

Aus dem Med. Zentrum für Urologie
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg.

Bedeutung molekularer Alterationen kritischer Regionen auf Chromosom 12p für die Differenzierung testikulärer Keimzelltumoren



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nanette Peitgen aus Gummersbach

Inhaltsverzeichnis

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 24.10.07

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Heidenreich

Korreferent: Prof. Dr. Ulshöfer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
1.1	TIN Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie	4
1.2	i(12p)	9
1.3	JAW1	11
1.4	SOX5	12
1.5	K-ras	13
1.6	Zielsetzung und Veröffentlichung der Ergebnisse	13
1.7	Liste der verwendeten Abkürzungen	15
2	Material und Methodik	17
2.1	Material	17
2.2	Methodik	19
2.2.1	Objekträgerbehandlung	19
2.2.2	Herstellung der Kryostatschnitte	20
2.2.3	Herstellung der Paraffinschnitte	20
2.2.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung	21
2.2.5	Mikrodissektion	22
2.2.6	RNA Isolierung	22
2.2.7	RT-PCR	24
2.2.8	Reverse Transkription zur c-DNA Synthese	24

Inhaltsverzeichnis

2.2.9	PCR	25
2.2.10	Kontrolle der c-DNA durch HR-GAPDH	26
2.2.11	HR-GAPDH	27
2.2.12	Optimierung der PCR Bed. für SOX5, JAW1 und K-ras	28
2.2.13	Isolation von SOX5	29
2.2.14	Isolation von JAW1	30
2.2.15	Isolation von K-ras	31
2.2.16	DNA Gelelektrophorese	33
2.2.17	Herstellung des Agarosegels	35
2.2.18	Photodokumentation des Gels	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Morphologische Ergebnisse	37
3.1.1	Hämatoxylin Eosin	37
3.1.2	Mikrodissektion und Extraktion der Total-RNA	40
3.2	Molekularbiologische Ergebnisse	40
3.2.1	Expression von HR-GAPDH	40
3.2.2	Expression von SOX5	43
3.2.3	Expression von JAW1	47
3.2.4	Expression von K-ras	51

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion	55
4.1	Bewertung des Expressionsmusters von SOX5	55
4.2	Bewertung des Expressionsmusters von JAW1	57
4.3	Bewertung des Expressionsmusters von K-ras	60
5	Literaturverzeichnis	62
6	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	68
7	Ehrenwörtliche Erklärung	69
8	Danksagung	70

1 Einleitung

Hodenkrebs ist der häufigste solide maligne Tumor bei Männern zwischen 15 und 35 Jahren, sein Anteil an allen Krebserkrankungen bei Männern beträgt allerdings nur 1 Prozent. (Jemal et al. ; 2003)

95 Prozent aller Hodentumore sind Keimzelltumoren, die sich zu gleichen Teilen aus Seminomen und Nicht-Seminomen zusammensetzen. Unter dem Begriff Nicht-Seminom werden alle reinen Tumoren außer dem Seminom und alle Mischtumoren ohne oder mit Einschluss des Seminoms zusammengefasst. Zu den Nicht-Seminomatösen Keimzelltumoren gehören Dottersacktumor, Chorioncarcinom, embryonales Carcinom, Teratom und das spermatocytische Seminom. Die restlichen 5 Prozent der Hodentumoren, die nicht zu den Keimzelltumoren gehören, sind Leydizell-, Sertolizell-, und Stromatumoren. Die histologische Einteilung der Hodentumore ist wegen deren unterschiedlicher Prognose von entscheidender Bedeutung, aber auch die Ausdehnung des Tumors und die Höhe der Tumormarker fließen in die Beurteilung hinsichtlich der Prognose und Therapie maßgeblich mit ein.

Die Zuordnung der in dieser Arbeit untersuchten Proben erfolgte nach folgenden Klassifikationen, die in Tab.1a-c dargestellt sind.

- TNM-Klassifikation der Keimzelltumoren des Hodens (UICC, 1997)
- Prognoseklassifikation der IGCCCG der Keimzelltumoren des Hodens
- Stadieneinteilung nach Lugano

Tab.1

TNM-Klassifikation der Keimzelltumoren des Hodens (UICC, 1997)

Primärtumor:

- Tx Primärtumor nicht beurteilbar
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- T1N Testikuläre intraepitheliale Neoplasie
- T1 Tumor auf Hoden begrenzt
- T2 Tumor infiltriert Gewebe jenseits der Tunica Albuginea oder den Nebenhoden
- T3 Tumor infiltriert den Samenstrang
- T4 Tumor infiltriert das Skrotum

Regionale Lymphknoten

- Nx Lymphknoten nicht beurteilbar
- N0 Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- N1 1-5 Lymphknotenmetastasen, keine über 2cm Durchmesser
- N2 Lymphknotenmetastasen mit 2 bis fünf cm Durchmesser oder multiple Lymphknotenmetastasen mit weniger als 5 cm Durchmesser.
- N3 Lymphknotenmetastasen mit mehr als 5cm Durchmesser

Fernmetastasen

- Mx Fernmetastasen nicht beurteilbar
- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen
- M1a Nicht regionale Lymphknoten- oder Lungenmetastase
- M1b Viscerale Metastasen außerhalb der Lunge

Einleitung

Unter Zuhilfenahme der TNM-Klassifikation werden die Prognoseklassifikation der IGCCCG und die Stadieneinteilung nach Lugano erstellt.

Tab. 2

Internationale Prognose-Klassifikation der fortgeschrittenen Hodentumoren nach Konsensus-Konferenz der „International Germ Cell Cancer Collaborative Group“ (IGCCCG).

Prognosekategorie	Seminom	Nicht-Seminom
Günstig	90% der Patienten Jedes T, N, M1a Normales AFP, jedes HCG und LDH	56% der Patienten Jedes T, N, M1a, S1
Intermediär	10% der Patienten Jedes T,N,M Normales AFP, jedes HCG und LDH	28% der Patienten Jedes T, N, M1a, S2
Ungünstig	--	16% der Patienten Jedes T,N,M, S3

*Alpha-Feto-Protein, **Humanes ChorionGonadotropin , ***Laktatdehydrogenase

Tab. 3

Stadieneinteilung nach Lugano

IA	pT1 N0 M0 S0				
IB	pT2-4 S0				
IS	pT1-4 S1-3				
IIA	pT1-4 N1 M0 S0/1				
IIB	pT1-4 N2 M0 S0/1				
IIC	pT1-4 N3 M0 S0/1				
IIIA	pT1-4 N0-3 M1a S0	oder	pT1-4 N0-3 M1a S1		
IIIB	pT1-4 N1-3 M0 S2	oder	pT1-4 N1-3 M1a S2		
IIIC	pT1-4 N1-3 M0 S3	oder	pT1-4 N1-3 M1a S3	oder	pT1-4 N1-3 M1b S0-3

S-Stadium (Tumormarker)

	LDH		HCG (IU/L)*		AFP (ng/ml)
S0	N	und	<5	und	<10
S1	<1,5xN	und	<5000	und	<1000
S2	1,5-10xN	oder	5000-50 000	oder	1000-10 000
S3	>10xN	oder	>50 000		oder >10 000

* HCG: 1ng/ml = 5 IU/L

1.1 TIN

Die Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie = TIN gilt als Vorläufer aller testikulären Keimzelltumoren, mit Ausnahme des seltenen Spermatoctytischen Seminoms. Die TIN ist in an Hodenkrebs angrenzendem Gewebe in bis zu 90% der Fälle (Jacobsen et al; 1981;) und in allen Gruppen, die ein erhöhtes Risiko tragen, einen Keimzelltumor zu entwickeln, nachweisbar. Dazu gehören u.a. auch Männer mit kryptorchidem Hoden, (Dieckmann et al;1982) sowie Männer mit einem Androgen-Rezeptordefekt. (Müller et al;1984) Weitere Fälle in denen eine TIN zu finden ist:

Einleitung

- Im kontralateralen Hoden eines Mannes mit ipsilateralem KZT
- Im Hoden eines Mannes mit extragonadalem KZT
- In einem kryptorchiden Hoden oder im normal dezensierten Hoden kontralateral zu einem kryptorchiden Hoden.
- Im Hoden zeugungsunfähiger Männer.

All diese Beobachtungen weisen auf einen Defekt hin, in dem genetische oder entwicklungsbedingte Vorkommnisse eine gonadale Dysfunktion hervorrufen und den Gonaden eine Prädisposition zur malignen Entartung verleihen. (Petersen et al.;1998).

Die TIN entwickelt sich aus primordialen Keimzellen und es wird angenommen, daß sie bereits zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden ist; z.B. wurde die TIN im Hoden von 4 Wochen alten Säuglingen entdeckt. (Shakkebaek et al. 1987). Obwohl noch nicht exakt geklärt ist, in welchem Entwicklungsstadium die TIN aufkommt, spricht einiges für einen Zeitraum von der 8.-12. Schwangerschaftswoche. 2 Proteine sind hier besonders hervorzuheben:

Der c-Kit-Rezeptor (KIT), und die Placentale-Alkalische Phosphatase (PLAP); beide werden in der TIN vermehrt exprimiert. Beide Proteine sind sog. Proto-Onkogene, diese spielen eine wichtige Rolle in der physiologischen Zellzyklusregulation in dem sie unter anderem für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Regulatoren der DNA- und RNA Synthese oder Transkriptionsfaktoren kodieren. Genetische Alterationen von Proto- Onkogenen wie c-Kit können zu Veränderungen der physiologisch programmierten Zellproliferation führen und so in einem unkontrollierten Zellwachstum münden.(Strohmeyer et al.1994)

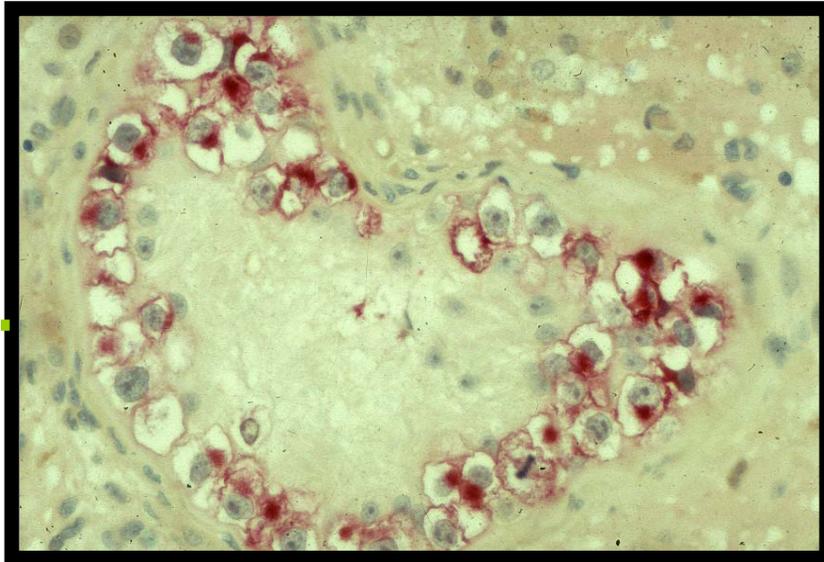
Diese und andere Marker werden von fetalen Keimzellen nur zwischen der 8. und 12. Schwangerschaftswoche exprimiert (Rajpert-De Meyts et al.;1994, Jorgensen et al. 1995). Die hohe Inzidenz von Hodenkrebs bei Männern mit Kryptorchismus oder anderen kongenitalen Fehlbildungen der Gonaden deutet auf intrauterine Faktoren hin, die eine wichtige Rolle in der Transformation der Keimzellen zur TIN spielen. Es besteht die Annahme, dass während der Zeit zwischen 8. bis 12. Schwangerschaftswoche, die einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung der Keimzellendifferenzierung darstellt, entweder genetische oder äußere Einflüsse (Östrogenspiegel) Keimzellen dazu veranlassen könnten, ein malignes Potential zu erwerben. (De Meytes et al.; 2000).

Eine schwedische Studie (Czene, Kichtenstein et al, 2002) schätzt den Anteil der hereditären Faktoren bei der Entstehung der Testikulären Keimzelltumoren auf 25%, wobei sie sich auf ein 9.6 Millionen zählendes Patientenkollektiv des Schwedischen Familien Krebsregisters beruft.

Es wird ebenfalls postuliert, dass die TIN aufgrund des veränderten hormonellen Milieus während der Pubertät mit der Teilung beginnt. (Shakkebaek et al.; 1987) Die initiale Ausbreitung der TIN erfolgt in longitudinaler Richtung entlang der Tubuli Seminiferi, bis sie das Rete Testis erreichen, das ihnen ermöglicht sich auf benachbarte Tubuli auszubreiten.

Abb. 1

Mikroskopische Aufnahme einer TIN, (PLAP-Färbung)



Mit freundlicher
Genehmigung von
Prof.Dr.med.A.
Heidenreich

Die Seminomzellen ähnelnde TIN kann hier in den Tubuli Seminiferi betrachtet werden. Sie zeichnet sich durch ein klares Cytoplasma und einen dunklen Zellkern aus.

Nach der Pubertät wird die TIN „invasiv“ und entwickelt sich zu einem seminomatösen oder Nicht-Seminomatösen Keimzelltumor. Neben der Aktivierung von Proto-Onkogenen wie c-Kit kann der Verlust eines Tumorsuppressorgens in die Tumorentstehung involviert sein. Ein Tumorsuppressorgen überwacht die Zellzyklusprogression an festgelegten Kontrollpunkten, somit kann der Verlust eines solchen negativ kontrollierenden Elements zur Vermehrung defekter DNA führen.

