4	0,39	0,0
CyclinD1	2,7E-03 (± 128%)	6,3E-04 (± 93%)	0,2	* 0,037	7,7E-04 (± 82%)	8,0E-04 (± 64%)	1,0	0,88	0,6
CyclinD2	1,8E-02 (± 113%)	4,3E-03 (± 69%)	0,3	* 0,023	2,5E-03 (± 85%)	1,2E-03 (± 43%)	0,5	* 0,041	0,3
CyclinD3	1,6E-03 (± 77%)	8,6E-04 (± 42%)	0,5	* 0,039	1,3E-03 (± 77%)	9,3E-04 (± 31%)	0,7	0,17	0,1
cdk4	1,3E-02 (± 78%)	7,6E-03 (± 48%)	0,6	0,069	8,7E-03 (± 75%)	5,0E-03 (± 39%)	0,6	0,056	0,0
CyclinE1	1,6E-03 (± 90%)	7,6E-04 (± 61%)	0,5	* 0,044	9,0E-04 (± 76%)	1,1E-03 (± 54%)	1,3	0,36	0,2
cdk2	4,6E-04 (± 73%)	3,0E-04 (± 61%)	0,6	0,12	3,5E-04 (± 62%)	2,8E-04 (± 61%)	0,8	0,39	0,1
PCNA	3,0E-03 (± 60%)	1,9E-03 (± 35%)	0,6	* 0,047	1,7E-03 (± 61%)	1,8E-03 (± 27%)	1,1	0,75	0,2
p21	1,8E-03 (± 106%)	1,1E-03 (± 60%)	0,6	0,22	2,4E-03 (± 69%)	1,9E-03 (± 43%)	0,8	0,34	0,1
p53	7,7E-03 (± 113%)	4,3E-03 (± 70%)	0,6	0,19	6,0E-03 (± 82%)	3,8E-03 (± 56%)	0,6	0,15	0,1
GADD45A	8,1E-04 (± 109%)	5,2E-04 (± 111%)	0,6	0,32	5,5E-04 (± 63%)	4,9E-04 (± 47%)	0,9	0,61	0,1
RAD23a	1,9E-03 (± 64%)	1,4E-03 (± 35%)	0,7	0,18	2,4E-03 (± 65%)	2,5E-03 (± 38%)	1,0	0,89	0,1
ERCC1	5,9E-03 (± 109%)	2,5E-03 (± 70%)	0,4	0,066	7,6E-03 (± 99%)	5,2E-03 (± 68%)	0,7	0,31	0,2
RAD52	5,1E-04 (± 95%)	1,9E-04 (± 52%)	0,4	* 0,024	2,3E-04 (± 61%)	1,3E-04 (± 70%)	0,6	* 0,04	0,2
RAD51	1,1E-03 (± 86%)	7,1E-04 (± 59%)	0,7	0,19	8,1E-04 (± 82%)	5,8E-04 (± 35%)	0,7	0,23	0,0
RAD50	8,1E-04 (± 40%)	4,7E-04 (± 21%)	0,6	** 0,0012	1,2E-03 (± 44%)	1,2E-03 (± 21%)	1,0	0,96	0,2
Ku70	5,8E-05 (± 64%)	3,8E-05 (± 41%)	0,7	0,077	5,2E-05 (± 56%)	6,2E-05 (± 46%)	1,2	0,41	0,1
Ku80	8,7E-03 (± 64%)	4,9E-03 (± 42%)	0,6	* 0,027	6,2E-03 (± 52%)	4,1E-03 (± 31%)	0,7	* 0,036	0,1
DNAPK	5,4E-03 (± 74%)	3,5E-03 (± 42%)	0,6	0,11	3,4E-03 (± 58%)	3,0E-03 (± 35%)	0,9	0,49	0,1
GPX2	6,0E-04 (± 67%)	5,1E-04 (± 92%)	0,9	0,62	6,2E-04 (± 111%)	2,2E-04 (± 39%)	0,3	* 0,038	-0,4
GSTA2	2,1E-04 (± 70%)	4,2E-05 (± 37%)	0,2	***0,0003	1,1E-03 (± 61%)	1,6E-03 (± 64%)	1,4	0,17	0,6
PRKR	2,6E-03 (± 73%)	1,9E-03 (± 70%)	0,7	0,29	1,5E-03 (± 58%)	1,2E-03 (± 66%)	0,8	0,28	0,0
NFKkappaB	1,4E-04 (± 58%)	1,0E-04 (± 46%)	0,7	0,16	2,9E-04 (± 78%)	2,9E-04 (± 31%)	1,0	0,96	0,1
Clusterin	4,0E-03 (± 67%)	2,0E-03 (± 51%)	0,5	* 0,015	5,9E-02 (± 69%)	5,2E-02 (± 29%)	0,9	0,57	0,3
RAB2	2,1E-03 (± 53%)	1,2E-03 (± 42%)	0,6	* 0,012	2,5E-03 (± 66%)	2,0E-03 (± 23%)	0,8	0,28	0,1
NME1	4,4E-03 (± 97%)	2,7E-03 (± 63%)	0,6	0,19	2,2E-03 (± 83%)	1,3E-03 (± 57%)	0,6	0,093	0,0

Tabelle 15: Absolute Expressionswerte [ng/10 µl] der unter 30-jährigen und der 30-37-jährigen Patienten. **Ratio, p-Wert:** Verhältnis der durchschnittlichen absoluten Expression eines Gens in beiden Gruppen und dessen Signifikanz (t-Test für unabhängige Variablen). **T/N:** positiv, wenn der Unterschied der absoluten Expression beider Gruppen im Tumorgewebe größer ist als im Normalgewebe.
* p < 0,5 ** p < 0,01 *** p < 0,001

	Tumorgewebe			Normalgewebe			T/N
	30-37 Jahre		>37 Jahre	30-37 Jahre		>37 Jahre	
	Expression (ng/10 µl)	Ratio, p-Wert	Expression (ng/10 µl)	Expression (ng/10 µl)	Expression (ng/10 µl)	Ratio, p-Wert	
NSMAF	6,1E-04 (± 35%)	1,0 0,88	6,3E-04 (± 57%)	2,3E-04 (± 52%)	3,3E-04 (± 87%)	1,4 0,27	-0,1
SMPD3	4,2E-05 (± 56%)	0,6 * 0,035	2,7E-05 (± 22%)	2,0E-04 (± 45%)	1,5E-04 (± 37%)	0,7 0,081	0,1
TNFR	5,1E-04 (± 60%)	0,7 0,09	3,4E-04 (± 45%)	2,0E-04 (± 86%)	1,3E-04 (± 48%)	0,6 0,18	0,0
FasL	5,5E-05 (± 72%)	1,0 0,96	5,5E-05 (± 35%)	2,1E-05 (± 95%)	8,2E-06 (± 77%)	0,4 * 0,04	-0,4
FasR	3,1E-04 (± 48%)	1,0 0,82	3,0E-04 (± 20%)	4,4E-04 (± 63%)	3,6E-04 (± 27%)	0,8 0,35	-0,1
FasTK	7,3E-05 (± 52%)	1,3 0,23	9,6E-05 (± 57%)	1,2E-04 (± 35%)	1,4E-04 (± 47%)	1,1 0,57	0,1
BCL2	1,8E-04 (± 40%)	1,3 * 0,047	2,4E-04 (± 33%)	3,4E-04 (± 34%)	3,5E-04 (± 40%)	1,0 0,83	0,1
BAG1	3,6E-04 (± 26%)	0,9 0,44	3,3E-04 (± 26%)	1,7E-03 (± 49%)	1,5E-03 (± 59%)	0,9 0,57	0,0
BAX	5,0E-03 (± 51%)	0,9 0,51	4,3E-03 (± 62%)	2,5E-03 (± 58%)	2,5E-03 (± 56%)	1,1 0,7	0,0
BAD	7,4E-05 (± 39%)	1,2 0,24	9,0E-05 (± 43%)	2,5E-04 (± 48%)	3,3E-04 (± 53%)	1,3 0,18	0,0
CASP3	2,1E-04 (± 39%)	1,2 0,4	2,6E-04 (± 71%)	1,9E-04 (± 72%)	1,3E-04 (± 63%)	0,7 0,22	-0,1
CASP4	1,1E-05 (± 68%)	0,9 0,64	9,6E-06 (± 69%)	3,4E-06 (± 111%)	1,5E-06 (± 98%)	0,4 0,11	-0,3
CyclinD1	6,3E-04 (± 93%)	1,5 0,35	9,4E-04 (± 110%)	8,0E-04 (± 64%)	6,7E-04 (± 39%)	0,8 0,42	0,1
CyclinD2	4,3E-03 (± 69%)	0,6 0,11	2,5E-03 (± 105%)	1,2E-03 (± 43%)	8,1E-04 (± 47%)	0,7 * 0,031	0,1
CyclinD3	8,6E-04 (± 42%)	1,6 0,24	1,3E-03 (± 109%)	9,3E-04 (± 31%)	1,1E-03 (± 62%)	1,1 0,51	0,1
cdk4	7,6E-03 (± 48%)	1,0 0,85	7,9E-03 (± 59%)	5,0E-03 (± 39%)	5,6E-03 (± 49%)	1,1 0,56	0,0
CyclinE1	7,6E-04 (± 61%)	1,1 0,7	8,5E-04 (± 90%)	1,1E-03 (± 54%)	3,1E-03 (± 232%)	2,8 0,31	-0,4
cdk2	3,0E-04 (± 61%)	0,8 0,4	2,4E-04 (± 53%)	2,8E-04 (± 61%)	2,9E-04 (± 47%)	1,0 0,89	0,1
PCNA	1,9E-03 (± 35%)	1,0 0,86	2,0E-03 (± 75%)	1,8E-03 (± 27%)	1,8E-03 (± 52%)	1,0 0,99	0,0
p21	1,1E-03 (± 60%)	0,9 0,67	9,5E-04 (± 92%)	1,9E-03 (± 43%)	2,6E-03 (± 58%)	1,4 0,15	-0,1
p53	4,3E-03 (± 70%)	0,9 0,84	4,1E-03 (± 80%)	3,8E-03 (± 56%)	4,6E-03 (± 47%)	1,2 0,36	-0,1
GADD45A	5,2E-04 (± 111%)	1,0 0,97	5,1E-04 (± 107%)	4,9E-04 (± 47%)	5,4E-04 (± 48%)	1,1 0,65	0,0
RAD23a	1,4E-03 (± 35%)	1,2 0,45	1,7E-03 (± 82%)	2,5E-03 (± 38%)	2,7E-03 (± 43%)	1,1 0,71	0,1
ERCC1	2,5E-03 (± 70%)	0,9 0,71	2,2E-03 (± 63%)	5,2E-03 (± 68%)	5,5E-03 (± 43%)	1,1 0,81	0,0
RAD52	1,9E-04 (± 52%)	0,7 0,11	1,3E-04 (± 67%)	1,3E-04 (± 70%)	1,3E-04 (± 30%)	1,0 0,92	0,2
RAD51	7,1E-04 (± 59%)	1,0 0,85	6,8E-04 (± 76%)	5,8E-04 (± 35%)	7,2E-04 (± 63%)	1,2 0,32	-0,1
RAD50	4,7E-04 (± 21%)	1,2 0,097	5,9E-04 (± 37%)	1,2E-03 (± 21%)	1,0E-03 (± 28%)	0,9 0,15	0,0
Ku70	3,8E-05 (± 41%)	1,0 0,87	3,7E-05 (± 49%)	6,2E-05 (± 46%)	7,9E-05 (± 52%)	1,3 0,22	-0,1
Ku80	4,9E-03 (± 42%)	1,0 0,83	5,1E-03 (± 65%)	4,1E-03 (± 31%)	5,0E-03 (± 42%)	1,2 0,19	-0,1
DNAPK	3,5E-03 (± 42%)	0,9 0,55	3,1E-03 (± 66%)	3,0E-03 (± 35%)	2,8E-03 (± 34%)	0,9 0,6	0,0
GPX2	5,1E-04 (± 92%)	0,7 0,31	3,6E-04 (± 48%)	2,2E-04 (± 39%)	3,2E-04 (± 50%)	1,5 * 0,048	0,0
GSTA2	4,2E-05 (± 37%)	2,1 * 0,05	8,7E-05 (± 92%)	1,6E-03 (± 64%)	1,6E-03 (± 35%)	1,0 0,88	0,3
PRKR	1,9E-03 (± 70%)	0,8 0,28	1,5E-03 (± 38%)	1,2E-03 (± 66%)	1,0E-03 (± 41%)	0,8 0,48	0,0
NFKappab	1,0E-04 (± 46%)	1,0 0,94	1,0E-04 (± 31%)	2,9E-04 (± 31%)	3,0E-04 (± 51%)	1,0 0,85	0,0
Clusterin	2,0E-03 (± 51%)	1,3 0,26	2,6E-03 (± 63%)	5,2E-02 (± 29%)	4,8E-02 (± 29%)	0,9 0,53	0,1
RAB2	1,2E-03 (± 42%)	1,0 0,8	1,1E-03 (± 42%)	2,0E-03 (± 23%)	2,0E-03 (± 39%)	1,0 0,94	0,0
NME1	2,7E-03 (± 63%)	1,0 0,9	2,6E-03 (± 68%)	1,3E-03 (± 57%)	1,3E-03 (± 58%)	1,1 0,79	0,0

