

**Anwendung der Mikroarray-Technologie  
für eine globale Charakterisierung  
der Spermatogenese des Menschen  
und seiner Pathologien**

**Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg**

vorgelegt von

CAROLINE FEIG

Hamburg 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Dissertationsgutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn  
Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie  
Martin-Luther-King-Platz 6  
20146 Hamburg

2. Dissertationsgutachterin:

Frau Prof. Dr. Christiane Kirchhoff  
Abteilung für Andrologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Martinistrasse 52  
20246 Hamburg

Tag der Disputation: 11. Mai 2007

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Problem der männlichen Infertilität .....	1
1.2 Die Organisation des Hodens .....	3
1.3 Die Spermatogenese .....	4
1.3.1 Phasen der Spermatogenese .....	4
1.3.2 Synchronisation der spermatogenetischen Stadien .....	6
1.4 Hormonelle Kontrolle der Spermatogenese .....	8
1.5 Genexpression im Testis .....	9
1.6 Mikroarray-Technologie .....	12
1.6.1 Das Prinzip .....	12
1.6.2 Verschiedene Mikroarray-Plattformen.....	14
1.6.2.1 Aufbau und Herstellung der Affymetrix GeneChips® .....	14
1.6.2.2 Aufbau und Herstellung der CodeLink <i>Bioarrays</i> .....	17
1.6.3 Die Mikroarray-Technologie in der Untersuchung multifaktorieller Krankheiten .....	18
1.6.4 Klassifizierung unterschiedlicher Testispathologien als eine notwendige Voraussetzung für globale Genexpressionsstudien.....	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	23
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Chemikalien .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.3 Geräte .....	26
2.1.4 Software und Internetadressen .....	27
2.1.5 Reaktions- <i>Kits</i> .....	28
2.1.6 Puffer und Lösungen .....	28
2.1.6.1 Allgemeine Lösungen .....	28
2.1.6.2 Für Mikroarray-Experimente verwendete Lösungen .....	29
2.1.6.2.1 Affymetrix-Plattform .....	29
2.1.6.2.2 CodeLink-Plattform .....	30

---

2.1.7	Molekulargewichtsmarker.....	30
2.1.8	Oligonukleotide.....	30
2.1.8.1	Primer für Referenzgene.....	31
2.1.8.2	Primer für die Mikroarray-Validierung ausgewählter Gene.....	31
2.1.9	Humanes Gewebematerial.....	33
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Gewebeproben.....	33
2.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	34
2.2.1.2.1	Photometer Ultrospec 3000.....	34
2.2.1.2.2	NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer.....	34
2.2.1.3	Agarose-GITC-Gelelektrophorese zur Überprüfung von Gesamt- RNA-Extraktion.....	34
2.2.1.4	Bioanalyzer-Messung.....	35
2.2.1.5	cDNA-Synthese.....	36
2.2.1.6	Real-time RT-PCR mit dem LightCycler™.....	36
2.2.2	Mikroarray-Analyse.....	40
2.2.2.1	Genereller Ablauf eines Mikroarray-Experimentes.....	40
2.2.2.2	Allgemeine Informationen zur Auswertung von Mikroarray-Daten.....	41
2.2.2.3	Affymetrix-Plattform (Santa Clara, USA).....	43
2.2.2.3.1	cRNA-Herstellung.....	43
2.2.2.3.2	Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays.....	44
2.2.2.3.3	Scannen der Mikroarrays.....	45
2.2.2.3.4	Qualitätskontrolle.....	46
2.2.2.3.5	Normalisierung der Daten und Hintergrundfilterung.....	46
2.2.2.3.6	Identifizierung differentiell exprimierter Gene.....	47
2.2.2.3.7	Clusteranalyse der Proben.....	47
2.2.2.3.8	<i>Clustering</i> von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen.....	48
2.2.2.3.9	Funktionelle Annotierung der PAM-Cluster.....	49
2.2.2.4	CodeLink-System (GE Healthcare, Piscataway, NJ).....	50
2.2.2.4.1	cRNA-Herstellung.....	50
2.2.2.4.2	Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays.....	50
2.2.2.4.3	Scannen der Mikroarrays.....	51
2.2.2.4.4	Hintergrundfilterung und Normalisierung der Daten.....	51

