

Immunhistochemische Untersuchungen zur Biologie des
AKT- Signalwegs bei nichtseminomatösen Hodentumoren

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Springer, Christine

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. J. Bedke

2.Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp

*Die Hoffnung ist der Regenbogen
Über den herabstürzenden Bach des Lebens
(Friedrich Nietzsche)*

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese von Hodentumoren	10
1.2 Hodentumoren	11
1.2.1 Klassifikation der Hodentumoren.....	11
1.2.2 TNM-System (UICC 201.....	12
1.2.3 IGCCCG- Klassifikation.....	13
1.2.4 Histopathologische Klassifikationssystem.....	15
1.2.5 extratestikuläre Keimzelltumoren.....	16
1.2.6 Klinik und Diagnostik von Hodentumoren.....	17
1.2.7 Therapie der Hodentumoren.....	18
1.2.7.1 Therapie des Primärtumors.....	18
1.2.7.2 Prognostische Faktoren.....	19
1.2.7.3 Therapie der Seminome und klinische Prognose.....	19
1.2.7.4 Therapie der Nichtseminome und klinische Prognose.....	20
1.3 Klinische und pathologische Bedeutung von Tumorsuppressorgen	22
1.3.1 Einführung.....	22
1.3.2 Schematische Darstellung des AKT Signalwegs.....	26
1.3.3 p-AKT.....	27
1.3.4 PTEN.....	28
1.3.5 p27 ^{kip1}	29
1.3.6 Fragestellung/Zielsetzung.....	30
2. Material und Methoden	31

2.1 Patienten	31
2.1.1 Rekrutierung.....	31
2.1.2 Einschlusskriterien.....	31
2.1.3 Ausschlusskriterien.....	32
2.2 Datenerhebung	32
2.2.1 Aufarbeitung der Präparate zur Befundung und immunhistochemischen Untersuchung/ Herstellung der Schnitte.....	32
2.2.2 Markierung der einzelnen Tumorentitäten auf dem Schnittpräparat.....	33
2.3 Beschreibung der verwendeten Antikörper	33
2.4 Durchführung der Immunhistochemie	35
2.4.1 Entparaffinierung.....	35
2.4.2 TBS.....	35
2.4.3 Antigendemaskierung.....	36
2.4.4 Avidin-Biotin-Block.....	36
2.4.5 Aufbringen des Primärantikörpers.....	37
2.4.6 Aufbringen des Sekundärantikörpers.....	37
2.4.7 Avidin-Biotin-Komplex Methode.....	37
2.4.8 Haematoxylin-Färbung.....	39
2.4.9 Negativ-/Positivkontrollen.....	39
2.5 Statistische Auswertung	40
3. Ergebnisse	42
3.1 Bilder der Negativ- und Positivkontrollen der immunhistochemischen Färbungen.....	42
3.2 Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem PTEN.....	43
3.3 Immunhistochemische Untersuchung des zytoplasmatischen PTEN.....	45
3.4. Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von PTEN..	48
3.5 Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem p27 ^{kip1}	49
3.6 Immunhistochemische Untersuchung von zytoplasmatischem p27 ^{kip1}	51
3.7 Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von p27 ^{kip1}	53
3.8 Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem p-AKT.....	55

3.9 Immunhistochemische Untersuchungen von zytoplasmatischem p-AKT.....	57
3.10 Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von p-AKT.....	59
3.11 Korrelate.....	64
3.12 Korrelate der Indizes für benignes Gewebe.....	64
3.13 Korrelate für Dottersacktumoren.....	65
3.14 Korrelate für Embryonalkarzinome.....	65
3.15 Korrelate für Teratome.....	66
4. Diskussion.....	68
4.1 der PKB/Akt Signalweg.....	68
4.2 PTEN.....	69
4.3 p27 ^{kip1}	73
4.4 p-AKT.....	76
4.5 Zielgerichtete Therapien.....	78
4.6 Schlussfolgerungen.....	82
5. Zusammenfassung.....	84
6. Literaturverzeichnis.....	85
7. Anhang.....	98
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	98
7.2 Tabellenverzeichnis.....	99
8. Danksagung.....	102
9. Lebenslauf.....	104
10. Erklärung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

SI- Einheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

Abkürzung	Erklärung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AFP	Alpha Fetoprotein
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUC	area under the curve
ben-Index	benigner Gewebe Index
BEP	Bleomycin Etoposid Cisplatin Kombinations-Chemotherapie
Beta-HCG	Beta-Humanchorion-Gonadotropin
°C	Grad Celsius
CHX	Chemotherapie
Cis	Carcinoma in situ
CKI	cyclinabhängiger Kinaseinhibitor
CT	Computertomographie
DAB	3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
ds-Index	Dottersacktumor-Index
EGCCCG	European Germ Cell Cancer Consensus Group
EGFR	epithelial growth factor receptor
EP	Etoposid Cisplatin Chemotherapie
ERK	extracellular signal-regulated kinase
em-Index	Emnryonalzellkarzinom-Index
Fc-Fragment	fragment crystalline-Fragment
Gy	Gray
hCG	Humanchorion-Gonadotropin
H&E	Haematoxylin und Eosin
HER 2	human epidermal growth factor receptor 2

IHC	Immunhistochemie
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Collaboration Group
ITGCNU	intratubular germ cell neoplasia of the unclassified type
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
Min.	Minute
MEK	mitogen-activated protein kinase
MMAC1	mutated in multiple advanced cancers
n	Anzahl
NSCLC	non small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OT	Objektträger
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PEI	Cisplatin Etoposid Ifosfamid Kombinations-Chemotherapie
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
PtdIns	Phosphatidylinositol
PIP 2	Phosphatidylinositoltriphosphat =PtdIns 3,4,5 triphosphate
PIP 3	Phosphatidylinositolbiphosphat =PtdIns 3,4 bisphosphate
PH	pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PVB	Cisplatin Vinblastin Bleomycin Kombinations- Chemotherapie
Rb	retinoblastoma protein
RLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
RT	Raumtemperatur
RT	Radiotherapie
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SGK 3	Serum glucocorticoid- regulated kinase 3
TBS	Trispuffer (Tris buffered saline)
ter-Index	Teratom-Index

TIN	testikuläre intraepitheliale Neoplasie
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNM	Tumor Nodus Metastase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGFR	Vascular-epithelial-growth-factor Rezeptor

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese von Hodentumoren

Hodentumoren sind eine eher seltene Tumorentität bei Männern und liegen bei der geschätzten Zahl an Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2006 mit 4.960 Krebsneuerkrankungen und einem Anteil von 2% an allen bösartigen Krebserkrankungen an 12. Stelle, weit hinter den häufigsten Tumoren bei Männern, dem Prostatakarzinom (60.120), Kolorektalkarzinom (36.300) und Lungenkarzinom (32.500), welche die ersten drei Stellen einnehmen. (Quelle: RKI-Schätzung für Deutschland 2006). Hodenkrebs ist jedoch die häufigste bösartige Erkrankung bei jungen Männern im Alter von 20 bis 34 Jahren [1]. Ein zweiter Altersgipfel für Seminome ist bei 50-60 jährigen Männern beschrieben. Die Inzidenz an Hodentumoren stieg weltweit in den letzten 30 Jahren an, mehrheitlich in den industrialisierten Ländern in Nordamerika, Europa und Asien [2,3]. In Deutschland stieg die Inzidenz in den letzten Jahren auf aktuell 9 pro 100.000 Einwohner pro Jahr an, es besteht ein Lebenserkrankungsrisiko von ca. 0,4% (Quelle: RKI-Schätzung für Deutschland 2006). Genaue Ursachen der steigenden Inzidenz sind nicht bekannt, es könnte sein, dass Umweltfaktoren, denen man lebenslang ausgesetzt ist eine Rolle spielen, da Hodenkrebs jedoch mehrheitlich in jungen Jahren auftritt, werden eher andere ätiologische Faktoren als auch schon Veränderungen in utero diskutiert [4]. Seit den 70er Jahren sank in den USA und in Westeuropa die Mortalitätsrate um rund 70%, während in Osteuropa die Mortalitätsrate seit Ende der 80er Jahre anstieg [5]. Die sinkende Mortalität hat mit der Einführung von cisplatinhaltigen Chemotherapien zur Behandlung von Hodenkrebs zu tun. Die Mortalität von Männern in Deutschland beträgt derzeit 0,3 pro 100.000 Fällen (RKI 2006), im Jahr 2000 starben 194 Männer an Hodenkrebs, im Vergleich starben 29.144 an Lungenkrebs, 13.658 an Kolorektaltumoren und 11.107 an einem Prostatakarzinom (Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

Die Ursache der malignen Keimzelltumoren ist bislang unbekannt. Als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Hodentumoren gilt der Kryptorchismus. So haben Männer deren Kryptorchismus nicht, beziehungsweise (bzw.) erst nach dem Eintritt des Schulalters behandelt wurde, ein 32fach erhöhtes Risiko an einem Hodenkarzinom zu erkranken, als Männer, bei denen eine Orchidopexie vor dem Schuleintritt durchgeführt wurde [6]. Ferner berichten einzelne Studien über eine 20fach erhöhte Inzidenz (im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung) bei infertilen Männern bzw. Männern mit abnormer Samenanalyse an einem Hodenkarzinom zu erkranken [7]. Genetische Faktoren spielen in der Tumorentstehung auch eine wichtige Rolle, so zeigt sich bei einzelnen Familienmitgliedern wie Brüdern, Vater/Sohn und Zwillingsbrüdern eine höhere Inzidenz [8]. Zu anderen eventuellen Risikofaktoren in Bezug auf Hodenkrebs, finden sich in der gegenwärtigen Literatur nicht-einheitliche bzw. widersprüchliche Aussagen. Ein niedriges Geburtsgewicht oder Frühgeburtlichkeit scheint ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Hodenkarzinome einherzugehen [9].

Auf die Pathogenese der malignen Hodentumoren soll an dieser Stelle nur kurz eingegangen werden. Es ist bekannt, dass es sich beim Carcinoma in situ (Cis) oder auch testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) genannt, um eine Vorstufe der malignen Keimzelltumoren handelt. So findet sich in nahezu jedem Hodentumor eine TIN [10]. Man weiss, dass sich nach schätzungsweise 7 Jahren 70% der TIN in einen invasiven Tumor umwandeln [11].

1.2 Hodentumoren

1.2.1 Klassifikation der Hodentumoren

So wie für die meisten malignen Erkrankungen existiert auch für die Hodentumoren eine genaue Klassifikation durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) anhand des TNM- Systems. In dieser Klassifikation wird auf die Ausbreitung/Grösse des Primärtumors, eine eventuelle Lymphknoteninfiltration und die Frage nach Fernmetastasen eingegangen [12].

Die International Germ Cell Cancer Consensus Group classification (IGCCCG) ist die derzeit gültige Klassifikation, mit der sich Patienten in 3 Prognosegruppen „gut“, „intermediär“ und „schlecht“ einteilen lassen. Hierbei erfolgt eine Einteilung in die o.g. Risikogruppen anhand der Parameter Lokalisation des Primärtumors, Höhe der Tumormarker und Ort der Metastasen [13].

1.2.2 TNM-System (UICC 2010) [12]

Tabelle 1: TNM Klassifikation bei Hodentumoren

T/pT= Primärtumor
pTX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0 Kein Anhalt für Primärtumor (z.B. histologische Narbe im Hoden)
pTis Intratubuläre Keimzellneoplasie (Carcinoma in situ)
pT1 Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden, ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion (der Tumor kann die Tunica albuginea infiltrieren, nicht aber die Tunica vaginalis)
pT2 Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden, mit Blut-/Lymphgefäßinvasion, oder Tumor mit Ausdehnung durch die Tunica albuginea mit Befall der Tunica vaginalis
pT3 Tumor infiltriert Samenstrang (mit oder ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)
pT4 Tumor infiltriert Skrotum (mit oder ohne Blut-/Lymphgefäßinvasion)
N/pN= regionale Lymphknoten (LK)
pNX regionale LK können nicht beurteilt werden
pN0 keine regionalen LK- Metastasen
pN1 Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, 2 cm oder weniger in grösster Ausdehnung, und 2 oder weniger positive Lymphknoten, keiner mehr als 2 cm in grösster Ausdehnung
pN2 Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in grösster Ausdehnung oder mehrere positive Lymphknoten, keiner mehr als 5 cm in grösster Ausdehnung
pN3 Metastasierung in Form eines Lymphknotenkonglomerats, mehr als 5 cm

in grösster Ausdehnung
M/pM= Fernmetastasen
cM0 keine Fernmetastasen
pM1 Fernmetastasen
pM1a Nicht-regionäre Lymphknoten- oder Lungenmetastasen
pM1b andere Fernmetastasen

Tabelle 2: Serum Tumormarker

S = Serum Tumormarker			
SX	Serum Tumormarker nicht vorhanden oder nicht bestimmt		
S0	Serum Tumormarker im Normbereich		
	LDH (U/l)	HCG (mIU/ml)	AFP (ng/ml)
S1	< 1,5 x N und	< 5.000 und	< 1.000
S2	1,5-10 x N oder	5.000-50.000 oder	1.000-10.000
S3	> 10 x N oder	> 50.000 oder	> 10.000

Die regionären Lymphknoten sind die im Retroperitoneum gelegenen Lymphknoten unterhalb des Nierenstiels. Die LK entlang der Vena spermatica werden ebenfalls den regionären LK zugeordnet. Alle anderen nichtregionären LK werden bei positivem Befall als Fernmetastasen verschlüsselt.

1.2.3. IGCCCG- Klassifikation [13]

Tabelle 3: Risikofaktoren entsprechend der IGCCCG- Klassifikation

Nichtseminom	Seminom	Marker	5-Jahres Überleben Seminom	5-Jahres Überleben Nichtseminom
„good prognosis“			86%	92%
- Hodentumor/	- Jede	- AFP < 1000		

retroperitonealer Tumor und - niedrige Marker und - keine nichtpulmonalen viszeralen Metastasen	Primärlokalisation und - Jeder Marker und - Keine nichtpulmonalen viszeralen Metastasen	ng/ml und - β -HCG < 1000 ng/mg (ca. 5000 IU/l) und - LDH < 1,5xNormalwert		
“intermediate prognosis”			72%	80%
- Hodentumor / retroperitonealer Tumor und - „intermediäre“ marker und - keine nichtpulmonalen viszeralen Metastasen	- jede Primärlokalisation und - jeder Marker und - nichtpulmonale viszerale Metastasen	- AFP < 1000-10.000 ng/ml oder - β -HCG < 1000- 10.000 ng/mg (ca. 5000- 50.000 IU/l) und - LDH < 1,5-10x Normalwert		
“poor prognosis”			Nicht klassifiziert	48%
-primär mediastinaler Tumor oder - Hodentumor/ retroperitonealer Tumor und - nichtpulmonale viszerale Metastasen	- nicht klassifiziert	- AFP > 10.000 ng/ml oder - β -HCG > 10.000 ng/mg (ca. 50.000 IU/l) oder - LDH > 10x Normalwert		

oder - „hohe“ Marker				
-------------------------	--	--	--	--

Aus allen Untersuchungsergebnissen zusammen wird dann das Erkrankungs-Stadium festgelegt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Erkrankungsstadien

Stadium der Erkrankung				
Stadium 0	pTis	N0	M0	S0 / SX
Stadium IA	pT1	N0	M0	S0
Stadium IB	pT2-4	N0	M0	S0
Stadium IS	Jedes pT	N0	M0	S1-3
Stadium IIA	Jedes pT	N1	M0	S0-S1
Stadium IIB	Jedes pT	N2	M0	S0-S1
Stadium IIC	Jedes pT	N3	M0	S0-S1
Stadium IIIA	Jedes pT	Jedes N	M1-1a	S0-S1
Stadium IIIB	Jedes pT	Jedes N	M0-1a	S2
Stadium IIIC	Jedes pT	Jedes N	M0-1b	S3

1.2.4 Histopathologische Klassifikationssysteme

Tabelle 5: histopathologische Klassifikationen der WHO (Mostofi) [14]

WHO (Mostofi, 1977)	Tumor-Häufigkeit	Tumor-Marker
Seminom	Ca. 40- 55%	
Klassisch (Typisch)	Davon ca. 85%	Beta-Humanchorion-Gonadotropin (Beta-HCG) pos.
anaplastisch	Davon ca. 5%	(fakult. pos.)
spermatozytär	Davon ca. 5%	Alpha-Fetoprotein (AFP) negativ.

Nichtseminomatöse Keinzelltumoren	Ca. 40-60%	
Teratom	Davon ca. 5-10%	Beta-HCG neg. AFP neg.
Teratokarzinom +/- Embryonales Karzinom + Teratom oder Teratom mit hochgradig atypischer Komponente mit maligner Transformation	Davon ca. 40%	Beta-HCG pos. AFP pos.
Embryonales Karzinom	Davon ca. 30%	Beta-HCG pos. AFP pos. (je fakultativ)
Dottersacktumor	Davon ca. 5.10%	Beta-HCG neg. AFP pos.
Chorionkarzinom- Komponente	Davon ca. 5-10%	Beta-HCG pos. AFP fakultativ (fak.) pos.
Reines Chorionkarzinom	Sehr selten	Beta-HCG pos. AFP neg.

1.2.5 Extratestikuläre Keimzelltumore [14]

Tabelle 6: Klassifikation der extratestikulären Keimzelltumoren

1. Keimstrang/Stroma-Tumoren
Differenzierte Formen
- Leydigzell-Tumor
- Sertolizell-Tumor
- Granulosazell-Tumor
gemischte Formen
inkomplette differenzierte Formen
- gonadale Stroma-Tumoren, Androblastom

2. Tumoren und tumorartige Veränderungen mit keimzell- und Keimstrang/Stroma-Elementen
- Gonadoblastom
3. Verschiedene Tumoren
- Karzinoid
4. Lymphatische und hämatopoetische Tumoren/ sekundäre Tumoren/ Tumoren der Gänge, von Rete testis, Epididymis, Samenstrang, Kapsel, Stützgewebe und Appendizes
- Adenomatoid-Tumor
- Mesotheliom
- Adenom
- Melanotische und neuro-ektodermale Tumoren
- Brenner Tumor
- Weichgewebs-Tumoren
- embryonales Rhabdomyosarkom
5. Unklassifizierte Tumoren/ Tumorartige Veränderungen
- epidermale Zyste
- unspezifische Orchitis
- Malakoplakie
- Spermgranulom
- Lipogranulom
- testikulärer Tumor bei adrenogenitalem Syndrom

1.2.6 Klinik und Diagnostik von Hodentumoren

Ein Hodentumor stellt sich für gewöhnlich als eine schmerzlose Schwellung des Hodens respektive als eine knötchenartige Verhärtung des Hodens dar. Diese Symptome werden von dem Patienten selbst oftmals zufällig wahrgenommen oder vom Geschlechtspartner bemerkt [15]. Verzögerungen in der Diagnosestellung können zum einen vom Patienten selbst verursacht sein, der

Symptome wie eine Schwellung des Hodens zu lange ignoriert, aber auch durch den behandelnden Arzt, der die Hodenschwellung zum Beispiel als Epididymitis interpretiert oder Rückenschmerzen die durch retroperitoneale Tumorausssaat bedingt ist zunächst als Bandscheibenprobleme behandelt [16]. Generell sollte bei allen jungen Männern mit einer supraklavikulären, mediastinalen oder retroperitonealen Raumforderung ein zugrundeliegender Hodentumor immer in Erwägung gezogen werden [16,17]. In rund 5% der Fälle kommt es zu einer neu aufgetretenen Gynäkomastie welche als systemische endokrine Manifestation der Hodentumorerkrankung gewertet werden kann [18]. Oftmals korreliert die Gynäkomastie mit der erhöhten Produktion von HCG, jedoch können zum jetzigen Zeitpunkt dazu noch keine definitiven Aussagen getroffen werden.

Die Diagnosesicherung umfasst zunächst die körperliche Untersuchung des Patienten mit Palpation und Sonographie der Hoden mit einem mindestens 7,5 MHz-Schallkopf sowie die Bestimmung der Tumormarker AFP, Beta-HCG und Laktatdehydrogenase (LDH) [19]. In der Sonographie können Läsionen im Hoden ab einer Grösse von 1-2 mm mit einer hohen Genauigkeit sichtbar gemacht werden. Nichtseminome erscheinen im Ultraschall typischerweise inhomogen, gegebenenfalls mit zystisch erweiterten Gebieten, Kalkablagerungen und unscharf abgrenzbaren Rändern [20]. Allerdings ist die Sonographie nicht dazu geeignet, ein korrektes T Stadium zu diagnostizieren (in der nachfolgend zitierten Studie konnten nur 8% der Nichtseminome richtig zugeordnet werden) und kann aus diesem Grund, was das Staging und die Zuordnung zu einem Seminom/ Nichtseminom anbelangt, die inguinale Orchiektomie mit nachfolgender Histologie bei einem Verdacht auf einen Keimzelltumor nicht ersetzen [21].

1.2.7 Therapie der Hodentumoren

1.2.7.1 Therapie des Primärtumors

Der Goldstandard für die Behandlung von klinisch lokal begrenzten bzw. organbegrenzten Hodentumoren ist die inguinale Orchiektomie, das heisst die

radikal operative Entfernung des Tumors über die Leiste. Jegliche skrotale Verletzung zur Biopsiegewinnung oder zur offenen Operation ist obsolet. Die Tumormarker sollten vor sowie nach der Operation abgenommen werden um die Kinetik der Halbwertszeiten zu bestimmen (Halbwertszeit von AFP <5-7 Tage, β -HCG <3 Tage). Bei lebensbedrohenden Metastasen sollte sofort mit einer Chemotherapie begonnen werden, die Orchiektomie kann in diesem Fall zweizeitig stattfinden [22].

1.2.7.2 Prognostische Faktoren

Beim Seminom im klinischen Stadium I gibt es retrospektive Studien, die eine Primärtumorgröße von mehr als 4cm und eine Rete-testis-Infiltration als unabhängige prognostische Faktoren für das Vorhandensein von okkulten Metastasen werten. Bei einer Hochrisikokonstellation, das heisst dem Vorhandensein von beiden der oben genannten Risikofaktoren liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit bei ca. 32%. [23].

Bei Nichtseminomen im klinischen Stadium I sind venöse Blutgefässinfiltrationen oder Lymphgefässinfiltrationen die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Auftreten von okkulten Metastasen und müssen daher bei allen Patienten beurteilt werden [24]. Die Proliferationsrate und prozentuale Verteilung von Embryonalkarzinom-Anteilen am gesamten Tumolvolumen sind weitere mögliche prognostische Faktoren [25].

1.2.7.3 Therapie der Seminome und klinische Prognose

Bei einem testikulären Seminom im klinischen Stadium I kann die Tumorerkrankung in nahezu 100% der Fälle geheilt werden. Dies kann durch 3 verschiedene Strategien erreicht werden [26] :

1. postoperative Surveillancestrategie („aktive Beobachtung“) mit Salvage Bestrahlung oder Salvage Chemotherapie bei einem Rückfall [27]
2. adjuvante Chemotherapie mit 1 Zyklus Carboplatin Monotherapie, Dosis area under the curve (AUC 7) [28]

3. adjuvante Radiotherapie (RT) des retroperitonealen paraaortalen Lymphabflusses mit 20-24 Gray (Gy) bzw. zusätzlich der ipsilateralen iliakalen Lymphknoten [29]

Die Rezidivrate beträgt bei der postoperativen Surveillancestrategie 12-16%, nach der Gabe von 1 Zyklus Carboplatin Mono 3-4% und nach adjuvanter RT 1-3%. Bei einer Hochrisikokonstellation, das heisst beim Vorhandensein von einer Tumorgrosse grösser als 4cm und Rete testis Infiltration, liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit bei ca. 32%. Im Wissen dieser Risikokonstellationen kann der Wunsch des Patienten und seine „Risikobereitschaft“ bei der Planung der bestmöglichen Therapieoption mitberücksichtigt werden [26]. Aufgrund der Nebenwirkungen mit erhöhtem Risiko einer Sekundärneoplasie wird die adjuvante Radiotherapie in der Niedrigrisikokonstellation in den EAU Guidelines nicht mehr empfohlen.

Bei einem Seminom im klinischen Stadium IIA besteht die Standardbehandlung in einer nachfolgenden RT der paraaortalen und ipsilateralen iliakalen LK mit einer Gesamtdosis von 30 Gy , während im Stadium IIB die Möglichkeit einer Dosiserhöhung auf 36 Gy besteht [30]. Das rezidivfreie Überleben nach 6 Jahren beträgt 95% im Stadium IIA und 89% im Stadium IIB. Das Gesamtüberleben beträgt annähernd 100% [30].

Als gleichwertige Therapieoptionen können im Stadium IIB auch eine cisplatinbasierten Chemotherapie mit 3 Zyklen Bleomycin, Etoposid, Cisplatin (PEB) oder 4 Zyklen Etoposid (PE) verabreicht werden. Dies wird vor allem bei Patienten mit grösserem, multinodalem retroperitonealem Lymphknotenbefall empfohlen [31].

Im fortgeschrittenen Stadium stellt die Chemotherapie das Therapieverfahren der Wahl dar. Als Chemotherapie Schemata können in Abhängigkeit der IGCCCG Prognosegruppe entweder 3-4 Zyklen PEB oder 4 Zyklen Cisplatin und PE verwendet werden. [32].