Einleitung

Entscheidend scheint hier ein homozygoter Allelverlust, bzw. eine homozygote Deletion des entsprechenden Allels zu sein, das einen Verlust des Tumorsuppressorgens zur Folge hat. Von Bedeutung bezüglich der Entstehung von Keimzelltumoren sind u.A. Allele auf den Chromosomen 11, 13 und 18.

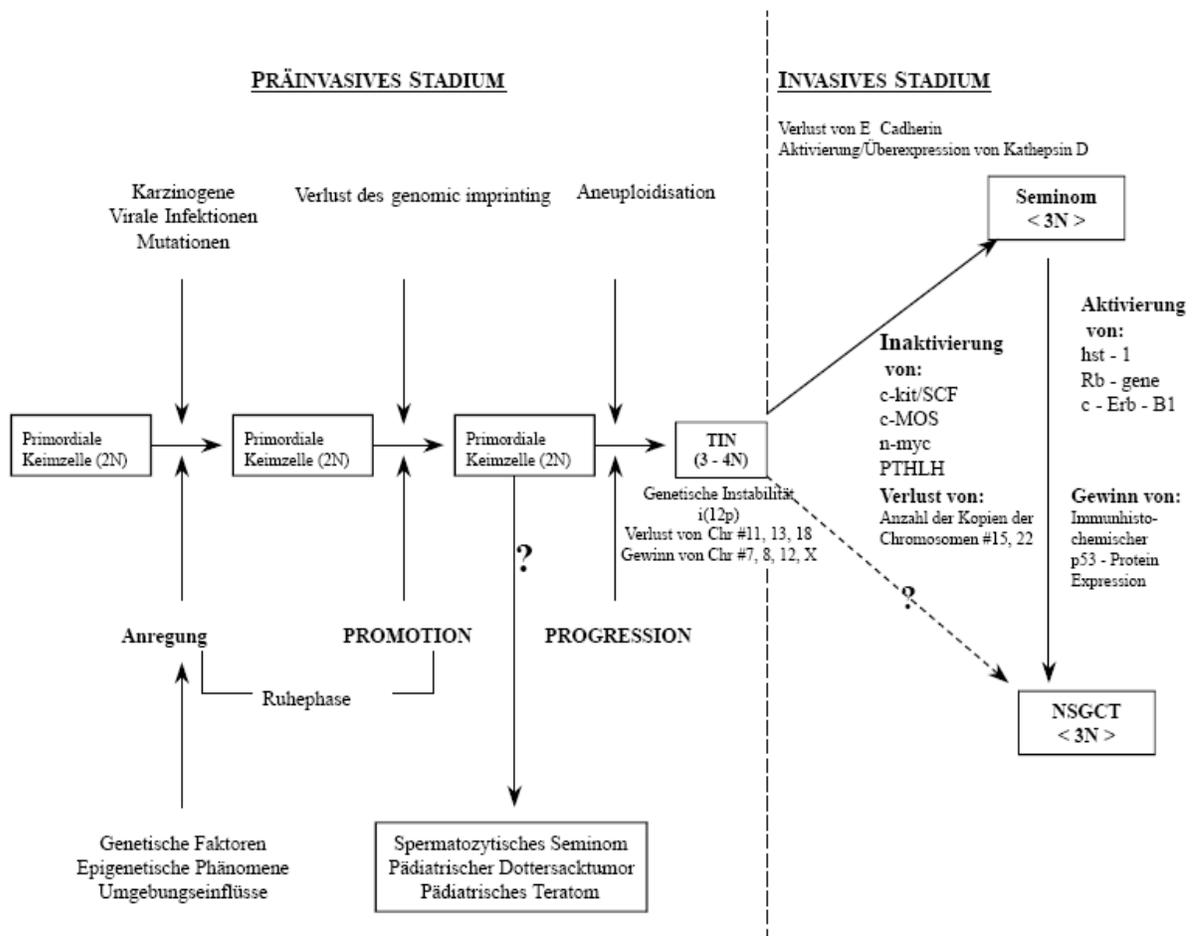


Abb.2 (Heidenreich et.al 2001)

Schematische Entwicklung der primordialen Keimzelle zu einem Seminomatösen oder Nicht-Seminomatösen Keimzelltumor.

1.2 i(12p)

Werden stabile strukturelle chromosomale Abnormitäten in Zellen entdeckt, so ist dies oft die Grundlage für den Nachweis von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, die an der Entstehung von spezifischen Tumortypen beteiligt sind. Die beständigste strukturelle Chromosomenaberration in Keimzelltumoren ist ein Isochromosom des kurzen Arms von Chromosom 12p. $\{i(12p)\}$. Diese Anomalie wurde zum ersten Mal von Atkin und Baker beschrieben. 50 % der Seminome und 80% der Nicht-Seminome zeigen mindestens ein $i(12p)$. (Van Echten-Ahrends et al.; 1995)

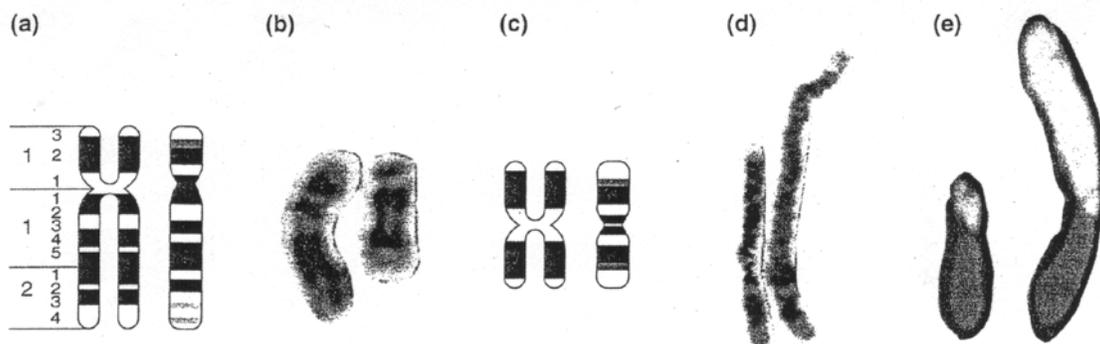


Abb.3

Isochromosom $i(12p)$: Schematische Darstellung des normalen Chromosoms 12 (a) und des $i(12p)$ (c). Eigentliche Abbildung des $i(12p)$ Chromosom 12 isoliert aus Seminom-Zellen die in einer Zelllinie kultiviert wurden und zusätzliche Fragmente von 12p enthalten.(d) Das entsprechende Chromosom dargestellt mit Hilfe der Fluoreszenz in situ hybridisierung.(e) (Leendert et al.; 1999)

Einleitung

Es konnte demonstriert werden, dass eine Poliploidisierung der i(12p) Formation vorausgeht.(van Kessel et al.; 1998) Keimzelltumoren ohne ein i(12p), sog. i(12p) negative Keimzelltumoren konnte mittels fluoreszierender in situ Hybridisierung auch ein i(12p) Zuwachs nachgewiesen werden.(Rodriguez et al.; 1993) Diese stabile Vermehrung von 12p wurde mittels komperativer genomischer Hybridisierung nachgewiesen (Korn et al.; 1996) und deutet daraufhin, dass sie für die Entstehung von Keimzelltumoren von entscheidender Bedeutung ist. Isochromosom i(12p) wurde auch in einer kleinen Anzahl von Fällen in TIN isoliert. (Vos et al.; 2000) Neuere Untersuchungen an invasiven Keimzelltumoren zeigten eine Amplifikation der Region 12p 11.2-p12.1. Roelofs et al konnten darstellen, dass die kürzeste sich überlappende Region der Genamplifikation (shortest region of overlap of amplification, SROA) 1.7 megabasen groß ist und für drei bekannte Gene codiert : SOX5, JAW1 und K-ras. In der folgenden Abbildung wird die SROA (shortest region of overlap of amplification) dargestellt.

Einleitung

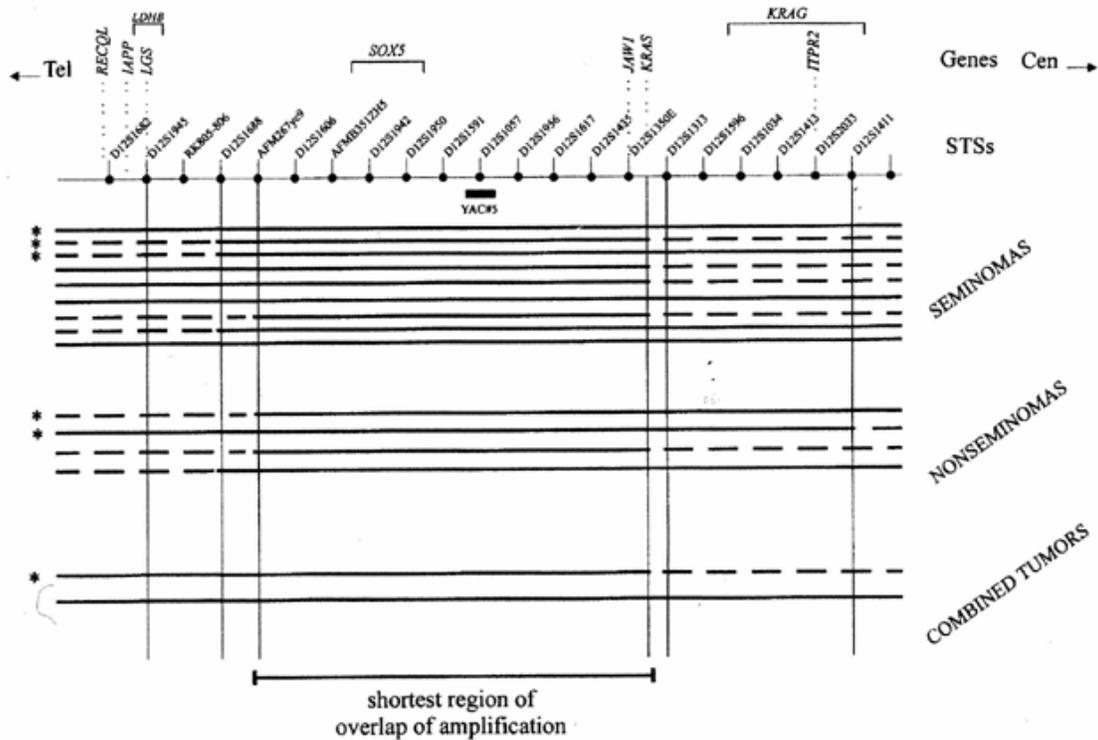


Abb.4

SROA : Schematische Darstellung der 12p11.2-p12.1 Region. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen Regionen, die in die 12p Amplifikation mit einbezogen sind; wobei die gepunktete Linie für die Regionen stehen, die von der Amplifikation ausgeschlossen sind. (Roelofs et al.; 2000)

1.3 JAW 1

JAW 1 wird in Lymphocyten exprimiert und ist auf der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Es gehört zu einer Familie von integralen Membranproteinen die ein Carboxy-terminales Ende besitzen. (Kutay et al.; 1993). Dieser Carboxy-terminale Anker dient der Befestigung von JAW 1 am Endoplasmatischen Retikulum.

Aufgrund seines Expressionsmusters und seiner Lokalisation am ER wird angenommen, dass JAW 1 eine Rolle in der Ausdifferenzierung des Antigenrezeptors bzw. der Antigen-Rezeptor Zusammensetzung spielt, oder dass es in anderer Weise Einfluss auf die Entwicklung der Lymphozyten nimmt. Die Expression von JAW 1 ist sowohl in B-Zellen wie auch in T-Zellen vorhanden. Am ausgeprägtesten ist die Expression allerdings in prämaternen B-Zellen, maternen B-Zellen und prämaternen T-Zellen. Behrens et al konnten zeigen, dass JAW 1 in nicht-hämatopoetischen Zelllinien **nicht** nachweisbar ist.

1.4 SOX5

Sry ist ein dominant aktives Gen, welches in Säugetieren die Entwicklung des Hodens induziert. Sry kodiert für ein Protein, das ein 79 Aminosäuren DNA bindendes Motiv, beschrieben als HMG Box, enthält. Eine Vielzahl von Genen, die eine Homologie von mehr als 60 % zur Sry HmgBox aufweisen, wurden identifiziert; diese Gene, bekannt als Sox (SOX im Humanen) für Sry zugehörige HmgBox Gene, wurden in diversen höheren Eukaryonten nachgewiesen. Wunderle et al klonierten und sequenzierten SOX5, ein neues Mitglied der Sox Familie, aus adulten Geweben wie Leber, Lunge, Herz, Nieren und fötalem Gehirn. Die Bedeutung von SOX5 ist bislang nicht vollständig erklärt. Blaise et al. 1999 zeigten in ihrer Arbeit, dass SOX5 als Transkriptionsfaktor für die Testes-spezifische Expression der hormonsensitiven Lipase (HSLtes) dienen könnte, und somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Spermatogenese einnimmt.

1.5 K-ras

Die spezifischen Gene der ras-Familie H-, N- und K-ras – kodieren für drei ähnliche Proteine (p21), die auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und in die Signaltransduktion involviert sind. Es ist beachtenswert, dass alle 3 Proto-Onkogene durch Punktmutationen in den gleichen Regionen (Codons 12, 13 und 61) in Onkogene transformiert werden und eine Potenzierung der p21 Signaltransduktionskapazität bewirken, die über ein autonomes Wachstum in einer unkontrollierten Proliferationsaktivität mündet. Nachdem K-ras auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert ist und Genamplifikationen in Metastasen embryonaler Karzinome dargestellt wurden, haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob Punktmutationen in die Pathogenese der Keimzelltumoren involviert sein könnten.