Tabelle 16: Absolute Expressionswerte [ng/10 µl] der 30-37-jährigen und der über 37-jährigen Patienten. **Ratio, p-Wert:** Verhältnis der durchschnittlichen absoluten Expression eines Gens in beiden Gruppen und dessen Signifikanz (t-Test für unabhängige Variablen). **T/N:** positiv, wenn der Unterschied der absoluten Expression beider Gruppen im Tumorgewebe größer ist als im Normalgewebe.
* p < 0,5 ** p < 0,01 *** p < 0,001

Unterschiede der absoluten Genexpression der beiden Altersgruppen

Unter 30-Jährige und 30-37-Jährige (Tabelle 15): Die absolute Genexpression der einzelnen Gene im Tumorgewebe der 30-37-jährigen Patienten war im Durchschnitt um den Faktor 0,63 (SD 57%) signifikant geringer als die absolute Expression im Tumorgewebe der unter 30-Jährigen ($p=0,017$). Auch die absolute Genexpression der Gene im Normalgewebe der 30-37-jährigen Patienten war signifikant geringer als die absolute Expression im Normalgewebe der unter 30-Jährigen ($p=0,008$), allerdings nur um den Faktor 0,85 (SD 43%). Die absolute Expression von fünf Genen unterschied sich im Normalgewebe stärker als im Tumorgewebe (NSMAF, SMPD3, Fas-R, BAX, GPX2). Bei sämtlichen Genen mit einem signifikanten Unterschied ihrer differentiellen Expression (vergl. Tabelle 14) in diesen beiden Altersgruppen waren die Unterschiede in der absoluten Expression ihrer Tumorgewebe stärker als diejenigen ihrer Normalgewebe.

30-37-Jährige und über 37-Jährige (Tabelle 16): Eine Trend zur allgemeinen Hoch- oder Herunterregulation der absoluten Expression bei der Gegenüberstellung der 30-37-Jährigen mit den über 37-Jährigen Patienten ließ sich weder im Tumor noch im Normalgewebe feststellen: Das Verhältnis der absoluten Expression eines Gens im Tumorgewebe eines 30-37-Jährigen zur Expression bei einem über 37-Jährigen lag im Durchschnitt bei 0,996 (SD 30%), das entsprechende Verhältnis der absoluten Expression im Normalgewebe im Durchschnitt bei 0,990 (SD 40%).

4.4 Vergleich der Ergebnisse aus RTQ-PCR und Array

In der dieser Arbeit vorausgehenden Untersuchung (PORT 2005) wurden bereits differentielle Genexpressionen mittels der Gen-Array-Methode bestimmt. Jener Arbeit lag eine andere Patientienkohorte zugrunde. Hier wurden die mittels RTQ-PCR gewonnenen Ergebnisse mit den erwähnten Array-Daten verglichen. Dabei wurden alle signifikanten differentiellen Expressionswerte im Array dem entsprechenden durch RTQ-PCR bestimmten Wert gegenübergestellt. Auf diese Weise wurden 30 Wertepaare verglichen (siehe Tabelle 17). Da zur Bestimmung der Array-Werte 5 Seminome und 6 Nichtseminome und zur Bestimmung der RTQ-PCR-Werte 9 Seminome und 10 Nichtseminome untersucht wurden, gingen insgesamt 196 Messungen an Seminomen und 272 Messungen an Nichtseminomen in den Vergleich ein. Nochmals sei erwähnt, dass bei beiden Untersuchungen zwar Material der gleichen Tumorentitäten, nicht jedoch derselben Patienten untersucht wurde.

Gen	Tumorentität	RTQ-PCR		Array	
		dmE	LER	dmE	LER
NSMAF	SE	3,0	0,479	1,9	0,279
NSMAF	NS	1,6	0,190	1,4	0,146
FAST	SE	0,7	-0,148	1,4	0,146
FAST	NS	0,6	-0,201	0,5	-0,301
BAG1	SE	0,2	-0,669	0,4	-0,398
BAG1	NS	0,4	-0,408	0,3	-0,523
BAX	SE	2,4	0,372	1,9	0,279
BAX	NS	1,4	0,140	1,1	0,041
BAD	SE	0,3	-0,506	0,7	-0,155
BAD	NS	0,4	-0,411	0,6	-0,222
CASP3	SE	1,3	0,099	1,6	0,204
CASP3	NS	1,7	0,219	1,8	0,255
CASP4	SE	8,9	0,950	1,1	0,041
CASP4	NS	7,0	0,845	1,5	0,176
PCNA	SE	1,1	0,022	1,5	0,176
PCNA	NS	1,3	0,127	1,5	0,176
GADD45A	NS	1,3	0,103	0,5	-0,301
RAD23a	NS	0,6	-0,200	0,6	-0,222
ERCC1	SE	0,5	-0,335	0,6	-0,222
ERCC1	NS	0,5	-0,292	0,4	-0,398
RAD51	SE	1,4	0,139	2,2	0,342
RAD51	NS	0,8	-0,111	0,6	-0,222
GPX2	SE	2,3	0,362	4,3	0,633
GPX2	NS	0,8	-0,079	0,9	-0,046
GSTA2	SE	0,04	-1,409	0,2	-0,699
GSTA2	NS	0,07	-1,141	0,2	-0,699
NFRkB	SE	0,4	-0,384	0,5	-0,301
NFRkB	NS	0,4	-0,368	0,5	-0,301
CLU	SE	0,03	-1,496	0,1	-1,097
CLU	NS	0,07	-1,180	0,0	-1,398

Tabelle 17: Gegenüberstellung der differentiellen Expression (dmE), wie sie mittels RTQ-PCR und mittels der Array-Methode bestimmt wurde. Zusätzlich zur dmE ist auch die LER (log expression ratio) angegeben. Den Ergebnissen beider Methoden liegen jeweils unterschiedliche Patientkohorten zugrunde.

In der Abbildung 20 wurden die LER-Werte aus Tabelle 17 gegeneinander aufgetragen. Nur in zwei Fällen wurde durch die RTQ-PCR eine zu den Array-Vergleichswerten gegensinnige differentielle Expression bestimmt: So lag die differentielle Expression von GADD45A bei Nichtseminomen laut Array-Methode bei 0,5. Mittels RTQ-PCR wurde sie aber mit 1,64 bestimmt. Entsprechend war der Array-Wert für FAST bei Seminomen 1,4, bei der RTQ-PCR-Untersuchung jedoch 0,85. Sämtliche anderen Vergleichspaare fielen in den rechten oberen („up-up“) bzw. in die linken-unteren (down-down) Quadranten. Das bedeutet, dass hier die durch beide Methoden ermittelten differentiellen Expressionen in die gleiche Richtung wiesen (Konkordanz), was einer Übereinstimmung von 93,7% entsprach. Die Wertepaare korrelierten mit der Regressionsgeraden ($y = 1,091 \cdot x - 0,019$) mit einem Koeffizienten von $r^2 = 0,71$.

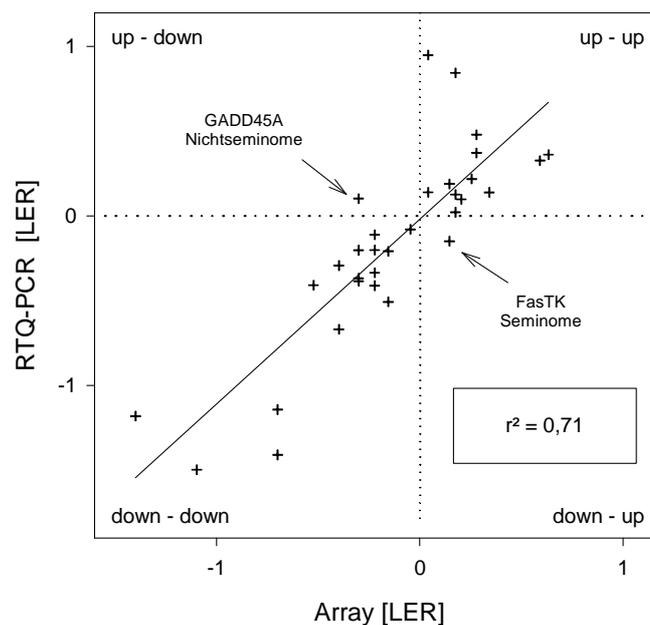


Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse aus RTQ-PCR und Array. Darstellung des Logarithmus der differentiellen Expression („LER“). Jedes Kreuz repräsentiert die dmE eines Gens entweder bei Seminomen oder Nichtseminomen. Vertikal: dmE aus den RTQ-PCR Messungen der vorliegenden Arbeit. Horizontal: dmE wie zuvor mittels Array bestimmt. GADD45A wurde in Nichtseminomen und FAST in Seminomen von beiden Methoden gegensätzlich bestimmt. Die RTQ-PCR-Daten und den Array-Daten gingen aus der Untersuchung unterschiedlicher Patientenkohorten hervor.

Detektionsraten von Array und RTQ-PCR

Durch das PCR-Verfahren wurden bei Seminomen und Nichtseminomen in 54% der Fälle signifikante differentielle Expressionen ermittelt ($p < 0,05$ im t-Test für abhängige Variablen bei der Gegenüberstellung der jeweiligen absoluten Expression im Tumorgewebe und im Normalgewebe). Durch das Array-Verfahren gelang dies bei der Untersuchung der gleichen Gene nur in 23% der Fälle. Um zu klären, ob die geringere Detektionsrate durch das Array-Verfahren vom absoluten Expressionsniveau abhängig war, wurden sämtliche Gene, für die in Seminomen oder Nichtseminomen durch eines der beiden Verfahren eine signifikante differentielle Expression ermittelt wurde, in Tabelle 18 zusammengefasst. Durch die Einteilung in vier Gruppen nach aufsteigender absoluter Expression im Normalgewebe wurde eine Abnahme des Anteils derjenigen Fälle erkennbar, in denen eine signifikante Bestimmung der dE durch RTQ-PCR, nicht aber durch Array gelang (von 75% in der Gruppe A bis auf 50% in der Gruppe D).