1.2.7.4 Therapie der Nichtseminome und klinische Prognose

Bei den Nichtseminomatösen Keimzelltumoren liegt die Heilungsrate im Stadium I bei ca. 99%. In Anbetracht von Risikofaktoren besteht die Möglichkeit der „aktiven“ Surveillance, einer primären adjuvanten Chemotherapie mit 2 Zyklen BEP- Chemotherapie oder die nervschonende modifizierte retroperitoneale Lymphadenektomie, wobei letztere nur noch selten zum Einsatz kommt (bei reinem Teratom im Stadium I). Wichtigster prognostischer Faktor für einen Rückfall ist wie bereits oben erwähnt eine vorliegende Gefässinvasion. Patienten mit Gefässinvasion haben ein Risiko von 48% im Verlauf der Erkrankung Metastasen zu entwickeln [24], dem gegenüber steht das Risiko von 14-22% bei Patienten ohne Gefässinvasion [24]. In einer schwedisch-norwegischen Untersuchung lag die Rezidivrate bei der low-risk-Gruppe unter aktiver Surveillance bei 13%, während sie in der high-risk-Gruppe bei 42% lag [33]. Die Therapie im Stadium I erfolgt risikoadaptiert. Als low-risk wertet man keine vaskuläre Invasion, während bei einer high-risk Situation eine Gefässinvasion vorliegt. Entsprechend empfiehlt man bei low-risk Situationen als Standardtherapie die Surveillancestrategie mit CT Kontrollen bei Diagnose, nach 3 und nach 12 Monaten [26, 34]. Bei high risk Situationen ist die adjuvante Chemotherapie mit 2 Zyklen PEB der Standard. Die anderen oben erwähnten Optionen sollten nur in Betracht gezogen werden, wenn wichtige Faktoren gegen die Standardtherapie sprechen [26, 34].

Inzwischen liegen auch Daten zur Sicherheit von nur einem Zyklus PEB in der adjuvanten Therapie vor, so erlitten in einer deutschen Studie von 191 Patienten die nur einen Zyklus PEB erhalten haben nur zwei Patienten Rezidive, die durch eine weitergehende Therapie geheilt werden konnten [35]. Es ist anzunehmen, dass sich in Zukunft bei vaskulärer Invasion eine adjuvante Chemotherapie mit nur einem Zyklus PEB etablieren könnte.

Die Heilungsrate für Nichtseminome im Stadium IIA und B ist annähernd 98% [36].

Die Therapie des Nichtseminoms im klinischen Stadium IIA wird in Abhängigkeit vom Tumormarkerstatus entschieden. Das grösste Problem im Stadium IIA

besteht in der hohen falsch-negativen Rate von 20-30% einer in der Computertomographie (CT) dargestellten retroperitonealen Lymphadenopathie mit tatsächlicher Metastasierung. Im Stadium IIA mit negativen Tumormarkern gibt es deshalb mehrere Optionen: nervschonende retroperitoneale Lymphadenektomie, kurzfristige bilgebende Verlaufskontrolle mit aktiver Therapie nur bei Progression, histologische Sicherung der Dignität durch eine CT-gesteuerte Biopsie mit anschließender Therapie im Falle von Malignität, eine primäre Chemotherapie mit 3 Zyklen PEB [37]. Im Stadium IIA mit positiven Tumormarkern sollte eine Chemotherapie mit 3 Zyklen PEB durchgeführt werden, mit anschließender operativer Entfernung falls residueller Tumor (>1cm) zurückgeblieben ist [23].

Bei nichtesminomatösen Hodentumoren im Stadium IIB richtet sich die Therapie entsprechend der International Germ Cell Consensus Classification (IGCCCG) Klassifikation, wobei der Goldstandard eine Chemotherapie mit 3-4 Zyklen PEB- Chemotherapie mit nachfolgender Residualtumorresektion gilt. [36]. Für Patienten mit "good prognosis" sind 3 Zyklen PEB der Standard [38]. Bei "good prognosis" Patienten mit vorbestehender Lungenerkrankung oder anderer Kontraindikation für Bleomycin kann eine Chemotherapie mit 4 Zyklen Cisplatin und Etoposid durchgeführt werden und somit auf Bleomycin verzichtet werden [39]. Patienten mit "intermediate prognosis" erreichen mit 4 Zyklen PEB eine Langzeitüberlebensrate von ca. 80%. Bei Kontraindikationen für Bleomycin können auch 4 Zyklen Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid (PEI) gegeben werden [40]. Für Patienten mit "poor prognosis" stellen 4 Zyklen Chemotherapie nach dem PEB Schema ausserhalb von Studien die Standardtherapie dar, diese Patienten haben jedoch ein mit nur ca. 50% Langzeitüberleben eine deutlich schlechtere Prognose [23].

Insgesamt sollten diese Patienten möglichst in entsprechenden Zentren behandelt werden, so die Empfehlung der aktuellen Leitlinien der Europäischen Konsensusgruppe [41,42].

1.3 Klinische und pathologische Bedeutung von Tumorsuppressorgenen

1.3.1 Einführung

Zur Entstehung von bösartigen Tumoren kann das sogenannte Mehrstufenmodell der Onkogenese herangezogen werden, dies besagt dass eine stufenweise, kumulative Dysregulation von Genen oder Genabschnitten, welche am zellulären Wachstum und an der zellulären Differenzierung beteiligt sind, stattfinden muss. Dies bedeutet letztlich eine Aktivierung von Onkogenen und eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, was in der Folge eine gestörte Proliferationskontrolle der betroffenen Zellen sowie zelluläre Atypien mit sich bringt. Aus diesen zellulären Atypien bzw. Dysplasien erfolgt dann meist eine Entwicklung sogenannter Tumorstufen, beispielsweise eines Carcinoma in situ, aus dem dann in der Folge ein invasives Karzinom entstehen kann, mit dem Risiko einer metastatischen Ausbreitung [43].

Bei den Hodenkarzinomen geht man davon aus, dass die Entstehung von Karzinomzellen über sogenannte testikuläre intraepitheliale Neoplasien (TIN) oder auch „intratubular germ cell neoplasia of the unclassified type“ (ITGCNU) genannt, vonstatten geht. TIN Zellen entstehen aus primordialen Stammzellen und man geht davon aus, dass diese Zellen bereits bei der Geburt vorhanden sein können [44,45]. Die hohe Inzidenz von Hodenkrebs bei Männern mit Kryptorchismus lässt den Schluss zu, dass bereits intrauterine Faktoren eine wichtige Rolle bei der Transformation von Keimzellen in TIN spielen. Man kann die Hypothese aufstellen, dass während dieser Periode entweder genetische Faktoren (zum Beispiel gonadale Fehlentwicklung) oder Umwelteinflüsse dazu führen, dass Keimzellen sich dahingehend verändern, dass sie malignes Potential entwickeln [46].

So findet man in Tumorgewebe von Keimzelltumoren in mehr als 90 Prozent der Fälle eine TIN [47], wobei diese Vorstufen bei allen Risikogruppen für Hodenkarzinom gefunden wurden, sei es bei Patienten mit Kryptorchismus [48] oder vorhergehender Hodenkrebskrankung [49]. Aufgrund der hohen Prävalenz von TIN bei Patienten mit Hodenkarzinom, geht man davon aus, dass es sich um Vorläuferzellen für Keimzelltumoren handelt. [50]. Der Verlust von PTEN spielt nachweislich eine Rolle bei der Entstehung von invasiven

Keimzelltumoren aus einer TIN [51]. Gerade in europäischen Ländern ist man der Ansicht, dass unbehandelte Fälle von TIN in einen invasiven Keimzelltumor münden. Aus diesem Grund wird eine kontralaterale Hodenbiopsie und bei nachgewiesenem TIN eine Strahlentherapie empfohlen [52].

Neuere Studienerkenntnisse zeigen, dass TIN sich in 2 verschiedenen Signalwegen in Keimzelltumoren verändern können, entweder über den Schritt von einem Seminom zu einem Nichtseminom oder auf direktem Weg zu einem nichtseminomatösen Hodentumor [53].

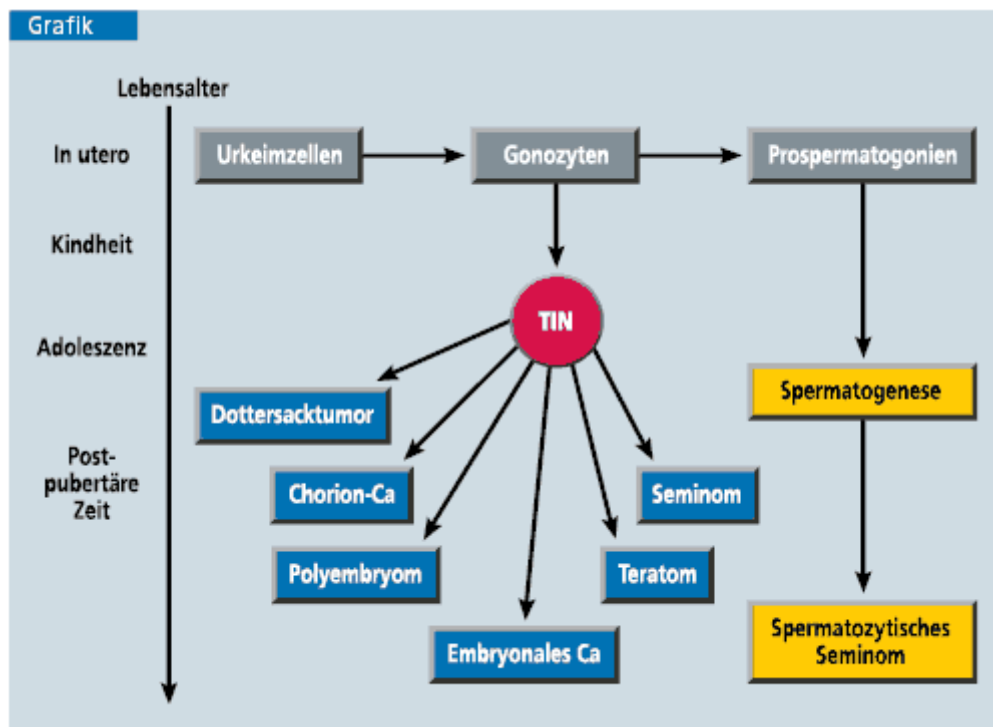


Abbildung 1: Histogeneseschema der germinalen Hodentumoren: TIN ist die totipotente Ursprungszelle aller Keimzelltumoren; Ca, Karzinom; TIN, testikuläre intraepitheliale Neoplasie [54]

Insgesamt lässt sich die Gruppe der Hodentumoren wie oben erwähnt, in zwei grosse Untergruppen einteilen, die Seminome und die Nichtseminome. Insgesamt sind ca. 50% aller testikulären Keimzelltumoren reine Seminome [55]. Neben einigen Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Gruppen (zum

Beispiel Erkrankungsalter zwischen 30-40 Jahren, bei Seminomen zusätzlich Inzidenz zwischen 50-60 Jahren) gibt es einige wichtige Unterschiede zwischen den genannten Entitäten.

Seminome werden häufig in frühen Stadien entdeckt, ca. 85% werden im Stadium I diagnostiziert, während nur ca. 10 Prozent bereits befallene retroperitoneale Lymphknoten oder Metastasen zeigen. Im Gegensatz dazu sind ca. 50% der Nichtseminome bei Erstdiagnose bereits metastasiert [56]. Seminome breiten sich seltener über die Blutbahn aus, während die Nichtseminome häufiger über die Blutbahn in andere Organe (Lunge, Leber, Knochen) metastasieren. Seminome sind sehr strahlenempfindlich, während Nichtseminome eher strahlenresistent sind. Die meisten Seminome gehen nicht mit erhöhten Tumormarkern einher, eine Erhöhung von beta-hCG kann bei Seminomen mit Synzytiotrophoblasten gesehen werden, während eine AFP-Erhöhung fast ausschliesslich bei Nichtseminomen zu sehen ist [56].

Als Beispiel eines Nichtseminoms sei das äusserst aggressive Chorionkarzinom genannt, das sehr früh hämatogen metastasiert. Diagnostisch charakteristisch für das Chorionkarzinom ist die Koexistenz von Syncytiotrophoblasten und Cytotrophoblastenzellen, welche entsprechend ihrer normalen embryonalen Funktion eine grosse Rolle bei der Gefässinvasion spielen [57]. Dieses Charakteristikum bedingt die frühe hämatogene Dissemination. Dieses Beispiel sei stellvertretend genannt für das unterschiedliche Angiogeneseverhalten der Seminome und Nichtseminome. In diesem Zusammenhang ist der AKT Signalweg aktuell in klinischer Untersuchung, da über diesen Signalweg Proliferationsvorgänge und die Angiogenese reguliert werden.

Beispielsweise kommen beim metastasierten Nierenzellkarzinom Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) als Inhibitoren des AKT Signalwegs therapeutisch zum Einsatz. So konnte durch klinische Studien gezeigt werden, dass der Tyrosinkinasehemmer Sunitinib (Sutent) die Gesamtüberlebensdauer von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom auf über 2 Jahre verlängert [58]. In einer Vergleichsstudie mit Interferon- α bei Patienten, die zuvor keine systemische Therapie erhalten hatten, zeigte sich Sunitinib in allen Studienparametern (Tumoransprechrage, Zeit bis zum Fortschreiten des Tumorwachstums, Gesamtüberlebensdauer) signifikant überlegen [59]. Sunitinib hemmt die Angiogenese, die Substanz blockiert unter anderem die

Phosphorylierung des intrazellulären Tyrosinkinaseanteils des VEGF-Rezeptors und verhindert dadurch das Andocken bestimmter intrazellulärer Kinasen an die phosphorylierte Region des Rezeptors. Damit werden zwei wichtige Signalkaskaden aktiviert. Zum Einen der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg, zum anderen die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade. Beide Signalwege bewirken eine Überexpression von CDK4/Cyclin D im Zellkern, wobei dieser aktivierte Komplex die promotogene Aktivität zur Zellproliferation und Neoangiogenese triggert [60]. Bei refraktären Keimzelltumoren, die kein Ansprechen mehr auf cisplatinhaltige Therapien zeigen werden bislang als wirksame Substanzen Paclitaxel, Oxaliplatin, Gemcitabine eingesetzt, wobei es zu einem Langzeitüberleben bei ca. 10% der Patienten kommt [61,62].

1.3.2 Schematische Darstellung des AKT Signalwegs

Mittlerweile stehen eine Reihe neuer therapeutischer Substanzen zur Verfügung, die gezielt einzelne Parameter innerhalb des AKT-Signalweges beeinflussen. Als Rationale für den Einsatz dieser Medikamente ist es eine Voraussetzung, die Expression und Aktivierung dieser AKT-Signaltransduktionskaskade in Hodentumorgewebe zu untersuchen. Hierdurch ließe sich die Bedeutung für die Pathogenese bzw. Progression von Hodentumoren über diesen Signalweg einschätzen, eine Fragestellung, die aktuell zum bisher größten Teil unbeantwortet geblieben ist.

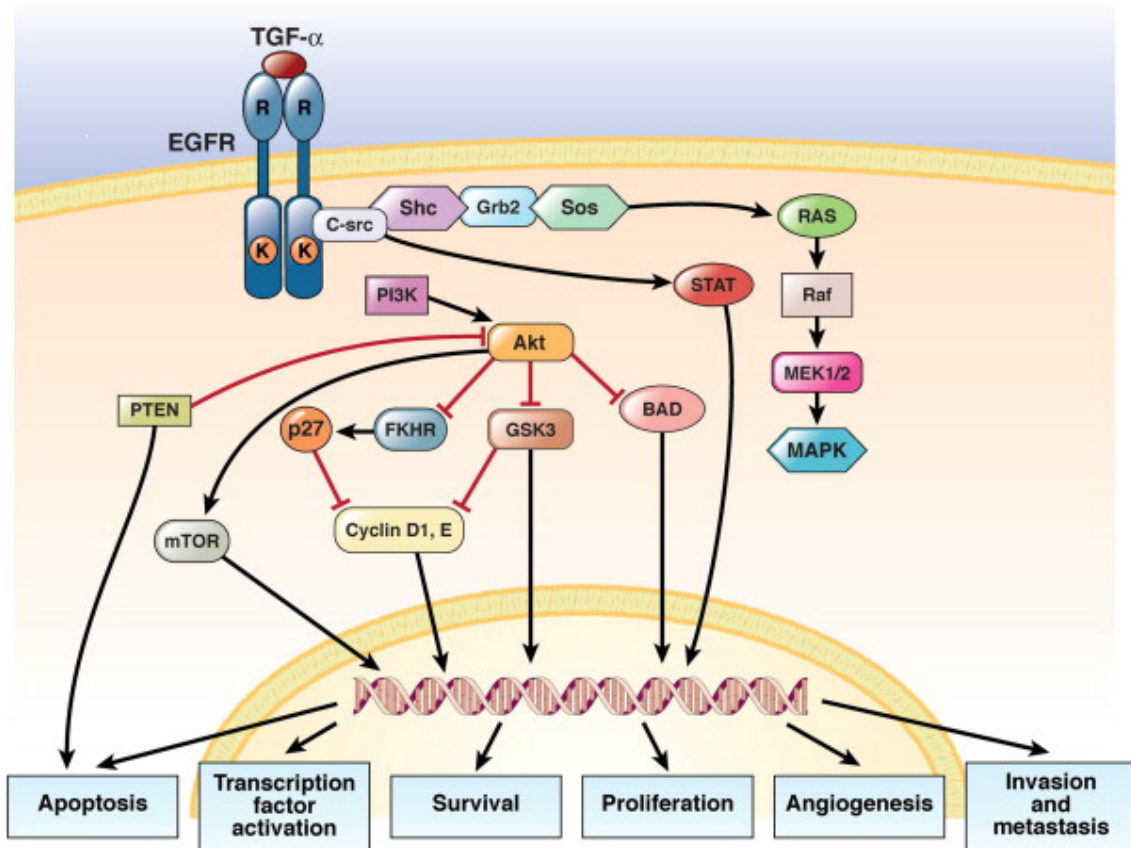


Abbildung 2: schematische Darstellung der PTEN/PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade [63].

Die PTEN/PI3K/AKT- Signaltransduktionskaskade ist ein entscheidender Regulationsmechanismus des Zellüberlebens. Der Verlust von PTEN führt zu einer Hyperphosphorylierung von AKT, was letztendlich in einer Steigerung der Zellproliferation und des Überlebens resultiert.

1.3.3 p-AKT

Serin-Threonin Proteinkinase Akt (AKT), auch bekannt als Proteinkinase B, (PKB) hilft bei der Regulierung der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) und spielt hierbei sowohl bei den gewöhnlichen, als auch bei pathologischen Regelkreisen eine grosse Rolle. Insgesamt gibt es drei Isoformen des AKT und zwar Akt 1

(PKB α), Akt 2 (PKB β), Akt 3 (PKB γ), welche auf drei unterschiedlichen Genen auf den Chromosomen 14q32, 19q13 und 1q43 lokalisiert sind. Sie sind alle sehr ähnlich in ihrer Struktur und Grösse und man nimmt an, dass sie auch alle über den gleichen Mechanismus aktiviert werden [64]. Erstmals entdeckt wurde Akt als v-akt Onkogen Anfang der 90-er Jahre [65]. Mittlerweile weiss man, dass unterschiedliche Tumorarten über eine Aktivierung von AKT entstehen [66]. Bei menschlichem Tumoren sind mehrere Mechanismen bekannt, die zu einer Deregulation der AKT Aktivität führen, z.B. AKT Proteinüberexpression, Verlust von PTEN, AKT Genamplifikationen und ungenügende Aktivierung von PI3K.

1.3.4 PTEN

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) / MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) / TEP-1 (TGF β -regulated and epithelial cellenriched phosphatase) ist ein Tumorsuppressorgen, welches auf dem Chromosom 10q23 lokalisiert ist [67] und sich entsprechend dem Knudsonprinzip an einer Reihe humaner Malignome alteriert und somit inaktiviert vorfindet [68]. Nach Knudson entstehen Tumore durch einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, wobei dieser Funktionsverlust durch eine Mutation der entsprechenden Gensequenz entsteht. Alle autosomal kodierenden Gene liegen in zwei Allelen vor, aus diesem Grund ist trotz des Ausfalls eines Allels in der Regel die Funktion der Zelle intakt. Erst der Funktionsverlust des zweiten Allels in derselben Zelle führt zum Ausfall der gesamten Genfunktion. Man nennt dies auch die „Zwei-Treffer-Hypothese“ von Knudson. Dies führt zu unkontrollierter Zellproliferation und maligner Entartung. Gemäss gegenwärtigem Kenntnisstand an der Entstehung humaner Malignome, scheint eine Dysregulation der Zellzykluskontrolle, vor allem an dem am Übergang von der G1 zur S-Phase lokalisiertem G1 Checkpoint beteiligt zu sein. Eine Alteration des PTEN-Gens induziert über eine Aktivierung der Signaltransduktionskaskade (im Rahmen des PKB / AKT-Signalweges) eine Beeinträchtigung der am G1 Checkpoint vermittelten physiologische Zellzykluskontrolle [69].

Man unterscheidet bei PTEN eine phosphorylierte und eine unphosphorylierte Form, in der phosphorylierten Form befindet sich PTEN in einer Art „geschlossenem Zustand“ mit einer geringen Affinität zur Proteinbindung, während die unphosphorylierte Form in einem „offenen Zustand“ auch zu hochmolekularen Komplexen in Verbindung treten kann [70].

PTEN spielt eine Rolle als Tumorsuppressor durch eine negative Regulierung des PI3K/PKB/AKT-Signalweges [71].

Mutationen von PTEN sind mit hereditären Krebsvorstufen wie z.B. der Cowden's Krankheit assoziiert [72]. Das Cowden-Syndrom ist ein autosomal-dominant auftretendes Syndrom, mit einer weltweiten Inzidenz von ca. 1.200.000, das klinisch durch Hamartome aller drei Keimblätter in Erscheinung tritt. 80% der Fälle sind auf Mutationen auf dem langen Arm des 10. Chromosoms zurückzuführen, dessen Sequenz das Tumorsuppressorgen PTEN kodiert. Circa 40% der Patienten mit Cowden-Syndrom entwickeln mindestens einen malignen Tumor während ihres Lebens.

Ausserdem weiss man, dass PTEN häufig bei sporadischen Tumorerkrankungen in inaktiviertem Zustand vorliegt, sei es bei Endometrium-Hirn- Prostata- oder Ovarialkarzinom [73,74,75].

1.3.5 p27^{kip1}

p27^{kip1} ist ein Cyclin abhängiger Kinaseinhibitor und ein Tumorsuppressor. Studien zeigen, dass p27^{kip1} eine wichtige Rolle in vielen fundamentalen Zellprozessen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, sowie eine Rolle bei der Pathogenese von mehreren menschlichen Tumorarten spielt, vor allem, wenn es wenig exprimiert wird, korreliert dies mit einer schlechten Prognose bei Tumorpatienten [76]. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass die Rate von Embryonalkarzinomen, die Cyclin E exprimieren sehr hoch ist (93%) und dass insgesamt 83% der testikulären Keimzelltumoren Cyclin D2 exprimierten. Überexpression von Cyclin D2 führt wiederum zu einem Funktionsverlust von p27 in Anwesenheit von Cyclin E und Cyclin D2 [77].

Im Widerspruch dazu stehen Studien bei testikulären Keimzelltumoren, bei denen die Karzinomzellen mit einer Überregulation von p27^{kip1} assoziiert sind, dies ist beispielsweise ebenso beim Retinoblastom der Fall. Man kann sagen, dass testikuläre Keimzelltumoren synergistische Genexpressionen wie beim Retinoblastom zeigen, in anderen Tumorentitäten ist dies aber eher selten der Fall [78].

1.3.6 Fragestellung/ Zielsetzung

Ziele der hier vorliegenden Arbeit sind folgende:

- Die immunhistochemische Untersuchung des AKT-Signalweges mit seinen Interaktionspartnern p-AKT, p27^{kip1}, PTEN bei der Tumorentität der Nichtseminome, zur Quantifizierung der Beteiligung dieser Signalkaskade beim Hodenkarzinom.
- Insbesondere sollen die unterschiedlichen Tumorentitäten der Dottersacktumore, der Teratome und der Embryonalzellkarzinome quantitativ bewertet und mit den korrespondierenden benignen Gewebeanteilen verglichen werden, um so die Bedeutung des AKT Signalweges im Hinblick auf die Tumorentstehung von Hodenkarzinomen zu evaluieren.
- Ein weiteres Ziel ist es, zu klären, ob sich die Aktivierung des AKT-Signalweges mit der anderer Tumorentitäten gleicht?
- Ebenfalls erfolgt diese Untersuchung vor dem Hintergrund, ob der Einsatz antiangiogenetischer Medikamente wie der Tyrosinkinaseinhibitoren, welche den AKT-Signalweg in ihrer Interaktion beeinflussen, beim Nicht-Seminom klinisch sinnvoll sein könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Eingang in diese Studie fanden 48 Patienten, bei denen zwischen 1993 und 2003 an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen eine inguinale Semikastration durchgeführt wurde.

Das durchschnittliche Alter der Patienten bei der Operation betrug 28,15 Jahre (Altersspanne 15 - 44 Jahre) \pm Standardabweichung (SEM) 6,39.

Es fand sich die folgende Verteilung der TNM Stadien:

Tabelle 7: Verteilung der TNM Stadien

	0	1	2	3	X	Summe
T	X	26	7	7	8	Σ 48
N	25	6	2	6	9	Σ 48
M	31	17	X	X	0	Σ 48

Alle Gewebeproben stammen von Patienten, die an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen behandelt wurden, wobei die vorliegende Untersuchung von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt wurde. Die zugrundeliegende Ethikvotum-Nummer ist folgende: 138/2006.

2.1.1 Rekrutierung

Es wurde auf bereits vorliegende Gewebepräparate der routinopathologischen Aufarbeitung zurückgegriffen.

2.1.2 Einschlusskriterien

Einschlusskriterium für die vorliegende Studie war die histologisch gesicherte Diagnose eines Hodenkarzinoms vom nichtseminomatösen Typ. Somit wurden

in die Studie Hodenkarzinome mit Anteilen von Embryonalzellkarzinomen, Teratomen und Dottersacktumoren aufgenommen.