1.6 Zielsetzung und Veröffentlichung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster der auf der SROA des i(12p) lokalisierten Gene JAW 1, SOX5 und K-ras untersucht. Erstmals wurde mit semiquantitativer PCR das tumorspezifische Expressionsmuster von JAW 1, SOX5 und K-ras in testikulären Keimzelltumoren und angrenzendem histologisch normalem Gewebe, das durch Mikrodissektion voneinander separiert wurde, analysiert.

Mein Doktorvater, Herr Prof. Dr. med. Axel Heidenreich, erhielt 2002 den Maximilian Nitze Preis der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. für eine wissenschaftliche Arbeit mit dem Titel: „Molekulare Phänomene testikulärer Keimzelltumoren - neue Erkenntnisse in Pathogenese und

Einleitung

Prognose“, die anlässlich des 54. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Wiesbaden von ihm eingereicht wurde. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Forschungsergebnissen durfte ich einen Teil zur Erlangung dieses Preises beitragen.

1.7 Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc. nr.	Accession number
AFP	Alpha-Feto-Protein
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
C°	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy Desoxyribonucleid Acid
cm	Centimeter
CTL	Zytotoxische Lymphozyten
D-NTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothrenitol
EDTA	Ethylenediamin-Tetra-Acetatsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
HCG	Humanes Chorion Gonadotropin
HE	Hämatoxylin Eosin
HSL	Hormon Sensitive Lipase
IGCCCG	International Germcell Cancer Consensus Collaborative Group
KIT	c-KIT Rezeptor
KZT	Keimzelltumor
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
m-RNA	messenger Ribonucleic Acid
ng	Nanogramm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLAP	Plazentale Alkalische Phosphatase
RNA	Ribonucleid Acid
Rpm	Revolutions per minute

Einleitung

RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
Sek.	Sekunde
SROA	Shortest Region of Overlap of Amplification
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Temp.	Temperatur
TIN	Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie
u.a.	unter anderem
U/l	Units pro Liter
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
vergl.	vergleich
z.B.	zum Beispiel

2 Material und Methodik

2.1 Material

Die in dieser Arbeit untersuchten Hoden, d.h. Karzinomgewebe und angrenzendes histologisch normales Gewebe wurden von der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr.med. R. Hofmann, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Hodengewebe stammt von Patienten, die sich aufgrund eines malignen Prozesses des Hodens einer Inguinalen Orchiektomie unterzogen. Das auf diese Weise gewonnene Gewebe wurde noch im Operationsaal unverzüglich mittels flüssigem Stickstoff auf eine Temp. von -70°C schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Gefrierschrank derselben Temperatur aufbewahrt.

Es standen 27 Hodentumore unterschiedlicher Histologie und Prognosestadien zur Untersuchung bereit. Zur Kontrolle standen von 20 Tumoren Biopsien aus angrenzendem Normalgewebe zur Verfügung, die restlichen 7 Proben bestanden komplett aus Tumorgewebe. Anhand der Patientenakten konnten Tumorstadium, Metastasierung und Tumormarker ermittelt werden. Um die Tumoren einzuteilen wurde die TNM-Klassifikation der Keimzelltumoren des Hodens, die Stadieneinteilung nach Lugano und die Internationale Prognose-Klassifikation der fortgeschrittenen Hodentumoren der Konsensus-Konferenz der „International Germ Cell Cancer Collaborative Group“ (IGCCCG) 1995 verwandt.

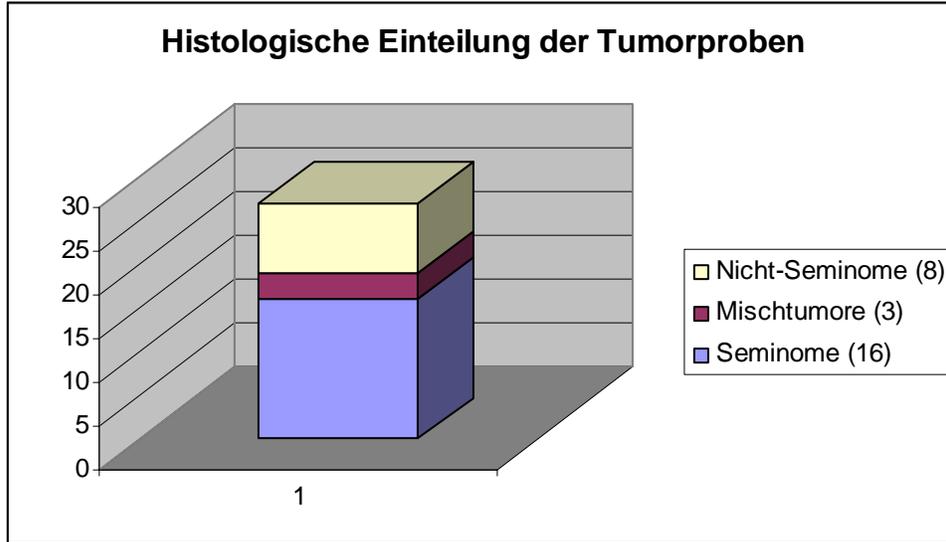


Abb.5

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um 16 Seminome, 3 Mischtumore, die Seminomatöse und Nicht-Seminomatöse Anteile enthielten, und 8 Nicht-Seminome.

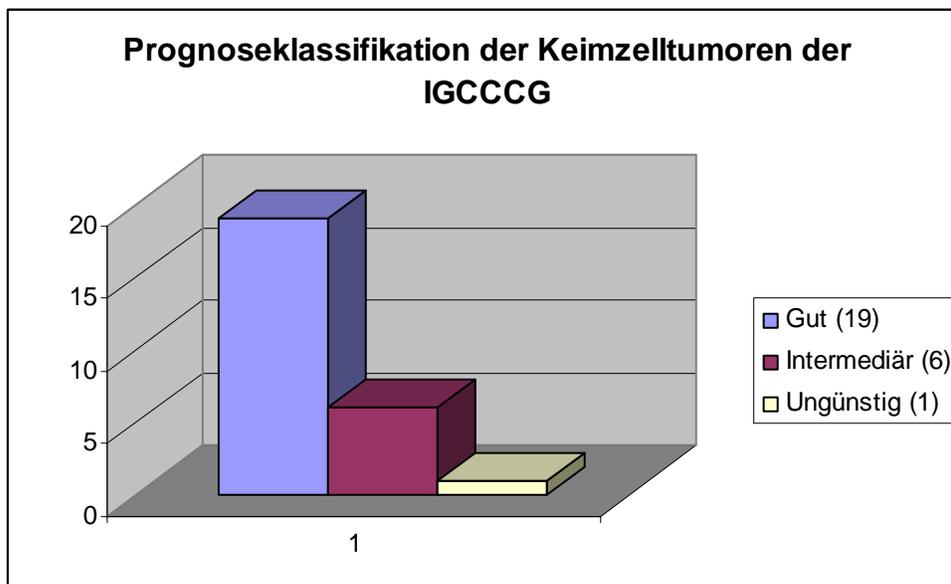


Abb.6

Nach der Prognoseklassifikation der IGCCCG konnte 19 der untersuchten Hodentumoren eine gute, 6 eine intermediäre und einem der Tumoren eine ungünstige Prognose zugeordnet werden

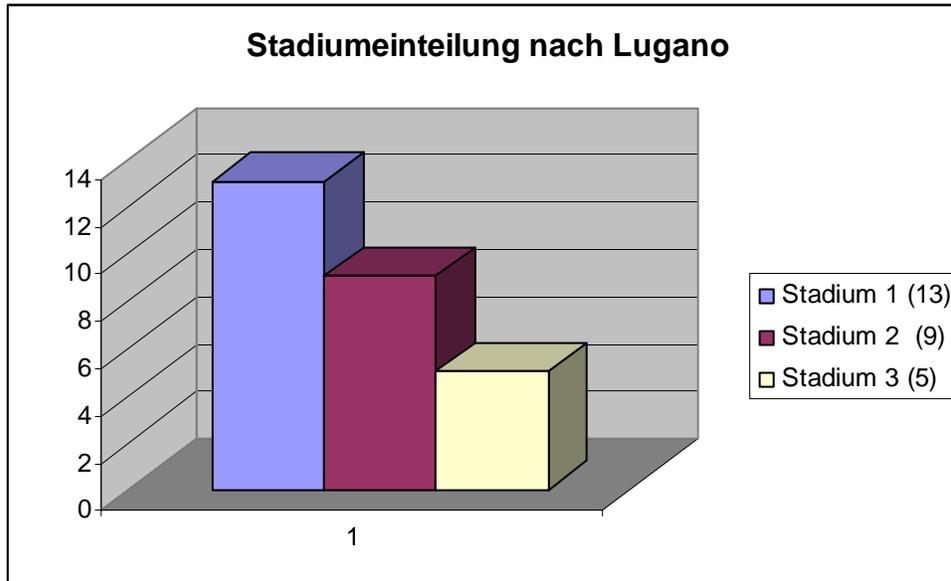


Abb.7

Die Stadieneinteilung nach Lugano ergab für 13 der untersuchten Tumoren das Stadium 1, 9 Tumoren entsprachen Stadium 2 und 5 Tumoren konnte Stadium 3 zugeordnet werden

2.2 Methodik

2.2.1 Objektträgerbehandlung

Vor der Herstellung der Kryostatschnitte wurden die Objektträger mit 3% iger H₂O₂-Lösung vorbehandelt, um einer Verunreinigung durch RNA-sen vorzubeugen. Die Objektträger werden über Nacht inkubiert und anschließend in einem 60 C° warmen Trockenschrank getrocknet.

2.2.2. Herstellung der Kryostatschnitte

Hierzu stand ein Kryostat (Microm Vacutom HM 500) mit einer konstanten Temp. von -22 C° zur Verfügung. Auch die Temperatur der Gewebeprobe betrug -22 C°. Die gefrorenen Gewebeprobe wurden mit Tissue Tec© auf einem Metallträger im Kryostat befestigt. Es wurden 10µm dünne Schnitte hergestellt, die auf die vorbehandelten Objektträger plaziert wurden und, um sie für die anschließende HE-Färbung vorzubereiten, kurz luftgetrocknet. Für die Mikrodissektion wurden auf gleiche Weise 10 µm dünne Schnitte gewonnen, in diesem Fall aber zügig weiter verarbeitet.

2.2.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Die 5 nm dünnen Paraffinschnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leitz, Wetzlar) hergestellt, in 40 C° warmes Wasser, und anschließend auf sialinisierte Objektträger überführt. (Super Frost Plus, Merck). Die Schnitte trockneten über Nacht bei 60 C° im Trockenschrank. Vor der HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin), wurden die Paraffinschnitte jeweils 3x für 5 Minuten mit Xylol und für 2x5 Minuten mit Isopropanol entparaffiniert.

Danach wurden sie mit einer absteigenden Alkoholreihe, (96%, 80%, 70%) je 3 Minuten behandelt und durch eine 5 minütige Waschung mit Aqua. dest. rehydriert. Nach dieser Behandlung waren die Schnitte bereit für die HE-Färbung.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die Schnitte einer pathologisch histologischen Begutachtung zugänglich zu machen, in der neben der Histologie der Probe auch Tumorzellen und histologisch normale Zellen identifiziert wurden, um sie später durch eine Mikrodissektion getrennt voneinander extrahieren zu können, wurde eine HE-Färbung vorgenommen. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte durch Herrn Prof. Dr. P. Barth (Pathologie, Universitätsklinik Marburg)

Material:

Saures HE nach Mayer:

Hämatoxylin	1.0g
NaJO ₃	0.2g
Kalialaun	50.0g
Chloralhydrat	50.0g
Zitronensäure	1.0g

Wässrige Eosinlösung:

1% Eosin-Y in 100ml Aqua.Dest. + 1 Tropfen Eisessig

Die Schnitte wurden kurz getrocknet, darauf folgte die 10 Min. Färbung in Hämatoxylin und eine 2x5 Min. Spülung mit Leitungswasser. Es schloss sich eine 3 Min. Färbung mit Eosin an. Nach einer Spülung mit Aqua dest. folgte die Entwässerung in einer ansteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) für je 3 Min. und eine 5 Min. Spülung in Xylol.

2.2.5 Mikrodissektion:

Es handelt sich hierbei um eine Methode, die es erlaubt Zellen und Zellverbände getrennt voneinander zu extrahieren, um sie anschließend den gewünschten Untersuchungen zuzuführen. In dieser Arbeit wurden auf diese Weise Hodentumorzellen und ihnen angrenzende histologisch normale Zellen durch manuelle Mikrodissektion getrennt voneinander gewonnen.

Vorgehensweise:

Unter Zuhilfenahme der HE-gefärbten Schnitte, anhand derer tumortragende und histologisch normale Zellen markiert worden waren, konnte nun an den korrespondierenden 10µm dünnen Gefrierschnitten die separate Entnahme der Zellverbände erfolgen. Unter mikroskopischer Kontrolle (Mikroskop, 25-fache Vergrößerung, Zeiss) wurden die Areale mit einer sterilen Nadel (Durchmesser 0.9mm, Microlance, Becton Dickinson) scharf disseziert und unverzüglich in 500 µl Trizol- Lsg überführt, um die Zellen für die folgende RNA-Isolierung vorzubereiten.

2.2.6 RNA-Isolierung

In dieser Arbeit wurde die standardisierte Trizol-Methode benutzt, um die Total-RNA Isolierung aus den Hodentumorzellen und den histologisch normalen Zellen vorzunehmen. Die Trizol Methode basiert auf einem standardisierten Protokoll, das eine DNA-freie RNA-Isolierung gewährleistet. Die Zellen wurden zunächst einer Homogenisierung unterzogen, anschließend wurde der Lösung 125µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sek. geschüttelt und nach einer 5 Min. Ruhephase für 15 Min. in einer

Kühl-zentrifuge (-4 C°) bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Auf diese Weise entstanden 3 scharf voneinander getrennte Phasen

Phase 1/Oben: Wässrig, enthielt die Total-RNA
Phase 2/Mitte: Milchig trüb, Proteine und Fette
Phase 3/Unten: Genomische DNA

Phase 1, in der sich die Total-RNA befand, wurde sauber abpipettiert, mit 125µl Chloroform versetzt und 15 Sek. geschüttelt, 5 Min. ruhen gelassen und 15 Min. bei maximaler Geschwindigkeit in die Kühlzentrifuge gestellt.