Gen und Entität	aE (NG)	Signifikante differentielle Expression detektiert?		Anteil der Fälle Array - / RTQ-PCR +	Gen und Entität	aE (NG)	Signifikante differentielle Expression detektiert?		Anteil der Fälle Array - / RTQ-PCR +
		RTQ-PCR	Array				RTQ-PCR	Array	
Caspase 4	SE	2,2E-06	+		NME1	SE	9,2E-04	+	
Caspase 4	NS	2,6E-06	+		RAD50	SE	1,1E-03	+	
FasL	NS	9,6E-06	+		RAD50	NS	1,1E-03	+	
FasL	SE	1,8E-05	+		GSTA2	SE	1,2E-03	+	
Ku70	NS	6,6E-05	+	Gruppe A (n=12)	BAG1	NS	1,2E-03	+	Gruppe C (n=11)
FAST	NS	1,2E-04	+		GSTA2	NS	1,7E-03	+	
TNFL	NS	1,4E-04	+	75%	PCNA	NS	1,7E-03	+	55%
Caspase 3	SE	1,5E-04	+		p21	SE	1,8E-03	+	
SMPD3	NS	2,0E-04	+		BAX	SE	1,8E-03	+	
GPX2	SE	2,1E-04	+		BAG1	SE	2,0E-03	+	
SMPD3	SE	2,1E-04	+		RAB2	NS	2,0E-03	+	
TNFL	SE	2,2E-04	+		NME1	NS	2,1E-03	+	
BAD	NS	2,4E-04	+		RAB2	SE	2,4E-03	+	
NFRkB	NS	2,7E-04	+		RAD23a	NS	2,5E-03	+	
NSMAF	SE	2,8E-04	+		RAD23a	SE	2,6E-03	+	
NFRkB	SE	3,2E-04	+		DNAPK	SE	2,7E-03	+	Gruppe D (n=12)
BCL2	SE	3,4E-04	+	Gruppe B (n=11)	p21	NS	2,8E-03	+	
BAD	SE	3,4E-04	+		ERCC1	SE	4,4E-03	+	50%
BCL2	NS	3,8E-04	+	64%	cdk4	SE	4,7E-03	+	
GADD45A	SE	4,2E-04	+		ERCC1	NS	7,5E-03	+	
Cyclin D1	SE	5,5E-04	+		cdk4	NS	7,9E-03	+	
RAD51	NS	6,1E-04	+		Clusterin	NS	5,1E-02	+	
RAD51	SE	7,9E-04	+		Clusterin	SE	5,6E-02	+	

Tabelle 18: Detektion einer signifikanten differentiellen Expression durch RTQ-PCR und durch Array. Gen und Entität: Alle Fälle, bei denen in der Gegenüberstellung von Seminomen und Nichtseminomen entweder durch Array oder durch RTQ-PCR eine differentielle Expression signifikant bestimmt wurde, sind aufgeführt. Durch welches der beiden Verfahren eine signifikante differentielle Expression detektiert wurde, ist mit Pluszeichen kenntlich gemacht. Diese sind aufsteigend nach absoluter Expression im entsprechenden Normalgewebe (aE(NG)) angeordnet. Sie sind in vier annähernd gleich große Gruppen eingeteilt. Man sieht, dass der Anteil der Fälle, in denen eine signifikante differentielle Expression durch das RTQ-PCR-Verfahren aber nicht durch das Array-Verfahren bestimmt werden konnte („Array-/RTQ-PCR+) mit zunehmender absoluter Expression abnahm.

5 Diskussion

5.1 *Seminome und Nichtseminome*

Es fanden sich kaum Expressionsunterschiede zwischen Seminomen und Nichtseminomen. Nur bei vier Genen konnte ein signifikanter Unterschied ihrer differentiellen Expression festgestellt werden. Auch eine Ähnlichkeitsanalyse ergab keine relevanten Unterschiede in den Expressionsprofilen von Seminomen und Nichtseminomen. Ebenso wenig fanden sich relevante Unterschiede bei der Untersuchung der absoluten Expression. Erwähnenswert ist allerdings die signifikant höhere Variabilität der Expression im Tumorgewebe der Nichtseminome (77%) gegenüber dem Tumorgewebe der Seminome (59%). Dies darf als Ausdruck einer größeren Heterogenität in erstgenannter Tumorentität gewertet werden.

5.1.1 Apoptoseregulation

Die anhand der 12 untersuchten Gene abgebildete Apoptoseregulation stellte sich in allen 19 untersuchten Hodentumoren ausgesprochen homogen dar. Kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten von Seminomen oder Nichtseminomen war zu erkennen. In allen Tumoren fand sich eine insgesamt deutlich proapoptotische Expressionsregulation. Diese ist gut vereinbar sowohl mit der Beobachtung einer den Hodentumoren innewohnenden Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli (SPIERINGS 2003) als auch mit der erhöhten Apoptoserate in Hodentumoren (Apoptoseindex 2,7% in Seminomen und 8% in Nichtseminomen bei Nachweis durch ISEL (in situ end-labeling), SCHMELZ 2004).

Initiation

Die Gene der Ceramid-induzierten Apoptose SMPD3 und NSMAF verhielten sich gegenseitig zueinander (deutliche Herunterregulation der Sphingomyelinase und Hochregulation des NSMAF). Demnach kann die exzellente Radiosensibilität v.a. der Seminome nicht mit der differentiellen Expression der Sphingomyelinase erklärt werden. Versuche an Hoden von ASMKO (Saure Sphingomyelinase knock-out) -Mäusen sprechen aber dafür, dass diese Radiosensibilität trotzdem über den Ceramid-Weg vermittelt werden könnte (OTALA 2004): Die dort nachgewiesenen Ceramidspiegel sowie die Apoptoseraten waren nach Bestrahlung (Photonen 6 MV bis 0,5 Gy/Maus) unverändert zur Kontrollgruppe erhöht. Entsprechende Versuche mit einer neutralen Sphingomyelinase sind noch nicht

publiziert. Dass die Ceramid-induzierte Apoptose auch in unveränderten menschlichem Hodengewebe (Orchidektomiepräparate bei Prostatakarzinom-Patienten) ein relevanter Signaltransduktionsweg ist, wurde durch SUOMALAINEN (2003) demonstriert. Zusammen mit dem hier vorliegenden Befund einer in allen 19 Hodentumoren deutlich herunterregulierten SMPD3 stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um eine frühe Fehlregulation handelt, welche die physiologische Apoptoseregulation des Hodengewebes hemmt und damit die Kanzerogenese an sich begünstigt. Möglicherweise kann man die Hochregulation von NSMAF in beiden Tumorgruppen als reaktiven Kompensationsmechanismus zu einer primär defizitären SMPD3-Expression interpretieren. Da der NSMAF imstande ist, TNF-R55-vermittelte Apoptosesignale an die SMPD3 weiterzuleiten (TCHERKASOWA 2002, MARCHESINI 2003), sollte die Rolle dieses Signalweges bei Hodentumoren näher untersucht werden, beispielsweise durch die Bestimmung von Ceramidspiegeln in Hodentumorzellen nach Apoptosestimulation durch TNF und in Abhängigkeit von der SMPD3- oder NSMAF-Expression.

Sowohl Fas-Ligand als auch TNF-Ligand waren im Tumorgewebe signifikant hochreguliert, während der Fas-Rezeptor und auch die Fas-Tyrosinkinase nichtsignifikant herunterreguliert waren. Bei immunhistologischen Untersuchungen an Nichtseminomen war die Rate sowohl der Fas-Ligand als auch der Fas-Rezeptor-positiven Lymphozyten größer als die der Tumorzellen (Tumorzellen: 50% positiv für Fas-Ligand, 51% für Fas-Rezeptor; Lymphozyten: 72% für Fas-Ligand, 73% für Fas-Rezeptor, SCHMELZ 2002). Deshalb ist es denkbar, dass die Genexpressionsaktivität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten für einen Teil der hier festgestellten Hochregulation der differentiellen Expression des Fas-Liganden verantwortlich war. Die ebenfalls festgestellte Herunterregulation des Fas-Rezeptors sowie der FAST sind aber sicher nicht durch die Lymphozyten bedingt. (1.) Eine zusätzliche, *geringe* Expressionsaktivität von in den Tumor infiltrierenden Zellen würde die differentielle Expression trotzdem *erhöhen*, da sie sich zu der bereits vorhandenen Expressionsaktivität *addieren* würde. (2.) In den Lymphozyten ist aufgrund der oben erwähnten Immunhistologie sogar von einem *höheren* Expressionsniveau des Fas-Rezeptor-Gens als in den Tumorzellen auszugehen. Somit wird auf Genexpressionsebene die Hypothese gestützt, (Hoden)tumoren entgingen dem Angriff von T-Lymphozyten, indem sie ihrerseits durch eine Überexpression von Fas-Ligand die T-Zellen in die Apoptose trieben (NAGATA 1995). Ebenfalls gestützt wurde die Hypothese, Hodentumoren entgingen der T-Zell-Kontrolle durch eine verminderte Induzierbarkeit eines Fas-abhängigen Zelltodes (TAKAYAMA 2002). Dies steht allerdings im

Widerspruch mit immunhistologischen Studien: Hier konnte weder eine Korrelation zwischen der Rate der Fas-Ligand-positiven Tumorzellen und dem Apoptoseindex der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (SCHMELZ 2002) noch zwischen der Rate der Fas-Rezeptor-tragenden Tumorzellen und ihrem eigenen Apoptoseindex festgestellt werden (SCHMELZ 2002, GROBHOLZ 2002). Möglicherweise sind posttranskriptionelle Mechanismen für diese Diskrepanz verantwortlich.

Integration

Die Expression der vier untersuchten Gene der Apoptoseintegration - BAX und BAD (proapoptotisch) sowie BCL-2 und BAG1 (antiapoptotisch) - war vorwiegend proapoptotisch verändert. Die erhöhte differentielle Expression von BCL-2 mag auch zum Teil auf die immunhistologisch nachgewiesene erhöhte Expression in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (GROBHOLZ 2002) zurückzuführen sein. In derselben Arbeit wurde eine positive Korrelation der Rate BAX-positiver Tumorzellen mit dem Apoptoseindex gezeigt ($r = 0,54$), was unterstreicht, dass die mitochondriale Apoptoseintegration eine Rolle bei der Apoptoseregulation in Hodentumoren spielt. Bei der vorliegenden Arbeit stach jedoch keines dieser vier untersuchten Gene aus dem allgemeinen proapoptotischen Trend in einer Weise hervor, die Rückschlüsse auf die Natur der hier einflussnehmenden proapoptotischen Signale zuließe. Ohnehin begründet keiner der bisher beschriebenen Einflüsse auf die BCL-2-ähnlichen Proteine (z.B. von Wachstumsfaktoren auf das BAD (ZHA 1997) oder Hsp70 bzw. Raf-1 auf BAG-1 (TOWNSEND 2003)) einen Exklusivitätsanspruch. Die BCL-2-ähnlichen Proteine sind schließlich Teil des Prozesses, in dem der Großteil sämtlicher Apoptosesignale konvergiert (DANIAL 2004).

Exekution

Die Erhöhung der differentiellen Expression von Caspase 3 als einem Schlüsselprotein der Caspasen-Kaskade (KIHLMARK 2001) unterstützt die Annahme, dass die in Hodentumoren vermehrt beobachtete Apoptose (siehe Apoptoseindices bei SCHMELZ 2002 und GROBHOLZ 2002) eine klassische, Caspase-3-abhängige, premitotische Apoptose ist (SHINOMIYA 2001, ROSS 1999). Allerdings wurde auch eine signifikante Erhöhung der Caspase 4 – Expression festgestellt. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch eine Caspase-3-unabhängige, durch ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress induzierte Apoptose (HITOMI 2004) bei Hodentumoren eine Rolle spielt. Da ER-Stress auch durch Ischämie ausgelöst wird, stellt dies aber womöglich nur ein Artefakt durch die Ligation des Samenstrangs vor der Orchidektomie dar.

Aufschlussreich könnten hier vergleichende Messungen an Hodengewebe sein, dass nicht ligiert wurde (beispielsweise Biopsate zur Infertilitätsdiagnostik).