2.1.3 Ausschlusskriterien

Das Vorhandensein sonstiger Malignome, kein Hodentumor. Patienten, deren Tumor in Lage oder Grösse so gestaltet war, dass das gesamte Tumorgewebe für die routinemässige pathologische Befundung verwendet wurde.

2.2 Datenerhebung

Im Rahmen der retrospektiven Studie zu immunhistochemischen Untersuchungen des AKT-Signalwegs bei Hodentumoren wurden die Daten zur weiteren Prozessierung in eine Access Datenbank übernommen, die unter anderem Informationen wie Alter der Patienten, Tumorentität, TNM Stadium und Expression der Tumormarker enthielt.

2.2.1 Aufarbeitung der Präparate zur Befundung und immunhistochemischen Untersuchung und Herstellung der Schnitte

Das Hodenfrischmaterial wurde direkt nach der Operation in 4% gepuffertem Formalin fixiert und anschliessend zur weiteren Verarbeitung in Paraffin eingebettet. Die Präparate wurden direkt nach der Operation im pathologischen Institut der Universität Tübingen histopathologisch bewertet. Die Einteilung erfolgte entsprechend der aktuellen TNM-Klassifikation. Auf die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung konnte durch ein universitätsinternes System zurückgegriffen werden.

Die in Paraffin eingebetteten Hodentumoren wurden dann am Microtom in 5 µm dicke Präparate geschnitten, auf Superfrostplus Objektträger (OT) aufgebracht und in einem ersten Schritt mit Haematoxylin und Eosin (H&E) für die histopathologische Diagnosestellung angefärbt. Vor der Färbung erfolgte eine Deparaffinisierung der Schnitte, in dem die Objektträger über Nacht in einer Wärmekammer bei 62°C belassen wurden. Am nächsten Morgen erfolgte ein

Waschen mit Xylol für 3x5 Minuten. Anschliessend wurden die Schnitte, bevor sie in die wässrigen Färbelösungen kamen, in einer absteigenden Alkoholreihe (100 bis 50%) ausgewaschen. Nach der Färbung wurden die Schnitte wieder mit Alkohol entwässert, in Xylol aufgehellt und mit Harz, sowie einem dünnen Deckglas eingedeckt. Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden von mir und dem Laborleiter Dipl. biol. J. Hennenlotter blind und voneinander unabhängig evaluiert.

2.2.2 Markierung der einzelnen Tumorentitäten auf dem Schnittpräparat

Die H&E gefärbten Schnitte wurden von einem Pathologen (Herrn PD Dr. Vogel) der Universität Tübingen histopathologisch bewertet, wobei die jeweilige Tumorentität (Embryonalzellkarzinom, Teratom und / oder Dottersacktumor) sowie die benignen Anteile mit einem Filzstift auf dem Objektträger farbig umrandet wurde. Jede Tumorspezies, respektive das benigne Gewebe wurden mit einer anderen, repräsentativen Farbe gekennzeichnet (beispielsweise blaue Umrandung für Embryonalzellkarzinomanteile auf dem Objektträger). Die auf diese Art und Weise markierten Schnitte konnten später mit den immunhistochemischen Färbungen optimalerweise verglichen werden.

2.3 Beschreibung der verwendeten Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden kommerziell erworben. Für die Inkubation wurden die Angaben der Herstellerfirmen, falls nicht explizit anders beschrieben, genau eingehalten. Sämtliche Antikörper wurden von den Herstellern speziell für den Einsatz in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe empfohlen. Die Aufbewahrung der Antikörper erfolgte entsprechend der Herstellerangaben für Phospho-Akt und PTEN bei jeweils -20° Celsius, für p27^{kip1} bei 4° Celsius. Die für die immunhistochemischen Untersuchungen notwendigen Verdünnungen der Antikörper wurden erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

Die jeweils eingesetzte Verdünnung der verwendeten Primärantikörper wurde im Rahmen von Verdünnungsreihen (1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:500) an Hodenkarzinomgeweben ermittelt.

Zur Untersuchung der Wirkungsweise von Phospho-Akt wurde der kommerziell erhältliche Phospho-Akt Antikörper der Firma Cell Signaling (Cell Signaling Technologies Inc. Beverly, MA, USA) verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Es handelt sich bei dem verwendeten Phospho-Akt (Ser473) Antikörper um einen polyklonalen Antikörper, der von immunisierten Tieren produziert wird.

Zur Detektion des PTEN Tumorsuppressorgens fand ebenfalls ein kommerziell erhältlicher PTEN Antikörper (PTEN 26H9 monoklonaler Antikörper) der Firma Cell Signaling Verwendung. Bei diesem handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper der in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt wurde.

Der verwendete p27^{kip1} Antikörper in dieser Studie war der Monoclonal Mouse Anti-Human p27^{kip1} (Clone SX53G8, Code No. M 7203) der Firma DakoCytomation (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Hier fand sich die optimale Verdünnung bei 1:100.

Um die optimale Verdünnung der jeweiligen Antikörper herauszufinden wurden wie oben erwähnt Verdünnungsreihen aufgebaut. Die optimale Konzentration des Primärantikörpers ist definiert als eine möglichst starke spezifische Anfärbung mit einer so klein als möglich gehaltenen Hintergrundfärbung.

Als Sekundärantikörper wurde bei P-AKT das kommerziell erwerbliche Sekundärantikörper der Firma Vector Laboratories (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) Vectastain- Mouse/Rabbit IgG BA1400 in einer Verdünnung 1:200 (angesetzt in Antibody Diluent with Background Reducing Components der Firma DakoCytomation, Code S3022) verwendet. Sowohl bei p27^{kip1} als auch bei PTEN fand der Sekundärantikörper der Firma Vector Laboratories,

Vectastain, PK 6102 Mouse IgG in der Verdünnung 1:200 (ebenfalls angesetzt in Diluent) Verwendung.

2.4 Durchführung der Immunhistochemie

2.4.1 Entparaffinierung

Vor Beginn der eigentlichen immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate einer Wärme-Vorbehandlung unterzogen und dazu über Nacht im Wärmeschrank bei 62° C gelagert und am nächsten Tag dreimal für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschliessend wurden die Objektträger für je 2x10 min in 100% Ethanol, 2x10 min in 96% Ethanol, 1x10 min in 70% Ethanol rehydriert, um schliesslich 1x5 min in destilliertem Wasser (Aqua dest.) gewaschen zu werden. Dieser Schritt war für jeden der verwendeten Antikörper identisch, auf die Unterschiede der immunhistochemischen Färbung bei den verschiedenen Antikörpern wird im folgenden eingegangen.

Als nächster Schritt wurde die endogene Peroxidase durch 3% Hydrogenperoxid (H₂O₂) für 30 min geblockt, danach wurden die Präparate 3x3 min in Aqua bidest gewaschen und für 5 min in TBS (tris buffered saline) Pufferlösung gelegt.

2.4.2 TBS

Um unspezifisch gebundene Reagenzien zu entfernen, wurde zwischen den einzelnen Reaktionsschritten TBS verwendet. Bei jeder neuen immunhistochemischen Charge wurde TBS aus Stammlösungen frisch hergestellt. Um eine noch bessere Effizienz zu erreichen, wurde zusätzlich der kommerziell hergestellte Waschpuffer 0,1% Tween 20 (Dako Cytomation, S1966) verwendet. Durch diesen Zusatz wurde die Oberflächenspannung der aufgetragenen Lösungen herabgesetzt und dadurch ein sicheres Aufbringen der Reagenzien bis an den Präparatrand gewährleistet.

2.4.3 Antigendemaskierung

Beim der sogenannten Demaskierung wurden die Präparate (p-AKT und p27^{kip1}) für 3x5 min in der Mikrowelle Stufe 2 Moulinex Micro Chef MO 500 (Moulinex, Frankreich) in Citratpuffer gekocht. Diese Gewebepreparation dient der Sensitivitätssteigerung bzw. der Demaskierung der durch Fixation veränderten Antigene in den Gewebeschnitten. Der Citratpuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch aus den Stammpuffern A (Natriumcitrat-Dihydrat) und B (Zitronensäure-Monohydrat) hergestellt und auf einen pH -Wert von 6,0 titriert, dieser Wert wurde stets mit einem pH-Meter überprüft. Während des Kochens in der Citratpufferlösung wurde in regelmässigen Abständen Aqua dest. auf die Präparate gefüllt, um ein Austrocknen zu verhindern. Hierdurch wurden auch eventuell entstandene Konzentrationsveränderungen der jeweiligen Inkubationslösung ausgeglichen. Danach wurden die Proben in der Pufferlösung 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und anschliessend 3x5 min in TBS gewaschen.

Bei PTEN erfolgte die Demaskierung durch eine Anverdauung mit Proteinase K, (Proteinase K, Ready-to-use Code S3020 der Firma DakoCytomation). Die besten Ergebnisse wurden bei einer Inkubationszeit von 3 Minuten erreicht. Die Andauung wurde in Vorversuchen optimiert. Anschliessend wurden auch bei PTEN die Objektträger 3x5 min in TBS gewaschen. Im folgenden wurden alle Proben auf den Objektträger mit einem DAKO-PEN umrandet, um später ein „Auslaufen“ der auf die Objektträger gebrachten Reagenzien zu verhindern.

2.4.4 Avidin-Biotin-Block

Der nächste Schritt gewährleistete das Blocken von endogenem Avidin und Biotin mit der sogenannten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex Methode). Dazu wurden zunächst 200µl Avidin D Solution pro Schnitt für 15 min in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Lösung wurde durch 3x5 minütiges waschen in TBS entfernt. Daraufhin wurden 200µl Biotin Solution pro Schnitt für ebenfalls 15 min in der feuchten Kammer bei RT auf dem OT belassen und im Anschluss wiederum 3x5 min in TBS gewaschen (Avidin-Biotin Blocking Kit, SP-2001; Vector Laboratories Inc. Burlingame, Ca, USA).

Unspezifische Hintergrundanfärbungen vermindern den Kontrast der spezifischen Reaktion und beeinträchtigen somit die Interpretierbarkeit und Sensitivität der Methode. Um unspezifische Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindung der Primär- und Sekundärantikörper möglichst gering zu halten, wurde eine Blocklösung aus Normalserum hergestellt und für jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Objektträgern inkubiert. Bei p-AKT und p27^{kip1} bestand die Blocklösung aus 150 µl Normalserum verdünnt in 10 ml TBS. Bei PTEN wurde, um die Färbeergebnisse zu verbessern, respektive um unspezifische Hintergrundreaktionen zu verhindern, zusätzlich 2% Milchpulver der oben genannten Blocklösung zugegeben.

2.4.5 Aufbringen des Primärantikörpers

Als nächster Schritt wurde der jeweilige Primärantikörper auf die Präparate aufgebracht und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Der primäre Antikörper ist gegen das darzustellende Antigen gerichtet. Am nächsten Morgen wurde der Primärantikörper zunächst auf einem Papiertuch abgeklopft und anschliessend wurden die Objektträger für je 4x5 Minuten in TBS Lösung gewaschen, um die Reaktion zu stoppen.

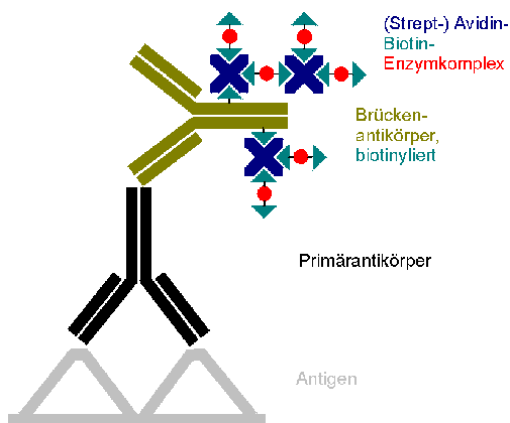
2.4.6 Aufbringen des Sekundärantikörpers

Im Anschluss daran wurden die Gewebeproben mit dem Sekundärantikörper versehen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur darauf belassen, um später wiederum für 4x5 Minuten in TBS Puffer gewaschen zu werden. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen das Fc-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der Primärantikörper hergestellt worden war.

2.4.7 Avidin-Biotin-Komplex Methode

Im folgenden wurde ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC), (Vectastain Elite ABC Kit der Firma Vector Laboratories) gemäss den Vorschriften für 30 Minuten auf den Objektträger bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch die Anwendung der ABC-Methode ist auch bei einer relativ hohen Verdünnung des Primärantikörpers eine ausreichende Intensität und eine hohe Spezifität der

immunhistochemischen Färbereaktion möglich. Bei dieser Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper als erstes an das zu detektierende Antigen. In einem zweiten Schritt bindet sich ein biotinmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper) an das fragment crystalline- Fragment (Fc-Fragment) des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper dient demzufolge als Bindeglied zwischen Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex. Letztendlich wird der Sekundärantikörper durch Hinzugeben des Avidin-Biotin-Gemisches an eine freie Stelle des Avidinmoleküls gebunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut 4x5 Minuten in TBS Lösung gewaschen.



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

Abbildung 3: schematische Darstellung des Avidin-Biotin-Komplexes. [79]

Die nun folgende Färbung mit 3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) geschah mit dem kommerziell erwerblichen Peroxidase Substrate KIT DAB (SK 4100) der Firma Vector Laboratories, bei mit P-AKT behandelten OT benötigte man eine Inkubationszeit von 4 Minuten, bei p27^{kip1} von 60 Sekunden und bei PTEN von 90 Sekunden. DAB ist ein Peroxidasesubstrat, das ein in Alkohol unlösliches braunes Endprodukt bildet. Es wird unter anderem für die Darstellung der Antigenstrukturen in Paraffinschnitten in der Immunhistochemie verwendet. Als Resultat ergibt sich eine Braunfärbung Peroxidase positiver Substrate. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung auf ein Papiertuch abgeklopft und die Reaktion durch das Eintauchen in Leitungswasser gestoppt.

2.4.8 Haematoxylin-Färbung

Als nächster Schritt wurde die Gegenfärbung mit Haematoxylin notwendig, die Objektträger wurden für jeweils 30 Sekunden in Mayers[®] Haematoxylin (Sigma-Aldrich, Egham, Grossbritannien) getaucht und anschliessend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1x Ethanol 70% für 3 Minuten, 1x Ethanol 80% für 3 Minuten, 2x Ethanol 96% für 2 Minuten, 2x Ethanol 100% für 2 Minuten) und letztendlich für 3x5 Minuten in Xylol gebracht. Die genaue Einhaltung der Zeit wurde mit einer Stoppuhr überwacht.

Als letzter Arbeitsschritt stand das Eindecken mit Eukitt[®] (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Deutschland) und einem Deckglas an. Die Präparate wurden daraufhin bei Raumtemperatur belassen und am nächsten Tag in die entsprechenden Behältnisse zur Aufbewahrung sortiert.

2.4.9 Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden der drei zu untersuchenden Antikörper wurden verschiedene Chargen mit jeweils 20 Objektträgern erstellt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich in jeder Charge Negativkontrollen, Positivkontrollen und benigne Gewebeproben befanden. Im Speziellen heisst dies, dass sich in jeder Charge mehrere Hodenkarzinompräparate von unterschiedlichen Patienten sowie Mammakarzinomgewebe für die Positiv/ und Negativkontrollen befanden. Es wurden für alle drei zu untersuchenden Antikörper dieselben Gewebeproben benutzt. Aus den Tumorblöcken wurden im Vorfeld genügend Schnitte erstellt um die Anfärbbarkeit der Antikörper somit bestmöglich zu vergleichen. Bei den Negativkontrollen wurde bei der Immunfärbung kein primärer Antikörper aufgebracht und um Kontaminationen zu vermeiden die Objektträger stets alleine in TBS gewaschen. Ansonsten gab es keine Unterschiede in der Behandlung der Schnitte von Tumorgewebe, benignem Gewebe, Negativkontrollen und Positivkontrollen. Die Negativ- und Positivkontrollen stammten wie oben erwähnt aus Gewebeproben von Mammakarzinomen.

2.5 Statistische Auswertung

Sämtliche Ergebnisse der Datenerhebungen wurden in eine selbst entworfene Microsoft Access Datenbank eingetragen. Erhoben wurden für jeden Patienten zahlreiche klinische (z.B. Tumorsubgruppen), epidemiologische (Geburtsdatum, Alter bei der Operation) und histopathologische Parameter (Färbereigenschaften der unterschiedlichen verwendeten Antikörper).

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte zunächst mittels Varianzanalyse ANOVA (**A**nalysis **o**f **V**ariance). Als Post-hoc-Test wurde der Tukey Kramer Test verwendet.

Als Software wurde das Programm Jump 5.1, (SAS, Cary, USA) verwendet.

Mittels linearer Regressionsanalysen wurde die jeweilige kernständige Expression mit der zytoplasmatischen Expression verglichen, dies erfolgte bei den benignen Geweben ebenso so wie bei allen Tumorentitäten.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färberegebnisse wurden die verwendeten Objekte nach Intensität, Prozentsatz der angefärbten Kerne und des Zytoplasma gewertet, ferner wurde ein Index erstellt. Die Schnitte wurden bei 150facher und 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

Das zugrunde liegende Auswerteschema basiert auf einem System, das sowohl die Stärke der jeweiligen Expression, als auch den exprimierten Anteil der jeweils betrachteten Fläche einbezieht. Es werden 4 unterschiedliche Stufen der Expressionsstärken unterschieden (0, 1-3). Der Score basiert auch auf dem Flächenanteil des gefärbten Areal (Stärke multipliziert mit prozentualer Verteilung) [80].

Die prozentuale Anfärbbarkeit entsprach der Anzahl der gefärbten Zellkerne und/ oder des Zytoplasmas der Zellen, wobei pro Tumorentität jeweils 100 Zellen ausgezählt und prozentual ins Verhältnis gesetzt wurden. Falls in Gewebeproben weniger als 100 Zellen vorhanden waren, wurden die gefundenen Zellen jeweils entsprechend extrapoliert. Entsprechend bedeuten 0

% dass keine Kerne bzw. Zytoplasma angefärbt wurden und 50 % dass 50 Kerne bzw. Zytoplasma durch die verwendeten Antikörper gefärbt wurden. Der gebildete Index konnte somit Werte zwischen 0 bis maximal 300 annehmen. Der Wert des Index war stetig, nicht skaliert.

3. Ergebnisse

3.1. Bilder der Negativ- und Positivkontrollen der immunhistochemischen Färbungen

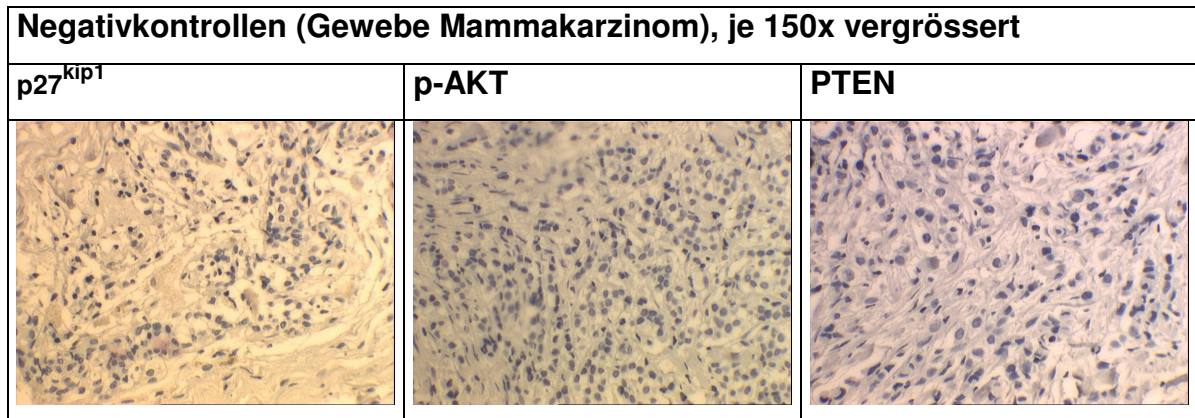


Abbildung 4: Bilder der Negativkontrollen der verwendeten Antikörper

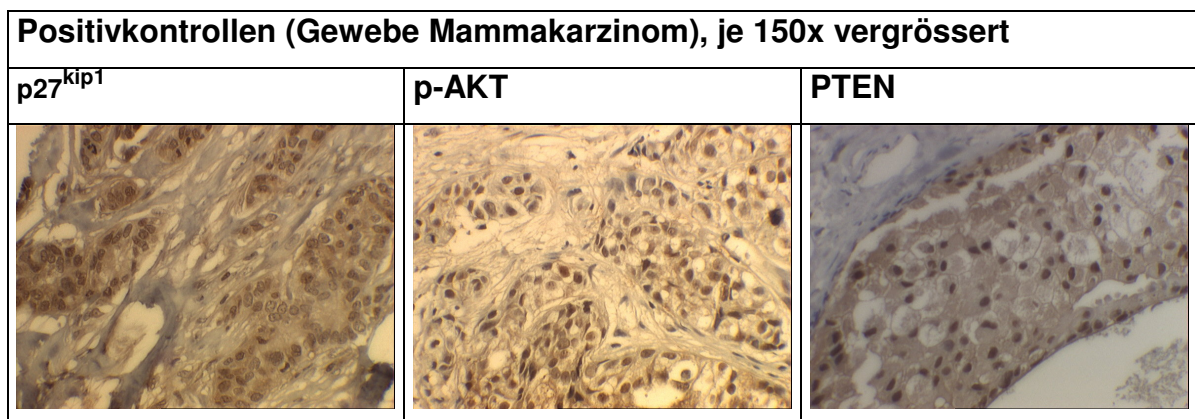


Abbildung 5: Bilder der Positivkontrollen der verwendeten Antikörper

3.2. Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem PTEN

Hierbei wurden die Indizes der verschiedenen Tumorentitäten Dottersacktumoren (ds-Index), Embryonalkarzinome (em-Index) sowie der Teratome (ter-Index) mit dem Index der benignen Gruppe (ben-Index) verglichen. Bereits eine visuelle Analyse zeigte, dass sich die benigne Gruppe von der Gruppe der Tumoren deutlich unterschied, wobei die unterschiedlichen Tumorentitäten als eine heterogene Gruppe zusammengefasst werden konnten. Insgesamt wurden hierbei die Daten von 54 Tumorarealen ausgewertet, wobei sich eine Gliederung wie folgt zeigte: 10 ben-Index Gewebeareale, 5 ds-Index, 26 em-Index sowie 13 ter-Index Areale.

Die benignen Gewebeareale zeigten eine deutliche Anfärbung mit einem Maximum des Index von 160,00, während sich die Tumorareale nur schwach färbten. Der Maximalwert beim Teratom lag bei 60,00 und war damit vergleichsweise deutlich höher als bei den anderen Tumorentitäten, wobei der Dottersacktumor mit einem Maximum des Index von 2,00 fast keine Färbung und Expression zeigte. Die Medianwerte der verschiedenen Indizes waren folgende: der Median lag beim ben-Index bei 20,00, beim ds-Index bei 1,00, beim em-Index bei 0,50 und beim ter-Index bei 1,00 (siehe Tabelle 8).

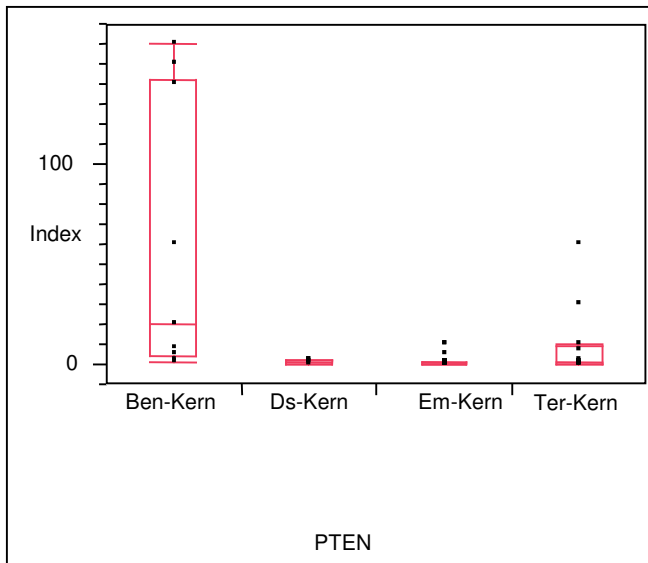


Abbildung 6: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei nukleärer PTEN Färbung

Die einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse zeigte eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.0001$ bzgl. eines Unterschiedes zwischen den Gruppen.

Tabelle 8: Minimum-, Maximum- sowie Medianwerte PTEN Kern

PTEN	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Kern	1,00	20,00	160,00
ds-Index Kern	0	1,00	2,00
em-Index Kern	0	0,50	10,00
ter-Index Kern	0	1,00	60,00

Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM- Wert = standard error of mean) der Indizes berechnet. Der Mittelwert des Index der benignen Areale im Kern lag bei 56,60 und somit signifikant höher als bei den Tumorealen, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 1,20 und 8,65 bewegten (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert PTEN Kern

PTEN	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Kern	10	56,60	66,80	21,12
ds-Index Kern	5	1,20	0,84	0,37
em-Index Kern	26	1,35	2,74	0,54
ter-Index Kern	13	8,65	17,53	4,86

Der durchgeführte Tukey Kramer post-hoc Test ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen ($p < 0,05$). Insgesamt war die Kern-Expression von PTEN in allen drei Tumor-Untergruppen signifikant reduziert.

3.3. Immunhistochemische Untersuchung des zytoplasmatischen PTEN

Hierbei wurden die gleichen 54 Areale wie bei der vorhergehenden Untersuchung verwendet, es wurde lediglich nun der Augenmerk auf die Verteilungen im Zytoplasma gerichtet.

Die benignen Gewebeareale zeigten eine deutliche Anfärbung mit einem Maximum des Index bei 160,00, während sich die Tumorareale ebenfalls nur schwach färbten. Der Maximalwert des Index lag beim Teratom bei 40,00, beim Embryonalkarzinom bei 20,00 und beim Dottersacktumor bei 10,00. Der Medianwert des ben-Index lag bei 30,00, des ds-Index bei 1,00, des em-Index bei 1,00 und des ter-Index bei 5,00 (siehe Tabelle 10).