Dies führte zur Bildung von 2 Phasen, wobei auch hier die obere abgenommen wurde, da sie die RNA enthielt, mit 339 µl Isopropanol (2-Propanol) versetzt, 10 Min. stehen gelassen und dann für weitere 10 Min. bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert.

Nun war die Total-RNA am Boden des Eppendorf-Cups als weißliches Pellet zu erkennen und der Überstand konnte sehr vorsichtig abgenommen werden. Nun wurde das Pellet mit 650 µl 75% Ethanol vermischt kurz geschüttelt und so gewaschen. Abschließend wurde die Lösung ein letztes Mal, bei 7000 rpm für 5 Min. in die Kühlzentrifuge gegeben.

Das am Boden deutlich sichtbare Pellet wurde abermals vom Überstand befreit und 15 Min. luftgetrocknet bis das gesamte Ethanol verdampft war.

Zur Aufbewahrung wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem bidestilliertem Wasser gelöst und in einem Eisschrank bei -80 C° bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Um eine eventuelle Verunreinigung durch Fremdproteine auszuschließen, wurden alle Proben mittels Photometrie (Cetrospec 3000, Biotech, Freiburg) auf ihren Reinheitsgrad geprüft.

2.2.7 RT-PCR

Um die **aktive** Expression der Gene SOX5, JAW1 und K-ras untersuchen zu können, wurde RNA isoliert. Um jedoch weitere Untersuchungen an RNA durchführen zu können, musste sie umgeschrieben (**R**reverse **T**ranskriptase) und anschließend vervielfältigt werden (**P**olymerase **C**hain **R**eaction). Zu diesem Zweck wurde die RNA in c-DNA (copy-DNA) umgeschrieben.

2.2.8 Reverse Transkripton zur c-DNA-Synthese

Es wurde jeweils 1µg Total RNA mit sterilem RNase freiem bidestilliertem Wasser auf 11µl in einem Eppendorf-cup verdünnt und mit 1µl Oligo(dt) (500µg/ml) Primer versetzt. Diese Lösung wurde für 10 Min. bei 70C° inkubiert und dann unverzüglich auf Eis gelegt.

Jeder Probe zugefügt wurden:

7µl Mix A: - 5x RT-Puffer (4µl),
 - 0.1 M DTT (2µl),
 - dNTP-Mix (ACGT), je 10mM (1µl)

Nach 2 Min. Inkubation bei 42C° wurde 1µl Reverse Transkriptase (Superscript II RNase H-, 200U/µl (Gibco) hinzugefügt und für 50 Min. inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationsphase wurde die Reaktion gestoppt, indem die Lösung für 15 Min. auf 72 C° erhitzt wurde.

2.2.9 PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Bei der PCR handelt es sich um eine Technik, die es erlaubt in vitro gezielt DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen (Primer) eingerahmt werden. Durch die exponentielle Vermehrung der spezifischen DNA-Sequenz wird die Voraussetzung für einen sicheren Nachweis der betreffenden Sequenz geschaffen.

Vorgehensweise:

Einsetzbar ist genomische DNA oder wie in diesem Fall cDNA, die mittels RT-PCR von der ursprünglich isolierten RNA gewonnen wurde. Die cDNA wird mit einem PCR-Supremix in einen Thermocycler gesetzt. Ein Thermocycler dient der Erhitzung bzw. Kühlung des PCR-Substrats indem die Höhe der Temperatur und die Dauer der einzelnen Temperaturabfolgen in Minuten bzw. Sekunden genau auf die zu amplifizierende Sequenz abgestimmt werden.

Grundsätzlich dient der erste Schritt der Spaltung der DNA Doppelhelix in zwei einzelne Stränge (Denaturierung). Dem folgt das sog. Annealing, bei dem sich der für die zu amplifizierende DNA-Sequenz spezifische Primer an die entsprechende Sequenz anlagert. Bei dem Primer handelt es sich um ein kurzes einzelsträngiges DNA-Molekül, das komplementär zu den Enden der definierten DNA-Vorlage ist. Hat sich der Primer angelagert, beginnt das hitzebeständige Enzym Taq-Polymerase den zu amplifizierenden DNA-Ab-

schnitt zu vervollständigen (Elongation). Die Temperaturen für Annealing und Elongation sind für jeden Primer bzw. jede zu amplifizierende DNA-Sequenz spezifisch und müssen durch wiederholte Versuche optimal eingestellt werden.

Vorgehensweise:

Es wurden 2 µl der jeweiligen cDNA und 48 µl des PCR-Supermix in ein Mini-Eppendorf gegeben. Der Supermix für die jeweiligen Primer (SOX5, JAW1 und K-ras) wurde unter Verwendung des PCR Optimierung Kit (Boehringer, Mannheim) bestmöglich abgestimmt. Die Temperaturhöhe und Dauer der einzelnen Schritte des PCR-Zyklus wurden an die Bedürfnisse der Primer individuell angepasst.

2.2.10 Kontrolle der cDNA durch HR-GAPDH

Bevor die aktive Expression von SOX5, JAW1 und K-ras untersucht wurde, galt es, die Effizienz der RT-PCR, sowie die Qualität und Quantität der extrahierten RNA zu überprüfen. Dazu wurde eine PCR der cDNA Proben mit HR-GAPDH vorgenommen. Die Expression von HR-GAPDH bewies zweifelsfrei die Anwesenheit von cDNA in der zu untersuchenden Probe und konnte so falsch negative Ergebnisse der nachfolgend untersuchten Gene in dieser Hinsicht ausschließen.

Alle eingesetzten Primer stammen von der Firma MWG Biotech

2.2.11 HR-GAPDH

Wir haben die folgenden Primer:

5' - TCA TCA GCA ATG CCT CCT GC - 3'

5' – GCT CAG GCA TGA CCT TGC C - 3'

Folgender Supermix wurde für den Primer angesetzt:

PCR-Supermix für HR-GAPDH

5 µl 10 x PCR-Puffer
 1 µl dNTP-Mix (ACGT, je 10mM)
 1 µl Primer 5' (10 pM/µl)
 1 µl Primer 3' (10 pM/µl)
 2 µl MgCl₂ (25mM)
 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

+ 37,75 µl Bidestilliertes Aqua dest.

Folgende Einstellungen wurden für den Thermocycler ermittelt:

Einstellung des Thermocyclers Für HR-GAPDH

Schritt 1	94C°	2.30 Min.	Denaturierung
Schritt 2	94C°	1.0 Min.	Denaturierung
35 Zyklen	59C°	1.0 Min.	Annealing
	72C°	1.0 Min.	Elongation
Schritt 3	72C°	5.0 Min.	Elongation

2.2.12 Optimierung der PCR Bedingungen für SOX5, JAW1 und K-ras

Primer unterscheiden sich nicht nur in der Summe ihrer Basenpaare sondern auch in der Anzahl und Relation der einzelne Nukleotide zueinander, sowie in dem Genprodukt, das sie amplifizieren. Daher ist es obligat, die Bedingungen für jeden Primer zu optimieren. Als entscheidende Variablen sind hier neben den Temperaturabfolgen des Thermocyclers die Magnesium-Chlorid Konzentration und der pH- wert des PCR-Supermix zu nennen.

Um die bestmöglichen Konzentrationen zu ermitteln, wurde ein PCR Optimierung Kit (Roche, Mannheim) eingesetzt.

	1.0 MgCl ₂ mM	1.5 MgCl ₂ mM	2.0 MgCl ₂ mM	2.5 MgCl ₂ mM
pH 8.3	A	B	C	D
pH 8.6	E	F	G	H
pH 8.9	I	J	K	L
pH 9.2	M	N	O	P

In Tabelle 4 sind die 16 Puffer des Kit dargestellt

Es wurden je :

1µl 5' Primer (SOX5, JAW1, Kras)

1µl 3' Primer (SOX5, JAW1, Kras)

2µl cDNA

mit jeweils einem der 16 Grundansätze des PCR Optimierung Kit versetzt.

Die Proben wurden anschließend in den Thermocycler überführt, dessen Temperaturabfolge ebenfalls auf die Primer abgestimmt wurde.

Der Grundansatz mit der jeweils größten Ausbeute wurde für zukünftige PCR übernommen.

2.2.13 Isolation von SOX5

Der Primer ist Intron-überspannend, daher kann eine unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA, die das Ergebnis verfälschen würde, ausgeschlossen werden.

Accession-number: S83308

Position: 654-672

923-941

Primer-Sequenz :

5'- TGA GGA GCA AGC CCG TCT C -3'

5' – GGG CTG CTA GAC ACG CTT G -3'

Basenpaare: 288 Basenpaare

Annealing-temp.: 60°C

PCR-Supermix für SOX5

5 µl	10 x PCR-Puffer pH 9.2
1 µl	dNTP-Mix (ACGT, je 10mM)
1 µl	Primer 5' (10 pM/µl)
1 µl	Primer 3' (10 pM/µl)
2 µl	MgCl ₂ (25mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

+ 37,75 µl Bidestilliertes Aqua dest.

Einstellung des Thermocyclers für SOX5

Schritt 1	95C°	2.30 Min.	Denaturierung
Schritt 2	95C°	2.0 Min.	Denaturierung
35 Zyklen	60C°	30 Sek.	Annealing
	72C°	30 Sek.	Elongation
Schritt 3	72C°	5.0 Min.	Elongation

2.2.14 Isolation von JAW1

Der Primer ist Intron-überspannend, daher kann eine unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA, die das Ergebnis verfälschen würde ausgeschlossen werden.

Accession-number: XM-006694

Position: 1676-1695

2103-2122

Primersequenz: 5' – TGA GGA GCA AGC CCG TCT C- 3'

5'- GGG CTG CTA GAC ACG CTT G – 3'

Basenpaare: 488 Basenpaare

Annealing-temp.: 59°C

PCR-Supermix für JAW1

5 µl	10 x PCR-Puffer pH 8.3
1 µl	dNTP-Mix (ACGT, je 10mM)
1 µl	Primer 5' (10 pM/µl)
1 µl	Primer 3' (10 pM/µl)
2 µl	MgCl ₂ (20mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

+ 37,75 µl Bidestilliertes Aqua dest.

Einstellung des Thermocyclers für JAW 1

Schritt 1	95C°	2.30 Min.	Denaturierung
Schritt 2	95C°	3 Min.	Denaturierung
35 Zyklen	59C°	1.0 Min.	Annealing
	73C°	1.0 Min.	Elongation
Schritt 3	73C°	5.0 Min.	Elongation

2.2.15 Isolation von K-ras

Der Primer ist Intron-überspannend, daher kann eine unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA, die das Ergebnis verfälschen würde, ausgeschlossen werden

Accession-number: XM-006694

Position: 169-190

389-410

Primersequenz: 5'- TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA G - 3'
 5'- ATG GCA AAT ACA CAA AGA AAG C- 3'

Basenpaare: 242 Basenpaare

Annealing-temp.: 57C°

PCR- Supermix für K-ras

5 µl 10 x PCR-Puffer pH 8.3
 1 µl dNTP-Mix (ACGT, je 10mM)
 1 µl Primer 5' (10 pM/µl)
 1 µl Primer 3' (10 pM/µl)
 2 µl MgCl₂ (20mM)
 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

+ 37,75 µl Bidestilliertes Aqua dest.

Einstellung des Thermocyclers für K-ras

Schritt 1	95C°	2.30 Min.	Denaturierung
Schritt 2	95C°	4 Min.	Denaturierung
35 Zyklen	57C°	2.0 Min.	Annealing
	74C°	1.0 Min.	Elongation
Schritt 3	74C°	10.0 Min.	Elongation

2.2.16 DNA- Gelelektrophorese

Doppelstrang- DNA richtet sich in einem elektrischen Feld in gestreckter Form aus. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrestes wandert die DNA, in einem leicht alkalischen Puffer eingebettet, zur Anode (+). Diese Eigenschaft ermöglicht die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel. Die Geschwindigkeit, mit der ein DNA-Fragment zur Anode wandert, hängt von der Summe seiner Basenpaare ab.; die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl seiner Basenpaare. Zusätzlich beeinflussen die Konzentration des Gels und die an das Gel angelegte Stromstärke die Geschwindigkeit, mit der ein DNA-Fragment von der Kathode zur Anode wandert. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, bedient man sich des Ethidiumbromids. Es wird mit der Agarose vermischt, hier wandern die Ethidiumbromidmoleküle zwischen die Basenpaare der DNA und lagern sich dort an. Legt man nun das Agarosegel mit der durch Ethidiumbromid gekennzeichneten DNA auf eine Lichtquelle (kurzwelliges UV-Licht, 260nm), wird dieses von der DNA absorbiert und durch das Ethidiumbromid in Form von orange-rottem Fluoreszenzlicht (590nm) wieder abgegeben, und ist so für das menschliche Auge sichtbar und photographisch dokumentierbar.