5.1.2 Zellzyklusregulation

Bei Seminomen und Nichtseminomen stellte sich die Expressionssituation der untersuchten Gene der Zellzyklusregulation gleichermaßen dar: Die Expression von cdk4 und Cyclin D2 war jeweils signifikant erhöht, während Cyclin D3 unverändert blieb. Signifikant unterschied sich die Expression von Cyclin D1 in Seminomen (herunterreguliert) und Nichtseminomen (hochreguliert). Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur, wobei die Cyclin D2-Erhöhung meist auf den pathognomonischen Befund einer vermehrten Zahl von Isochromosomen i(12p) in Hodentumoren zurückgeführt wird, auf dem das Cyclin D2-Gen lokalisiert ist (CHAGANTI und HOULDSWORTH 2000, ALBERS und WEIBBACH 2003). Die Cyclin D2-Überexpression wurde aber auch schon mit der FSH (Follikel-stimulierendes Hormon)-Abhängigkeit dieses Gens in Verbindung gebracht (YAN 2003). Immunhistochemische Untersuchungen an Hodentumoren zeigten, dass bei schwankender RB-Protein-Expression dieses aber immer phosphoryliert (d.h. in die G₁/S-permissive Form überführt) war, was auf eine Aktivierung des D-Cyclin/cdk4-Komplexes hindeutet (BARTKOWA 2003b). Für die Expression von Cyclin E/cdk2 in Hodentumoren fanden sich allerdings unterschiedliche Angaben: Diese wurde sowohl als herunterreguliert (SCHMIDT 2001, BARTKOVA 2003a/b) als auch als hochreguliert (BARTKOVA 2000) beschrieben. Cyclin D1 wurde sogar als nicht detektierbar angegeben (SCHMIDT 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde Cyclin E1 (genauso wie Cyclin D1) altersabhängig entweder hoch- (jünger als 30 J.) oder herunterreguliert (älter als 30 J.) exprimiert. Diese Unterschiede waren signifikant und erklären möglicherweise die unterschiedlichen Literaturangaben. Insgesamt stellte sich das Bild einer G₁/S-permissiven Zellzyklusregulation dar. Besonders, wenn man davon ausgeht, dass es für den weiteren Effekt der D-Cycline unerheblich ist, welches der D-Cycline exprimiert wird (MURRAY 2004). Der angenommenen Unspezifität der Cyclin D-Subgruppen für weiter downstream gelegene Prozesse widerspricht auch nicht die Beobachtung definierter Entwicklungsdefekte an Mäusen mit knock-out mehrerer Cyclin D-Subgruppen (CIEMERYCH 2002) – diese spiegeln am ehesten die unterschiedliche Expressionsverteilung der Cyclin D-Subgruppen in den einzelnen Organsystemen wider (MURRAY 2004). Weiteren Aufschluss über die funktionelle Auswirkung der unterschiedlichen Cyclin D1-Regulation bei Hodentumoren könnten in-vitro knock-down-Versuche mit den verschiedenen D-Cyclinen in Seminom- und Nichtseminomzelllinien mittels siRNA (small interfering RNA, MOUSSES

2003) geben, wie sie für spätere Prozesse der G₁/s-Transition an menschlichen Zellkulturen schon etabliert wurden (E2F-abhängige NPAT-Regulation, GAO 2003). Die Ursache der Hochregulation von Cyclin D1 in Seminomen könnten solche funktionellen knock-down – Versuche an weiter upstream gelegenen Genen klären. So wurde mittels dieser Methode kürzlich die ursächliche Rolle der ribosomalen S6-Kinase 1 für die Cyclin D1-Hochregulation beim Mammakarzinom gezeigt (KOZICZAK 2004). Als andere Einflußgrößen auf die Cyclin D1-Expression sind das mögliche Onkogen BCL-3 (WESTERHEIDE 2001), die MAPK-Kaskade (TERADA 1999) und das Protoonkogen c-myc (PHILIPP 1994) bekannt.

Das Anticyclin **p21** (*syn.* CDKN1A, Cip1, WAF1) war unterschiedslos bei Seminomen und Nichtseminomen signifikant herunterreguliert und wirkte somit permissiv auf den Zellzyklus. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde bereits an CIS-Präparaten eine verminderte p21-Expression beobachtet (BARTKOVA 2000), und sogar eine signifikante weitere Expressionsverminderung beim Vergleich mit invasiven Karzinomen dargestellt (DATTA 2001). Da all diese Bestimmungen auf Proteinebene erfolgten, kam hierbei möglicherweise ein posttranslationaler Abbau zum Tragen. Dieser wurde als wichtiger Weg der p21-Regulation beschrieben (Zhang 1999). An den Hodentumor-Zelllinien Tera und Scha ließ sich ein Zusammenhang zwischen niedriger p21-Expression und der erleichterten Apoptoseinduktion über den Fas-Weg demonstrieren (SPIERINGS 2004). Dies stellt möglicherweise das Pendant des apoptoseinhibierenden Effekts einer Erhöhung der p21-Expression dar, wie er an Kolon-Karzinomzellen beschrieben wurde (ZHANG 1999). Der Nachweis einer erniedrigten p21-Expression in den vorliegenden 19 Hodenkarzinomen unterstützt die Vermutung, dass der von SPIERING (2004) gezeigte Zusammenhang auch in vivo besteht und zu der hohen Chemo- und Radiosensibilität dieser Tumorentität beiträgt.

Eine **Cyclin E/cdk2**-Hochregulation (nach MURRAY (2004) das wichtigste D-Cyclin-abhängige Ereignis im Zellzyklus) konnte weder bei Seminomen noch bei Nichtseminomen beobachtet werden. Die ist in guter Übereinstimmung mit der von BARTKOVA (2003a) beschriebenen Dysregulation des RB-Pfades bei Hodentumoren.

Es verwundert, dass das **PCNA** in (hyperproliferierendem) Hodentumorgewebe unverändert exprimiert wird. In anderem Zusammenhang (Infertilitätsdiagnostik) verhält sich das PCNA auch in Hodengewebe in zu erwartender Weise (ZENG 2001). Hier wäre es interessant, die absolute PCNA-Expression im Hodengewebe von Nicht-Hodentumor-Patienten (beispielsweise Orchidektomiepräparate i.R. von Prostata-Karzinomen) mit derjenigen in Normalgewebepräparaten von Hodentumorpatienten zu vergleichen, um so etwaige prämorbid Veränderungen in der PCNA-Expression aufzudecken.

5.1.3 Reparaturgene und Gene der Stressantwort

Weder in Seminomen noch in Nichtseminomen konnten signifikante Änderungen der **p53**-Expression ausgemacht werden. Übereinstimmend fielen Untersuchungen des p53-Status auf Transkriptions- und Translationsebene an Hodentumorgewebe aus (KERSEMAEKERS 2002). Gleichzeitig wurde eine sehr geringe p53-Mutationsrate beschrieben (nur eine, zudem stille Mutation in 39 Hodentumoren). Zudem bestand keine Abhängigkeit zwischen der Cisplatin-Sensitivität und der p53-Expression (BURGER 1999, KERSEMAEKERS 2002). Zusammengenommen ergibt sich auch weiterhin kein Hinweis auf eine zentrale Rolle von p53 in der Pathogenese der Hodentumoren.

Signifikant unterschied sich die Expression von **GADD45A** in Seminomen (herunterreguliert) und Nichtseminomen (leicht überdurchschnittlich exprimiert). Weitere Untersuchungen über GADD45-Proteine in Hodentumoren sind bisher nicht publiziert. In anderen Tumoren (außer in Pankreas-Karzinomen) werden GADD45A-Mutationen als unüblich bewertet (CAMPOMENOSI UND HALL 2000, HILDESHEIM 2002). Als bekannte Einflußgrößen auf die GADD45A-Expression sind p53 und BRCA1 beschrieben (HOLLANDER und FORNACE 2002). Die im Vergleich zu p53 höhere Spezifität für DNA-Schäden lässt weitere Regulationswege vermuten (Xiao 2000). Besonders beachtenswert ist die Suppression von GADD45A durch das Proto-Onkogen c-myc (BARSYTE-LOVEJOY 2004, HOLLANDER und FORNACE 2002, BUSH 1998), denn auch für das ebenfalls nur in Seminomen signifikant herunterregulierte Cyclin D1 ist eine c-myc-bedingte Suppression schon seit langem bekannt (PHILIPP 1994), womit ein möglicher gemeinsamer Regulationsmechanismus benannt wäre. Eine Studie der c-myc-Expression in Hodentumoren beschrieb nur in einem von 25 Fällen eine Hochregulation (SCHMIDT 1997). Auf Proteinebene wurden bislang keine Untersuchungen publiziert. Interessant wäre die Wiederholung der c-myc-Bestimmung durch die genauere RTQ-PCR-Methode und die Untersuchung des c-myc-Proteinstatus. Außerdem ergäbe sich auch hier ein vielversprechender Ansatzpunkt für knock-down-Experimente mittels siRNA.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unterschiedslos bei Seminomen und Nichtseminomen eine signifikante Herunterregulation der NER-Gene **RAD23a** und **ERCC1** und des HR-Gens **RAD50**. Ausserdem wurden ERCC1 und RAD 50 bei den 30-37 jährigen Patienten signifikant stärker heruntergeregelt als bei den unter 30-Jährigen. Hinweise auf eine (1.) besondere Funktion des ERCC1 in normalem Hodengewebe, wo es (2.) unter Umständen auch beim Menschen altersabhängig reguliert sein könnte, ergaben die Beobachtungen, dass

(1.) in ERCC1-knock-out-Mäusen eine normale Gonadenentwicklung unmöglich ist und (2.) in den Gonaden junger Mäuse eine stärkere ERCC1-Expression zu verzeichnen war als bei älteren (HSIA 2003). Das ausgesprochen gute Ansprechen auf Chemotherapie ist ein Charakteristikum der Hodentumoren, das unter anderem mit ihrer verminderten DNA-Reparatur-Kapazität erklärt wird (KÖBERLE 1997). Besonders die Nukleotid-Exzisions-Reparatur NER ist zuständig für die Behebung der im Rahmen einer Cisplatin-Therapie entstehenden Schäden (FURUTA 2002). In Ovarialkarzinomen wurde die Induktion der NER mit der sich häufig entwickelnden sekundären Cisplatin-Resistenz in Verbindung gebracht (FERRY 2000). In Hodentumor-Zelllinien wurde eine verminderte Expression von ERCC1, XPA und XPF gezeigt (MASTERS und KÖBERLE 2003, WELSH 2004), die nun für ERCC1 an Patientengewebe bestätigt werden konnte. Für die hier ebenfalls festgestellte signifikante Herunterregulation des HR-Proteins RAD50 in Hodentumoren fand sich kein Hinweis in der Literatur. Über einen zugrundeliegenden, möglicherweise gemeinsamen Regulations-Mechanismus kann nur spekuliert werden. Dafür spräche, dass die Protagonisten ERCC1 und RAD50 beide signifikant altersabhängig herunterreguliert wurden.

Das Gen für die Glutathion-Peroxidase 2 **GPX2** wurde signifikant unterschiedlich in Seminomen (hochreguliert) und Nichtseminomen (unverändert) exprimiert. Bisher wurde die Expression von GPX2 in Hodengewebe noch nicht beschrieben. Es konnte weder durch Western-Blot noch mittels Immunhistologie nachgewiesen werden (KOMATSU 2001). Möglicherweise ist diese Hochregulation von GPX2 in den Seminomen der Ausdruck einer ihnen innewohnenden Fähigkeit, auf oxidativen Stress mit der Expression von Glutathion-Peroxidasen zu reagieren, ähnlich wie es bei Spermatozoen bekannt ist (MESEGUER 2004), mit denen sie die gemeinsamen histogenetischen Vorfahren teilen. In diesem Fall wäre die unterschiedliche Expression in SE und NS nicht als ein Hinweis auf pathogenetische Unterschiede zu werten, sondern als Herkunftsmerkmal. Die besondere Expressionssituation von GPX2 wird weiter unten eingehender besprochen werden.

Die Glutathion S-Transferase A2 **GSTA2** fand sich in allen 19 Hodentumoren um durchschnittlich mehr als das zehnfache herunterreguliert, wobei auch hier die Herunterregulation bei den über 30-Jährigen nochmals signifikant stärker ausfiel als bei den unter 30-Jährigen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Glutathion S-Transferasen eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Keimzellenkulturen spielen und ihre Inhibition zu einer erleichterten Apoptoseinduktion führt (RAO und SHAHA 2000). Möglicherweise repräsentiert vorliegender Befund einen pathogenetisch wichtigen Funktionsverlust für die Entstehung von

Hodentumoren – wirkt doch auch oxidativer Stress mutagen (EVANS 2004). Zumindest aber könnte die von RAO und SHAHA in vitro demonstrierte Rolle der Glutathion S-Transferasen auch in vivo ihren Anteil an der den Hodentumoren innewohnenden Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli (SPIERINGS 2003) haben. In Mäusen zeigte sich bei einem Vergleich verschiedener gesunder Organe die höchste Glykosylasen-Aktivität in den Hoden (Karahalil 2002); diese Enzyme sind im Rahmen der Basen-Exzisions-Reparatur für die Beseitigung von oxidativen DNA-Schäden zuständig. Über den Zustand der Basen-Exzisions-Reparatur in Hodentumoren oder entsprechenden Zellkulturen fanden sich keine Literaturangaben, weshalb sich weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung empfehlen.