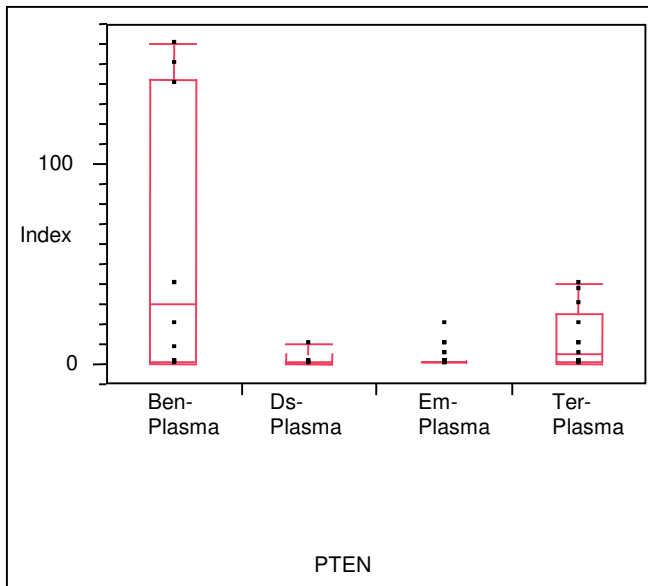


Abbildung 7: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmatischer PTEN Färbung

Die einfaktorielle ANOVA Varianzanalyse zeigte eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.0001$.

Tabelle 10: Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte PTEN im Zytoplasma

PTEN	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Plasma	0	30,00	160,00
ds-Index Plasma	0	1,00	10,00
em-Index Plasma	0	1,00	20,00
ter-Index Plasma	0	5,00	40,00

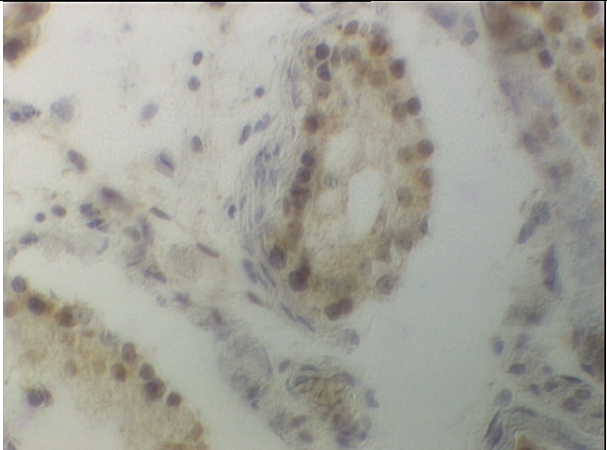
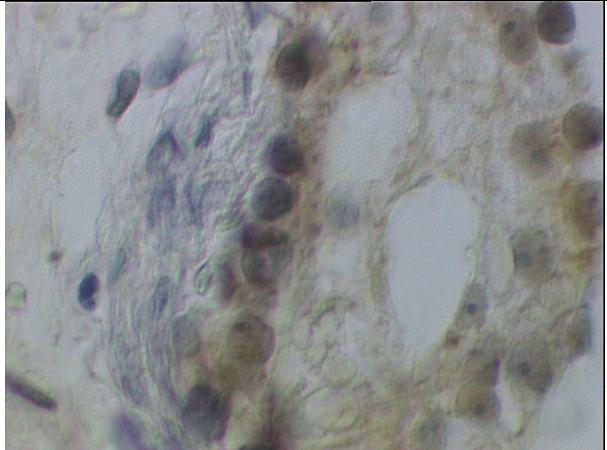
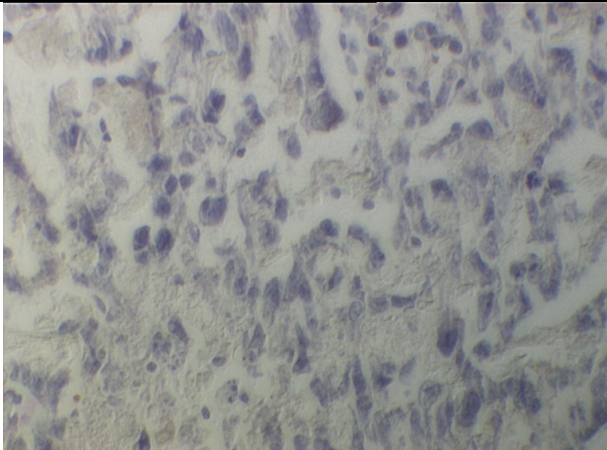
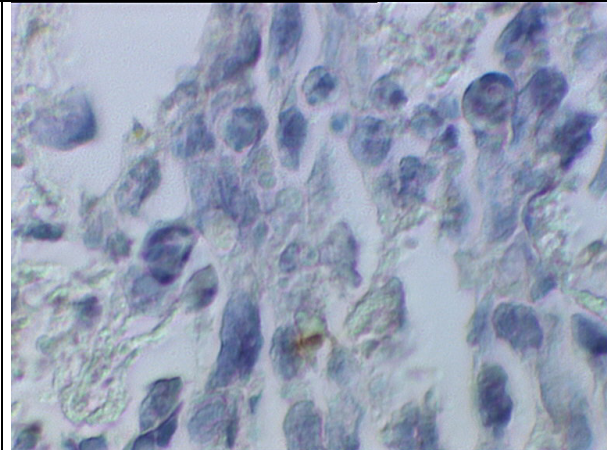
Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der SEM Wert der Indizes berechnet. Der Mittelwert der Indizes der benignen Areale im Zytoplasma lag bei 56,00 und war somit signifikant höher als bei den Tumorearealen, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 2,40 und 12,04 bewegten (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Werte von PTEN im Zytoplasma

PTEN	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Plasma	10	56,00	66,67	21,08
ds-Index Plasma	5	2,40	4,28	1,91
em-Index Plasma	26	2,58	4,45	0,87
ter-Index Plasma	13	12,04	14,86	4,12

Der nachfolgende Post-hoc Test mittels Tukey Kramer ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Untersuchung von PTEN im Kern, es gab einen signifikanten Unterschied beim Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen ($p < 0,05$). Die zytoplasmatische Expression von PTEN war in allen Tumoruntergruppen signifikant reduziert.

3.4. Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von PTEN

Benignes Gewebe	
	
Abbildung 8 : benignes Hodengewebe, PTEN, 150fache Vergrößerung	Abbildung 9 : benignes Hodengewebe, PTEN, 400fache Vergrößerung
Dottersacktumor	
	
Abbildung 10: Dottersacktumor, PTEN, 150fache Vergrößerung	Abbildung 11: Dottersacktumor, PTEN, 400fache Vergrößerung
Embryonalkarzinom	

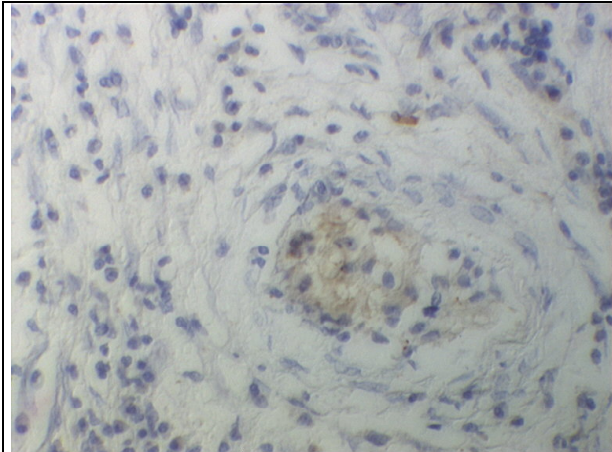


Abbildung 12: Embryonalkarzinom PTEN, 150fache Vergrößerung

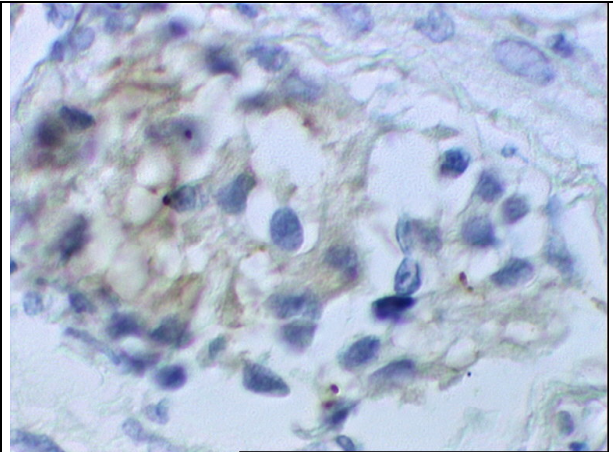


Abbildung 13: Embryonalkarzinom PTEN, 400fache Vergrößerung

Teratom

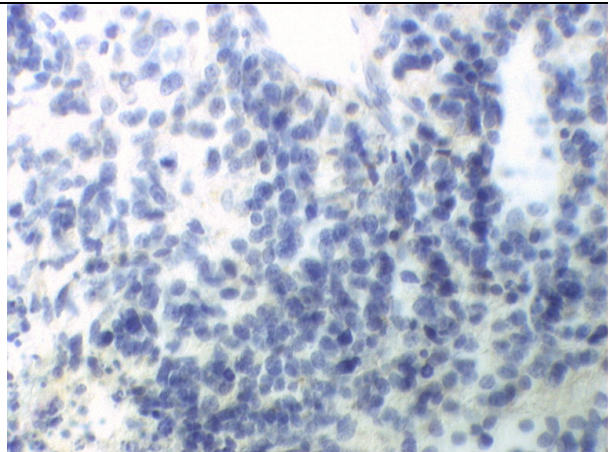


Abbildung 14: Teratom, PTEN 150fache Vergrößerung

3.5 Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem p27^{kip1}

Hierbei wurden die Indizes von 63 mit p27^{kip1} gefärbten Gewebearealen ausgewertet. Insgesamt wurden 14 Proben von benignem Gewebe, 6 von ds-Tumoren, 27 von em-Tumoren und 16 von ter-Tumoren untersucht. Sowohl die benignen als auch die Tumoreareale zeigten ähnliche Maximalwerte der Indizes. So lag das Maximum des ben-Index bei 180,00 des ds-Index bei 60,00 des em-Index bei 170,00 und des ter-Index bei 270,00. Der Index der Teratome war mit Abstand der höchste Wert beim Vergleich der Gruppen. Eine visuelle Analyse

legte nahe, dass sich die einzelnen Gruppen nicht unterschieden. Die Medianwerte der verschiedenen Indizes waren folgende: Er lag beim ben-Index bei 138,75, beim ds-Index bei 40,00 beim em-Index bei 50,00 und beim ter-Index bei 77,50 (siehe Tabelle 12).

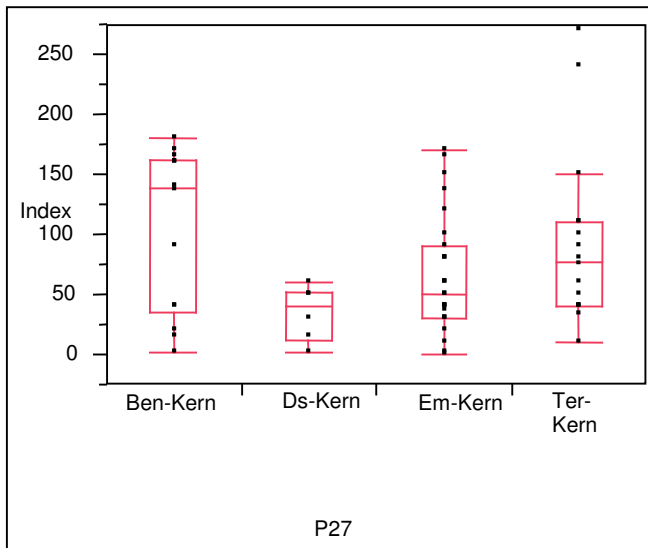


Abbildung 15: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei kernständiger p27^{kip1} Färbung

Die einfaktorielle ANOVA Varianzanalyse zeigte einen Wahrscheinlichkeitswert $p < 0.0403$.

Tabelle 12: Minimum- Maximum- sowie Medianwerte der p27^{kip1} Kernfärbung

p27 ^{kip1}	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Kern	1	138,75	180,00
ds-Index Kern	2	40,00	60,00
em-Index Kern	0	50,00	170,00
ter-Index Kern	10	77,50	270,00

Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der SEM Wert der Indizes berechnet. Der Mittelwert der Indizes der benignen Proben im

Zytoplasma lag bei 105,61, und somit nicht signifikant höher als bei den Tumorarealen, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 34,50 und 93,69 bewegten (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM-Wert bei der p27^{kip1} Kernfärbung

p27 ^{kip1}	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Kern	14	105,61	67,72	18,10
ds-Index Kern	6	34,50	22,75	9,29
em-Index Kern	27	65,59	47,99	9,24
ter-Index Kern	16	93,69	72,59	18,15

Der durchgeführte Tukey-Kramer Test ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen. Insgesamt war die Kern-Expression von p27^{kip1} in allen drei Tumor-Untergruppen nicht signifikant reduziert.

3.6 Immunhistochemische Untersuchung von zytoplasmatischem p27^{kip1}

Hierbei wurden die Indizes der verschiedenen Tumorentitäten mit dem Index der benignen Gruppe verglichen. Insgesamt wurden die Indizes von 63 Gewebearealen untersucht (14 benigne, 6 Dottersacktumoren, 27 Embryonalkarzinome, 16 Teratome). Bereits bei der ersten visuellen Betrachtung fällt ein Unterschied auf, wenn man die benignen Areale mit den Tumorarealen verglich. Die benignen Gewebeareale zeigten eine deutliche Anfärbung mit einem Maximum des Index von 170,00, während die Indizes der Tumorgewebe niedriger waren. So lag das Maximum beim ds-Index bei 30,00, beim ter-Index bei 60,00, einzig der em-Index mit 110 war etwas höher als die restlichen Tumorentitäten. Der Medianwert des ben-Index lag bei 80,00, des ds-Index bei 17,50, des em-Index bei 15,00 und des ter-Index ebenfalls bei 15,00 (siehe Tabelle 14).

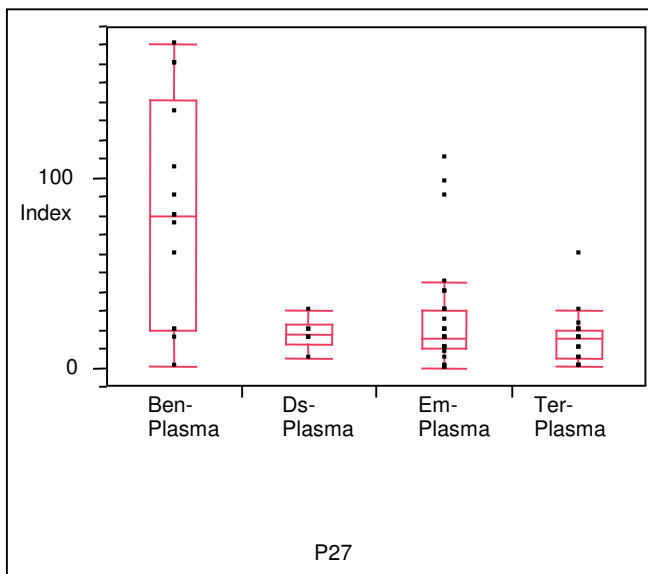


Abbildung 16: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmatischer p27^{kip1} Färbung

Die einfaktorielle ANOVA Varianzanalyse zeigte einen Wahrscheinlichkeitswert $p < 0.0001$. Somit unterschieden sich die Indizes der benignen Proben von den Tumorproben statistisch signifikant.

Tabelle 14: Minimum-, Maximum- sowie Medianwerte für zytoplasmatisches p27^{kip1}

p27 ^{kip1}	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Plasma	1,00	80,00	170,00
ds-Index Plasma	5,00	17,50	30,00
em-Index Plasma	0,00	15,00	110,00
ter-Index Plasma	1,00	15,00	60,00

Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der SEM Wert berechnet. Der Mittelwert des Index der benignen Areale im Zytoplasma lag bei

83,64 und somit signifikant höher als bei den Tumorarealen, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 15,66 und 26,39 bewegten (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert von zytoplasmatischem p27^{kip1}

p27 ^{kip1}	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Plasma	14	83,64	57,21	15,29
ds-Index Plasma	6	17,50	8,22	3,35
em-Index Plasma	27	26,39	29,12	5,60
ter-Index Plasma	16	15,66	14,63	3,66

Der durchgeführte Tukey-Kramer Test ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen ($p < 0,05$). Insgesamt war die zytoplasmatische Expression von p27^{kip1} in allen drei Tumor-Untergruppen signifikant reduziert.

3.7. Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von p27^{kip1}

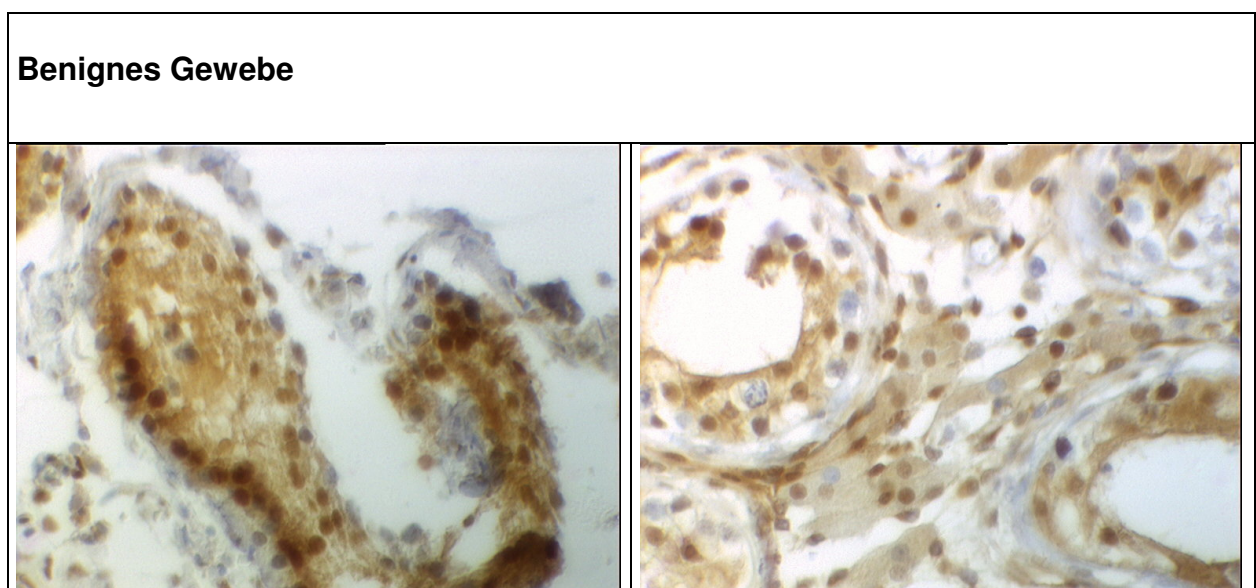


Abbildung 17 : benignes Hodengewebe, p27^{kip1}, 150fache Vergrößerung

Abbildung 18 : benignes Hodengewebe, p27^{kip1} 150fache Vergrößerung

Embryonalkarzinom

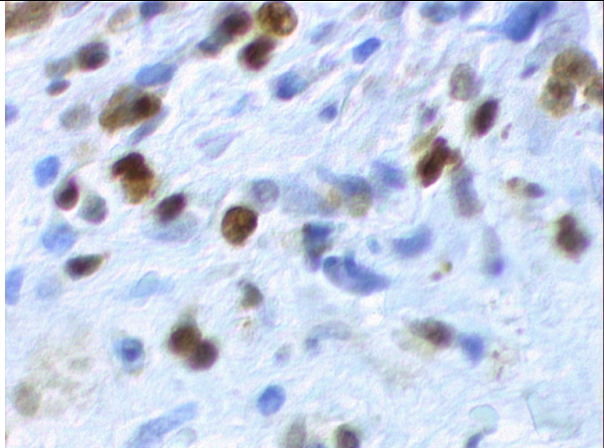
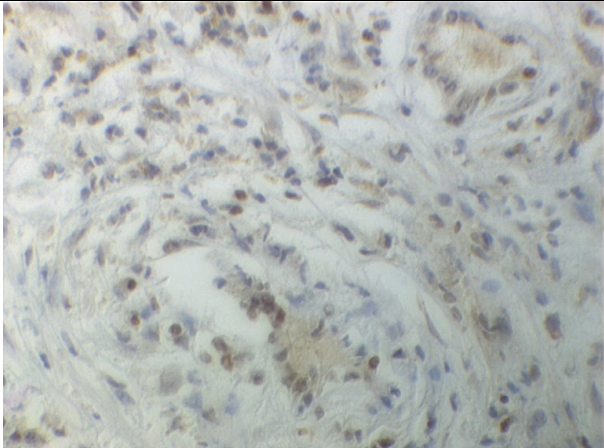


Abbildung 19: Embryonalkarzinom, p27^{kip1} 150fache Vergrößerung

Abbildung 20: Embryonalkarzinom, p27^{kip1} 400fache Vergrößerung

Embryonalkarzinom und Teratom

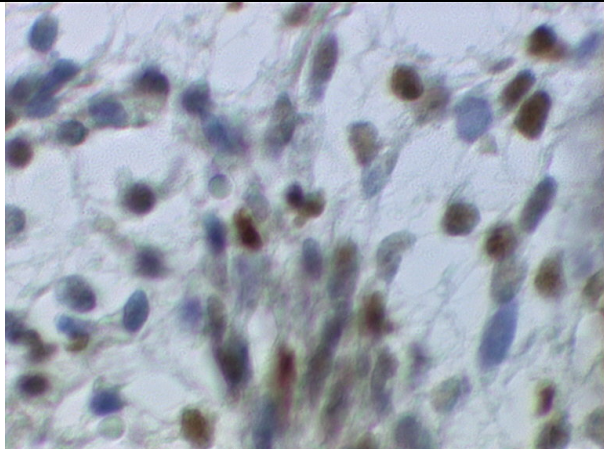
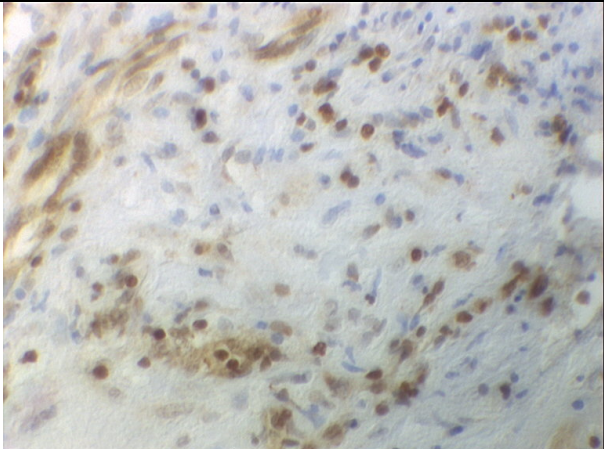


Abbildung 21: Embryonalkarzinom, p27^{kip1} 150fache Vergrößerung

Abbildung 22: Teratom, p27^{kip1} 400fache Vergrößerung

Teratom

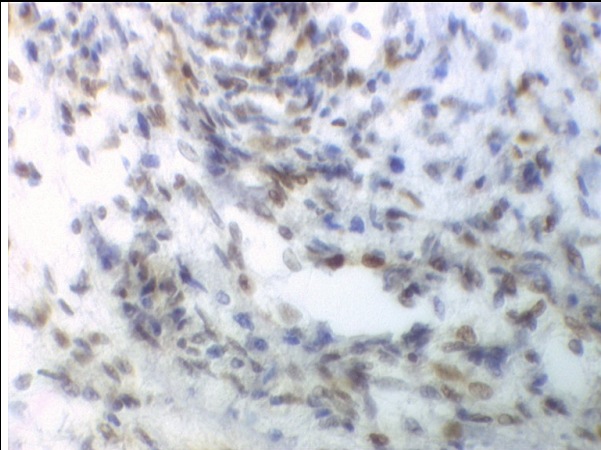


Abbildung 23: Teratom, p27^{kip1}, 150fache Vergrößerung

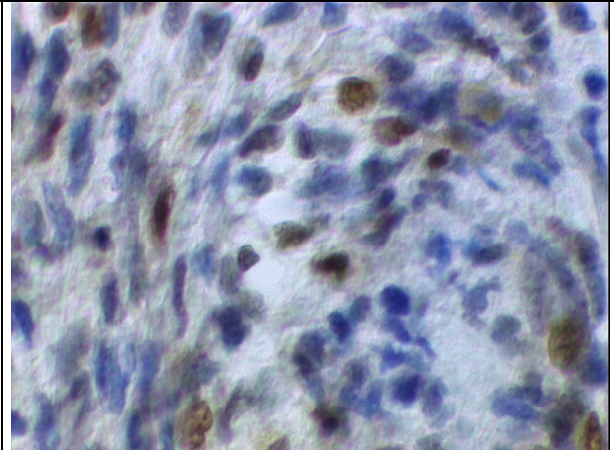


Abbildung 24: Teratom, p27^{kip1}, 400fache Vergrößerung

3.8. Immunhistochemische Untersuchung von nukleärem p-AKT

Hierbei wurden die Indizes von 57 Gewebearealen untersucht, worunter 12 benigne Gewebeareale fielen, sowie 6 Dottersacktumore, 24 Embryonalzellkarzinome und 15 Teratome.

Die Maximalwerte der Indizes im Kern von benignen Arealen und Tumorarealen unterschieden sich kaum, so lag der Maximalwert des ben-Index bei 110,00, des ds-Index bei 137,50, des ter-Index bei 90,00 und des em-Index bei 140,00. Der Medianwert des ben-Index im Kern lag bei 47,50, des ds-Index bei 50,00, des em-Index bei 27,50 und des ter-Index bei 60,00 (siehe Tabelle 16).