Elektrodenpuffer: 1xTBE:

-10xTBE (Tris-Borat/EDTA) Puffer

Tris	121.1g
Borsäure	51.35g
EDTA	3.27g

In 1000ml Aqua dest. lösen

-Agarose; lyophilisiert, Ultra pure (Gibco, Berlin)

-DNA-Proben Puffer

(Blue/Orange 6x „Loading Dye“ (Promega))

-Ethidiumbromid (Roche)

Ethidiumbromid 0.1g

In 1000 ml Aqua dest. lösen

2.2.17 Herstellung des Agarosegels

100ml 1xTBE-Puffer versetzt mit 2g Agarose werden in der Mikrowelle 2-3 Min. aufgekocht, bis eine klare bläschenfreie Flüssigkeit entsteht. Diese wird ca. 1 Min. zum Kühlen stehen gelassen und anschließend in die Gelkammer gegossen.

Unter dem Abzug werden nun 75µl 0.1% Ethidiumbromidlösung in das Gel pipettiert, und sorgfältig im gesamten Gel verteilt und ein Kamm zur Aussparung der Probetaschen eingesetzt. Nach 15 Min. hat das Gel die gewünschte Festigkeit erlangt, der Kamm kann jetzt behutsam entfernt werden und das Gel in die schon mit 1xTBE Puffer aufgefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Dabei liegt der Flüssigkeitsspiegel leicht über dem Gel, so dass es vollständig mit 1xTBE Puffer bedeckt ist.

Die Geltaschen werden mittels einer Pipette beladen. Die erste Tasche wird mit einer 100bp Leiter (Promega) zur späteren Größenbestimmung der eingesetzten PCR Produkte (DNA) beladen. Darauf folgt die sog. Negativ-Kontrolle. Diese enthält den PCR-Supermix des jeweils zu amplifizierenden Genprodukts, ohne jedoch mit DNA versetzt worden zu sein. So können Verunreinigungen mit DNA, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten, ausgeschlossen werden. Die restlichen Taschen werden mit jeweils 12 µl DNA (PCR-Produkt) und 3 µl Loading Dye befüllt. Nun kann die Spannung angelegt werden. Zunächst 5 Min. bei 90 Volt und anschließend 90 Min. bei 120 Volt.

2.2.18 Photodokumentation des Gels

Nach 95 Min. wird der Strom abgeschaltet und das Gel aus der Elektrophorese-Kammer entfernt. Das Gel wird auf einen UV-Lichtschirm (kurzwellig, 250 nm) gelegt. Die Photodokumentation erfolgte bei HR-GAPDH mit einer Polaroid-Sofortbildkamara, Belichtungszeit 1 Sekunde. Für SOX5, JAW1 und K-ras wurde eine Canon Powershot Digitalkamera, Belichtungszeit 4 Sek. verwandt und die Photos im Biometra Whatman-Software-Programm zur Dokumentation der Ergebnisse festgehalten.

3 Ergebnisse

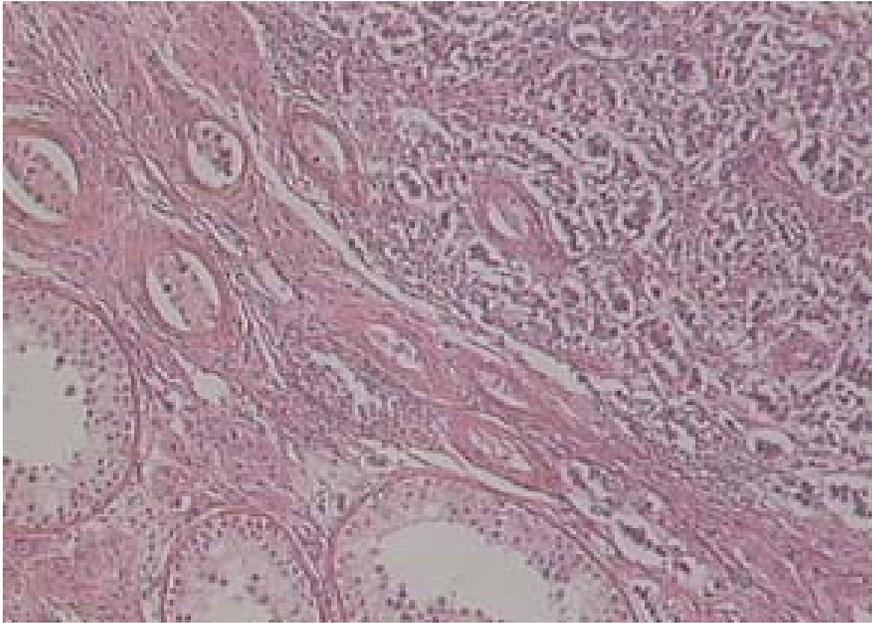
Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand darin, das Tumorspezifische Expressionsmuster der auf der SROA des Isochromosoms $i\{12p\}$ lokalisierten Gene SOX5, JAW1 und K-ras in Hodentumorgewebe und angrenzendem histologisch normalem Gewebe mittels semiquantitativer PCR zu analysieren, und auf diesem Weg Erkenntnisse über den Einfluss dieser Gene auf die molekularbiologische Pathogenese Seminomatöser und Nicht-Seminomatöser Keimzelltumoren zu gewinnen. Den entscheidenden molekularbiologischen Untersuchungen, die auf der Isolierung von Total-RNA aus Tumor.- und Normalgewebe und einer anschließenden RT-PCR mit den Primern für SOX5, JAW1 und K-ras bestanden, ging ein morphologischer Arbeitsgang voraus, der darin bestand, den vorhandenen Proben die entsprechende Histologie zuzuordnen und während der darauf folgenden Mikrodissektion Karzinomzellen und, falls vorhanden, histologisch normale Zellen getrennt aus den Proben zu entnehmen.

3.1 Morphologische Ergebnisse

3.1.1 Hämatoxylin Eosin

Als Vorbereitung für die Mikrodissektion der Kryostatschnitte wurden alle Proben nach HE gefärbt. Anhand dieser Schnitte erfolgte die histologische Einteilung sowie die Kennzeichnung der Karzinom.- und histologisch normalen Zellen. (Die histologische Beurteilung erfolgte durch Herrn Professor Dr. P. Barth, Pathologie, Universität Marburg)

Ergebnisse



←
Seminomatöser
Keimzelltumor

↑ Histologisch „normale“ Zellen.

Abb.8

Typisches Bild eines Seminoms bei 10-facher Vergrößerung (Paraffinschnitt), im oberen rechten Anteil des Bildes ist der Seminomatöse Keimzelltumor und im unteren linken Teil die histologisch normalen Zellverbände des Schnitts zu sehen.

Ergebnisse

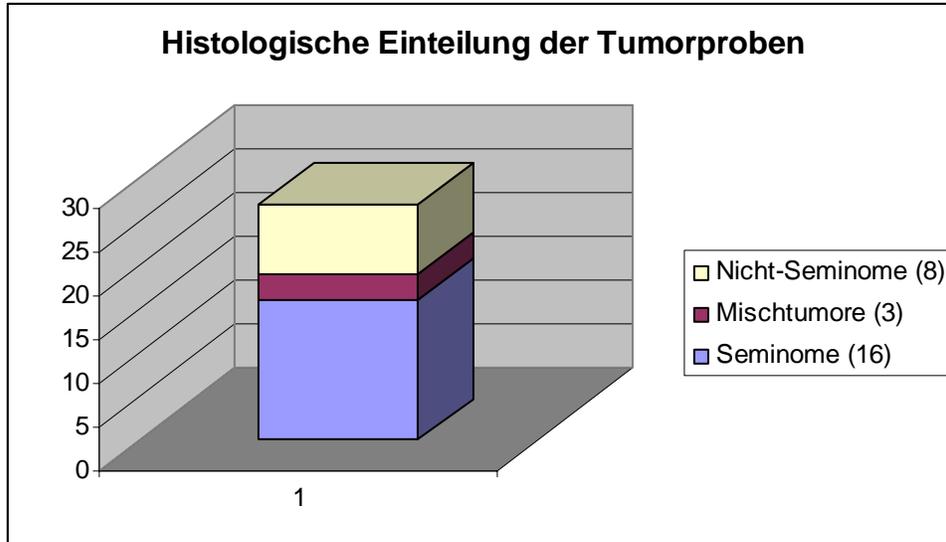


Abb.9

Die pathologisch-histologische Begutachtung der 27 Hodentumorproben ergab 16 Seminome, 3 Mischtumore und 8 Nicht-Seminome.

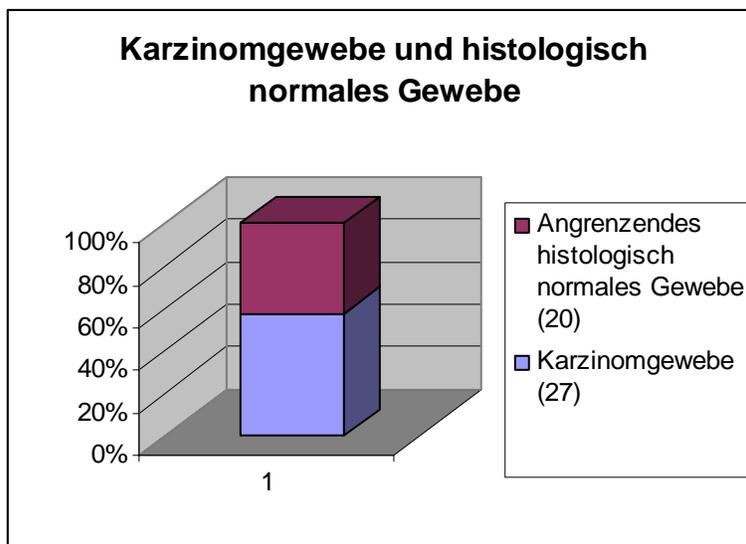


Abb.10

Von 20 der insgesamt 27 Tumorproben stand für die RNA-Extraktion auch normales Gewebe zur Verfügung, die restlichen Proben enthielten ausschließlich Tumorgewebe.

3.1.2 Mikrodissektion und Extraktion der Total-RNA

Um aus einem Kryostatschnitt Zellen und Zellverbände entnehmen zu können, wurde das Verfahren der Mikrodissektion angewendet. Unter mikroskopischer Kontrolle (25 fache Vergrößerung) wurden Tumorzellen und histologisch normale Zellen getrennt voneinander entnommen und einer Total-RNA Extraktion unter Verwendung der Trizol-Methode unterzogen. Die Qualität der RNA wurde photometrisch überprüft. Hier ergab sich ein durchschnittliches Absorptionsverhältnis von 1.85 bei 260/280 nm, wobei der optimale Wert zwischen 1.8 und 2.0 liegt. Dieses Ergebnis lässt auf eine saubere RNA-Extraktion ohne Verunreinigung durch Fremdeiweiß (DNA) schließen.

3.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Im Folgenden werden die Expressionsmuster folgender Gene in Keimzell-tumoren und angrenzendem histologisch normalem Gewebe vorgestellt.

- HR-GAPDH, - SOX5, - JAW1, - K-Ras

3.2.1 Expression von HR-GAPDH

Die RT-PCR mit HR-GAPDH erlaubt den sicheren Nachweis von c-DNA. Auf diese Weise kann so indirekt der Nachweis geführt werden, dass die vorausgegangene reverse Transskription der ursprünglich isolierten RNA zu cDNA fehlerfrei erfolgt ist.

Ergebnisse

Alle vorhandenen Proben wurden einer RT-PCR mit HR-GAPDH unterzogen. In der anschließenden Gelelektrophorese konnte das gewünschte PCR-Produkt bei **100%** der tumortragenden sowie bei **100%** der histologisch normalen Zellen eindeutig identifiziert werden.

Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 18 Proben	100%	
Normalgewebe 12 Proben	100%	

Nicht-Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 9 Proben	100%	
Normalgewebe 8 Proben	100%	

Tab.5

Prozentuale Expression von HR-GAPDH

Ergebnisse

Ergebnisse HR-GAPDH (234 Basenpaare)

Karzinomgewebe: (27 Proben):

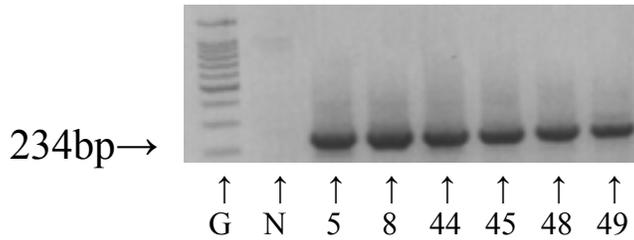


Abb.11.1

Gelelektrophorese HR-GAPDH

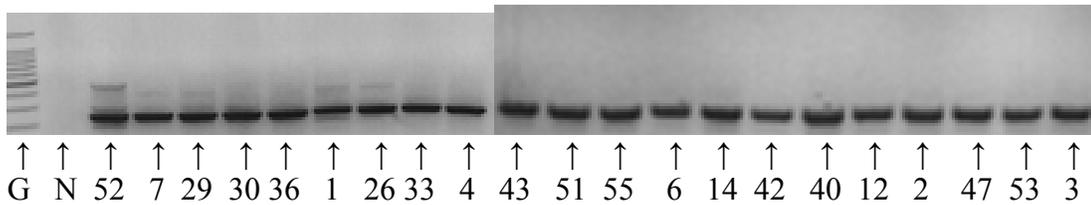


Abb.11.2

Gelelektrophorese HR-GAPDH

Angrenzendes Normalgewebe: (20 Proben):