Überraschenderweise zeigte sich die Expression des Faktors **NFRkB** in den Hodentumoren beiderlei Entität jeweils signifikant herunterreguliert. Geht man weiterhin davon aus, dass NFRkB ausschließlich in T-Lymphozyten exprimiert wird (ADAMS 1991), sind noch zwei weitere Annahmen zur Erklärung dieses Umstandes notwendig: (1.) Auch im Normalgewebe kamen T-Lymphozyten in relevantem Umfang vor. Die in dieser Arbeit bestimmte absolute NFRkB-Expression im jeweiligen Normalgewebe repräsentierte deren Expressionsaktivität. (2.) Da im eigentlichen Tumorgewebe die Lymphozytendichte nicht geringer als im umgebenden Normalgewebe angenommen werden kann, müssen diese demnach ihre NFRkB-Expression deutlich vermindert haben. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, der die „Immun-Privilegierung der Hodentumoren“ (SCHMELZ 2002) erklären könnte. Vor der weiteren Untersuchung von IL-2 Effekten in und an tumorinfiltrierenden Lymphozyten müsste zuerst geklärt werden, ob nicht doch auch eine NFRkB-Expression in lymphozytenfreien Geweben – beispielsweise in Hodentumor-Zellkulturen - stattfindet.

5.1.4 Sonstige Gene

Clusterin **CLU** wurde von Seminomen und Nichtseminomen signifikant und stark herunterreguliert (SE: dmE 0,03; NS: dmE 0,07), was mit den Untersuchungen von BEHRENS (2001) übereinstimmt. Allerdings hatten hier die LEYDIG-Zellen der Normalgewebe einen großen Anteil an der Gesamtexpression. Besagte Zellen sind in Tumorarealen aber als verdrängt anzunehmen, weshalb wohl ein Teil der differentiellen Expression auf die unterschiedliche gewebliche Komposition des Normalgewebes mit seinen akzessorischen Zellen zurückzuführen ist. Deutlicher noch trifft das auf die monomorphen reinen Seminome zu, was die Ursache dafür sein mag, dass hier die Herunterregulation nochmals signifikant stärker ausfiel als bei den Nichtseminomen. Interessanterweise war auch hier die

Herunterregulation bei den unter 30-jährigen Patienten signifikant stärker als bei den über 30-Jährigen. In der Untersuchung normaler Hoden von BEHRENS waren von den Keimzellen vor allem die reiferen und lumennahen anfärbbar. Möglicherweise ist diese differenzierungsabhängige Regulation von **Clusterin** auch für das altersabhängig unterschiedliche Expressionsverhalten bei den Hodentumoren verantwortlich.

NME1 fand sich in SE und NS signifikant erhöht, was mit Angaben anderer Autoren übereinstimmt (SCHMIDT 1997, HORI 1997). Zwar zeigten hier alle der drei Tumoren mit bekannten Metastasen (Pat 8, 15, 16) eine NME1-Regulation im Normalbereich. Der Expressionsunterschied war aber nicht signifikant ($p=0,11$). Auch in den zuvor genannten Arbeiten konnte keine Assoziation der NME1-Expression mit dem Tumorstatus festgestellt werden.

5.2 Embryonale Karzinome

Der Nachweis bzw. der Anteil von Embryonalen Karzinomen in einem Gesamttumor im lokalen Stadium ist nach der venösen/lymphatischen Infiltration der nächststärkste prognostische Faktor für das Vorhandensein okkultester Metastasen (SOUCHON 2002). Bei der Gegenüberstellung der reinen Embryonalen Karzinome und den Mischtumoren fand sich die differentielle Expression des **Fas-Rezeptors** (EC: 1,28; MT: 0,71) signifikant unterschiedlich. Man sollte jedoch von dieser mathematischen Signifikanz nicht auf eine biologische Relevanz schließen, da die differentiellen Expressionen der individuellen Tumoren mit einer Ausnahme immer im Kontrollbereich lagen. Für die signifikant stärkere Herunterregulation von **Clusterin** in reinen Embryonalen Karzinomen bietet sich dieselbe Erklärungsweise wie zwischen Seminomen und Nichtseminomen an, nämlich dass hier die homogenere Histologie und der geringere Stromalanteil (v.a. LEYDIG-Zellen) am Tumorgewebe zum Tragen kommt. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der anderen Gene, einschließlich des **NME1**-Gens. Aus den erhobenen Expressionsdaten ergibt sich somit kein Erklärungsansatz für die ungünstigere Metastasierungsprognose beim Nachweis eines Embryonalen Karzinoms.

5.3 Einfluss des Patientenalters

Bei der allein altersabhängigen Betrachtung aller Hodentumoren ohne Berücksichtigung der Tumorentität ergab sich ein Trend zur Herunterregulation mit zunehmendem Alter. Beim Vergleich der unter 30-Jährigen mit den 30-37-Jährigen war der Unterschied ihrer durchschnittlichen differentiellen Expression signifikant (dmE 0,99 gegenüber dmE 0,8, $p=0,021$). Zwischen Seminomen und Nichtseminomen (jeweils ohne Berücksichtigung des Patientenalters) konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden, was die Relevanz obigen Ergebnisses unterstreicht. Insgesamt wurden 6 Gene von den Tumoren älterer Patienten (30-37 Jahre) signifikant geringer exprimiert als von den Tumoren jüngerer Patienten (Cyclin D1, Cyclin E1, ERCC1, RAD50, GSTA2 und Clusterin). Der umgekehrte Fall fand sich niemals.

Absolute Expression

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl die absolute Expression im Tumorgewebe als auch die absolute Expression im Normalgewebe bei den 30-37 jährigen Patienten signifikant geringer war als bei den unter 30-Jährigen. Dabei war die relative Abnahme beim Tumorgewebe mit 0,63 signifikant stärker als beim Normalgewebe mit 0,85, nämlich um den Faktor 0,74.

Literatur zu altersabhängigen Expressionsänderungen in Hodengewebe liegt bislang nicht vor. Wenige Veröffentlichungen haben bisher überhaupt den Aspekt der altersabhängigen Genexpression behandelt. In menschlichen Fibroblasten zeigten etwa 1% der Gene altersabhängige mRNA-Änderungen. Dies traf bei etwa 1% der Gene in Mäuse-Hepatozyten und 4% der Gene in Rattenhepatozyten zu (KIRSCHNER 2002). In menschlichem Colon-Epithel wurden aus 6000 Genen 9 mit einer altersabhängigen Expression identifiziert, bzw. 12 Gene aus 6000 bei Colon-Adenomen (KIRSCHNER 2002). Die Mehrzahl der Gene zeigte dabei eine zunehmende Expression mit dem Patientenalter. Die differentielle Expression wurde nicht untersucht. Außerdem wurde eine altersabhängig unterschiedliche Expression in Ependymomen bei 8 aus 2600 Genen identifiziert, die in der älteren Vergleichsgruppe sämtlich herunterreguliert waren (KORSHUNOV 2003). Dies ist besonders interessant, da die Ependymome als Tumoren des Kindes- und Jugendalters, mit Prävalenz des männlichen Geschlechts und gutem Ansprechen auf Radiotherapie (WINKLER und HERRMANN 1999) zumindest lose biologische Gemeinsamkeiten mit den Hodentumoren zeigen.

Kein Literaturhinweis fand sich zu einer generellen altersabhängigen Herunterregulation, wie sie in dieser Arbeit sowohl für Normalgewebe, Tumorgewebe als auch für die differentielle Expression gezeigt wurde. Dieser Befund legt die Vermutung eines allgemeinen supprimierenden Einflusses auf das Hodengewebe nahe. Verschiedene Prozesse mit einem Einfluss auf die allgemeine Genexpression wurden beschrieben: Dies kann die generelle Aktivität der Transkriptionsmaschinerie (das Transkriptom, bzw. das RNA-Polymerase II-Holoenzym) betreffen (SCHÜLLER und LEHMING 2003). Ein anderer Mechanismus ist die Konformationsänderung des Chromatins, die eine Transkriptionsrepression bewirkt, und zwar durch Proteine der „Polycomb“-Gruppe, wobei ein Zusammenhang mit Entwicklungsvorgängen vermutet wird (FRANCIS 2004). Eine generelle neuronale Transkriptionsrepression durch die Proteine Huntingtin und Ataxin-1 (jeweils pathognomische für die neurodegenerativen Erkrankungen Chorea Huntington und Spinocerebelläre Ataxie I) wurde festgestellt (HOSHINO 2004). Aber auch DNA-Hypermethylierung und genetische Instabilität (KITAGAWA 2004) gehören zu den möglichen Ursachen. Bezüglich der altersabhängigen genetischen Stabilität in humanen Keimzellen (außer Spermatozyten) liegt keine Literatur vor. Es existieren aber Studien an Nagern, die eine altersabhängige Zunahme der genetischen Instabilität in männlichen Keimzellen belegen (SLOTTER 2004).

Sämtliche altersabhängigen Expressionunterschiede traten zwischen den Altergruppen der unter 30-Jährigen und der 30-37-Jährigen auf, nicht aber zwischen den 30-37-Jährigen und den über 37-Jährigen. Außerdem ließen sich die Expressionswerte in keinem Fall mit dem Patientenalter korrelieren. Es ist also unwahrscheinlich, dass hier ein kontinuierlicher altersabhängiger Einfluss besteht. Eher ist eine stufenartige Veränderung im allgemeinen Expressionsverhalten des Hodengewebes um das Alter von 30 Jahren zu vermuten. Daher ist auch weniger von einem kausalen Einfluss abnehmenden Testosterons mit zunehmendem Alter auszugehen, da dieses über mehrere Dekaden stetig absinkt (Harman 2001).

Für eine andere, derzeit noch nicht publizierte Arbeit wurden die auch vorliegender Arbeit zugrundeliegenden Daten nochmals in anderer Weise analysiert. Dabei wurden alterabhängige Expressionsänderungen innerhalb von Gen-Funktionsgruppen (Apoptoseregulation, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Stressantwort) sowie getrennt nach Seminomen und Nichtseminomen untersucht. Abweichend zu obigen Ergebnissen ließen sich dabei signifikante altersabhängige absolute Expressionsunterschiede nur im jeweiligen

Tumorgewebe, nicht jedoch im Normalgewebe darstellen. Es wäre interessant zu sehen, ob sich nach einer Erweiterung der Untersuchungskohorte auch innerhalb dieser Subgruppen die oben für die Gesamtheit aller Gene und Tumorentitäten gezeigten signifikanten Expressionsänderungen auch im Normalgewebe reproduzieren ließen.

Differentielle Expression

Im Durchschnitt fand sich für alle Gene bei den unter 30-Jährigen eine differentielle Expression von 0,99, bei den 30-37-Jährigen aber eine Herunterregulation (dmE 0,80), wobei dieser Unterschied signifikant war ($p=0,021$). Im einzelnen wurden sechs Gene signifikant herunterreguliert. Sie lassen sich drei Funktionsgruppen zuordnen: Zellzyklus (Cyclin D1, Cyclin E1), DNA-Reparatur (ERCC1, RAD50) und Stressantwort (GSTA2 und Clusterin).