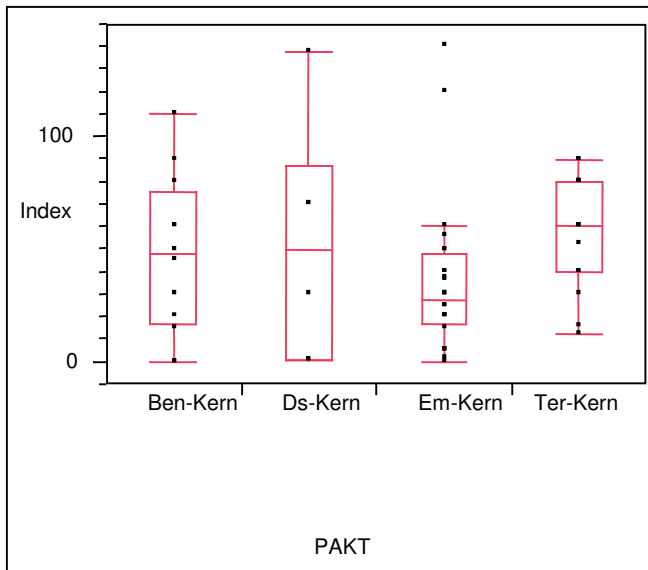


Abbildung 25: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei nukleärer p-AKT Färbung

Die einfaktorielle ANOVA Varianzanalyse zeigte einen Wahrscheinlichkeitswert $p < 0.2525$ und war somit statistisch nicht signifikant.

Tabelle 16: Minimum-, Maximum- sowie Medianwerte p-AKT im Kern

p-AKT	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Kern	0,00	47,50	110,00
ds-Index Kern	1,00	50,00	137,50
em-Index Kern	0,00	27,50	140,00
ter-Index Kern	12,00	60,00	90,00

Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der SEM Wert der Indizes berechnet. Der Mittelwert des Index der benignen Areale im Kern lag bei 46,67 und entsprach annähernd den Werten der Tumoreareale, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 35,48 und 58,03 bewegten (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert p-AKT im Kern

p-AKT	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Kern	12	46,67	35,31	10,19
ds-Index Kern	6	51,58	52,24	21,33
em-Index Kern	24	35,48	33,87	6,91
ter-Index Kern	15	58,03	25,83	6,67

Der durchgeführte Tukey-Kramer Test ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebearale mit den Tumorarealen. Insgesamt war die Kern-Expression von p-AKT in allen drei Tumor-Untergruppen nicht signifikant reduziert. Somit unterschieden sich die Indizes der benigne Areale von den Tumorarealen nicht signifikant.

3.9 Immunhistochemische Untersuchungen von zytoplasmatischem p-AKT

Die untersuchten 57 Gewebearale (12 benigne, 6 Dottersacktumoren, 24 Embryonalkarzinome, 15 Teratome) zeigten alle ein ähnliches Anfärbeverhalten und eine ähnliche prozentuale Verteilung, so dass sich die Medianwerte der Indizes im Zytoplasma kaum unterschieden. Die Maximalwerte der Indizes im Zytoplasma lagen in ähnlichen Bereichen (ben-Index 82,50, ds-Index 80,00, ter-Index 80,00), der Maximalwert des Embryonalkarzinomgewebes lag mit 140,00 über den anderen Werten. Die Medianwerte der verschiedenen Indizes waren folgende: Er lag beim ben-Index bei 27,50, beim ds-Index bei 10,00, beim em-Index bei 10,00 und beim ter-Index bei 10,00 (siehe Tabelle 18).

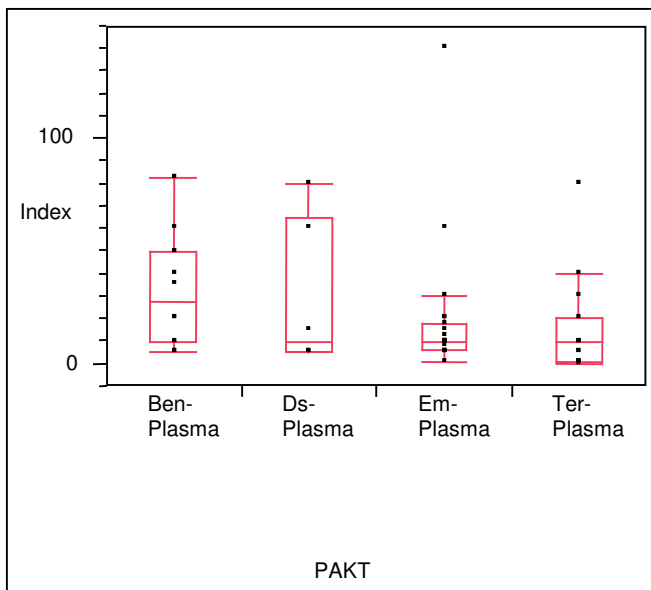


Abbildung 26: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmatischem p-AKT Färbung:

Die einfaktorielle ANOVA Varianzanalyse zeigte einen Wahrscheinlichkeitswert $p < 0.3125$ und war somit statistisch nicht signifikant.

Tabelle 18: Minimum-, Maximum- sowie Medianwerte von zytoplasmatischem p-AKT

p-AKT	Minimum	Median	Maximum
ben-Index Plasma	5,00	27,50	82,50
ds-Index Plasma	5,00	10,00	80,00
em-Index Plasma	1,00	10,00	140,00
ter-Index Plasma	0,00	10,00	80,00

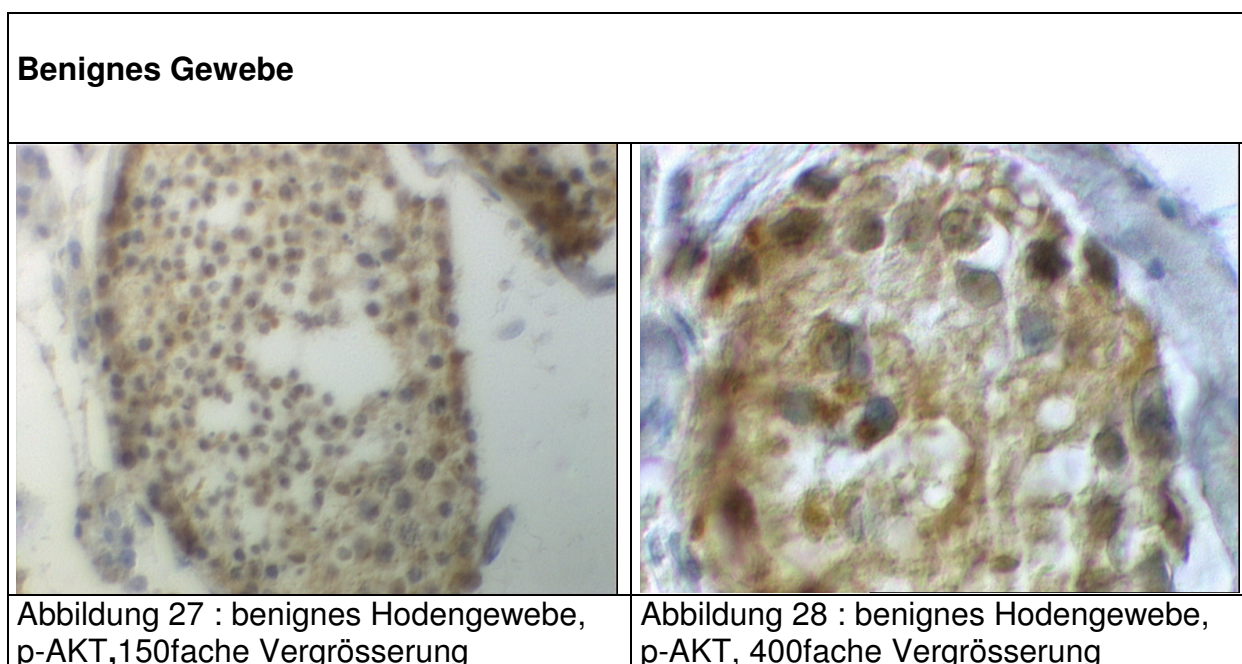
Ferner wurden die Mittelwerte, Standardabweichung und der SEM-Wert der Indizes berechnet. Der Mittelwert des Index der benignen Areale im Zytoplasma lag bei 32,29 und entsprach annähernd den Werten der Tumoreale, bei denen sich die Mittelwerte zwischen 14,93 und 28,33 bewegten (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM-Wert von zytoplasmatischem p-AKT

p-AKT	Anzahl	Mittelwert	SD	SEM
ben-Index Plasma	12	32,29	24,81	7,16
ds-Index Plasma	6	28,33	33,12	13,52
em-Index Plasma	24	18,29	28,48	5,81
ter-Index Plasma	15	14,93	21,40	5,52

Der durchgeführte Tukey-Kramer Test ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der benignen Gewebeareale mit den Tumorarealen. Insgesamt war die Zytoplasma- Expression von p-AKT in allen drei Tumor-Untergruppen nicht signifikant reduziert.

3.10 Beispielhafte Bilder immunhistochemischer Untersuchungen von p-AKT



Dottersacktumor

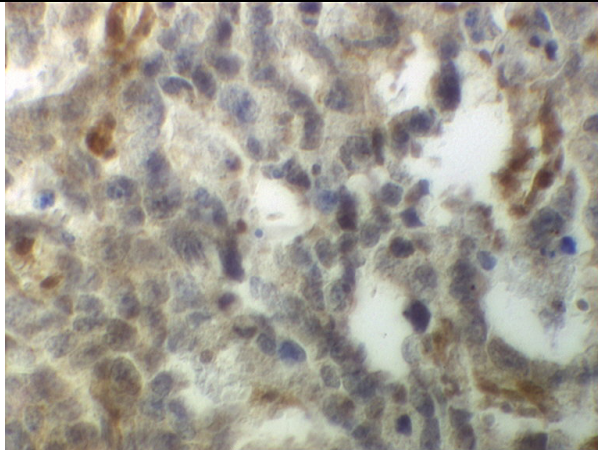


Abbildung 29: Dottersacktumor, p-AKT, 150fache Vergrößerung

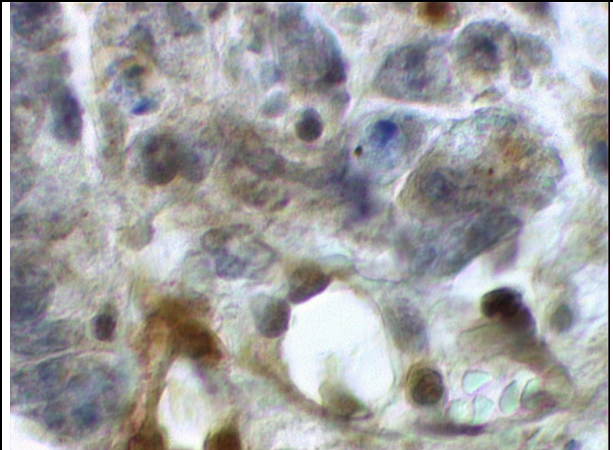


Abbildung 30: Dottersacktumor, p-AKT, 400fache Vergrößerung

Embryonalkarzinom

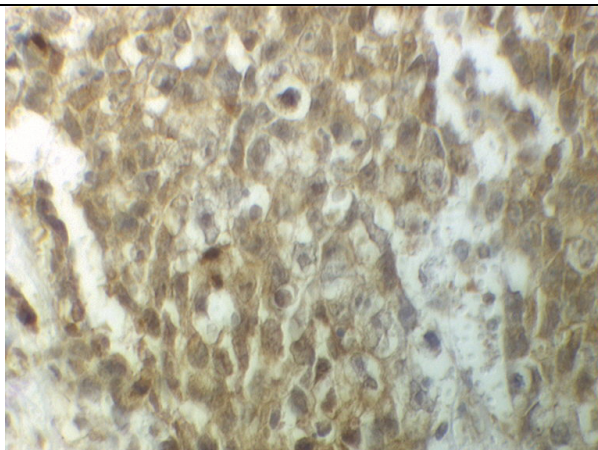


Abbildung 31: Embryonalkarzinom, p-AKT, 150fache Vergrößerung

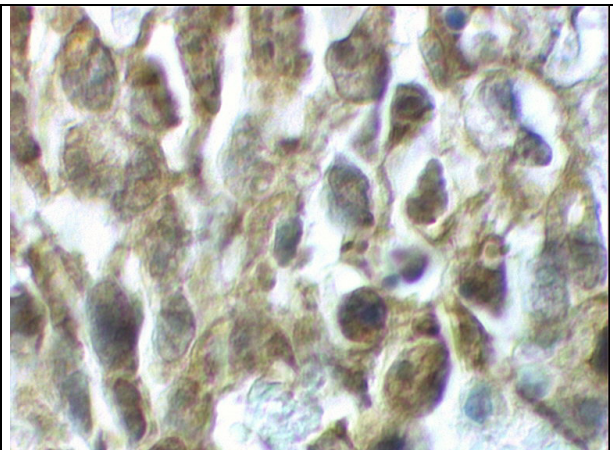


Abbildung 32: Embryonalkarzinom, p-AKT, 400fache Vergrößerung

Teratom

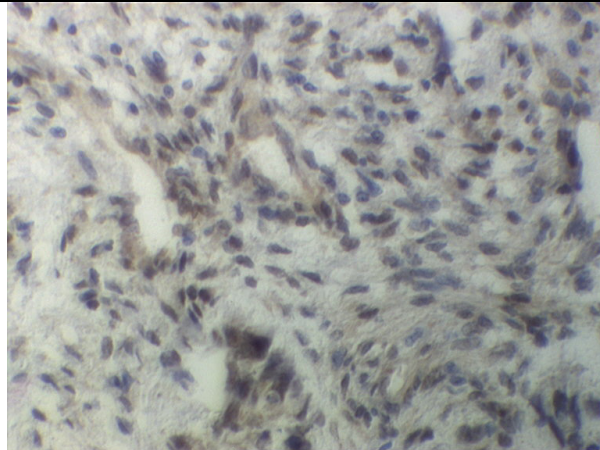


Abbildung 33: Teratom, p-AKT, 150fache Vergrößerung

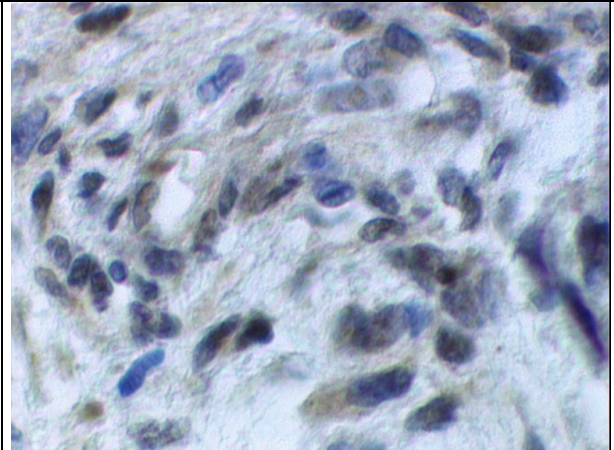


Abbildung 34: Teratom, p-AKT, 400fache Vergrößerung

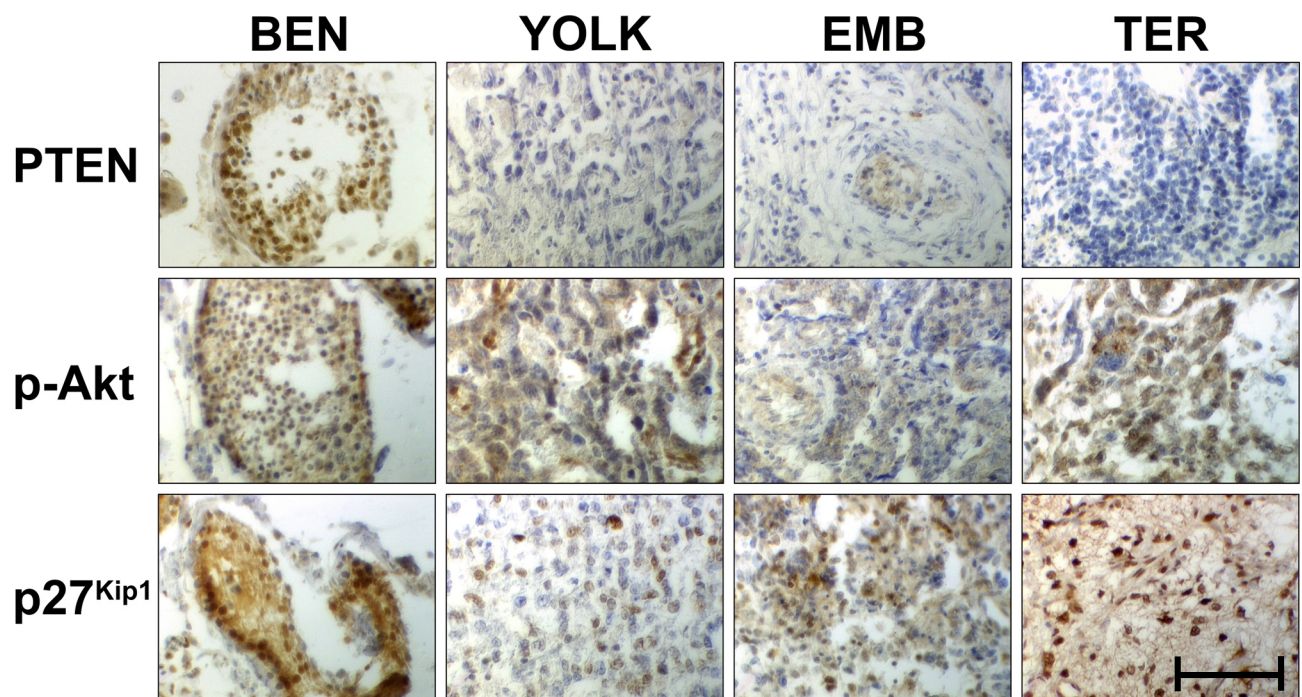


Abbildung 35: Gesamtübersicht der immunhistochemischen Untersuchungen
 BEN = benignes Hodengewebe, YOLK = Yolk Sac Tumor (Dottersacktumor),
 EMB = Embryonalkarzinom, TER = Teratom, Massstab = 100µm,
 Vergrößerung: x 150

Tabelle 21: Gesamtübersicht der Mittelwerte plus SEM bei allen Färbungen im Vergleich Kern und Zytoplasma

		PTEN MW ± SEM	p27^{kip1} MW ± SEM	p-AKT MW ± SEM
Kern	Benigne	56,60 ± 21,12	105,61 ± 18,10	46,67 ± 10,19
	Dottersacktumor	1,200 ± 0,37	34,50 ± 9,29	51,58 ± 21,33
	Embryonalzellkarzinom	1,35 ± 0,54	65,60 ± 9,24	35,48 ± 6,91
	Teratom	8,66 ± 4,86	93,67 ± 18,15	58,03 ± 6,67
Zytoplasma	Benigne	56,00 ± 21,08	83,64 ± 15,29	32,29 ± 7,16
	Dottersacktumor	2,40 ± 1,91	17,50 ± 3,35	28,33 ± 13,52
	Embryonalzellkarzinom	2,58 ± 0,87	26,39 ± 5,60	18,29 ± 5,81
	Teratom (ter- Index)	12,04 ± 4,12	15,66 ± 3,66	14,93 ± 5,52

Tabelle 22: Gesamtübersicht Minimum- und Maximalwerte bei allen Färbungen im Vergleich Kern und Zytoplasma

		PTEN Min-Max	p27^{kip1} Min-Max	p-AKT Min-Max
Kern	ben- Index	1,00-160,00	1,00-180,00	0-110,00
	ds- Index	0-2,00	2,00-60,00	1,00-137,50
	em- Index	0-10,00	0-170,00	0-40,00
	ter- Index	0-60,00	10,00-270,00	12,00-90,00
Zytoplasma	ben- Index	0-160,00	1,00-170,00	5,00-82,50
	ds- Index	0-10,00	5,00-30,00	5,00-80,00
	em- Index	0-20,00	0-110,00	1,00-140,00
	ter-Index	0-40,00	1,00-60,00	0 -80,00

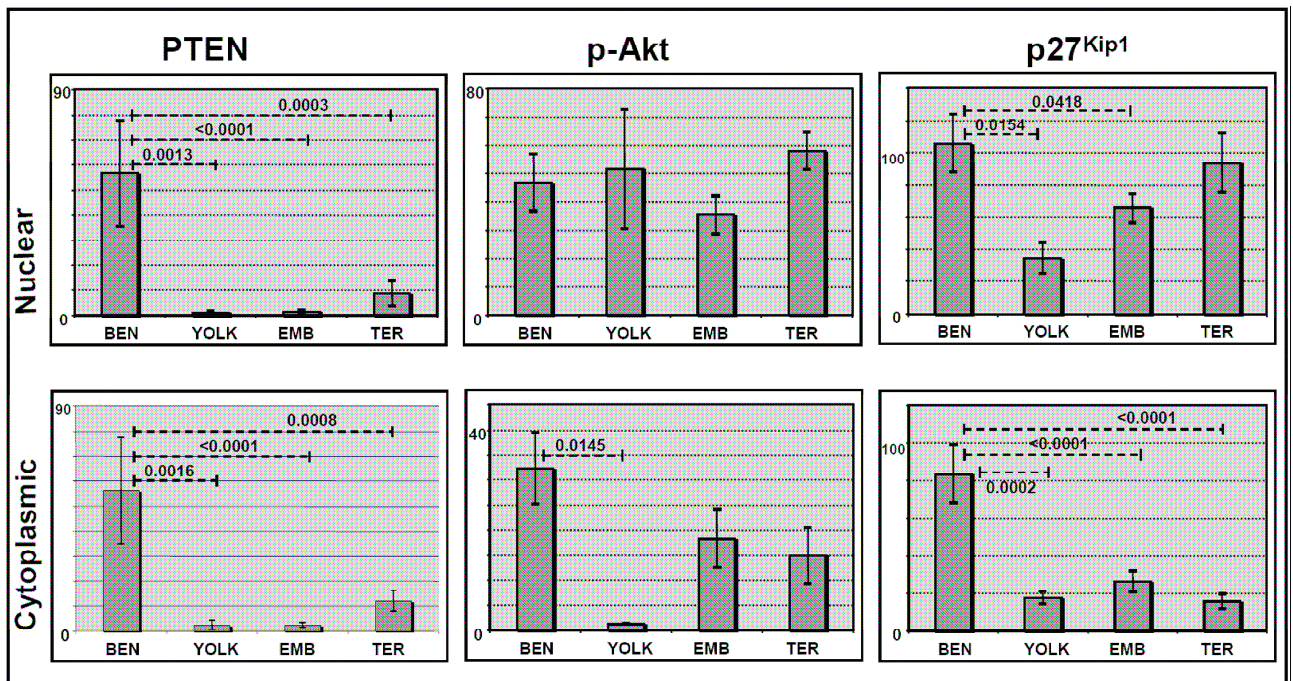


Abbildung 36: Zusammenfassung der durchschnittliche Anfärbbarkeit der Tumorsubgruppen für PTEN, p-AKT, p27^{Kip1} (Färbungs-Score: prozentualer Anteil der positiven Zellen x Intensität der Färbung). Signifikanzen des Student t-Tests zwischen den Paaren sind dargestellt.

3.11 Korrelate

Mittels linearer Regressionsanalysen von nukleärem und zytoplasmatischem p27^{Kip1}, PTEN und p-AKT wurde sowohl in den benignen Hodengewebe, als auch in sämtlichen Tumoruntergruppen (Dottersacktumoren, Embryonalkarzinomen und Teratomen) die jeweilige kernständige Expression mit der zytoplasmatischen Expression verglichen. In den unten genannten Ausführungen sollen die jeweiligen Resultate kurz skizziert werden.

3.12 Korrelate der Indizes für benignes Gewebe

Mittels linearer Regressionsanalyse von nukleärem und zytoplasmatischem p27^{Kip1} in benignen Hodenparenchyomen wurde die jeweilige nukleäre

Expression mit der zytoplasmatischen verglichen. Bei n=14 Gewebeproben betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,694 ($p < 0.0002$) und war somit statistisch signifikant.

Bei der Untersuchung von PTEN in benignen Hodenparenchymen zeigte sich bei n=10 Gewebeproben betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,600 ($p < 0.0084$) und war somit statistisch signifikant. .

Bei p-AKT in benignen Hodenparenchymen ergab sich bei n=12 Gewebeproben betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,355 ($p < 0.0409$) und war somit ebenfalls statistisch signifikant.

3.13 Korrelate für Dottersacktumoren

Mittels linearer Regressionsanalyse von nukleärem und zytoplasmatischem p27^{kip1} in Dottersacktumoren wurde die jeweilige nukleäre Expression mit der zytoplasmatischen verglichen. Bei n=6 Gewebeproben betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,091 ($p < 0.5604$) und war statistisch nicht signifikant.

Bei der Untersuchung von PTEN in Dottersacktumoren (n=5 Gewebeproben) betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,282 ($p < 0.3573$) und war statistisch nicht signifikant.

Bei p-AKT in Dottersacktumoren betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung bei n=6 Gewebeproben 0,020 ($p < 0.7904$) und war somit statistisch ebenfalls nicht signifikant.

3.14 Korrelate für Embryonalkarzinome

Mittels linearer Regressionsanalyse von nukleärem und zytoplasmatischem p27^{kip1} in Embryonalzellkarzinomen wurde die jeweilige nukleäre Expression mit der zytoplasmatischen verglichen. Bei n=27 Gewebeproben betrug der

Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,378 ($p < 0.0006$) und war statistisch signifikant.

Bei der Untersuchung von PTEN in Embryonalzellkarzinomen betrug bei $n=26$ Gewebeproben der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,011 ($p < 0.6119$) und war statistisch nicht signifikant.

Bei p-AKT in Embryonalzellkarzinomen ($n=24$ Gewebeproben) betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,308 ($p < 0.0049$) und war somit statistisch signifikant.