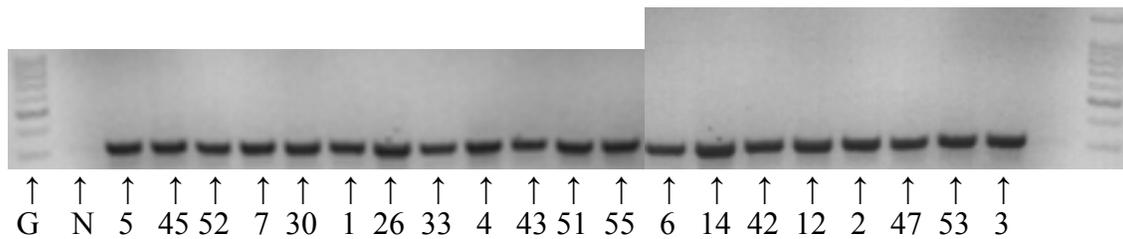


Abb.11.3

Gelelektrophorese HR-GAPDH

3.2.2 Expression von SOX5 (288 Basenpaare)

Die RT-PCR mit SOX5 mit cDNA aus Hodentumorzellen ergab in **27/27** ein positives Ergebnis, das erwartete PCR-Produkt (288Basenpaare) konnte in der Gelelektrophorese zweifelsfrei dokumentiert werden. Die RT-PCR mit SOX5 mit cDNA aus histologisch normalen Zellen zeigte in **19/20** ein eindeutig positives Ergebnis, in einer Probe war die Expression nur in Spuren nachweisbar. Da es Ziel dieser Arbeit war, die aktive Expression von SOX5 zu untersuchen, die eine DNA-freie RNA-Isolierung voraussetzt, war es von großer Bedeutung, eine Verunreinigung der Proben durch genomische DNA auszuschließen (vergl.2.2.7). Zusätzlich wurde ein Primer eingesetzt, der Intron-überspannend war, daher kann eine Amplifikation von genomischer DNA, die eventuell zu einem falsch positiven Ergebnis hätte führen können, mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 18 Proben	100%	
Normalgewebe 12 Proben	100%	

Nicht-Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 9 Proben	100%	
Normalgewebe 8 Proben	100%	

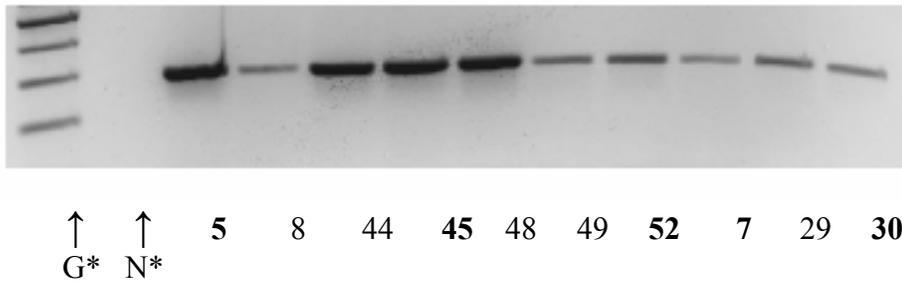
Tab.6
Expression von SOX5

Ergebnisse

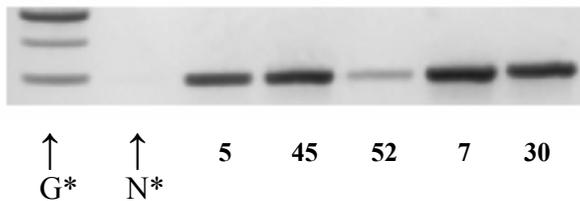
SOX5 (288 Basenpaare)

Karzinomgewebe

Ergebnisse:



Angrenzendes Normalgewebe



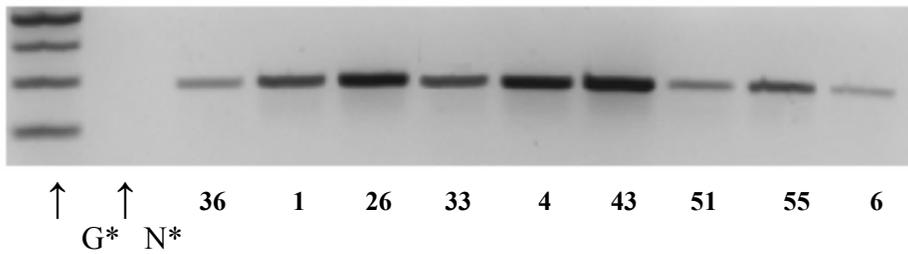
Proben Nr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.Marker	Pat.Alter
5	Ia	pT1 N0 M0	Seminom	LDH 897 U/l	32
8	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 5U/l	40
44	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	32
45	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 2U/l LDH 245U/l	35
48	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 3U/l LDH 157 U/l	31
49	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 4U/l betaHcg 2.8 LDH 131 U/l	38
52	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 6 U/l	34
7	I	pT1 N1 M0	Seminom	normal	46
29	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 1U/l LDH 125 U/l	28
30	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	35

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

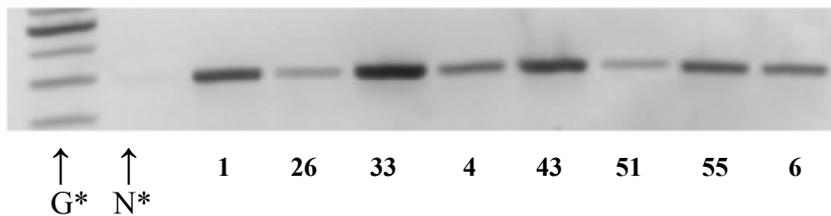
Ergebnisse

SOX5 (288 Basenpaare)

Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



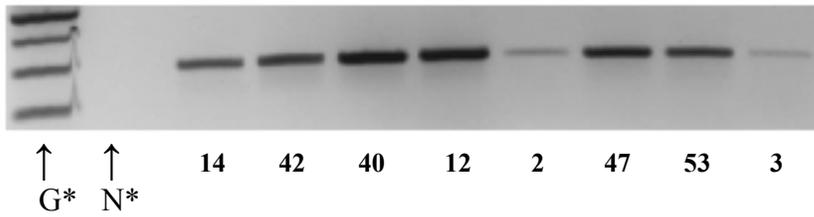
Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
36	I	pT2 N0M0	Seminom	AFP 4 U/l	50
1	I	pT2 N0M0	Spermatocytisches Seminom	LDH 251 U/l	40
26	Ib	pT3 N0M0	Seminom	AFP 2 U/l b- Hcg 24	32
33	I	pT3 N0M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg <1 LDH160U/l	42
4	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg 11	38
43	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 3 U/l b- Hcg ,1 LDH 229 U/l	21
51	IIc	pT1 N1 Mx	Seminom	LDH 937 U/l	44
55	IIb	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 4U/l b- Hcg <1	24
6	IIb	pT3 N1 M0	Seminom	AFP 7 U/l LDH 129U/l	37

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

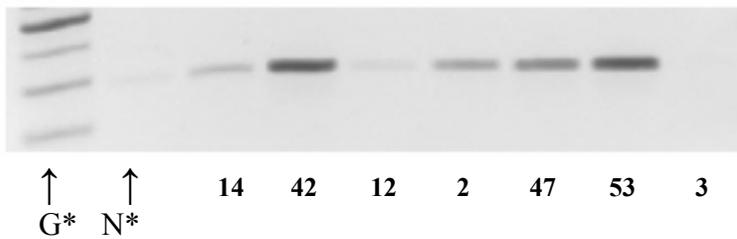
Ergebnisse

SOX5 (288 Basenpaare)

Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
14	I	pT2N0 M0	Yolk-Sac Tumor	AFP 295 U/l b-Hcg 5430	48
42	I	pT2N0 M0	Teratom reif und unreifes Terratocarcinom	AFP 36U/l LDH 185 U/l	54
40	IIIb	pTx Nx M1	unreifes Terratom	121U/l b-Hcg>150000	19
12	IIIb	pT4a Nx M1	Dottersack, unreifes Terratom	AFP 5540U/l b-Hcg 9U/l LDH 543 U/l	34
2	IIc	pT2N1	TIN Terratocarcinom	AFP 1200 U/l b-Hcg 9210 U/l LDH 465U/l	24
47	IIa	pT1 N1 M0	Embryonales Carcinom	AFP 7 U/l b-Hcg 241	22
53	IIa	pT3 N1 Mo	Embryonales Carcinom	(Keine Angaben zu Tm.)	25
3	III	pT3 Nx M1	Embryonales Carcinom	AFP 112U/l b-Hcg 3670 LDH 871 U/l	

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

3.2.3 Expression von JAW1

Die RT-PCR von JAW1 aus Hodentumorzellen ergab in **19** von **27** Fällen eine positive Expression, das erwartete PCR-Produkt von 488 Basenpaaren konnte in der Gelelektrophorese eindeutig dargestellt werden. Die RT-PCR mit histologisch normalen Zellen zeigte in **12** von **20** Proben ein positives Ergebnis, das erwartete PCR-Produkt von 488 Basenpaaren konnte eindeutig identifiziert werden. Ziel der Arbeit war der Nachweis der aktiven Expression von JAW1, dies setzte eine DNA freie RNA-Isolierung voraus (vergl.2.2.7). Der eingesetzte Primer war Intron-überspannend, was eine Amplifikation von genomischer DNA, die zu einem möglicherweise falsch positiven Ergebnis hätte führen können, ausschließt.

JAW1 (488 bp)

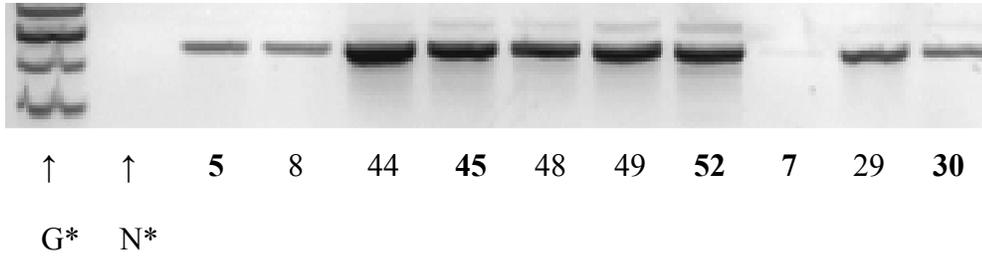
Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 18 Proben	83.%	17.%
Normalgewebe 12 Proben	58.%	42%

Nicht-Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 9 Proben	44%	56%
Normalgewebe 8 Proben	62%	38%

Tab.7
Expression von JAW1

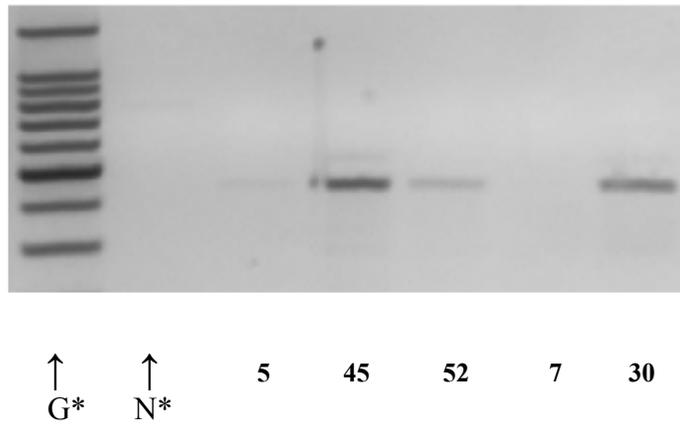
Ergebnisse

JAW1 (488 Basenpaare)
Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe:

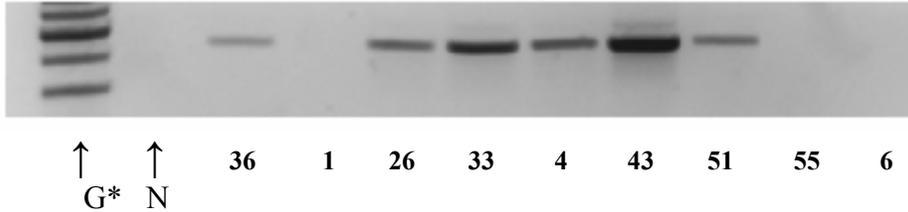
G* = Größenmarker,
N* = Negativkontrolle



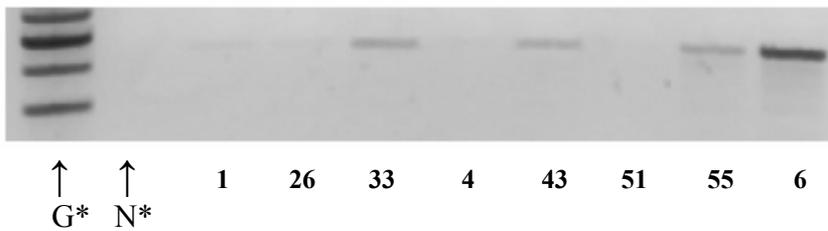
Proben Nr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.Marker	Pat.Alter
5	Ia	pT1 N0 M0	Seminom	LDH 897 U/l	32
8	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 5U/l	40
44	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	32
45	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 2U/l LDH 245U/l	35
48	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 3U/l LDH 157 U/l	31
49	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 4U/l betaHcg 2.8 LDH 131 U/l	38
52	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 6 U/l	34
7	I	pT1 N1 M0	Seminom	normal	46
29	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 1U/l LDH 125 U/l	28
30	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	35

Ergebnisse

JAW1 (488 Basenpaare)
Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe

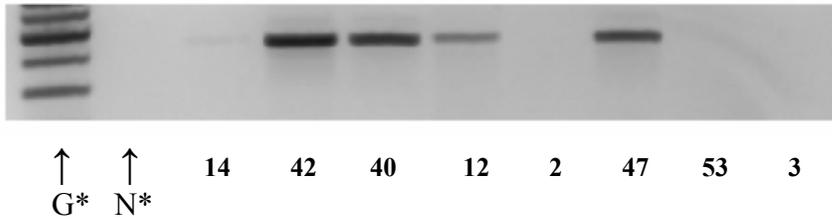


Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
36	I	pT2 N0M0	Seminom	AFP 4 U/l	50
1	I	pT2 N0M0	Spermatocytisches Seminom	LDH 251 U/l	40
26	Ib	pT3 N0M0	Seminom	AFP 2 U/l b- Hcg 24	32
33	I	pT3 N0M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg <1 LDH160U/l	42
4	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg 11	38
43	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 3 U/l b- Hcg ,1 LDH 229 U/l	21
51	IIc	pT1 N1 Mx	Seminom	LDH 937 U/l	44
55	IIb	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 4U/l b-Hcg <1	24
6	IIb	pT3 N1 M0	Seminom	AFP 7 U/l LDH 129U/l	37