Zur Erklärung der altersabhängig unterschiedlichen differentiellen Expression dieser Gene bieten sich zwei Hypothesen an: (1.) Es existiert ein Regulationszusammenhang in Tumorzellen, der eine differentielle Expression bestimmter abhängiger Gene verursacht und zudem noch altersabhängig ist. Durch Bestimmung der einzelnen Einflussfaktoren auf die im einzelnen altersabhängig differentiiell exprimierten Gene könnte man auf diesen Regulationszusammenhang schließen. Die Ursache der im Normalgewebe signifikant verminderten absoluten Expression wäre hierdurch allerdings schwer zu erklären. (2.) Es gibt einen dem Hodengewebe innewohnenden Mechanismus, der altersabhängig die allgemeine Expressionstätigkeit vermindert. Durch ihn wurde die im Normalgewebe festgestellte Verminderung der absoluten Expression verursacht. Im Tumorgewebe wird derselbe Mechanismus in seiner Wirkung verstärkt. Er verursachte damit die im Vergleich zum Normalgewebe stärkere Herunterregulation der absoluten Expression im Tumorgewebe. Eine (teilweise auch signifikant) veränderte differentielle Expression ist hieraus schon allein aus Gründen der Mathematik zu erwarten.

5.4 Die „differentielle Expression“ als beschreibende Größe für Genexpressionsänderungen

Das Konzept der differentiellen Expression geht davon aus, dass das Normalgewebe eines Patienten eine intraindividuell normale Expression aufweist, die deshalb als Bezugspunkt für die Beurteilung der Expression im Tumorgewebe dienen kann. Möglichkeiten für Fehlinterpretationen sollen anhand der differentiellen Expression von **GPX2** diskutiert werden. GPX2 wurde von Seminomen "hochreguliert" (dmE 2,3) und von Nichtseminomen

leicht herunterreguliert (dmE 0,81), wobei der Unterschied signifikant war. Es bieten sich zwei Betrachtungsweisen an: (1.) Wählt man die Expression im „Normalgewebe“ als Bezugspunkt, wie es in dieser Arbeit generell geschah, so wird man daraus schließen, dass in den Tumorgeweben der einzelnen Seminome das GPX2-Gen jeweils stärker exprimiert wurde, als es normalerweise der Fall ist. (2.) Betrachtet man die absolute Expression von GPX2 in Seminomen und Nichtseminomen (Tabelle 11, Abbildung A-31), so stellt man fest, dass die durchschnittliche absolute Expression im Tumorgewebe der Seminome kaum größer war als bei den Nichtseminomen (Faktor 1,3, nichtsignifikant). Gleichzeitig war die durchschnittliche absolute GPX2-Expression im Normalgewebe der Seminome signifikant geringer (Faktor 0,4; $p=0,021$) als bei den Nichtseminomen. Es stellt sich daher die Frage, ob in diesem Falle die Expressionsminderung im „Normalgewebe“ der Seminome die eigentliche Abweichung vom Normalzustand darstellte. In diesem Falle würde die bei GPX2 signifikant *hochregulierte* differentielle Expression ein irreführendes Bild der tatsächlichen Umstände ergeben.

Welche dieser beiden Betrachtungsweisen im Einzelfall die tatsächlichen Umstände besser widerspiegelt, ließe sich nur durch Einführung eines weiteren Bezugspunktes (z.B. GPX2 in Hodengewebe von nicht Hodentumorkranken Patienten) klären.

Denkbare Ursachen für eine von einem Normalzustand abweichende Expression im „Normalgewebe“ wären: (1.) Expressions-Veränderungen, die tumorbedingt sind (z.B. parakrin, durch Verdrängung oder Entzündung, etc.). (2.) Eine prämorbid veränderte Expression, die eine aus ihr folgende Tumorbildung ermöglichte. (3.) Gemeinsame Einflussfaktoren, die sowohl die beobachtete Expressionsabweichung im Normalgewebe bewirken, als auch die Entstehung der jeweils untersuchten Tumorentität begünstigen.

Beim Vergleich der Seminome und der Nichtseminome fielen 10 von 37 Genen auf, bei denen sich die durchschnittliche absolute Expression im Normalgewebe stärker zwischen beiden Tumorgruppen unterschied, als dies im Tumorgewebe der Fall war („T/N-Zahl“ negativ in Tabelle 10). Dies ist aber jeweils nur als Indiz zu verstehen, dass bei diesen 10 Genen im Einzelfall die 2. Betrachtungsweise die angemessenere sein könnte. Unter diesen 10 Genen wurde nur im Falle des GPX2 eine signifikant unterschiedliche differentielle Expression in Seminomen und Nichtseminomen festgestellt, weshalb die Frage der zutreffenderen Perspektive für die anderen neun Gene weniger relevant ist. Festzuhalten

bleibt, dass die alleinige Betrachtung der differentiellen Expression unter Außerachtlassung der absoluten Expression die Gefahr von Fehlinterpretationen im dargestellten Sinne birgt.

5.5 Bewertung der Methode und Vergleich mit Array-Daten

Die RTQ-PCR wird heute als Gold-Standard der Verfahren zur RNA-Quantifizierung angesehen (LEUTENEGGER, 2004). Vom Hersteller des Analysegerätes und der Nachweisreagenzien (Applied Biosystems) wird eine Wiederholungsgenauigkeit von 0,5 C_t Werten (entspricht einer 1,4-fachen Differenz oder einem relativen Fehler von 40%) angegeben. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Untersuchung 1406 Doppelmessungen durchgeführt. Der relative Abweichung lag im Mittel bei 13,2% (SD 15%). 30% der Messungen hatten eine Wiederholungsgenauigkeit von $\leq 5\%$. Bei 51% lag sie unter 10% (90% der Messungen $\leq 30\%$; 95% d. M. $\leq 40\%$ Wiederholungsgenauigkeit). Da somit eine gute Messgenauigkeit demonstriert war, konnten die hier mittels RTQ-PCR gewonnenen differentiellen Expressionswerte auch als Maßstab zur Evaluation der vorbestehenden differentiellen Expressionswerte aus dem Array-Experiment (PORT 2005) verwendet werden:

Es zeigte sich eine befriedigende Korrelation von $r^2 = 0,71$ der differentiellen Expressionswerte aus Array-Experiment und RTQ-PCR-Bestimmung. Bei ausschließlicher Betrachtung der Konkordanz der Ergebnisse stimmten 28 von 30 überein (93%). Da beide Messungen an unterschiedlichen Patientenpopulationen durchgeführt wurden, war ein Teil der Nichtübereinstimmungen möglicherweise auf tatsächliche Unterschiede im Expressionsverhalten beider Populationen zurückzuführen. Dieses Ergebnis unterstreicht den hohen Wert vor allem der qualitativen Expressionsergebnisse des Array-Verfahrens und damit auch die Aussagekraft der Array-Studie (PORT 2005).

Bei dieser Array-Studie wurden 1176 Gene in 5 reinen Seminomen und 6 Nichtseminomen untersucht. Dabei fanden sich in insgesamt 152 Fällen im Tumorgewebe eine signifikant andere Expression als im Normalgewebe. Das entsprach einer Detektionsrate signifikanter differentieller Expressionen von 6,5% ($152/(2 \cdot 1176)$). Bei der vorliegenden RTQ-PCR-Untersuchung traf dies in 40 Fällen bei jeweils 37 Genen zu ($40/(2 \cdot 37) = 54\%$). Mögliche Gründe für die wesentlich höhere Detektionsrate durch die RTQ-PCR sind:

(1.) Die extrem hohe Sensitivität des RTQ-PCR-Verfahrens: Nur beim Gen Caspase 4 stieß es an seine Nachweisgrenze. Hingegen lag die Expression von 65% der in der Array-Studie

untersuchten Gene im Bereich des Hintergrundrauschens, womit eine Bestimmung der differentiellen Expression hier gar nicht erst möglich war (Die in dieser Hinsicht korrigierte Detektionsrate der Array-Studie läge bei 18%). Diese Annahme wird weiter unterstützt durch die Beobachtung, dass die Array-Detektionsrate mit geringerem absoluten Expressionsniveau abnimmt (vergl. Tabelle 18).

(2.) Die größere Fallzahl bei den RTQ-PCR Versuchen (10 statt 5 Seminom-Patienten, 9 statt 6 Nichtseminom-Patienten).

(3.) Tatsächliche Expressionsunterschiede zwischen den jeweils untersuchten Kohorten.

(4.) Die Auswahl der untersuchten Gene: Betrachtet man nur die auch durch das RTQ-PCR-Verfahren untersuchten Gene, so wurden unter ihnen durch das Array-Verfahren 18 signifikante differentielle Expressionen entdeckt, was einer Detektionsrate von 23% entspricht. Damit liegt die Detektionsrate dieser Auswahl von Genen auch innerhalb des Array-Verfahren deutlich höher als im Durchschnitt (6,5%, s.o.).

(5.) Man könnte annehmen, dass durch eine geringere Messgenauigkeit beim Array-Verfahren kleine Expressionsunterschiede weniger oft als signifikant dargestellt werden konnten als dies durch das genauere RTQ-PCR-Verfahren der Fall gewesen wäre. Sollte dies einen Grund für die geringere Detektionsrate signifikanter differentieller Expressionen durch das Array-Verfahren darstellen, so wäre eine unterschiedliche Ergebnisverteilung bei beiden Verfahren anzunehmen: Beim RTQ-PCR-Verfahren wurde keine signifikante differentielle Expression ermittelt, die geringer einem 1,3-fachen Expressionsunterschied war ($3\% \leq 1,4\text{-fach}$; $5\% \leq 1,5\text{-fach}$; $28\% \leq 1,8\text{-fach}$; $33\% \leq 2\text{-fach}$; $78\% \leq 5\text{-fach}$ und $90\% \leq 10\text{-fach}$). Bei der Ergebnisverteilung der Array-Experimente lag jedoch keine Minderrepräsentation der kleinen differentiellen Expressionswerte vor ($0\% \leq 1,1\text{-fach}$; $1\% \leq 1,2\text{-fach}$; $4\% \leq 1,4\text{-fach}$; $14\% \leq 1,5\text{-fach}$; $28\% \leq 1,8\text{-fach}$; $43\% \leq 2\text{-fach}$; $91\% \leq 5\text{-fach}$ und $100\% \leq 10\text{-fach}$). Somit ist diese Hypothese widerlegt.

Die Array-Methode lieferte also bezüglich der Konkordanz der differentiellen Expressionsergebnisse mit einer Rate von 93% der zur RTQ-PCR gleichsinnigen Werte zuverlässige Ergebnisse. Unterlegen war sie der RTQ-PCR v.a. in Hinsicht auf die Sensitivität, da sie wesentlich weniger signifikante differentielle Expressionswerte lieferte.

6 Zusammenfassung

Ziel: Untersuchung der Expression von Schlüsselgenen zentraler Zellfunktionen (Apoptoseregulation, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Stressantwort) in Hodentumoren verschiedener Tumorentität. Validierung zuvor mittels Array-Verfahren erhobener Ergebnisse (PORT 2005).

Methode: Untersuchung der differentiellen Expression von 37 Genen in Tumorgewebe und Normalgewebe von 9 Seminom(SE)-Patienten und 10-Nichtseminom(NS)-Patienten mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR).

Ergebnisse und Diskussion: (1) An unterschiedlichen Patientenkohorten durchgeführte Untersuchungen der Differentiellen Expression durch RTQ-PCR zum einen und durch Array zum anderen zeigten in 93% der Gene gleichsinnige Expressionsänderungen. Durch RTQ-PCR wurden häufiger signifikante Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe festgestellt (54% der untersuchten Gene durch RTQ-PCR gegenüber 23% der gleichen Gene durch Array). (2) Die differentielle Expression in Seminomen und Nichtseminomen unterschied sich in der Regel nicht. Signifikante Unterschiede der differentiellen Expression wurden nur für Cyclin D1 und GADD45A (SE hochreguliert, NS herunterreguliert), GPX2 (SE herunterreguliert NS hochreguliert) sowie Clusterin (SE stärker als NS herunterreguliert) festgestellt. (3) Bei Hodentumoren beider Entitäten zeigte sich eine Dysregulation der Apoptoseinduktion, eine vorwiegend proapoptotische Apoptoseintegration und eine aktivierte Apoptoseexekution. Bei letzterer wurde erstmals eine Hochregulation der Caspase 4 festgestellt, die auf eine mögliche Rolle eines alternativen Weges der Apoptoseauslösung in Hodentumoren hinweist. Es bestand eine permissive Zellzyklusregulation. Die DNA-Reparatur-Gene ERCC1, RAD23a und RAD50 waren signifikant herunterreguliert, was eine mögliche Ursache der exzellenten Wirksamkeit der Chemotherapie darstellt. (4) Nach Einteilung der Patienten in drei Altersgruppen (<30, 30-37, >37 Jahre), ohne Berücksichtigung der Tumorentität, zeigte sich (a) eine altersabhängige Abnahme der globalen absoluten Expression sowohl in Normalgewebe als auch in Tumorgewebe. (b) Außerdem zeigte sich bei der differentiellen Expression ein altersabhängiger Trend zur Herunterregulation. Diese Befunde waren für den Vergleich der Altersgruppen <30 und 30-37 Jahre signifikant. (c) Da die altersabhängige Abnahme der globalen absoluten Expression auch im Normalgewebe auftrat, wird ein altersabhängiger Mechanismus der globalen Transkriptionsrepression postuliert, der im Rahmen der Karzinogenese verstärkt wird.