3.15 Korrelate für Teratome

Mittels linearer Regressionsanalyse von nukleärem und zytoplasmatischem p27^{kip1} in Teratomen wurde die jeweilige nukleäre Expression mit der zytoplasmatischen verglichen. Bei $n=16$ Gewebeproben betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,127 ($p < 0.1762$) und war statistisch nicht signifikant.

Bei der Untersuchung von PTEN in Teratomen betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung bei $n=13$ Gewebeproben 0,125 ($p < 0.2358$) und war statistisch nicht signifikant.

Bei p-AKT in Teratomen ($n=15$ Gewebeproben) betrug der Korrelationskoeffizient der Geradenanpassung 0,008 ($p < 0.7488$) und war statistisch nicht signifikant.

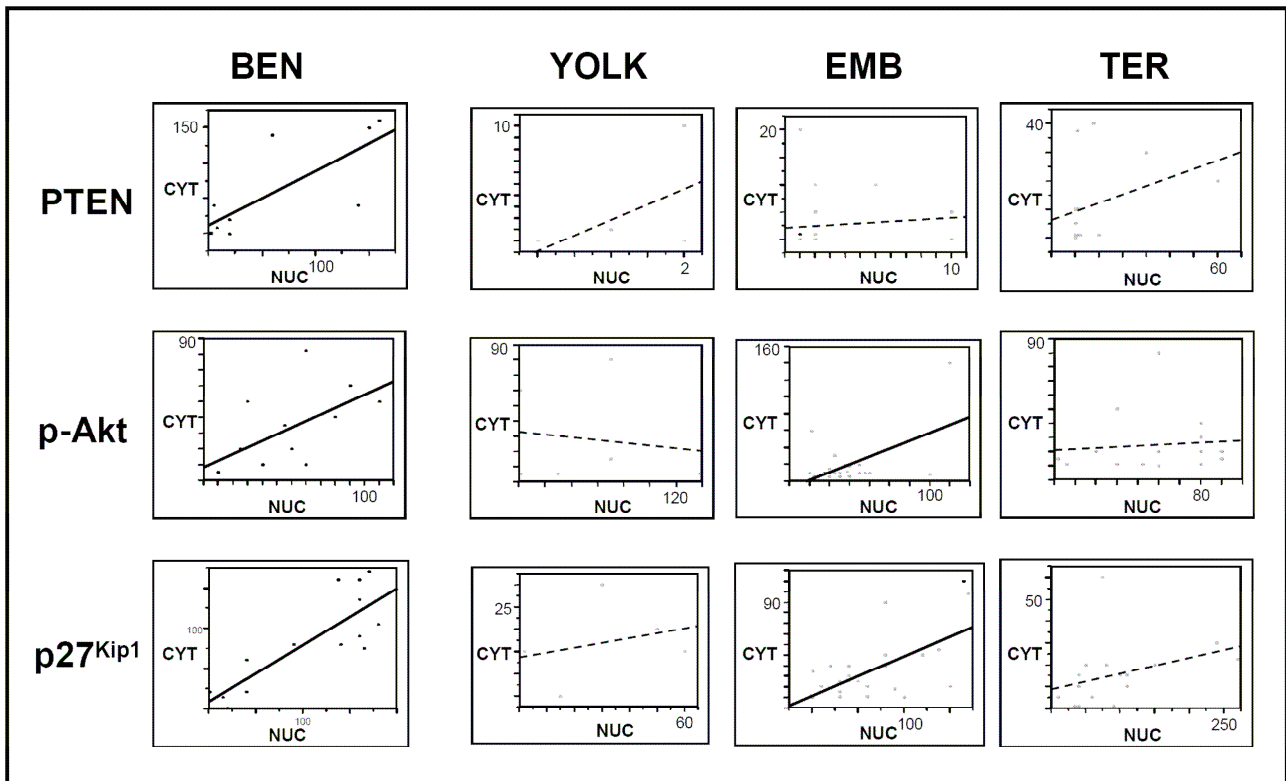


Abbildung 37: Gesamtübersicht der Korrelate (BEN = Benigne, YOLK = Yolk Sac Tumor (≅ Dottersacktumor), EMB = Embryonalkarzinom, TER = Teratom

In der oben gezeigten Abbildung werden die Korrelate der jeweiligen Kernexpression (aufgetragen in der Abszisse) mit der zytoplasmatischen Expression (aufgetragen auf der Ordinate) aufgezeigt. Signifikante Korrelationen sind als durchgezogene Linie dargestellt, nichtsignifikante als gestrichelte Linie.

4. Diskussion

4.1 Der PKB/AKT-Signalweg

Um die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext des AKT Signalwegs einzuordnen, soll hier näher auf diesen Signalweg eingegangen werden. Ein besonderes Augenmerk wird auf die in der Arbeit untersuchten $p27^{kip1}$, PTEN und p-AKT gelegt werden, über die sich dieser Signalweg definiert [81].

Der PI3K Signalweg spielt eine grosse Rolle im Zellwachstum, der Proliferation und dem Zellüberleben [82] und ist in vielen Tumorarten als verändert beschrieben [83]. Mittlerweile sind verschiedene genomische Veränderungen bei multiplen Genen in diesem Signalweg bekannt. Diese schliessen das Tumorsuppressorgen PTEN ein, wobei die Gene durch Mutationen oder Verlust im vielen sporadischen Krebsarten nachgewiesen werden konnten [84].

PI3K triggert die Signale mehrerer bekannter Signalwege und fördert insgesamt das Zellwachstum und Überleben der Zellen. PTEN wirkt dem entgegengesetzt und führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose [85]. Die genauen Faktoren, wie PTEN den Zellzyklusarrest induziert, sind noch nicht gänzlich erforscht. Jedoch scheint eine der Zielstrukturen von PTEN der $p27^{kip1}$ cyclinabhängige Kinaseinhibitor zu sein. PTEN regt eine $p27^{kip1}$ Expression an und fördert so eine Komplexbildung mit Cyclin E. Dies wiederum reduziert die Aktivität der Cyclin-dependent-Kinase 2 (CDK 2) und resultiert in einer erniedrigten Phosphorylierung von retinoblastoma protein (Rb). Die Verminderung von Rb führt dann zu einem Stillstand im Zellzyklus und damit zu einem Zellzyklusarrest. Eine weitere Möglichkeit der Zellzykluskontrolle durch PTEN kommt durch eine Hemmung der Cyclin D1 Anhäufung zustande. AKT phosphoryliert glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) was zu dessen Inaktivierung führt, die aktive Form von GSK 3 phosphoryliert Cyclin D1 mit dem Ziel der Erniedrigung eben jener Substanz. AKT scheint die Cyclin D1 Anhäufung zu unterstützen. Mittels dieser Modelle wird beschrieben, dass PTEN eine Gegenspielerfunktion zu AKT besitzt.

PTEN wird also allgemein als ein negativer Regulator des PI3K/AKT Signalweges gesehen und diese Inhibierung stellt eine wichtige Rolle von PTEN

als Tumorsuppressorgen dar [86]. Dabei wird häufig der Verlust und Mutationen als Ursache der Fehlregulierungen von PTEN beschrieben.

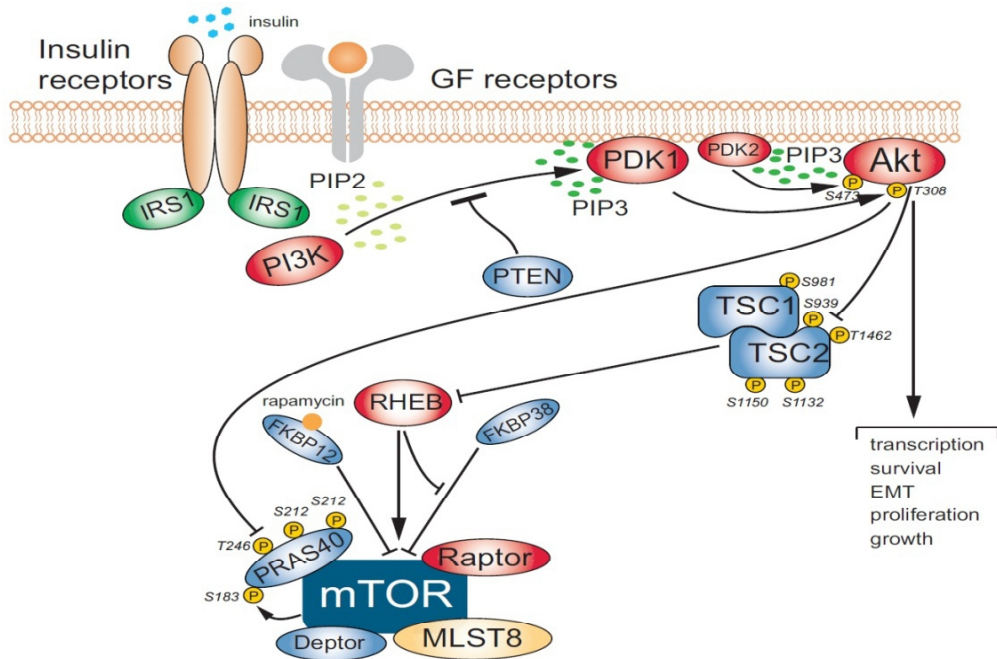


Abbildung 38: Inhibition des PKB/Akt Signalweges durch PTEN [87].

4.2 PTEN

Die Auswertungen beim nichtseminomatösen Hodenkarzinom in dieser Arbeit zeigten einen signifikanten Unterschied bei der Anfärbarkeit und prozentualen Verteilung sämtlicher Tumoruntergruppen im Vergleich mit dem benignen Gewebe. So war der Mittelwert der Indizes bei PTEN im Kern von benignen Gewebeproben bei 56.60 (Zytoplasma 56.00) im Vergleich dazu bei den Dottersacktumoren im Kern 1.20 (Zytoplasma 2.40), Embryonalkarzinomen im Kern 1.34 (Zytoplasma 2.57) und Teratomen im Kern 8.65 (Zytoplasma 12.03). Hierbei zeigt sich eine eindeutige Reduktion von PTEN sowohl im Kern als auch im Zytoplasma bei den Tumorgeweben im Vergleich zu den benignen Proben. Diese Ergebnisse decken sich mit der aktuellen Literatur aus anderen

Malignomen, welche ebenfalls eine signifikante Verminderung aus der PTEN Proteinexpression im Tumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe zeigen. So findet sich z.B. ein Verlust von PTEN auch bei Blasenkrebs und geht dort sogar in frühen Stadien mit einem aggressiven Tumorwachstum einher [88].

Die Tumorsuppressoraktivität von PTEN wirkt antagonistisch auf die PI3K Signaltransduktion. PTEN Verlust resultiert dadurch in einem dysregulierten PI3K Signalweg, der wiederum zu einer Aktivierung nachgeschalteter Gene wie z.B. AKT und dem wiederum nachgeschaltetem p27^{kip1} führen soll. In allen 3 Tumoruntergruppen war ein dramatischer Verlust von PTEN mit einer erniedrigten Expression des in der Signalkaskade unter p-AKT stehenden p27^{kip1} Proteins zu sehen. Dieses Ergebnis entspricht der allgemeinen bislang bekannten Meinung des AKT Signalweges, so dass eine verminderte Funktion von p27^{kip1} zu einer gesteigerten Zellproliferation führt [89]. Veränderungen im PTEN/AKT Signalweg gelten daher als ein guter Marker für aggressives Tumorverhalten [90].

Beim Prostatakarzinom zeigt sich eine PTEN Proteinalteration sowohl in der Membran, im Zytoplasma als auch im Zellkern. In hormonabhängigen Prostatakarzinomen waren niedrige Level vom zytoplasmatischen PTEN mit einer kürzeren Zeitdauer bis zum Rezidiv assoziiert im Vergleich zu einer höheren PTEN Expression. Der Verlust von PTEN im Zellkern des hormonabhängigen Prostatakarzinoms war hier unabhängig mit dem krankheitsspezifischen Überleben assoziiert [91]. In einer Studie von Halvorsen [92] konnte gezeigt werden, dass in den histologischen Prostatapräparaten von Patienten nach radikaler Prostatektomie bei Prostatakarzinom ein Verlust bestimmter Zellregulationsproteine wie PTEN und p27^{kip1} mit einem höheren Aggressivitätsgrad des Tumors und damit auch mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergeht. Aktuelle Einschätzungen nehmen an, dass der PI3K/AKT Signalweg bei Prostatakarzinomen in 30-50% überreguliert ist, meist durch den Verlust von PTEN [93]. Ein Verlust von PTEN wird in der Mehrheit von Prostatakarzinom-Zelllinien sowie einer signifikanten Subpopulation

hormonrefraktärer Prostatakarzinome beobachtet. [94]. PTEN ist seit seiner Entdeckung als Tumorsuppressorgen, dessen Verlust oder Mutationen in mehreren Tumorarten beschrieben wurden, zu einem wichtigen Punkt der Signalkaskade des AKT/PKB-Signalweges geworden. Im Folgenden soll auf die Funktion und Regulation eingegangen werden und insbesondere, ob und wie Veränderungen oder Manipulationen von PTEN in der Krebstherapie verwendet werden könnten [95]. In der Zeit kurz nach der Entdeckung von PTEN als Tumorsuppressor ging man davon aus, dass PTEN lediglich im Zytoplasma lokalisiert sein soll [96]. Heutzutage ist es gut dokumentiert, dass PTEN ebenso auch im Zellkern lokalisiert ist und dort auch Funktionen wahrnimmt. So wurde PTEN in Neuronen [97] oder in Ösophaguskarzinomzellen (squamösen Zellkarzinomen) [98] oder in der intestinalen Mukosa nachgewiesen [99]. Generell gilt aber, dass die subzelluläre Lokalisation von PTEN ein wichtiger Parameter in der Zellphysiologie ist und die Translokation von Nukleärem PTEN ins Zytoplasma mit dem Auftreten von Krebserkrankungen assoziiert ist [100]. Der in dieser Arbeit gezeigte Verlust von PTEN in den nichtseminomatösen Hodentumoren scheint sich auf beide Kompartimente gleich auszuwirken. Kernständiges PTEN könnte zum Wachstumsarrest von p53 führen, während PTEN im Zytoplasma den Akt Signalweg negativ regulieren könnte [101]. Basierend auf diesen Daten sollte eine Verbindung mit der p53 Proteinfunktion mit der Reduktion von PTEN in nichtseminomatösen Hodentumoren diskutiert werden, besonders auch aus dem Grund, da p53 Alterationen häufig in Keimzelltumoren auftreten [102].

Beim Blasenkarzinom wurden Mutationen unter anderem von PI3KCA, AKT 1 und PTEN gefunden [103]. PTEN wurde sowohl in der Zellemembran, im Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden, wobei man annimmt, dass PTEN im Zellkern zusätzliche tumorsuppressive Funktionen ausführt [104].

Deletionen von 10q inklusive der PTEN Region sind in 24-58% der Fälle bei invasivem Blasenkarzinom gefunden worden [105,103].

Beim Blasenkarzinom findet sich häufig eine reduzierte PTEN Proteinexpression [106]. Zwei Studien beim Blasenkarzinom untersuchten die

Anfärbarkeit von PTEN vom Zytoplasma und vom Kern getrennt, wobei das Zytoplasma stärker anfärbte als der Kern. Die reduzierte PTEN Expression war signifikant mit dem Tumorstadium assoziiert [107].

Tatsächlich ist die Abwesenheit von nukleärem PTEN mit stärker aggressiven Tumorerkrankungen bzw. Tumorverläufen assoziiert. Diese These wird durch Untersuchungen bei Patienten mit Hautkrebs [108], kolorektalem Karzinom [109] und Fällen von grosszelligen B-Zell-Lymphomen [110] untermauert.

Bei Hirntumoren, insbesondere den am häufigsten vorkommenden Gliomen ist der Verlust von PTEN und die damit verbundene Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (epithelial growth factor (EGF Rezeptor), platelet-derived-growth-factor (PDGF Rezeptor) und vascular-epithelial-growth-factor (VEGF Rezeptor)) die am meisten bekannte molekulare Dysfunktion, die mit der Malignität assoziiert ist. PTEN interagiert an mehreren Schaltstellen der Rezeptortyrosinkinase-abhängigen (RTK) Signalkaskaden. Eine kombinierte RTK gezielte Therapie mit einem gezielten Effekt auf PTEN könnte therapeutische Vorteile haben [111].

Der Verlust von PTEN ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein schlechtes Outcome bei Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (non small cell lung cancer = NSCLC). Beim NSCLC ist p-AKT überexprimiert, während bei PTEN ein Verlust nachgewiesen werden konnte. Patienten mit einer p-AKT Expression und einem PTEN Verlust zeigten die schlechtesten 5 Jahres-Überlebensraten (JÜR) im Vergleich zu Patienten bei denen eine Reduktion und eine PTEN Expression nachgewiesen werden konnte [112].

Neben der allgemeinen Darstellung des PTEN Verlust-Modells werden allerdings auch gegensätzliche Darstellungen berichtet. So wird zum Beispiel beim Nierezellkarzinom beschrieben, dass PTEN eben nicht verloren geht [113]. Weiterhin scheinen diese Verluste immer nur für Teile der Tumoren zu gelten, es stellt sich nun die Frage, ob es innerhalb der Entitäten unterschiedliche molekulare Genesen gibt, oder ob PTEN in seiner Rolle als Tumorsuppressor sich als kompensatorischer Effekt gegen die Tumorlast

stemmt, damit überexprimiert wird und sein Verlust als Spätereignis gelten muss. Damit wäre seine prognostische Wertigkeit erklärt.

In dieser Kontroverse zeigen die nichtseminomatösen Hodentumoren in der vorliegenden Arbeit die klassisch angenommene Verhaltensweise eines Proteinverlustes. Eine Beteiligung von PTEN in der klassisch angenommenen Weise an der Tumorgenese von nichtseminomatösen Hodentumoren ist damit in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

Die Darstellungen der Interaktionen zwischen nukleärem und zytoplasmatischem PTEN zeigt, dass sich in benignen Hodengewebe die Verteilung zwischen nukleärem und zytoplasmatischem PTEN unabhängig der Expression relativ konstant darstellt, während diese konstante Verteilung bei Dottersacktumoren verloren geht. Dabei ist bei Embryonalkarzinomen und bei Teratomen ein Hinweis auf die Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von zytoplasmatischem PTEN gegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zum Verlust damit ein weiterer Mechanismus der PTEN Inaktivierung bei nichtseminomatösen Hodentumoren zu diskutieren ist.

4.3 p27^{kip1}

Der nächste untersuchte Antikörper p27^{kip1} war im Zytoplasma von benignen Präparaten mit einem Mittelwert des Index von 83,64 signifikant höher als bei den Tumorproben. Beim Dottersacktumor fand sich ein Mittelwert von 17,50, beim Embryonalkarzinom von 26,38, beim Teratom 15,65. Diese hier festgestellte Suppression von p27^{kip1} im Zytoplasma bei Tumoren deckt sich mit Teilen der gängigen Literatur. So ist bekannt, dass p27^{kip1} ein Tumorsuppressor ist und ein cyclinabhängiger Kinaseinhibitor (CKI), dessen Verlust zu einer Hyperplasie von Organen inklusive der Hoden und zu Krebs bei Mäusen führen kann. Indem p27^{kip1} an den Cyclin E/cdk2- Komplex bindet und diesen inhibiert wird der Übergang von der G1 zur S-Phase im Zellzyklus reguliert. Insgesamt führt die Abwesenheit von Inhibin und p27^{kip1} in Mäusen zu einer schnelleren Entstehung von testikulären Karzinomen und zu einem früheren Tod als bei der Abwesenheit von Inhibin alleine [114]. Es wird angenommen, dass niedrige

Level von p27^{kip1} ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt sind, wie man in Studien mit p27^{kip1} heterozygoten Mäusen, die haploinsuffizient für die Tumorsuppression sind, gezeigt hat [115].

Die in dieser Arbeit gefundene Akkumulation von p27^{kip1} im Kern war evident bei den Embryonalkarzinomen und Teratomen. Im Kontrast hierzu stand das Phänomen des Kernexports, welcher erstmals beim Mammakarzinom beschrieben wurde und nicht zuletzt zum Teil durch eine AKT Aktivierung verursacht wurde [116]. Es könnte jedoch auch sein, dass eine andere Signalsequenz in der Dedifferenzierung zum nichtseminomatösen Hodentumor involviert ist. Die zytoplasmatische Lokalisation von p27^{kip1} könnte ein Spätereignis bei der Tumorentstehung sein, was dadurch unterstützt wird, dass die zytoplasmatische Form von p27^{kip1} eine positive prognostische Signifikanz hat [117].

Untersuchungen beim Prostatakarzinom zeigten, dass in der normalen adulten Prostata p27^{kip1} vor allem von den sekretorischen Epithelien exprimiert wird. [118]. Besonders nach Androgenblockade und bei benigner Prostatahyperplasie kommen vermehrt Zellen ohne p27^{kip1} Expression, aber mit basalzellspezifischem Expressionsmuster zwischen luminalen Zellen und Basalzellschicht vor. Die fehlende p27^{kip1} Expression in den suprabasalen Epithelien könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich um eine Subpopulation von Zellen handelt, die auch ohne Androgenstimulation proliferieren [119]. Eine Dysregulation von p27^{kip1} könnte ein frühes Ereignis in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms sein. Immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass eine fehlende p27^{kip1} Expression auf Proteinebene mit einer schlechteren Prognose einhergeht [120].

Eine niedrige Expression von p27^{kip1} findet man generell in vielen menschlichen Tumorarten. Die Reduktion korreliert stark mit der Tumoraggressivität und bringt eine schlechte Prognose mit sich [121]. Dies wurde bei Brust- und Kolonkarzinomen, aber auch anderen Tumorentitäten demonstriert [122].

Beim Ovarialkarzinom geht eine hohe Expression von p27^{kip1} mit einem längeren disease-free-survival einher als bei Patientinnen mit niedriger p27^{kip1} Expression, womit p27^{kip1} ein prognostischer Faktor bei Ovarialkarzinomen

bezüglich des krankheitsfreien Überleben war, allerdings nicht bezüglich des Gesamtüberlebens [123].

Die Ergebnisse der Indizes von p27^{kip1} im Kern zeigten keine eindeutigen Unterschiede, wenn man die benignen mit den malignen Geweben verglich. So fand sich bei den benignen Gewebeproben ein Mittelwert von 105,60, von Dottersacktumoren von 34,50, bei Embryonalkarzinomen 65,59 und bei Teratomen von 93,68. Bei der Funktion von p27^{kip1} als Tumorsuppressorgen würde man eine Verminderung in Tumorzellen erwarten. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch auf, dass es durchaus Studien gibt, die mit einer p27^{kip1} Überexpression in Tumorzellen einhergehen.

So gibt es eine Korrelation zwischen einer hohen Expression von p27^{kip1}, die mit einer Überexpression von Cyclin D1 bei menschlichen Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* vergesellschaftet ist. In manchen hochproliferativen Brustkrebszellen war ein hohes Level von p27^{kip1} zu sehen, was dafür spricht dass es einen Mechanismus geben muss, wie manche wachsenden Tumorzellen diesen eigentlichen Inhibitor des Zellzyklus tolerieren müssen. Die höchsten p27^{kip1} Expressionen im Zellkern wurden in den Tumoren mit dem niedrigsten Malignitätsniveau gefunden. Um zu schauen, ob die inverse Korrelation zwischen der p27^{kip1} Expression und dem Malignitätsgrad auch in anderen menschlichen Tumorarten nachgewiesen werden konnte, wurden in Studien zusätzlich Kolonkarzinomgewebeproben untersucht. Hier fand sich ebenfalls häufig eine hohe Expression von p27^{kip1} im Zellkern bei den eher niedrig malignen Kolonkarzinomen im Stadium Dukes A und nur in wenigen Fällen eine Kernexpression im Stadium Dukes D [124].

In einer weiteren Studie [125] zur Untersuchung unter anderem von p27^{kip1} bei Rektumkarzinomgewebeproben fand sich ebenfalls, dass ein hoher Prozentsatz p27^{kip1} exprimierte, diese Expression war mit der Tumorgröße und der Cyclin D1 Expression assoziiert. p27^{kip1} konnte als Vorhersagewert für ein Tumorrezidiv genutzt werden. p27^{kip1} korrelierte allerdings nicht mit dem Krankheitsfreien Überleben.

Letztlich bleibt der genaue Wirkmechanismus der hohen Expression von p27^{kip1} im Zellkern von menschlichen Tumoren ungeklärt. Es könnte jedoch sein, dass die Expression von p27^{kip1} im Zellkern in Zukunft als prognostischer Faktor zur Vorhersage des Aggressivitätspotentials eines Tumors genutzt werden kann.

Die Darstellungen der Interaktionen zwischen nukleärem und zytoplasmatischem p27^{kip1} zeigt, dass sich in benignen Hodengeweben die Verteilung zwischen nukleärem und zytoplasmatischem p27^{kip1} unabhängig der Expression relativ konstant darstellt, während diese konstante Verteilung bei den Tumorentitäten verloren geht. Dabei ist bei Teratomen und Dottersacktumoren ein Hinweis auf die Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von zytoplasmatischem p27^{kip1} gegeben. Beim Mammakarzinom wird in einigen Studien eben genau solche zelluläre Situation, das heisst eine Translokation von p27^{kip1} ins Zytoplasma beschrieben. In diesen Fällen geht die Akkumulierung von p27^{kip1} im Zytoplasma mit einer hohen Tumoraggressivität und schlechtem Gesamtüberleben einher [126].