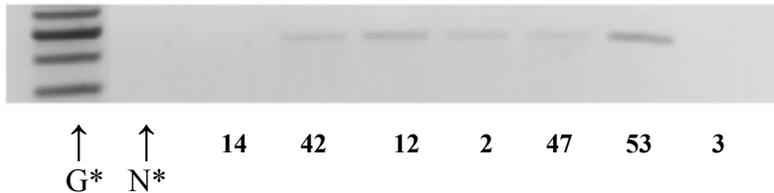
*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

Ergebnisse

JAW1 (488 Basenpaare)
Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
14	I	pT2N0 M0	Yolk-Sac Tumor	AFP 295 U/l b-Hcg 5430	48
42	I	pT2N0 M0	Teratom reif und unreifes Terratocarcinom	AFP 36U/l LDH 185 U/l	54
40	IIIb	pTx Nx M1	unreifes Terratom	121U/l b-Hcg >150000	19
12	IIIb	pT4a Nx M1	Dottersack, unreifes Terratom	AFP 5540U/l b-Hcg 9U/l LDH 543 U/l	34
2	IIc	pT2N1	TIN Terratocarcinom	AFP 1200 U/l b-Hcg 9210 U/l LDH 465U/l	24
47	IIa	pT1 N1 M0	Embryonales Carcinom	AFP 7 U/l b-Hcg 241	22
53	IIa	pT3 N1 Mo	Embryonales Carcinom	(Keine Angaben zu Tm.)	25
3	III	pT3 Nx M1	Embryonales Carcinom	AFP 112U/l b-Hcg 3670 LDH 871 U/l	

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

3.2.4 Expression von K-ras

Die RT-PCR von K-ras mit cDNA aus Hodentumorzellen ergab in **27/27** ein positives Ergebnis, das erwartete PCR-Produkt (234 Basenpaare) konnte in der Gelelektrophorese zweifelsfrei dokumentiert werden. Die RT-PCR mit K-ras mit cDNA aus histologisch normalen Zellen zeigte in **20/20** ein eindeutig positives Ergebnis. Da es Ziel dieser Arbeit war, die aktive Expression von K-ras zu untersuchen, die eine DNA freie RNA-Isolierung voraussetzt, war es von großer Bedeutung eine Verunreinigung der Proben durch genomische DNA auszuschließen (vergl.2.2.7). Zusätzlich wurde ein Primer eingesetzt, der Intron-überspannend war, daher kann eine Amplifikation von genomischer DNA, die eventuell zu einem falsch positiven Ergebnis hätte führen können, mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 18 Proben	100%	
Normalgewebe 12 Proben	100%	

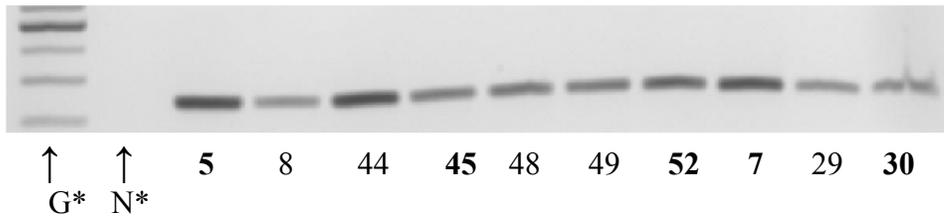
Nicht-Seminom	Positive Expression	Keine Expression
Karzinomgewebe 9 Proben	100%	
Normalgewebe 8 Proben	100%	

Tab.8
Expression von K-ras

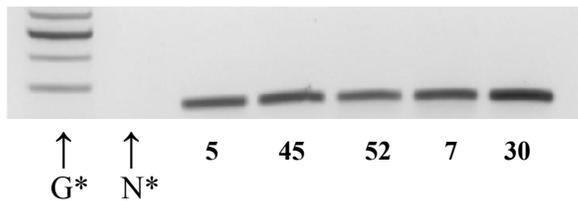
Ergebnisse

K-ras / Ergebnisse (234 Basenpaare)

Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



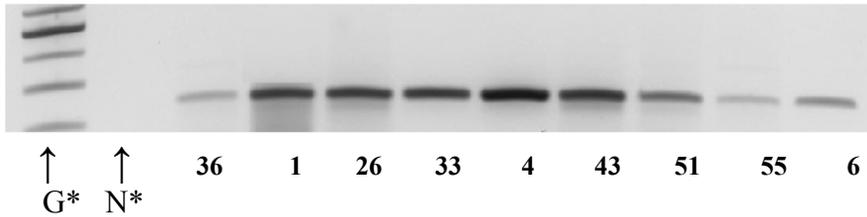
Proben Nr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.Marker	Pat.Alter
5	Ia	pT1 N0 M0	Seminom	LDH 897 U/l	32
8	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 5U/l	40
44	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	32
45	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 2U/l LDH 245U/l	35
48	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 3U/l LDH 157 U/l	31
49	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 4U/l betaHcg 2.8 LDH 131 U/l	38
52	I	pT1 N0 M0	Seminom, TIN	AFP 6 U/l	34
7	I	pT1 N1 M0	Seminom	normal	46
29	I	pT1 N0 M0	Seminom	AFP 1U/l LDH 125 U/l	28
30	I	pT1 N0 M0	Seminom	normal	35

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

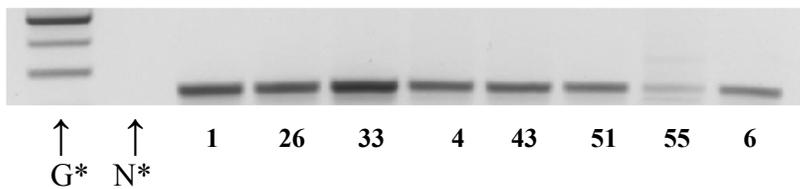
Ergebnisse

K-ras / Ergebnisse (234 Basenpaare)

Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



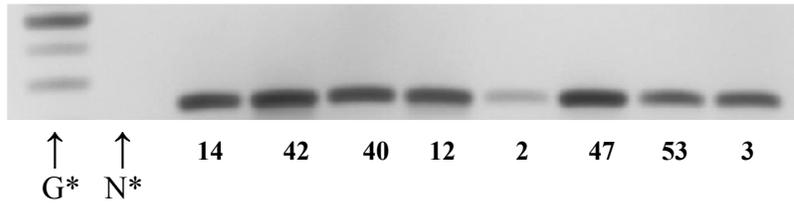
Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
36	I	pT2 N0M0	Seminom	AFP 4 U/l	50
1	I	pT2 N0M0	Spermatocytisches Seminom	LDH 251 U/l	40
26	Ib	pT3 N0M0	Seminom	AFP 2 U/l b- Hcg 24	32
33	I	pT3 N0M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg <1 LDH160U/l	42
4	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 5 U/l b- Hcg 11	38
43	IIa	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 3 U/l b- Hcg ,1 LDH 229 U/l	21
51	IIc	pT1 N1 Mx	Seminom	LDH 937 U/l	44
55	IIIb	pT1 N1 M0	Seminom	AFP 4U/l b-Hcg <1	24
6	IIb	pT3 N1 M0	Seminom	AFP 7 U/l LDH 129U/l	37

*G = Größenmarker, *N = Negativkontrolle

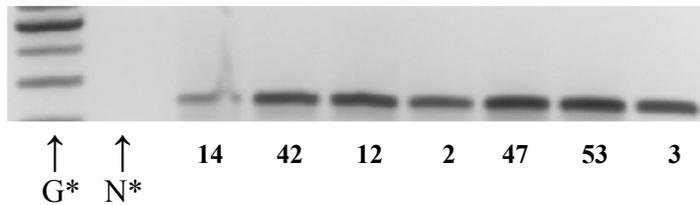
Ergebnisse

Kras / Ergebnisse (234 Basenpaare)

Karzinomgewebe



Angrenzendes Normalgewebe



Probennr.	Stadium	TNM	Histologie	Tu.marker	Pat.alter
14	I	pT2N0 M0	Yolk-Sac Tumor	AFP 295 U/l b-Hcg 5430	48
42	I	pT2N0 M0	Teratom reif und unreifes Terratocarcinom	AFP 36U/l LDH 185 U/l	54
40	IIIb	pTx Nx M1	unreifes Terratom	121U/l b-Hcg >150000	19
12	IIIb	pT4a Nx M1	Dottersack, unreifes Terratom	AFP 5540U/l b-Hcg 9U/l LDH 543 U/l	34
2	IIc	pT2N1	TIN Terratocarcinom	AFP 1200 U/l b-Hcg 9210 U/l LDH 465U/l	24
47	IIa	pT1 N1 M0	Embryonales Carcinom	AFP 7 U/l b-Hcg 241	22
53	IIa	pT3 N1 Mo	Embryonales Carcinom	(Keine Angaben zu Tm.)	25
3	III	pT3 Nx M1	Embryonales Carcinom	AFP 112U/l b-Hcg 3670 LDH 871 U/l	

4 Diskussion

4.1 Bewertung des Expressionsmusters von SOX5

Das an das Y-Chromosom gekoppelte hodendeterminierende Gen SRY kodiert für ein Protein, das die sog. HMG-Box als DNA-bindendes Motiv beinhaltet. (Takamatzu et al.; 1995) Eine große Anzahl von Genen weist eine hohe Sequenzhomologie mit der SRY HMG-Box auf und wird in der Gruppe der SRY-related HMG-Box (SOX) zusammengefasst. SOX5 wurde als Mitglied der SOX-Gruppe in adulten Geweben wie Hoden, Herz, Leber, Lunge und Niere identifiziert.(Wunderle et al.; 1996) Die Funktion von SOX5 ist im Wesentlichen noch unklar. Jüngste Untersuchungen legen nahe, dass SOX5 als Transkriptionsfaktor für die hodenspezifische hormonsensitive Lipase dienen könnte und somit eine wichtige Rolle in der Regulation der Spermatogenese einnimmt.(Blaise et al.; 1999)

Untersuchungen bezüglich der Expression von SOX5 in testikulären Keimzelltumoren wurden bislang nur in sehr geringer Anzahl vorgenommen. Mostert et al (1998) zeigten mit semiquantitativer RT-PCR eine SOX5 Expression in 5 von 6 Keimzelltumoren.

Meine Analysen decken sich mit diesen Ergebnissen. In einem großen Kollektiv von 27 Keimzelltumoren wiesen 100% der untersuchten Proben eine positive Expression von SOX5 auf. SOX5 konnte in 100% der Seminome und in 100% der Nichtseminome, sowie in sämtlichen Proben des die Tumore umgebenden histologisch normalen Gewebes eindeutig dargestellt werden.

Schlussfolgerung:

100% der auf eine aktive Expression von SOX5 untersuchten Keimzell-tumore weisen ein positives Ergebnis auf. Obwohl sich die hohe Expression sowohl in den TIN tragenden Gewebeprobe, als auch in den invasiven Entwicklungsstufen der Keimzelltumore darstellen ließ, scheint dem SOX5 keine Bedeutung für die Pathogenese zuzukommen nachdem die semiquantitative RT-PCR eine gleiche Expressionsintensität auch im testikulären Normalgewebe nachweisen konnte. Diese Daten gehen konform mit den Aussagen von Danny et al (2001), die eine generelle SOX5 Expression in postmeiotischen Keimzellen publizierten, insbesondere in runden Spermatiden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass SOX5 nicht als verantwortliches Gen in die Pathogenese der Keimzelltumoren involviert ist.

4.2 Bewertung des Expressionsmusters von JAW1

JAW1 ist ein ausschließlich von Lymphocyten exprimiertes Protein, (Behrends et al.; 1994) und hat einen Carboxy-terminalen Membranständigen Anker mit einem 36 Aminosäuren zählenden, ins Lumen ragenden Ende. Expression der JAW1 messenger RNA und des JAW1 Proteins sind jeweils in B- und T-Zelllinien vorhanden. Die mit Abstand ausgeprägteste Expression wurde jedoch in prämaternen B- und T- Lymphocyten sowie in ausgereiften B-Lymphocyten nachgewiesen. Diverse Untersuchungen weisen darauf hin, dass JAW1 nur im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird. Yakirevich et al wiesen mit immunhistologischen Untersuchungen in Tumorzellnestern und im umgebenden Tumorstroma zwei Subtypen von zytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs) nach. Der Mechanismus der CTL Aktivierung in testikulären Seminomen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Aktivierung und Proliferation der Lymphocyten könnte nach Präsentation von Tumorspezifischem Antigen durch professionelle Anti-genpräsentierende Zellen (APC) oder durch die Tumorzellen selbst erfolgen. Die Migration der Antigen-Rezeptoren von B- und T-Lymphocyten aus dem Endoplasmatischen Retikulum ist auch abhängig vom jeweiligen Ent-wicklungstadium der Zellen. In reifen B-Zellen befindet sich die μ m-Kette auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz hierzu wird sie in den B-Plasmazellen im ER festgehalten.(Sitia et al.; 1987). Der T-Zellrezeptor-(TCR) ist im ER von doppelt positiven (CD4+, CD8+) Thymocyten lokalisiert, wohingegen er in reifen T-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. (Nakayama et al.;1990, Bonifacio et al.; 1990). Die molekularen Mechanismen, die diesen Veränderungen im

intrazellulären Austausch unterliegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt, aber die korrekte Zusammensetzung der Untereinheiten der B- und T-Zellrezeptoren wird vom Endoplasmatischen Reticulum überwacht. Falsch zusammengefügte Rezeptoren werden vom ER einbehalten und dort abgebaut. (Klausner et al.; 1990). Über das Expressionsmuster von JAW 1 in Keimzelltumoren liegt zur Zeit nur eine Publikation mit einem sehr kleinen Kollektiv von 5 Tumoren vor (Mostert et al.; 1998). In dieser Arbeit konnte **erstmal**s eine hohe Expressionsrate von **83%** bei Seminomen dargestellt werden. Die Nichtseminome wiesen eine Expressionsrate von **44%** auf. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich nicht um Tumorspezifische Expressionscharakteristika sondern vielmehr um das Ergebnis einer Kontamination durch tumorinfiltrierende Lymphozyten handelt. Yakirevich et al zeigten 2002 durch immunhistochemische Untersuchungen an Seminomen und Nicht-Seminomen, dass die Anzahl der zytotoxischen tumor-infiltrierenden Lymphozyten und die Anzahl der zytotoxisch aktiven T-Zellen bei den Seminomen signifikant höher ist als bei den Nicht-Seminomen. Desweiteren wurde von der gleichen Arbeitsgruppe eine große Anzahl aktivierter Lymphozyten mittels Tunelassay in dichtem Kontakt mit apoptotischen Tumorzellen gefunden. Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse stehen im Einklang mit dem geführten Nachweis der seminomspezifischen Expression von Hodentumorantigen (CTA) mit konsekutiver Attraktion von T-Lymphozyten, (Yuasa et al.; 2001) während Nichtseminome praktisch keine positive Expression der CTA aufwiesen.