Abstract

Aim: To assess the expression of certain genes coding for biological processes like apoptosis, cell cycle control, DNA repair and stress response, which are relevant for tumorigenesis in testicular tumors of different entities. Additionally, results obtained by prior Array studies (PORT 2005) are to be validated.

Method: Examination of the differential expression of 37 genes in tumor tissues and in normal tissues of 9 seminoma (SE) and 10 non-seminoma (NS) patients using real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR).

Results and Discussion: (1) Studies of the differential expression performed in two different cohorts (using RTQ-PCR in one cohort while Array technique was used in the other cohort) indicated an identical direction of the changes in genetic expression in 93% of the examined genes. RTQ-PCR revealed significant changes in genetic expression more frequently compared to Array technique (54% of the examined genes by RTQ-PCR vs. 23% of the same genes by Array technique). (2) Differential expression in Seminoma and Non-Seminoma did not present any distinction in general. Only the expression of Cyclin D1 and GADD45A was found to be different in SE (down-regulated) and NS (up-regulated), as well as the expression of GPX2 (down-regulated in SE while up-regulated in NS) and of Clusterin (more downregulated in SE than in NS). (3) Testicular Tumors of both entities showed dysregulation of the induction of apoptosis, a mainly proapoptotic situation in the integration phase and an activated execution phase of apoptosis. In the latter case for the first time an up-regulation of Caspase 4 could be demonstrated. That points towards a possible role of an alternative way of initiation of apoptosis in testicular tumors. Cell cycle control was permissive. The DNA repair genes ERCC1, RAD23a and RAD50 were significantly down-regulated, what may be a reason for the excellent effectiveness of chemotherapy. (4) After the patients have been divided into three age groups (<30, 30-37, >37 years) (a) an age-dependent decrease in globale absolute expression was found in both, normal tissue and tumor tissue. (b) Additionally, there was an age-dependent trend towards down-regulation in differential expression. This finding was significant when comparing the age group <30 years with the age group 30-37 years. (c) Because age-dependent decrease of global absolute expression was found even in normal tissue, an age-dependent mechanism of global repression of transcription is postulated, which may be augmented within the scope of carcinogenesis.

7 Literatur

Abend, M., Port, M., Schmelz, H.U., Kraft, K., Sparwasser, C.

Significance of apoptosis in metastasizing testis tumors

Urol Res 32 (2004) 28-35

Adams, B.S., Leung, K.Y., Hanley, E.W., Nabel, G.J.

Cloning of R kappa B, a novel DNA-binding protein that recognizes the interleukin-2 receptor alpha chain kappa B site

New Biol 3 (1991) 1063-73

Akoulitchev, S., Reinberg, D.

The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIID is mediated by phosphorylation of CDK7

Genes Dev 12 (1998) 3541-50

Albers, P., Bamberg, M.

Das Modell „Hodentumor“

Onkologie 9 (2003) 925

Albers, P., Weißbach, L.

Hodentumoren

in: Jocham, D., Miller, K.: Praxis der Urologie, Band II

Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2003, 2. überarbeitete Auflage

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.

Molecular Biology of the Cell

Garland Science, New York, 2002, 4. Auflage

Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W.

Multivariate Analysemethoden

Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2003, 10. Auflage

Barsyte-Lovejoy, D., Mao, D.Y., Penn, L.Z.

c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism

Oncogene 23 (2004) 3481-6

Bartkova, J., Lukas, C., Sorensen, C.S., Meyts, E.R., Skakkebaek, N.E., Lukas, J., Bartek, J.

Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell tumours

J Pathol 200 (2003a) 149-56

Bartkova, J., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., Lukas, J., Bartek, J.

Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours

APMIS 111 (2003b) 252-65

Bartkova, J., Thullberg, M., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., Bartek, J.

Cell cycle regulators in testicular cancer: loss of p18INK4C marks progression from carcinoma in situ to invasive germ cell tumours

Int J Cancer 85 (2000) 370-5

Behrens, P., Jeske, W., Wernert, N., Wellmann, A.

Downregulation of clusterin expression in testicular germ cell tumours

Pathobiology 69 (2001) 19-23

Bergeron, J., Benlimame, N., Zeng-Rong, N., Xiao, D., Scrivens, P.J., Koromilas, A.E., Alaoui-Jamali, M.A.

Identification of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase as a regulator of cellular response to bulky adducts.

Cancer Res 60 (2000) 6800-4

Boyle P.

Testicular cancer: the challenge for cancer control

Lancet Oncology 5 (2003) 56-61

Brown, T. A.

Gentechnologie für Einsteiger

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, 2002, 3. Auflage

Budd, R.C.

Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis

J Clin Invest 109 (2002) 437–442

**Burger, H., Nooter, K., Boersma, A.W., van Wingerden, K.E., Looijenga, L.H.,
Jochemsen, A.G., Stoter, G.**

Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines

Int J Cancer 81 (1999) 620-8

Campomenosi, P., Hall, P.A.

Gadd45 mutations are uncommon in human tumour cell lines

Cell Prolif 33 (2000) 301-6

Cavalli, F., Monfardini, S., Pizzocaro, G.

Report on the International Workshop on Staging and Treatment of Testicular Cancer

Eur J Cancer 16 (1980) 1367-72

Chaganti, R.S., Houldsworth, J.

Genetics and biology of adult human male germ cell tumors

Cancer Res 60 (2000) 1475-82

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B.

Mechanisms of human DNA repair: an update

Toxicology 193 (2003) 3-34

Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, RT., Rowitch, DH., Gardner, H., Sicinski, P.

Development of mice expressing a single D-type cyclin
Genes Dev 16 (2002) 3277-89

Damjanov, I.

Tumors of the Testis and Epidymidis
In: Murphy, W. M.(Hrsg.): Urological Pathology
W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1989, 1. Auflage

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J.

Cell death: critical control points
Cell 116 (2004) 205-19

Datta, M.W., Macri, E., Signoretti, S., Renshaw, A.A., Loda M.

Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression
Mod Pathol 14 (2001) 437-42

Dbaiibo, G.S., Pushkareva, M.Y., Rachid, R.A., Alter, N., Smyth, M.J., Obeid, L.M., Hannun, Y.A.

p53-dependent ceramide response to genotoxic stress
J Clin Invest 102 (1998) 329-39

Dieckmann, K.-P., Pichlmeier, U.

Epidemiologie der testikulären Keimzelltumoren
Onkologie 9 (2003) 943-954

Dixon, D.A., Balch, G.C., Kedersha, N., Anderson, P., Zimmerman, G.A., Beauchamp, R.D., Prescott, S.M.

Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1
J Exp Med 198 (2003) 475-81

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S.

Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance

Mutat Res 567 (2004) 1-61

Ferry, K.V., Hamilton, T.C., Johnson, S.W.

Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF

Biochem Pharmacol 60 (2000) 1305-13

Fesik, S.W., Shi, Y.

Structural biology. Controlling the caspases

Science 294 (2001) 1477-8

Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H., Pommier, Y.

Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells

Cancer Res 62 (2002) 4899-902

Gao, G., Bracken, A.P., Burkard, K., Pasini, D., Classon, M., Attwooll, C., Sagara, M., Imai, T., Helin, K., Zhao, J.

NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression

Mol Cell Biol 23 (2003) 2821-33

Glockzin, S., Ogi, F.X., Hengstermann, A., Scheffner, M., Blattner, C.

Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation

Mol Cell Biol 23 (2003) 8960-9

Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M.C., Holbrook, N.J.

p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells

Oncogene 14 (1997) 929-35

Grobholz, R., Zentgraf, H., Kohrmann, K.U., Bleyl, U.

Bax, Bcl-2, fas and Fas-L antigen expression in human seminoma: correlation with the apoptotic index

APMIS 110 (2002) 724-32

Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H., Lang, F.

Physiology of apoptosis

Am J Physiol Renal Physiol 279 (2000) 605-15

Harman, S.M., Metter, E.J., Tobin, J.D., Pearson, J., Blackman, M.R.

Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging

J Clin Endocrinol Metab 86 (2001) 724-31

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y.

Apoptosis - the p53 network

J Cell Sci 116 (2003) 4077-85

Hildesheim, J., Fornace, A.J. Jr.

Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer

Clin Cancer Res 8 (2002) 2475-9

Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M.

Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death

J Cell Biol 165 (2004) 347-56

Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., Stoffel, W.

Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase

Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 5895-900

Hollander, M.C., Fornace, A.J. Jr.

Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a
Oncogene 21 (2002) 6228-33

Holzlik, M.F., Rapley, E.A., Hoekstra, H.J., Sleijfer, D.T., Nolte, I.M., Sijmons, R.H.

Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours
Lancet Oncol 5 (2004) 363-71

Hori, K., Uematsu, K., Yasoshima, H., Sakurai, K., Yamada, A., Ohya, M.

Immunohistochemical analysis of the nm23 gene products in testicular seminoma
Pathol Int 47 (1997) 288-92

Hsia, K.T., Millar, M.R., King, S., Selfridge, J., Redhead, N.J., Melton, D.W., Saunders, P.T.

DNA repair gene Ercc1 is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse
Development 130 (2003) 369-78

Huyghe, E., Matsuda, T., Thonneau, P.

Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review
J Urol 170 (2003) 5-11

Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, S.W., Thompson, C.B.

Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL
Mol Cell Biol (1997) 7040-6

Kersemaekers, A.M., Mayer, F., Molier, M., van Weeren, P.C., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H.

Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors
J Clin Oncol 20 (2002) 1551-61

Kirschner, M., Pujol, G., Radu, A.

Oligonucleotide microarray data mining: search for age-dependent gene expression

Biochem Biophys Res Commun 298 (2002) 772-8

Kitagawa, M., Utsuyama, M., Kurata, M., Yamamoto, K., Yuasa, Y., Ishikawa, Y., Arai, T., Hirokawa, K.

Cancer and aging: symposium of the 27th annual meeting of the Japanese society for biomedical gerontology, Tokyo

Cancer Immunol Immunother, elektronische Vorabveröffentlichung 1. Dez. 2004

Klokov, D., Criswell, T., Leskov, K.S., Araki, S., Mayo, L., Boothman, D.A.

IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects.

Mutat Res 568 (2004) 97-110

Komatsu, H., Okayasu, I., Mitomi, H., Imai, H., Nakagawa, Y., Obata, F.

Immunohistochemical detection of human gastrointestinal glutathione peroxidase in normal tissues and cultured cells with novel mouse monoclonal antibodies

J Histochem Cytochem 49 (2001) 759-66

Korshunov, A., Neben, K., Wrobel, G., Tews, B., Benner, A., Hahn, M., Golanov, A., Lichter, P.

Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age

Am J Pathol 163 (2003) 1721-7

Köberle, B., Grimaldi, K.A., Sinters, A., Hartley, J.A., Kelland, L.R., Masters, J.R.

DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells

Int J Cancer 70 (1997) 551-5

Koziczak, M., Hynes, N.E.

Cooperation between Fibroblast Growth Factor Receptor-4 and ErbB2 in Regulation of Cyclin D1 Translation

J Biol Chem 279 (2004) 50004-50011

Lee, J.T., Xu, J., Lee, J.M., Ku, G., Han, X., Yang, D.I., Chen, S., Hsu, C.Y.

Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway

J Cell Biol 164 (2004) 123-31

Leutenegger, C. M.