4.4 p-AKT

Bei den Untersuchungen des dritten verwendeten Parameters p-AKT fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilungen bei benignen Proben und den Tumorproben. So war der Mittelwert der Indizes im Kern bei den benignen Geweben 46,66, bei Dottersacktumoren bei 51,58, bei Embryonalkarzinomen 35,47 und bei den Teratomen 58,03. Auch im Zytoplasma konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Mittelwert der Indizes beim benignen Gewebe lag bei 32,29, Dottersacktumore 28,33, Embryonalkarzinome 18,29 und Teratome 14,93. Es liessen sich auch keine Subgruppen zuordnen.

Die aktuellen Literaturergebnisse sind indifferent, so finden sich einige Studien, die häufig eine Aktivierung von AKT in menschlichen Krebserkrankungen zeigen. Die AKT-Aktivierung findet entweder durch eine Überexpression oder durch Phosphorylierung statt, was dann in der G(2)/M Phase des Zellzyklus zu einer DNA Schädigung führen kann [127]. So fanden sich beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom erhöhte Level von AKT [128]. Auch bei

Patienten die an einem primären Prostatakarzinom litten und bei denen eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde, zeigte sich bei den meisten Patienten eine Überregulation und/ oder Phosphorylierung von PKB/AKT in den malignen Gewebeproben [129]. Beim Blasenkarzinom konnte eine Studie zeigen, dass phosphoryliertes AKT bei 55% der Tumorproben signifikant höhere Level zeigt als die Normalkontrolle [130]. Unkontrollierte PI3K/AKT/mTOR Signale können mit einem schlechten klinischen Outcome bei Patienten mit Lungen-, Cervix-, Ovarial- und Ösophaguskarzinom einhergehen [131,132,133,134]. Es wird berichtet, dass AKT Amplifikationen Cisplatinresistenzen bei Lungen-, Cervix- und Ovarialkarzinom hervorrufen können [131,132].

Beim Mammakarzinom fanden sich ebenfalls häufig erhöhte Expressionen von AKT-1. Interessanterweise kommt es bei einer Aktivierung von AKT-1 zusammen mit ErbB-2 im Mausmodell signifikant seltener zu einer Metastasierung als wenn nur ErbB-2 alleine aktiviert wurde. Das lässt darauf schliessen, dass AKT-1 in diesem Fall schützende Effekte auf das Tumorwachstum und auf die Metastasenbildung hat [135]. In einer aktuellen Studie fand sich jedoch auch Gegenteiliges zu der bisherigen Annahme, so zeigten Brustkrebszellen eine nur minimale AKT Aktivierung und auch in vielen PIK3CA mutierten Krebs-Zelllinien fand sich eine nur geringe AKT Aktivierung [136]. Letztendlich kam diese Studie zu dem Schluss, dass PIK3CA Mutationen die Tumorentstehung sowohl durch einen AKT-abhängigen als auch durch einen AKT-unabhängigen Mechanismus bedingen. In Abwesenheit von aktiviertem AKT könnte PDK1 alternative Signale wie z.B. die Serum glucocorticoid- regulated kinase 3 (SGK3) ins Rollen bringen. Die SGK Familie teilt sich bekanntermassen mehr als 50% der Identität mit der AKT Kinasen Domäne [137] und werden über eine Phosphorylierung des C-Endes zu Substraten der PDK1 [138]. Eben diese PDK1 abhängige SGK3 Aktivierung wurde in den PIK3CA mutierten Zellreihen gefunden [136]. Aus diesen gefundenen Ergebnissen lässt sich postulieren, dass die Hemmung von PI3K und/ oder PDK1 in manchen Fällen, was die Entwicklung neuer Substanzen zur

Tumorbekämpfung betrifft mehr Gewicht geschenkt werden sollte, als einer Hemmung von AKT.

Die Ergebnisse der dargelegten Arbeit würden den oben genannten Ausführungen entsprechen, so dass es sein könnte, dass p-AKT beim Hodenkarzinom eben nicht in überexprimierter Form vorliegen muss, sondern dass die gewonnenen Ergebnisse dafür sprechen, dass andere Signalkaskaden trotz ausbleibender Aktivierung von p-AKT in den Tumorzellen in die Wege geleitet werden. Ob es sich dabei um eine SGK3 Aktivierung handelt oder nicht, kann letztlich in diesem Fall nicht eruiert werden. Es wäre jedoch sicherlich sinnvoll in Zukunft diese Möglichkeit in Betracht zu ziehen und mit weiteren Untersuchungen gezielt diese anderen Mechanismen zu eruiieren.

Mausmodell Studien zeigen, dass einzelne Gendysfunktionen im PI3K/AKT Signalweg nicht ausreichen, um Krebs zu verursachen [139].

Genetische Variationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg können das Überleben bei Patienten mit metastasiertem Blasenkarzinom beeinflussen, es wurden sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs) als Prediktor für die Prognose untersucht, wobei AKT2/PI3KCA und RAPTOR signifikant mit dem Überleben assoziiert waren [140]. Beim Ösophaguskarzinom sind SNPs in AKT2 ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert [141].

4.5 „Zielgerichtete Therapien“

Nichtseminome gelten als chemotherapiesensibel und sprechen auf Cisplatin an. Hierbei können momentan sehr gute Heilungsraten erzielt werden. Auch bei einem Rezidiv oder mehreren Rückfällen besteht mit einer Salvage- oder Hochdosis-Chemotherapie die Chance auf eine Heilung. Bei refraktären Keimzelltumoren, die kein Ansprechen mehr auf cisplatinhaltige Therapien zeigen, können trotz alternativer Chemotherapeutika nur Langzeitüberleben von bis zu 10% erreicht werden können. Hier könnten dann neue, zielgerichtete Therapien ansetzen. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den AKT Signalweg bei Hodentumoren zu untersuchen und herauszufinden, ob und wie die Ergebnisse mit anderen Tumorarten korrelieren. Damit kann eine Abschätzung

erfolgen, inwieweit der Akt Signalweg an der Pathogenese von Hodentumoren beteiligt ist und ob potenziell die Möglichkeit besteht, zielgerichtete Therapien für Hodentumoren in Betracht zu ziehen.

Nachfolgendes Schaubild zeigt Inhibitoren des PI3K und verwandten Signalwegen, welche aktuell in klinischer Entwicklung sind. So gibt es von verschiedenen Herstellerfirmen gezielte Inhibitoren für AKT, z.B. Perifosine, MK2206, VQD002 und XL418m welche alle momentan in klinischer Erprobung sind.

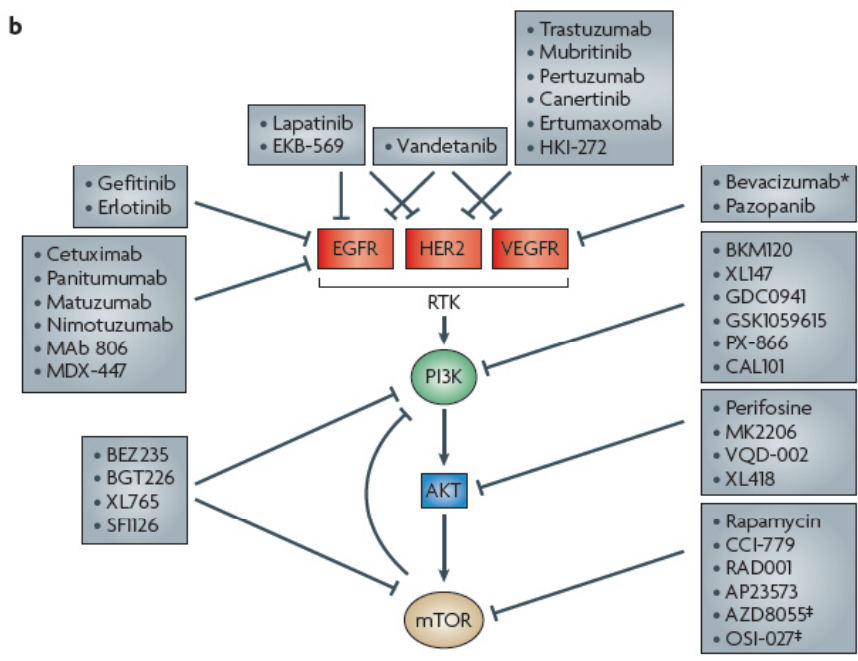


Abbildung 38: Inhibitoren des PI3K und verwandten Signalwegen, welche in klinischer Entwicklung sind. EGFR (epidermal growth factor receptor), ERK (extracellular signal-regulated kinase), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) [142].

Das nachfolgende Schaubild zeigt Inhibitoren, die an Zielstrukturen des AKT Signalwegs ansetzen. Sowohl Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), als auch von PI3K, AKT und mTOR haben klinische Trials erreicht. In neuerer Entwicklung sind duale Inhibitoren, die sowohl auf PI3K und RTKs oder PI3K und mTOR zielen und potentere therapeutische Effekte erzielen könnten [142].

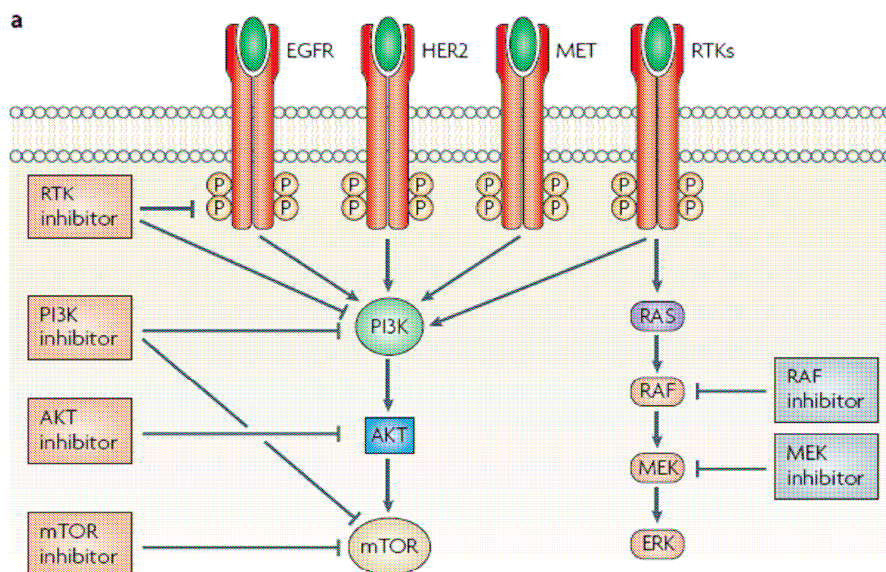


Abbildung 39: Inhibitoren, die an Zielstrukturen im Phosphoinositide 3-Kinase Signalweg ansetzen [142].

Aktuell finden sich in der aktuellen Literatur wenige abgeschlossene Studien die sich mit Tyrosinkinaseinhibitoren beim Hodenkarzinom beschäftigen. Eine Phase II Studie untersuchte Sunitinib bei Patienten mit rezidivierendem oder refraktärem Keimzelltumor, hierbei kann man sagen, dass Sunitinib recht gut verträglich war, jedoch kam es nur zu einer Tumormarkerstabilisierung und zu keinem Absinken der Tumormarker. Innerhalb von 3 Zyklen entwickelten alle Patienten ein Fortschreiten der Krankheit [143].

Die sogenannte SUITE-Studie ist eine aktuelle Phase II-Studie zur Prüfung von Sunitinib bei rezidivierten oder refraktären Hodentumoren. Es handelt sich hierbei um eine prospektive, nicht-randomisierte Phase II-Studie zu SUO11248 (Sunitinib) als Monotherapie bei Patienten mit rezidiviertem oder Cisplatin-refraktären Keimzelltumoren. Die Studie ist geschlossen, aktuelle Auswertungen liegen jedoch noch nicht vor [144]. Eine weitere Phase II Studie

untersucht den Tyrosinkinasehemmer Sorafenib beim Hodenkarzinom. Das Ziel dieser Studie [145] ist es, herauszufinden, ob mehrfach rezidivierende, chemotherapieresistente Patienten von der Sorafenib Monotherapie profitieren können.

Für ein komplettes Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib gibt es einen Fallbericht für einen Patienten mit einem chemotherapieresistenten Seminom, der nach der zusätzlichen Gabe von Imatinib zur Chemotherapie mit Paclitaxel, Oxaliplatin und Gemcitabine auch 36 Monate nach Ende der Therapie krankheitsfrei ist [146]. Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wird ebenfalls in einer Phase II Studie beim Hodenkarzinom untersucht. Ziel ist es die Effektivität von Imatinib bei der Behandlung von Patienten mit fortschreitendem, chemotherapie-resistentem oder rezidivierendem Stadium II oder III Hodenkrebs zu testen. Aktuelle Ergebnisse dieser Studie [147] und der anderen oben genannten Studien liegen noch nicht vor.

Insgesamt findet sich in der Medizin heutzutage eine enorme Zunahme und Entwicklung von sogenannten „zielgerichteter Therapien“ gerade im onkologischen Bereich [148]. So brachte zum Beispiel die Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ganz neue Ansätze [149]. Über eine Blockade des PDGF-Rezeptor und des VEGF-Rezeptor wird durch Tyrosinkinaseinhibitoren der Beginn der weiterführenden Enzymkaskade gehemmt und damit die Zellproliferation und Neoangiogenese verhindert.

Momentan gibt es nur wenige klinische Studien bezüglich der Tyrosinkinaseinhibitoren beim Hodentumor [149,150]. Jedoch gibt es wie oben bereits erwähnt, weltweit mehrere Phase II Studien, die sich mit Tyrosinkinaseinhibitoren bei malignen Keimzelltumoren beschäftigen.

Substanzen wie Bevacizumab zeigen beim metastasierten Kolorektalkarzinom oder Nierenzellkarzinom vielversprechende Ergebnisse. Aber auch beim fortgeschrittenen Nicht-Kleinzelligen Bronchuskarzinom, bei Hirntumoren, Ovarialkarzinomen gibt es viele Studien, die auf die Wirksamkeit von Angiogeneseinhibitoren eingehen. Der therapeutische Ansatz ergibt sich durch eben genannte Angiogeneseinhibitoren die durch Bindung an den VEGF-

Rezeptor den nachgeschalteten PKB/AKT/mTor Signalweg blockieren und damit die abnorm verlaufende Angiogenese hemmen. Da AKT bei vielen menschlichen Tumoren häufig überexprimiert wird, ist er ein idealer Angriffspunkt für neue Therapiemöglichkeiten. Es ist sicherlich eine Frage der Zeit, bis auch auf dem Gebiet der Hodentumoren Therapieansätze entstehen werden, die in klinischen Studien etabliert werden können, um irgendwann dem krebserkrankten Patienten zu helfen und vielleicht auch solchen, die bisher auf Chemotherapien resistent waren, eine Heilungschance zu ermöglichen. Aufgrund der enormen Fortschritte innerhalb der letzten Jahre gerade im Bezug auf Genexpressionsanalysen und der Entdeckung immer neuer Gene und Signalkaskaden sollte es möglich sein, in der Zukunft auch „zielgerichtete Therapien“ beim Hodenkarzinom zu entwickeln.

4.6 Schlussfolgerungen

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse der Arbeit mit aktuellen Studienergebnissen, die sich ebenfalls mit der Thematik des PKB/AKT-Signalweges beschäftigen, grösstenteils korrelieren, jedoch wurde der erwartete Anstieg von AKT nicht beobachtet; und die erwartete inverse Beziehung von PTEN zu p-AKT als auch von p-AKT zu p27^{kip1} ebenso nicht gefunden, wobei in der Ergebnisinterpretation dieser Arbeit die Fallzahlen mit zu berücksichtigen sind, was den Charakter einer Pilotstudie unterstreicht. Eine Bestätigung an einer grösseren Menge an Gewebeproben wäre sinnvoll. Unter Berücksichtigung der gefundenen Ergebnisse muss man annehmen, dass noch andere Signalwege in die AKT-Achse hineinspielen und bei der Entstehung von nichtseminomatösen Hodentumoren beteiligt sein müssen. Insgesamt gibt es, wie in der oben erfolgten Auswertung gezeigt, in der aktuellen Literatur teilweise widersprüchliche Aussagen, so dass es sicher weiterer Forschungsarbeit auf diesem Gebiet bedarf. Gerade bei urologischen Tumoren gibt es eine Vielzahl von Studien die sich mit dieser Thematik befassen, allerdings liegt der Schwerpunkt meist beim viel häufigeren Prostatakarzinom oder beim Nierenzellkarzinom. Beim metastasierten Nierenzellkarzinom ist man bei der

Entwicklung sogenannter „zielgerichteter Therapien“ viel weiter als bei den Hodenkarzinomen.

Ob Tyrosinkinaseinhibitoren beim refraktären Hodenkarzinom wirken, wird derzeit in mehreren Studien geprüft.

Die vorliegenden Ergebnisse legen allerdings nahe, dass Alterationen innerhalb dieses Signalwegs an der Tumorgenese von nichtseminomatösen Hodentumoren beteiligt sind. Damit ist eine potenzielle Wirksamkeit von dort angreifenden „molekularen zielgerichteten Therapien“ gegeben. Welche und in welchem Subkollektiv müssen nachfolgende Studien zeigen. Zumindest ist die für einen prediktiven Einsatz notwendige Biomarkereigenschaft für PTEN und p27^{kip1} hier gezeigt worden. Eine Biomarkereigenschaft des namengebenden AKT ist entsprechend einer Vielzahl publizierter Ergebnisse aus anderen Tumorentitäten auch beim nichtseminomatösen Hodentumor nicht gegeben. Dessen Aktivierung scheint damit eher über das Verhältnis AKT/ (p)-AKT und die zelluläre Lokalisation von (p-)AKT definiert zu sein.

Da für die prediktive Wertigkeit von Biomarkern zunehmend Markerkombinationen diskutiert werden [142] können als Bestandteile der Kombination, die zur Darstellung von AKT Beteiligung herangezogen werden können, zumindest für die nichtseminomatösen Hodentumoren nach der vorliegenden Arbeit PTEN und p27^{kip1} vorgeschlagen werden.

5. Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die immunhistochemische Untersuchung der Signalkaskade der Proteinkinase-B (AKT) vermittelten Proteine PTEN, p-AKT und p27^{Kip1} in nichtseminomatösen Hodentumoren, nicht zuletzt auch unter dem Gesichtspunkt, auf zukünftige, neue, zielgerichtete therapeutische Möglichkeiten einzugehen. Das Expressionsverhalten von PTEN, p-AKT und p27^{Kip1} wurde durch immunhistochemische Untersuchungen an dem Gewebematerial von insgesamt 17 Teratomen, 27 Embryonalzellkarzinomen, 6 Dottersacktumoren und 24 benignen Hodengewebe dokumentiert. Die zytoplasmatische und korrespondierende nukleäre Verteilung der jeweiligen Marker wurden miteinander verglichen und mit der jeweiligen Tumorentität korreliert. Die Ergebnisse lieferten zum einen eine deutliche Reduktion von PTEN in allen Subgruppen der nichtseminomatösen Hodentumoren. Ferner fanden sich in Teratomen und Embryonalzellkarzinomen konzentrierte, hohe nukleäre p27^{Kip1} Werte und gleichzeitig der Verlust der zytoplasmatischen Form. In dieser Arbeit wurde weder eine veränderte noch eine negative AKT Regulierung gefunden. Die Dottersacktumoren zeigten eine späte zytoplasmatische Verlagerung von PTEN und p27^{Kip1}.

Als Ergebnis kann man festhalten, dass sowohl die fehlende Überexpression von p-AKT als auch die fehlende negative Korrelation zu PTEN und p27^{Kip1} andeuten, dass der Signalweg dieser Parameter bei den nichtseminomatösen Hodentumoren eher zusätzliche Mechanismen wie zum Beispiel eine Verbindung zu anderen Signalwegen einschliessen muss, als die klassische bei anderen Tumoren bekannte AKT Aktivierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit einen Überblick über die 3 genannten Parameter bei der AKT Signalkaskade liefert und einen Beitrag dazu leistet, dass sich auch in Zukunft die Forschung mit neuen, zielgerichteten Therapien beim nichtseminomatösen Hodentumor beschäftigt.

6. Literaturverzeichnis

1. **Huyghe E.**, Matsuda T., and Thonneau P.: Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J. Urol.* 170 (1):5-11, 2003
2. **Garner M.J.**, Turner M.C., Ghadirian P. Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int. J. Cancer* 116 (3):331-339, 2005
3. **Zheng T.**, Holford T.R. Continuing increase in incidence of germ-cell testis cancer in young adults: experience from Connecticut, USA, 1935-1992. *Int J Cancer* (65):723-729, 1996
4. **Ekbom A.**, Akre O.: Increasing incidence of testicular cancer- birth cohort effects. *APMIS* 206(1):225-229, 1998
5. **Levi F.**, La Vecchia C., Boyle P. Western and eastern European trends in testicular cancer mortality. *Lancet* 357 (9271):1853-1854, 2001
6. **Hendersin B.E.**, Benton B., Jing J. Risk factors for cancer of the testis in young men. *Int J. Cancer* (23):598-602, 1979
7. **Raman J.D.**, Nobert C.F., Goldstein M. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J. Urol.* 174 (5):1819-1822, 2005
8. **Nicholson P.W.**, Harland S.J. Inheritance and testicular cancer *Br J Cancer* (71):421-426, 1995
9. **Moller H.**, Skakkebaek N.E. Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors:case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* (8):904-912, 1997
10. **Rorth M.**, Rajpert-De Meyts E., Andersson L. Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol*, (Suppl):166-186, 2000
11. **Giwerzman A.**, Muller J., Cryptorchidism and testicular neoplasia. *Horm Res* (30):157-163, 1988
12. **UICC:** Wittekind, Ch., Meyer H.J., Bootz F. (Hrsg): *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage. 2010. Springer, Berlin Heidelberg New York.
13. **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.* 15:594-603 (1997)

14. **Mostofi F.K.**, Sobin L.H. Histological typing of testis tumors. International histological classification of tumors. Nr. 16, World Health organisation, Geneva 1977
15. **Bosl G.J.**, Motzer R.J., Testicular Germ-Cell cancer. The New England Journal of medicine. (337):242-254, 1997
16. **Bokemeyer C.**, Droz J.P., Horwich A. et al. Extragonadal seminoma: an international multicenter analysis of prognostic factors and long term treatment outcome. Cancer (91):1394-401, 2001
17. **Hartmann J.T.**, Fossa S.D., Nichols C.R. et al. Incidence of metachronous testicular cancer in patients with extragonadal germ cell tumors. J. Natl Cancer Inst. (93):1733-8, 2001
18. **Tseng A. Jr.**, Horning S.J., Freiha F.S. Gynecomastia in testicular cancer patients. Prognostic and therapeutic implications. Cancer. 56(10): 2534-2538, 1985
19. **Hartmann M.**, Pottek T. Bussar-Matz R. et al. Elevated human chorionic gonadotropin concentrations in the testicular vein and in peripheral venous blood in seminoma patients. An analysis of various parameters. Eur Urol. (31): 408-413, 1997
20. **Benson, C.B.** The role of ultrasound in diagnosis and staging of testicular cancer. Semin Urol. 6(3):189-202, 1988
21. **Marth D.**, Scheidegger J., Studer U.E. Ultrasonography of testicular tumors. Urol Int. 45(4):237-240, 1990
22. **Leibovitch I.**, Baniel J., Foster R.S. et al. The clinical implications of procedural deviations during orchiectomy for nonseminomatous testis cancer. J. Urol. (154):935-9, 1995
23. **Warde P.**, Specht I., Horwich A. et al. Prognostic factors for relapse in stage I seminoma managed by surveillance. J Clin Oncol 20: 4448-4452, 2002
24. **Albers P.**, Siener R. Kliesch S. et al. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German testicular Cancer Study Group trial. J. Clin Oncol. 821):1505-12, 2003
25. **Ondrus D.**, Matoska J., Belan V. et al. Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors: rationale for different risk-adapted treatment. Eur Urol. (33): 562-6, 1998
26. **Krege S.**, Beyer J., Souchon R. et al. European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: A report of the second meeting of

the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): Part I. Eur Urol 53:478-496 (2008)

27. **Warde P.R.**, Gospodarowicz M.K., Goodman P.J. et al. Results of a policy of surveillance in stage I testicular seminoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. (27):11-5, 1993

28. **Oliver R.T.**, Mason M.D., Mead G.M. et al. Radiotherapy versus single-dose carboplatin in adjuvant treatment of stage I seminoma: a randomized trial. Lancet (366):293-300, 2005

29. **Fossa S.D.**, Horwich A., Russel J.M. Optimal planning target volume for stage I testicular seminoma: a medical research Council randomized trial. J. Clin Oncol. (17):1146-54, 1999

30. **Classen J.**, Schmidberger H., Meisner C. et al. Radiotherapy for stages IIA/B testicular seminoma: final report of a prospective multicenter clinical trial. J. Clin Oncol (21):1101-6, 2003

31. **Arranz J.A.**, Garcia del Muro X. et al. E 400P in advanced seminoma of good prognosis according to the International Germ Cell Cancer Collaboration Group (IGCCCG) classification: the Spanish Germ Cell Cancer Group experience. Ann Oncol (12):487-91, 2001

32. **Bokemeyer C.**, Schmoll H.J. Treatment of testicular cancer and the development of secondary malignancies. J. Clin. Oncol. (13):283-292, 1995

33. **Tandstad T.**, Dahl O., Cohn-Cedermark G. et al. Risk-adapted treatment in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer: the SWENOTECA management program. J. Clin Oncol 27:2122-2128 (2009)

34. **Rustin G.J.**, Mead G.M., Sally P. et al. Randomized trial of two or five computer tomography scans in the surveillance of patients with stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: Medical Research Council Trial TE08. ISRCTN56475197- The National Cancer Research Institute Testis Cancer Clinical Studies Group. J Clin Oncol. (10):1310-5, 2007

35. **Albers P.**, Siener R., Krege S. et al. Randomized phase II trial comparing retroperitoneal lymph node dissection with one course of bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumours: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. J. Clin Oncol 26:2966-2972 (2008)

36. **Krege S.**, Beyer J., Souchon R. et al. European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: A report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): Part II. Eur Urol 53:497-513 (2008)