Der Nachweis von aktivierten zytotoxischen Lymphozyten in testikulären Seminomen könnte eine der Ursachen für die gute klinische Prognose von Seminomen gegenüber Nichtseminomen erklären.

Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung legt den Schluss nahe, daß die JAW 1 Expression eher eine untergeordnete Bedeutung für die Pathogenese der Keimzelltumoren darstellt. Zukünftige Untersuchungen mit immunhistologischen Methoden müssen zeigen, ob JAW 1 als Prognosemarker für Seminome einsetzbar ist.

4.3 Bewertung des Expressionsmusters von K-ras

Die spezifischen Gene der ras Familie (H-, N- und K-ras) kodieren für drei ähnliche Proteine (p21), die auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und in die Signaltransduktion involviert sind. Interessanterweise werden alle 3 Proto-Onkogene durch Punktmutationen in den gleichen Regionen – Codons 12, 13 und 16 – in Onkogene transformiert und bewirken eine Potenzierung der p21 Signal-Transduktionskapazität, die über ein autonomes Wachstum in einer unkontrollierten Proliferationsaktivität mündet. Nachdem K-ras auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert ist und Genamplifikationen in Metastasen embryonaler Karzinome dargestellt wurden, haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob Punktmutationen in die Pathogenese der Keimzelltumoren involviert sein könnten. Während Mulder et al. (1998) sowie Ganguly et al. (1990) eine Mutationsfrequenz von 40% bis 60% der analysierten KZT beschreiben, konnten Moul et al. (1992) Mutationen in lediglich 9% der Hodentumoren darstellen; in testikulären Zelllinien fehlen die Mutationen gar völlig. Keine der Studien kann eine Korrelation der K-ras Mutationen mit dem klinischen Stadium oder Verlauf der Erkrankung herstellen.

Nachdem sowohl Mutationen als auch Amplifikationen des K-ras durch erhöhte Kopieanzahl des Wildtyp Allels zu einer malignen Transformation beitragen können, haben sich weitere Arbeitsgruppen mit der potentiellen Bedeutung des K-ras bei testikulären KZT befasst. Roelofs et al.(2000) konnten darstellen, dass ein auch K-ras kodierender Sequenzabschnitt auf 12p in den lokal invasiven Keimzelltumoren, nicht aber in den assoziierten TIN – Zellen nachweisbar ist. Die Autoren leiten hieraus ab, dass die

Überexpression von K-ras in die lokale Progression der TIN involviert ist und schreiben K-ras eine pathogenetische Bedeutung für die Entwicklung testikulären KZT zu. Allerdings ist einschränkend zu bemerken, dass diese Veränderungen nur bei 8% aller KZT zu beobachten waren. Im Rahmen meiner Untersuchungen komme ich zu konträren Schlussfolgerungen, da mittels semiquantitativer RT-PCR kein Expressionsunterschied zwischen testikulärem Normalgewebe, TIN und invasiven KZT bezüglich der K-ras Expression zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten früherer Studien, die mittels Northern-Blot Analyse eine positive K-ras Expression nicht nur in allen histologischen Subtypen der KZT, sondern auch in dem testikulären Normalgewebe nachweisen konnten.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund meiner Resultate und der Befunde in der Literatur schlussfolgern, dass **K-ras** keine signifikante Bedeutung für die Pathogenese und die Progression testikulärer KZT besitzt.

5 Literaturverzeichnis

Atkin NB, Baker MC,
Specific Chromosome Change, i(12p) in testicular tumours?
Lancet (1982) **2** 1349

Behrens, T.W. Jagadeesh, J. Scherle, P. Kearns, G.M. Yewdell, J.W.
Jaw 1, a lymphoid restricted protein, localized at the endoplasmatic
reticulum.
J. Immunol. (1994) **153** 682-690

Blaise R, Grobert J, Rouett P, et al.
Testis expression of hormone sensitive Lipase is conferred by a specific
promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins.
Chem (1999) **274** 9327

Bonifacino, J.S., S.A. McCarthy, J.E. Maguire, T. Nakayama, D.S. Singer,
R.D. Klausner, and A. Singer.
Novel post-translational regulation of TCR expression in CD4+ CD8+
Thymocytes influenced by CD4.
Nature (1990) **344** 247

Czene K. Lichtenstein P.
Enviromental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals
in the Swedish Family-Cancer-Database.
Int. J Cancer (2002) **99** 260-266

De Meytes, ER, Giwerzman, A, Skakkebaek, NE.
Carcinoma in situ of the testis- a precursor of testicular germ cell cancer:
biological and clinical aspects.
In: Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, Vogelzang, NJ,
Scardino, PT, Shipley, WU, Coffey, DS (Eds), Lippincott,
(2000), Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 900.

Denny P, Swift S, Connor F, et al.

An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein.

EMBO J (1992) **11** 3705

Dieckmann, KP, Skakkebaek, NE.

Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features.

Int J Cancer (1999) **83** 815.

Ganguly S, Murty VS, Samaniengo F, et al.

Detection of preferential n-ras mutations in human male germ cell tumors by polymerase chain reaction.

Genes Chromosomes Cancer (1990) **1** 228

Geurts van Kessel A. Van Drunen E. De Jong B.

Chromosome 12p heterozygosity is retained in i(12p)-positive testicular germ cell tumor cells.

Cancer Genetics and Cytogenetics (1989) **40** 129-134

Groettrup, M., A. Baron, G., G. Griffiths, R. Palacios, and H. von Boehmer.
T cell receptor (TCR) β -chain homodimers on the surface of immature but not mature alpha, gamma, tetra-chain-deficient T cell lines.

EMBO J (1992) **11** 2735

Heidenreich A.

Molekulare Veränderungen bei Hodentumoren.

Klinische Onkologie 2000/01

Heidenreich, A.

Molekulare Phänomene testikulärer Keimzelltumoren, neue Erkenntnisse in Pathogenese und Prognose.

Wissenschaftliche Arbeit eingereicht zum 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie.

International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG).

The International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor based staging system for metastatic germ cell cancer.

J Clin Oncol (1997) **15** 594–603

- Jacobsen, GK, Henriksen, OB, der Masse, HV.
Carcinoma in situ of testicular tissue adjacent to malignant germ-cell tumors: a study of 105 cases.
Cancer (1981) **47** 2660
- Jemal, A Murray, T, Samuels, A et al.
Cancer statistics CA Cancer.
J Clin (2003) **53** 5
- Jorgensen, N, Rajpert-De Meyts, E, Graem, N, et al.
Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells.
Lab Invest (1995) **72** 223.
- Klausner, R.D. ,and R.Sitia.
Protein degradation in the endoplasmatic reticulum.
Cell (1990) **62** 611
- Korn MW, Olde Weghuis DEM, Suijkerbuijk RF.
Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization.
Genes Chromosomes Cancer (1996) **17** 78-87
- Kutay, U., Hartmann, E. and Rapoport, T.A.
A class of membrane proteins with a c-terminal anchor.
Trends Cell Biology (1993) **3** 72-75
- Leendert H,.J.Loojenga, Oosterhuis W.
Pathogenesis of testicular germ cell tumors.
Reviews of Reproduction (1999) **4** 90-100
- Mead GM. International consensus prognostic classification for metastatic germ cell tumours treated with platinum based chemotherapy: Final report of the International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG).
Clin Oncol (1995) **14** 235

Mostert MC, Verkerk AJMH, van de Pol M, et al.
Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults.
Oncogene (1998) **16** 2617

Moul JW, Theune SM, Chang EH et al.
Detection of ras mutations in archival testicular germ cell tumors by polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization.
Genes Chromosomes Cancer (1992) **5** 109

Mulder MP, Keijzer W, Verkerk A et al.
Activated ras genes in human seminoma : evidence for tumor heterogeneity.
Oncogene (1989) **4** 1345

Muller, J, Skakkebaek, NE.
Testicular carcinoma in situ in children with the androgen insensitivity (testicular feminisation) syndrome.
Br Med J (Clin Res Ed) (1984) **288** 1419.

Nakayama, T., C.H. June, T.I. Munitz, M. Sheard, S.A. McCarthy S.O. Sharrow, L.E. Samelson, and A.Singer.
Inhibition of T cell receptor expression and function in immature CD4+ CD8+ cells by CD4.
Science (1990) **249** 1558

Petersen, PM, Giwercman, A, Skakkebaek, NE, Rorth, M.
Gonadal function in men with testicular cancer.
Oncol (1998) **25** 224.

Rajpert-De Meyts, E, Skakkebaek, NE.
Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours.
Int J Androl (1994) **17** 85.

Rodruigez E, Houldsworth J. Molecular.
Cytogenetic analysis of i(12p) negative human male germ cell tumors.
Genes Chromosomes Cancer (1993) **8** 230-236

Roelofs H., Mostert M., Pompe K.
Restricted 12p amplification and ras mutation in human germ cell tumors of the adult testis.

Am Journ Patho (2000) **157** 1155-66

Skakkebaek, NE, Berethelsen, JG, Giwercman, A, Muller, J.
Carcinoma in situ: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumors except spermatocytoma.

Int J Androl (1987) **10** 19

Sitia, R., Neuberger, Milstein, C.
Regulation of membrane IgM expression in secretory B cells: translational and posttranslational events.

EMBO J. (1987) **6** 3969

Strohmeyer, T.,
Molecular biologic investigations of proto-oncogenes and growth factors in human testicular germ cell tumors.

World J. Urol. (1994) **12** 7478

Takamatsu N, et al .
A Gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine-zipper containing protein.

Mol Cell Biol (1995) **15** 3759

Van Echten-Ahrends J, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ
No recurrent structural abnormalities in germ cell tumors of the adult testis apart from i(12p).

Genes Chromosomes Cancer (1995)**14** 133-144

Vos A, Oosterhuis JW, De Jong B.
Cytogenetics of carcinoma in situ of the testis.

Cancer Genetics Cytogenetics (1990) **46** 75-81

Wunderle VM, Critcher R, Ashworth et al.
Cloning and characterization of SOX5 a new member of the human SOX gene family.

Genomics (1996) **36** 354

Yakirevch E, Lefel O, Sova Y, et al.

Activated status of tumor-infiltrating lymphocytes and apoptosis in testicular seminoma.

J Pathol (2002) **196** 67

Yuasa T, Okamoto K, Kawakami T et al.

Expression patterns of cancer testis antigens in testicular germ cell tumors and adjacent testicular tissue.

J Urol (2001) **165** 17

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Hochschuldozenten der Philipps Universität Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bayer, Behr, Bertalanffy, Bien, Cetin, Daut, Feusser, Fruhstorf, Gemsa, Geuss, Görg, Gotthardt, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Herzum, Hesse, Hoeffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kaiser, Kann, Kern, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lennartz, Leppek, Lippert, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schulz, Schulze, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Sommer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Walters, Weihe, Werner und Zielke.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Bedeutung molekularer Alterationen kritischer Regionen auf Chromosom 12p für die Differenzierung testikulärer Keimzelltumoren

in der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Axel Heidenreich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bremen, den 12.4.07

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Axel Heidenreich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Betreuung und die motivierenden Gespräche. Durch die Arbeit habe ich mir moderne Verfahren der Molekularbiologie erarbeiten können, auch dafür möchte ich mich bedanken.

Herrn PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad danke ich besonders für die Beratung und Hilfe bei allen komplizierten molekularbiologischen Fragen, mit seinem fachkundigen Rat konnten Probleme stets aus dem Weg geräumt werden.

Für die Bewertung der histologischen Schnitte danke ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Barth.

Carsten Ohlmann danke ich für die Basisausbildung in der PCR, sowie meinem Kollegen im Labor Thomas Buntenbroich.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Tante Dipl. Biol. Birgit Jaspert, die mir mit ihrer Erfahrung und großen Sachkenntnis in wichtigen Belangen auf die Sprünge half.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Karin und Prof. Dr. rer. nat. Heinz-Otto Peitgen und meiner Schwester Elena, die mit mir in allen Lebenslagen durch dick und dünn gegangen ist.