The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine

Veterinary Science Tomorrow 1 (2001):

(http://www.vetscite.org/issue1/tools/txt_leut_0800.htm)

Lewin, B.

Genes VII

Oxford University Press, Oxford, 2000, 7. Auflage

Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B.

Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair

Nature 371 (1994) 534-7

Li, W., Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Lee, G., Anderson, P.

FAST is a BCL-X(L)-associated mitochondrial protein

Biochem Biophys Res Commun 318 (2004) 95-102

Lodish, H., Matsudaira, P.

Molecular cell biology

Freeman, New York, 2000, 4. Auflage

Looijenga, L.H., Zafarana, G., Grygalewicz, B., Summersgill, B., Debiec-Rychter, M., Veltman, J., Schoenmakers, E.F., Rodriguez, S., Jafer, O., Clark, J., van Kessel, A.G., Shipley, J., van Gurp, R.J., Gillis, A.J., Oosterhuis, J.W.

Role of gain of 12p in germ cell tumour development

APMIS 111 (2003) 161-71

Lysiak, J.J.

The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis

Reprod Biol Endocrinol (2) 2004 9

Maga, G., Hubscher, U.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners

J Cell Sci 116 (2003) 3051-60

Marchesini, N., Luberto, C., Hannun, Y.A.

Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism

J Biol Chem 278 (2003) 13775-83

Masters, J.R., Köberle, B.

Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours

Nat Rev Cancer 3 (2003) 517-25

Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J.

Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa

J Androl 25 (2004) 773-80

Mousses, S., Caplen, N.J., Cornelison, R., Weaver, D., Basik, M., Hautaniemi, S., Elkahloun, A.G., Lotufo, R.A., Choudary, A., Dougherty, E.R., Suh, E., Kallioniemi, O.

RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells

Genome Res 13 (2003) 2341-7

Mülhardt, C.

Real Time Quantitative PCR Teil 3, Kurvendiskussionen

Laborjournal 10 (2001) 64-65

Munier, A., Serres, C., Kann, M.L., Boissan, M., Lesaffre, C., Capeau, J., Fouquet, J.P., Lacombe, M.L.

Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility?

Exp Cell Res 289 (2003) 295-306

Murray, A.W.

Recycling the cell cycle: cyclins revisited

Cell 116 (2004) 221-34

Nagata, S., Golstein, P.

The Fas death factor

Science 267 (1995) 1449-56

Nakamura, Y.

Isolation of p53-target genes and their functional analysis

Cancer Sci 95 (2004) 7-11

Narayan, S., Jaiswal, A.S., Balusu, R.

Tumor suppressor APC blocks DNA polymerase beta -dependent strand-displacement synthesis during long-patch but not short-patch base excision repair and increases sensitivity to methylmethane sulfonate

J Biol Chem (16) 2004

Nevins, J.R.

The Rb/E2F pathway and cancer. The Rb/E2F pathway and cancer

Hum Mol Genet 10 (2001) 699-703

Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., Tsujimoto, Y.

Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2

Cancer Res 59 (1999) 5542-8

Oosterhuis JW, Looijenga LH.

Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis

APMIS 111 (2003) 280-9

Otala, M., Pentikainen, M.O., Matikainen, T., Suomalainen, L., Hakala, J.K., Perez, G.I., Tenhunen, M., Erkkila, K., Kovanen, P., Parvinen, M., Dunkel, L.

Effects of Acid Sphingomyelinase Deficiency on Male Germ Cell Development and Programmed Cell Death

Biol Reprod 15 (2004), elektronische Vorabveröffentlichung

Ouatas, T., Salerno, M., Palmieri, D., Steeg, P.S.

Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23

J Bioenerg Biomembr 35 (2003) 73-9

Parkinson, M.C., Harland, S.J., Harnden, P., Sandison, A.

The role of the histopathologist in the management of testicular germ cell tumour in adults

Histopathology 38 (2001) 183-94

Pfaffl, M. W.

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR

Nucleic Acids Res 29 (2001) 2002-2007

Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., Eilers, M.

Repression of cyclin D1: a novel function of MYC

Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):4032-43

Pluquet, O., Hainaut, P.

Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction

Cancer Lett 174 (2001) 1-15

Port, M., Schmelz, H.U., Stockinger, M., Sparwasser, C., Albers, P., Pottek, T. Abend, M.

Gene expression profiling in seminoma and nonseminoma

J Clin Oncol 23 (2005) 58-69

Rajpert-De Meyts, E., Bartkova, J., Samson, M., Høi-Hansen, C.E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J., Skakkebaek, N.E.

The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell

APMIS 111 (2003) 267-78

Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D.

Targeting and fusion proteins during mammalian spermiogenesis

Biol Res 34 (2001) 147-52

Rao, A.V., Shaha, C.

Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis
Free Radic Biol Med 29 (2000) 1015-27

Rapley, E.A., Crockford, G.P., Easton, D.F., Stratton, M.R., Bishop, D.T.

Localisation of susceptibility genes for familial testicular germ cell tumour
APMIS 111 (2003) 128-33

Schärer, O.D.

Chemistry and biology of DNA repair
Angew Chem Int Ed Engl 42 (2003) 2946-74

Schmelz, H.U., Abend, M., Port, M., Schwerer, M., Hauck, E.W., Weidner, W., Sparwasser, C.

Comparative analysis of different apoptosis detection methods in human testicular cancer
Urol Res 32 (2004) 332-7

Schmelz, H.U., Abend, M., Kraft, K., Hauck, E.W., Weidner, W., Van Beuningen, D., Sparwasser, C.

Fas/Fas ligand system and apoptosis induction in testicular carcinoma
Cancer 95 (2002) 73-81

Schmidt, B., Ackermann, R., Hartmann, M., Strohmeyer, T.

Alterations of the metastasis suppressor gene nm23 and the proto-oncogene c-myc in human testicular germ cell tumors
J Urol 158 (1997) 2000-5

Schmidt, B.A., Rose, A., Steinhoff, C., Strohmeyer, T., Hartmann, M., Ackermann, R.

Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors
Cancer Res 61 (2001) 4214-21

Sherr, C.J.

The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited

Cancer Res 60 (2000) 3689-95

Shinomiya, N.

New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'

J Cell Mol Med 5 (2001) 240-53

Skotheim, R.I., Lothe, R.A.

The testicular germ cell tumour genome

APMIS 111 (2003) 136-50

Sloter, E., Nath, J., Eskenazi, B., Wyrobek, A.J.

Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents

Fertil Steril 81 (2004) 925-43

Souchon, R., Schmoll, H.J., Krege, S.

Deutsche Krebsgesellschaft: Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren auf Grundlage evidenzbasierter Medizin (EBM).

W. Zuckschwerdt Verlag, München-Bern-Wien-New York, 2002, 1. Auflage

Spierings, D.C., de Vries, E.G., Stel, A.J., te Rietstap, N., Vellenga, E., de Jong, S.

Low p21Waf1/Cip1 protein level sensitizes testicular germ cell tumor cells to Fas-mediated apoptosis

Oncogene 23 (2004) 4862-72

Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., de Jong, S.

The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli

J Pathol 200 (2003) 137-48

Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A., Wood, R.D., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.

Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity

Mol Cell Biol 17 (1997) 6924-31

Suomalainen, L., Hakala, J.K., Pentikainen, V., Ojala, M., Erkkila, K., Pentikainen, M.O., Dunkel, L.

Sphingosine-1-phosphate in inhibition of male germ cell apoptosis in the human testis

J Clin Endocrinol Metab 88 (2003) 5572-9

Szczesny, B., Hazra, T.K., Papaconstantinou, J., Mitra, S., Boldogh, I.

Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases

Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 10670-5

Takayama, H., Takakuwa, T., Tsujimoto, Y., Tani, Y., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S., Aozasa, K.

Frequent Fas gene mutations in testicular germ cell tumors

Am J Pathol 161 (2002) 635-41

Tcherkasowa, A.E., Adam-Klages, S., Kruse, M.L., Wiegmann, K., Mathieu, S., Kolanus, W., Kronke, M., Adam, D.

Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor

J Immunol 169 (2002) 5161-70

Terada, Y., Inoshita, S., Nakashima, O., Kuwahara, M., Sasaki, S., Marumo, F.

Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade

Kidney Int 56 (1999) 1258-61

Tian Q, Taupin J, Elledge S, Robertson M, Anderson P.

Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis.

J Exp Med 1995 Sept 1;182(3):865-74.

Townsend, P.A., Cutress, R.I., Sharp, A., Brimmell, M., Packham, G.

BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway

Cancer Res 63 (2003) 4150-7

Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A.G., Hoffman, B., Liebermann, D.A.

Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control

J Biol Chem 22 (2000) 16810-9

Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J.R., Wood, R.D., Koberle, B.

Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines

Int J Cancer 110 (2004) 352-61

Westerheide, S.D., Mayo, M.W., Anest, V., Hanson, J.L., Baldwin, A.S. Jr.

The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition

Mol Cell Biol 21 (2001) 8428-36

Willis, S., Day, C.L., Hinds, M.G., Huang, D.C.

The Bcl-2-regulated apoptotic pathway

J Cell Sci (2003) 4053-6

Winkler, D., Herrmann, H.-D.

Tumoren des Rückenmarks, der Hirnhäute und des Knochens

In: Kunze, K.: Praxis der Neurologie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999, 2. vollst. überarbeitete Aufl.

Wittekind, C., Neid, M.

Hodentumoren. Pathologische Klassifikation und molekulare Pathogenese

Onkologie 9 (2003) 937-942

Yan, W., Burns, K.H., Matzuk, M.M.

Genetic engineering to study testicular tumorigenesis

APMIS 111 (2003) 174-81

Zafarana, G., Grygalewicz, B., Gillis, A.J., Vissers, L.E., van de Vliet, W., van Gorp, R.J., Stoop, H., Debiec-Rychter, M., Oosterhuis, J.W., van Kessel, A.G., Schoenmakers, E.F., Looijenga, L.H., Veltman, J.A.

12p-amplicon structure analysis in testicular germ cell tumors of adolescents and adults by array CGH

Oncogene 22 (2003) 7695-701

Zeng, L, Kong, X.T., Su, J.W., Xia, T.L., Na, Y.Q., Guo, Y.L.

Evaluation of germ-cell kinetics in infertile patients with proliferating cell nuclear antigen proliferating index

Asian J Androl 3 (2001) 63-6

Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G., Korsmeyer, S.J.

BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity

J Biol Chem 272 (1997) 24101-4

Zhang, Y., Fujita, N., Tsuruo, T.

Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis

Oncogene 18 (1999) 1131-8

8 Erklärung

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.

9 Lebenslauf

Name: Stockinger
Vorname: Marcus
Geburtsdatum/ -ort: 15.8.1973, Frankfurt am Main
Anschrift: Auf dem Albansberg 4
55131 Mainz

Eltern: Anneliese Stockinger (geb. Druschel), geb 23.3.1943 und
Reinfried Rudolf Stockinger, geb. 9.4.1939.

Schulbildung
8/1980 - 6/1986 Adolf-Reichwein-Schule, Rodenbach
8/1986 - 6/1993 Karl-Rehbein-Gymnasium, Hanau

Zivildienst
9/1993 – 12/1994 Rettungsdienst des DRK Hanau

Hochschulbildung
ab 8/1995 Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
8/1997 Physikum
8/1998 1. Staatsexamen
8/2001 2. Staatsexamen
10/2001 - 8/2002 Praktisches Jahr:
Neurologie (Wahlfach, Klinikum Aschaffenburg)
Chirurgie (Spital Dornach, Schweiz)
Innere Medizin (Klinikum Coburg)
11/2002 3. Staatsexamen und zugleich Studienabschluss

Berufstätigkeit
2/2003-12/2003 Arzt im Praktikum, Klinikum Freising (Gastroenterologie, Nephrologie)
1/2004-3/2005 Freie Tätigkeit für Clinical Research Services, Kelkheim/Ts.
und 6/2005-8/2005
4/2005-5/2005 Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik am Klinikum Aschaffenburg
Seit 9/2005 Assistenzarzt an der Klinik für Radioonkologie der Universität Mainz