37. **Honecker F.**, Souchon R., Krege S. Bokemeyer C. Therapie von Hodentumoren- stadienspezifisch und leitliniengerecht behandeln. Best practice onkologie 5:4-13 (2010) Springer Medizin Verlag 2010
38. **Saxman S.B.**, Dinch D., Gonin R., Einhorn L.H. et al. Long-term follow-up of a phase III study of three versus four cycles of bleomycin, etoposide and cisplatin in Favorable-prognosis germ-cell tumors: The Indiana University experience. *J. Clin Oncol.* 16:702-706 (1998)
39. **Kondagunta G.V.**, Bacik J., Bajorin D. et al. Etoposide and cisplatin chemotherapy for metastatic good-risk germ cell tumors. *J. Clin Oncol.* 23:9290-9294 (2005)
40. **Nichols C.R.**, Catalano P.J., Crawford E.D. et al. Randomized comparison of cisplatin and etoposide and either bleomycin or ifosfamid in treatment of advanced disseminated germ cell tumors: an Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin Oncol.* 16:1287-1293 (2003)
41. **Beyer J.**, Bokemeyer C. Schmol H.J. Treatment intensification in disseminated germ cell tumors. *World J. Urol.* (12):207-218, 1994
42. **Beyer J.**, Kramer A. Mandanas R. High-dose chemotherapy as salvage treatment in germ cell tumors: A multivariate analysis of prognostic variables. *J. Clin. Oncol.* (14):2638-2645, 1996
43. **Skotheim R.I.**, Lothe R.A. The testicular germ cell tumour genome. *APMIS* 111(1):136-150, 2003
44. **Skakkebaek N.E.**, Berthelsen J.G., Carcinoma in situ: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10:19, 1987
45. **Almstrup K.**, Hoei-Hansen, C.E. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 64:4736, 2004
46. **De Meytes B.R.**, Giwercman A., Skakkebaek N.E. Carcinom 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, Williams and Wilkins, Philadelphia 2000. p.900.
47. **Jacobsen G.K.**, Henriksen O.B., der Maase H.V. Carcinoma on situ of testicular tissue adjacent to malignant germ-cell tumors: a study of 105 cases. *Cancer* 47:2660, 1981

48. **Dieckmann K.P.**, Skakkebaek N.E. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J. Cancer* 83:815, 1999
49. **Dieckmann K.P.**, Loy V., Buttner P. Prevalence of bilateral testicular germ cell tumours and early detection based on contralateral testicular intra-epithelial neoplasia. *Br. J Urol.* 71:340, 1993
50. **Linke J.**, Loy V., Dieckmann K.P. Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males. *J Urol.*, 173:1577, 2005
51. **Di Vizio D.**, Cito L., Boccia A. et al. Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene* (24): 1882-94, 2005
52. **Von der Maase H.** Is a contralateral testicular biopsy in patients with unilateral germ cell testicular cancer indicated as a routine procedure? *Acta Oncol* 44:523, 2005
53. **Rajpert-De Meyts E.**, Kvist M., Skakkebaek N.E. heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 428:133, 1997
54. **Dieckmann K.P.**, Claßen, J., Loy, V. Serie: Präkanzerose der Hodentumoren – Testikuläre intraepitheliale Neoplasie *Dtsch Arztebl* 2005; 102(45): A-3106 / B-2623 / C-2463
55. **Ulbright, T.M.**, Amin M.B., Young R.H. Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord, and scrotum. In: *Atlas of Tumor pathology*, 3rd ed, Rosai, J, Sobin, LH (Eds), Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 1999
56. „Seminoma versus NSGCT“ UpToDate online, Zugriff im Juni 2010
57. **Weinstein M.**, Hirsch M. Anatomy and pathology of testicular tumors. UpToDate online, Zugriff im Juni 2010
58. **Figlin R.**, et al. Overall survival with sunitinib versus interferon (IFN-)alpha as first-line treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol.* 26, Suppl (2008); Abstract 5024
59. **Motzer R.** et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* (295) 2516-2524, 2006
60. **Retz M.**, Gschwend J.E. Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *TZM News* 1/ 2010 (12 JG.)
61. **Hinton S.**, Catalano P., Einhorn L.H. et al. Phase II study of paclitaxel plus gemcitabine in refractory germ cell tumors (E9897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin Oncol.* 20 (7): 1859-63, 2002

62. **Bokemeyer C.**, Oechsle K., Honecker F. et al. Combination chemotherapy with gemcitabine, oxaliplatin and paclitaxel in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ-cell tumors: a study of the German testicular Cancer Study Group. *Ann Oncol.* 19:448-453
63. **Winder T.**, Lenz H.J. Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer. *Gastroenterology* (6): 2163-76, 2010
64. **Okana J.**, Gaslightwala I., Birnbaum M.J. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 275(40):30934-30942, 2000
65. **Bellacosa A.**, Testa J.R. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science.* 254(5029):274-277, 1991
66. **Bellacosa A.**, Kumar C.C., Di Cristofano A. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* (94):29-86, 2005
67. **Teng D.H.**, Hu R., Lin H., Davis T. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 57(23):5221-5225, 1997
68. **Hermans, K.G.**, van Alewijk, D.C., Veltman, J.A. et al: Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, (39): 171, 2004
69. **Dahia P.L.**, Aguiar R.C., Albert J. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanism haematological malignancies. *Hum Mol. Genet.* 8 (2):185-193, 1999
70. **Vazquez F.**, Ramaswamy S., Nakamura N. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* 20(14):5010-5018, 2000
71. **Carnero A.**, Blanco-Aparicio C., Renner O. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets.* 8(3):187-198, 2008
72. **Liaw D.**, Marsh D.J., Li J. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat genet.* 16(1):64-67, 1997
73. **Bostrom J.**, Cobbers J.M., Wolter M. Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome 10q. *Cancer Res.* 58(1):29-33, 1998

74. **Obata K.**, Morland S.J., Watson R.H. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 58(10):2095-2097, 1998
75. **Ramaswamy S.**, Nakamura N., Vazquez F. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(5):2110-2115
76. **Sgambato A.**, Cittadini A., Faraglia B. Multiple functions of p27^{Kip1} and its alterations in tumor cells: a review. *J. Cell. Physiol.* (183):18-27, 2000
77. **Kukoski R.**, Blonigen B., Macri E. p27 and cyclin E/D2 associations in testicular germ cell tumors: implications for tumorigenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 11(2):138-43, 2003
78. **Von Eyben F.E.** Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 151(2):93-138, 2004
79. schematische Darstellung des Avidin-Biotin-Komplexes, www.pathologie-online.de/ Zugriff Juni 2008
80. **Kruck S.**, Bedke J., Hennenlotter J. et al. Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression. *Oncol Rep.* 23(1): 159-163, 2010
81. **Vivanco I.**, Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2(7):489-501, 2002
82. **Cantley L.C.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296 (5573):1655-1657, 2002
83. **Luo J.**, Manning B.D. und Cantley L.C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and premise. *Cancer Cell* 4:257-262, 2003
84. **Eng C.** PTEN: one gene, many syndroms. *Human Mutation* 2:183-198, 2003
85. **Li J.**, Simpson L., Takahashi M. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the Akt/protein kinase B oncogene. *Cancer Res.* 58 (24):5667-5672, 1998
86. **Wu X.**, Senechal K., Neshat M.S. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (26):15587-15591, 1998

87. **Huang C.**, Buchtitel: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Protein phosphorylation in human health", ISBN 978-953-51-0737-8, publiziert: September 6, 2012
88. **Cordes I.**, Kluth M., Zygis D. PTEN deletions are relates to disease progression and unfavourable prognosis in early bladder cancer. *Histopathology*, 2013 Jun 21 10.1111-12209
89. **Hollander M.C.**, Blumenthal G.M., Dennis P.A., PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*. 11(4):289-301, 2011
90. **Perner S.**, Mertz K.D., Küfer R., Rubin M.A. Biomarker beim Prostatakarzinom- Molekulare Ansätze zur Prognoseabschätzung. *Der Onkologe* 13:669-676, 2007
91. **McCall P.**, Witton C.J., Grimsley S. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostata cancer? *Br J Cancer* 98(8):1296-1301, 2008
92. **Halvorsen, O.J.**, Haukaas S.A., Akslen, L.A. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 9: 1474-1479
93. **Morgan T.M.**, Koreckij T.D. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 9(2):237-249, 2009
94. **Rubin M.A.**, Gerstein A., Reid K. et al. 10q23.3 loss of heterozygosity is higher in lymph node-positiv (pT2-3, N+) versus lymph node-negativ (pT2-3, N0) prostate cancer. *Hum Pathol*. 31:504-508, 2000
95. **Salmena L.**, Carracedo A., Pandolci P.P. tenete of PTEN tumor suppression. *Cell*. 133(3):403-414, 2008
96. **Lee J.O.**, Yang H., Georgescu M.M. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* (99):323-334, 1999
97. **Lachyankar M.B.**, Sultana N., Schonhoff C.M. A role for nuclear PTEN in neuronal diffenentiation. *J. Neuroscie*. (20):1404-1413, 2000
98. **Tachibana M.**, Shibakita M., Ohno S. Expression and prognostic signifance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* (94):1955-1960, 2002

99. **Trotman L.C.**, Wang X., Alimonti A. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* (128):141-156, 2007
100. **Pandolfi P.P.**, P-TEN exciting years : from the cytosol to the nucleus and back to keep cancer at bay. *Oncogene* 27(41): 5386, 2008
101. **Chang C.J.**, Mulholland D.J. et al. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol.* 28(10): 3281-3289, 2008
102. **Bartkova J.**, Bartek J. et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J cancer* 49(2): 196-202, 1991
103. **Aveyard J.S.**, Skilleter A. et al. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *British J. of Cancer* 80:904-908, 1999
104. **Planchon S.M.**, Waite K.A., Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J of Cell Science* 121:249-253, 2008
105. **Cappellen D.**, Diez G., de Medina S. et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 14:3059-3066, 1997
106. **Puzio-Kuter A.M.**, Castillo-Martin M. et al. Inactivation of p53 and PTEN promotes invasive bladder cancer. *Genes and Development* 23:675-680, 2009
107. **Tsuruta H.**, Kishimoto H. et al. Hyperplasia and carcinomas in PTEN-deficient mice and reduced PTEN Protein in human bladder cancer patients. *Cancer Research* 66:8389-8396, 2006
108. **Whiteman D.C.**, Zhou X.P., Cummings M.C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* (99):63-67, 2002
109. **Zhou X.P.**, Loukola A., Salovaara R. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* (161):439-447, 2002
110. **Fridberg M.**, Servin A., Anagnostaki L., Protein expression and cellular localization in two prognostic subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: Higher expression of ZAP70 and PKC-beta II in the non-germinal center group and poor survival in patients deficient in nuclear PTEN. *Lymphoma* (48):2221-2232, 2007
111. **Aboundor R.** Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 9(2):235-245, 2009

112. **Tang J.M.**, He Q.Y. Guo R.X. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung cancer* Nov 28, 2005
113. **Hennenlotter J.**, Ohneseit P.A. et al PTEN and p27kip1 are not downregulated in the majority of renal cell carcinomas—implications for Akt activation. *Oncol Rep.* 19(5):1141-7, 2008
114. **Cipriano S.C.**, Chen L., Burns K.H. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 15(6):985-996, 2001
115. **Fero M.L.**, Randel E., Gurley K.E. The murine gene p27kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* (396):177-180, 1998
116. **Liang J.**, Zubovitz J, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat med* 8(10): 1153-1160, 2002
117. **Hidaka T.**, Hama S. et al. The combination of low cytoplasmic and high nuclear expression of p27 predicts a better prognosis in high-grade astrocytomas. *Anticancer Res* 29(2): 597-603, 2009
118. **Perner S.**, Mertz K.D., Küfer R., Rubin M.A. Biomarker beim Prostatakarzinom- Molekulare Ansätze zur Prognoseabschätzung. *Der Onkologe* 13:669-676, 2007
119. **De Marco A.M.**, Meeker A.K., Epstein J.I. et al. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J. Pathol.* 153:911-919, 1998
120. **Macri E.**, Loda M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 17:337-344, 1998
121. **Tsihlias J.**, Kapusta L., Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med.* (50):401-423, 1999
122. **Loda M.**, Cukor B., Tam S.W. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat. med.* (3):231-234, 1997
123. **Schmider-Ross A.**, Pirsig O., Gottschalk E. Cyclin-dependent kinase inhibitors CIP1 (p21) and KIP1 (p27) in ovarian cancer. *J cancer Res Clin Oncol.* (19):1-8, 2005
124. **Fredersdorf S.**, Burns J., Milne A. High level expressions of p27^{Kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the

expression of p27^{Kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci USA. 94(12):6380-6385, 1997

125. **Schwandner O.**, Bruch H.P., Broll R. p21, p27, caclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? Int J Colorectal Dis. 17(1) :11-19, 2002

126. **Blain S.W.**, Massague J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. Nat. Med.8(10):1076-8, 2002

127. **Kandel E.S.**, Skeen J., Majewski N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. Mol Cell Biol. 22(22):7831-7841, 2002

128. **McCubrey J.A.**, Steelman L.S.m Abrams S.L. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. Adv Enzyme Regul. (46):249-279, 2006

129. **Jendrossek V.**, Henkel M., Hennenlotter J. Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. BJU Int. 102(3):371-382, 2008

130. **Wu X.**, Obata T. et al. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. BJU International 93:143-150, 2004

131. **Liu L.Z.**, Zhou X.D.et al. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. Cancer Res 67:6325-32, 2007

132. **Faried L.S.**, Faried A., Kanuma T. et al. Predictive and prognostic role of activated mammalian target of rapamycin in cervical cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. Oncol Rep 16:57-63, 2006

133. **Lee D.**, Phase II data with ZD6474, a small-molecule kinase inhibitor of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor, in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 7(2):89–91, 2005

134. **Lee S.**, Choi E.J., Jin C., Kim D.H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. Gynecol Oncol 97:26-34, 2005

135. **Hutchinson J.N.**, Jin J., Cardiff R.D. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. Cancer res 64(9):3171-3178, 2004

136. **Vasudevan K.M.**, Barbie D.A., Davies M.A. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 16(1):21-32, 2009
137. **Tessier M.**, Woodgett J.R. Role of the Phox homology domain and phosphorylation in activation of serum and glucocorticoid-regulated kinase-3. *J. Biol. Chem.* (281):23978-23989, 2006
138. **Frodin M.**, Antal T.L. Dummler B.A. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* (21):5396-5407, 2002
139. **Yang X.**, Fraser M., Moll U.M. et al. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer Res* 66:3126-36, 2006
140. **Chen M.**, Gu J., Delclos G.L. et al. Genetic variations of the PI3K- AKT-mTOR pathway and clinical outcome in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Carcinogenesis* Jun 7, 2010
141. **Hildebrandt M.A.**, Yang H., Hung M.C., et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 27:857-71, 2009
142. **Liu P.**, Cheng H., Roberts T.M., Zhao J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Review Drug Discovery* 8: 627-644, 2009
143. **Feldman D.R.**, Turkula S. Ginsberg M.S. et al. Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest new Drugs* (4):523-8, 2010
144. Phase II study of SU 011248 (Sunitinib) in male patients with relapsed or cisplatin-refractory germ cell cancer. www.clinicaltrials.gov, NCT: 00371553, Zugriff 27.07.2010
145. Sorafenib Monotherapy in inoperable/ recurrent germ cell carcinoma refractory to chemotherapy (GCT). www.clinicaltrials.gov, NCT: 00772694, Zugriff 27.07.2010
146. **Pectasides D.**, Nikolaou M., Pectasides E. et al. Complete response after imatinib mesylate administration in a patient with chemoresistant stage IV seminoma. *Anticancer Res.* 28(4C):2137-20, 2008
147. A phase II study of Imatinib mesylate in patients with refractory seminoma. www.clinicaltrials.gov, NCT: 0042952, Zugriff 27.07.2010

148. **Martinschek A.**, Ruf C.G. Sparwasser C. Der Stellenwert der Targeted-Therapie beim Hodentumor. *Urologe* (47):1328-1333, 2008
149. **Chieffi P.** Molecular targets for the treatment of testicular germ cell tumors. *Mini Rev Med Chem* (7):755-759, 2007
150. **Zakarija A.**, Soff G., Update on angiogenesis inhibitors. *Curr Opin Oncol.* 17(6):578-583, 2005

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Histogeneseschema der germinalen Hodentumoren: TIN ist die totipotente Ursprungszelle aller Keimzelltumoren; Ca, Karzinom; TIN, testikuläre intraepitheliale Neoplasie [80]
- Abbildung 2: schematische Darstellung der PTEN/PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade [92].
- Abbildung 3: schematische Darstellung des Avidin- Biotin- Komplexes. [114]
- Abbildung 4: Bilder der Negativkontrollen der verwendeten Antikörper
- Abbildung 5: Bilder der Positivkontrollen der verwendeten Antikörper
- Abbildung 6: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei kernständiger PTEN Färbung
- Abbildung 7: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmaständiger PTEN Färbung
- Abbildung 8 : benignes Hodengewebe, PTEN, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 9 : benignes Hodengewebe, PTEN, 4000fache Vergrößerung
- Abbildung 10: Dottersacktumor, PTEN, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 11: Dottersacktumor, PTEN, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 12: Embryonalkarzinom PTEN, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 13: Embryonalkarzinom PTEN, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 14: Teratom, PTEN 150fache Vergrößerung
- Abbildung 15: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei kernständiger p27^{kip1} Färbung
- Abbildung 16: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmaständiger p27^{kip1} Färbung
- Abbildung 17 : benignes Hodengewebe, p27^{kip1}, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 18 : benignes Hodengewebe, p27^{kip1} 150fache Vergrößerung
- Abbildung 19: Embryonalkarzinom, p27^{kip1} 150fache Vergrößerung
- Abbildung 20: Embryonalkarzinom, p27^{kip1} 400fache Vergrößerung

- Abbildung 21: Embryonalkarzinom, p27^{kip1}, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 22: Teratom, p27^{kip1} 400fache Vergrößerung
- Abbildung 23: Teratom, p27^{kip1}, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 24: Teratom, p27^{kip1}, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 25: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei kernständiger p-AKT Färbung
- Abbildung 26: Vergleich der Indizes benigner Hodengewebe zu Tumorgewebe bei zytoplasmaständiger p-AKT Färbung
- Abbildung 27 : benignes Hodengewebe, p-AKT, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 28 : benignes Hodengewebe, p-AKT, 4000fache Vergrößerung
- Abbildung 29: Dottersacktumor, p-AKT, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 30: Dottersacktumor, p-AKT, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 31: Embryonalkarzinom, p-AKT, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 32: Embryonalkarzinom, p-AKT, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 33: Teratom, p-AKT, 150fache Vergrößerung
- Abbildung 34: Teratom, p-AKT, 400fache Vergrößerung
- Abbildung 35: Gesamtübersicht der immunhistochemischen Untersuchungen
- Abbildung 36: Durchschnittliche Anfärbarkeit der Tumorsubgruppen für PTEN, p-AKT, p27^{kip1}
- Abbildung 37: Gesamtübersicht der Korrelate
- Abbildung 38: Inhibitoren des PI3K und verwandten Signalwegen, welche in klinischer Entwicklung sind.
- Abbildung 39: Inhibitoren, die an Zielstrukturen im Phosphoinositide 3-Kinase Signalweg ansetzen [189].

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM Klassifikation bei Hodentumoren
Tabelle 2:	Serum Tumormarker
Tabelle 3:	Risikofaktoren entsprechend der IGCCCG- Klassifikation
Tabelle 4:	Erkrankungsstadien
Tabelle 5:	histopathologische Klassifikationen der WHO (Mostofi) [24]
Tabelle 6:	Kassifikation der extratestikulären Keimzelltumoren
Tabelle 7:	Verteilung der TNM Stadien
Tabelle 8:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte PTEN Kern
Tabelle 9:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert PTEN Kern
Tabelle 10:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte PTEN Plasma
Tabelle 11:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert PTEN Plasma
Tabelle 12:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte p27 ^{kip1} Kern
Tabelle 13:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert p27 ^{kip1} Kern
Tabelle 14:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte für zytoplasmaständiges p27 ^{kip1}
Tabelle 15:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert p27 ^{kip1} Plasma
Tabelle 16:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte p-AKT Kern
Tabelle 17:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert p-AKT Kern
Tabelle 18:	Minimum-/ Maximum- sowie Medianwerte p-AKT Plasma
Tabelle 19:	Mittelwerte, Standardabweichungen und SEM- Wert p-AKT Plasma
Tabelle 20:	Gesamtübersicht der immunhistochemischen Untersuchungen
Tabelle 21:	Gesamtübersicht Mittelwerte plus Standardfehler Mittelwert bei allen verwendeten Antikörpern/ Vergleich Kern und Zytoplasma

Tabelle 22: Gesamtübersicht Minimum- und Maximalwerte bei allen verwendeten Antikörpern/ Vergleich Kern und Zytoplasma

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl

Direktor der Klinik für Urologie der Universität Tübingen für die Überlassung des interessanten Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Das experimentelle Arbeiten im Labor der Klinik für Urologie und natürlich die onkologische Fragestellung überhaupt haben in mir das Interesse für die Onkologie im Generellen geweckt, und so zieht sich die onkologische Thematik wie ein roter Faden durch meinen bisherigen Lebenslauf.

Herrn Prof Dr. med. Jens Bedke

Oberarzt der Klinik für Urologie der Universität Tübingen und Betreuer während der letzten Zeit der Erstellung meiner Dissertation. Ihm danke ich für die Durchsicht meiner Dissertation und wertvollen Hinweisen zur Gestaltung der Arbeit.

Herrn Dipl. biol. Jörg Hennenlotter

Leiter des uro-onkologischen Labors der Universität Tübingen, der mir während all der Jahre meiner Dissertation ein sehr guter Ansprechpartner gewesen ist, der mich motiviert hat, unterstützt hat und der mit mir zusammen die Hoden-Datenbank erstellt hat und ohne dessen Engagement und Hilfe bei der Auswertung der vielen Daten die Arbeit wohl nicht so entstanden wäre.

Herrn PD Dr. med. Ulrich Vogel

Pathologe an der Universität Tübingen, der freundlicherweise die Präparate lichtmikroskopisch begutachtet hat und die einzelnen Tumorentitäten auf den jeweiligen Schnitten umrandete, so dass ein Vergleich mit den gefärbten Schnitten erst möglich wurde.

Frau Ursula Kuehs

MTA in der Urologie Tübingen, die mir während der experimentellen Arbeiten im Labor mit ihrer langjährigen Erfahrung rat- und tatkräftig zur Seite stand.

Meinen Eltern

die mich während des gesamten Studiums und auch heute noch in so vielfältiger Weise unterstützen, dass ich Ihnen zu allergrösstem Dank verpflichtet bin.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und Ort	28.04.1980 in Karlsruhe
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	katholisch

Schulbildung

09.1986- 07.1990	Grundschule in Ettlingen
09.1990- 06.1999	Eichendorff-Gymnasium in Ettlingen
06.1999	Abitur am Eichendorff-Gymnasium Ettlingen

Studium

04.2000- 05.2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
04.2002	Physikum
03.2003	1. Staatsexamen
01.04.2005	2. Staatsexamen
09.05.2006	3. Staatsexamen, Approbation als Ärztin

Famulaturen

09.2002	Famulatur in Facharztpraxis für Innere Medizin
09.2003	Famulatur im Städtischen Klinikum Karlsruhe im Bereich Hämatologie/ Onkologie (Direktor Prof. Fischer)
03.2004	Famulatur im Kantonsspital Luzern in der Klinik für Radioonkologie (Direktor Dr.Thum)
09.2004	Famulatur in der Universitätsklinik Tübingen,

Klinik für Urologie (Direktor Prof. Stenzl)

Praktisches Jahr

04.2005- 08.2005	Radioonkologie, Universitätsklinik Tübingen
08.2005- 12.2005	Innere Medizin, Universitätsklinik Tübingen
12.2005- 03.2006	Chirurgie, Kantonsspital Sursee (Schweiz)

Berufserfahrung

07.2006-06.2008	Assistenzärztin in der Klinik für Radio-Onkologie des Kantonsspitals Winterthur
07.2008-06.2009	Assistenzärztin in der Klinik Susenberg, Zürich
07.2009-17.09.09	Assistenzärztin in der Klinik für Medizinische Onkologie des Kantonsspitals Winterthur
18.09.09- 31.07.10	Assistenzärztin in der Klinik für Radio-Onkologie des Kantonsspitals Winterthur
01.09.10-31.01.13	Assistenzärztin in der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische-Onkologie, Palliativmedizin, St. Vincentius Krankenhaus Karlsruhe
01.02.13-31.07.13	Funktionsoberärztin in der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische-Onkologie, Palliativmedizin, St. Vincentius Krankenhaus Karlsruhe
seit 01.08.2013	Oberärztin in der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische-Onkologie, Palliativmedizin, St. Vincentius Krankenhaus Karlsruhe

Facharztweiterbildung

24.09.2012	Fachkundeprüfung- Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz in der Medizin
------------	---

31.01.2013

(Strahlenbehandlung Teletherapie und
Brachytherapie, Gesamtgebiet)

Facharztprüfung- Anerkennung als Fachärztin für
Strahlentherapie

10. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Immunhistochemische Untersuchungen zur Biologie des AKT- Signalwegs bei nichtseminomatösen Hodentumoren“

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere des Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe belegt wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Prof. Dr. A. Stenzl, Urologie Universität Tübingen
2. Prof. Dr. J. Bedke, Urologie Universität Tübingen
3. Dipl. biol. J. Hennenlotter, Urologie Universität Tübingen
4. Prof. Dr. M. Kuczyk, Urologie Medizinische Hochschule Hannover

Die vorgelegte Dissertation wurde

- bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert.

Den Grad eines Dr. der Medizin habe ich noch nicht erworben.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.