---

2.2.2.4.5	Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	52
2.2.2.4.6	Clusteranalyse der Proben .....	52
2.2.2.4.7	<i>Clustering</i> von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen.....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
3.1	Etablierung eines „molekularen Archivs“ individueller humaner Testisbiopsien.....	54
3.1.1	Einführung.....	54
3.1.2	RNA-Qualität .....	54
3.2	Auswahl geeigneter Biopsien für die globale Genexpressionsanalyse des humanen Testis.....	59
3.3	Verteilungsmuster der spermatogenetischen Aktivität im Testis.....	64
3.4	Qualitätskontrolle der Arrays vor der Normalisierung.....	67
3.4.1	RNA-Degradations- und Dichteplots der Affymetrix-Arrays.....	67
3.4.2	Boxplots der Affymetrix-Arrays .....	68
3.4.3	Anteil der detektierten Signale auf den Arrays .....	69
3.5	Die molekulare Klassifizierung verschiedener humaner Testispathologien .....	71
3.5.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....	71
3.5.2	Clusteranalyse anhand der differentiell exprimierten Gene.....	73
3.5.3	Clusteranalyse nach größter Varianz.....	77
3.6	Die globale Erfassung der humanen Spermatogenese .....	79
3.6.1	Gewebeverteilung der differentiell exprimierten Transkripte.....	79
3.6.2	<i>Clustering</i> von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen.....	80
3.6.3	Virtuelle, funktionelle Analysen der Affymetrix PAM-Cluster .....	83
3.6.4	Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit Hilfe der real-time RT-PCR.....	89
3.6.4.1	Auswahl geeigneter Referenzgene .....	90
3.6.4.2	RT-PCR-Profile ausgewählter Gene .....	91
3.7	Expressionsprofile somatisch exprimierter Gene.....	93
3.7.1	Verschiedene Anteile somatischer Zelltypen und Transkripte in verschiedenen..... Testispathologien .....	93
3.7.2	Gene, deren Expressionslevel in Testispathologien zunehmen.....	97
3.7.3	Validierung ausgewählter Gene mit Hilfe der real-time RT-PCR .....	100

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>102</b>
4.1	Molekulare Klassifizierung humaner Testispathologien.....	102
4.2	Humane Testispathologien für die globale Charakterisierung der normalen Spermatogenese.....	105
4.3	Gene, deren Expressionslevel in Testispathologien zunehmen.....	112
4.4	Direkter Vergleich der beiden Mikroarray-Plattformen.....	115
4.5	Ausblick .....	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>134</b>
7.1	Gefahrstoffinformation.....	134
7.2	Veröffentlichungen.....	135
7.3	Danksagung .....	136
7.4	Lebenslauf .....	137
7.5	Erklärung .....	138

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

Ad	A( <i>dark</i> )
AMEN	<i>Annotation, Mapping, Expression and Network Tool</i>
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
Ap	A( <i>pale</i> )
bidest	bidestillata (doppelt destilliert)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CEL	<i>Cell Intensity File</i> (bei den Affymetrix-Arrays)
CHP	<i>Chip File</i> (bei den Affymetrix-Arrays)
CP	<i>Crossing Point</i>
cRNA	komplementäre RNA ( <i>complementary RNA</i> )
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dest.	destillata (einfach destilliert)
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<i>et al.</i>	Et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FDR	multiple Testkorrektur ( <i>false discovery rate</i> )
FSH	follikelstimulierendes Hormon
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GITC	Guanidinisothiocyanat
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde ( <i>hour</i> )
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
ID	Identifikationsnummer
IQR	Interquartilsabstand im Boxplot ( <i>interquartile range</i> )
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
kb	Kilobasen (RNA), Kilobasenpaare (DNA)
l	Liter
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LH	luteinisierendes Hormon
M	Molar

MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	<i>Mismatch</i> (bei den Affymetrix-Arrays)
µl	Mikroliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAM	<i>Partitioning around medoids</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	Hydrogenanion-Exponent ( <i>potentia hydrogenii</i> )
PM	<i>Perfect Match</i>
Poly-A <sup>+</sup> RNA	polyadenylierte RNA
RACE	<i>Remote Analysis Computation for Gene Expression Data</i>
<i>RefSeq</i>	<i>Reference Sequence</i> der NCBI-Datenbank
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RMA	<i>Robust Multi-Array Analysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Partikel
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
SAPE	Streptavidin-gekoppeltes Phycoerythrin
SCO	<i>Sertoli cell-only</i>
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
sek	Sekunden
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sog.	so genannt(e)
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
™	Warenzeichen
T <sub>M</sub>	Schmelzpunkt
TNF	Tumornekrosefaktor
usw.	und so weiter
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche



**Abkürzungen von Gennamen**

ACT	<i>activator of crem in testis</i>
AKAP	<i>A-kinase anchoring proteins</i>
ATP8B4	<i>ATPase, Class I, type 8B, member 4</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2, early onset</i>
C7	<i>Komplementfaktor 7</i>
CALB2	<i>Calretinin</i>
CAPPA3	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3</i>
CATSPER	<i>cation channel of sperm</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHST7	<i>carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7</i>
CLEC2B	<i>C-type lectin domain family 2, member B</i>
COL27A1	<i>collagen, type XXVII, alpha 1</i>
CPA3	<i>Carboxypeptidase A3</i>
CREM	<i>cAMP-responsive-element-modulator</i>
CRISP1	<i>cysteine-rich secretory protein 1</i>
CST8	<i>cystatin-related epididymal specific</i>
CTSC	<i>Cathepsin C</i>
CYP11A1	<i>cytochrome P<sub>450</sub> side-chain-cleavage enzyme</i>
CYP19A1	<i>cytochrome P450, family 19, subfamily A</i>
Dazl	<i>deleted in azoospermia-like</i>
DLK1	<i>delta-like 1 homolog (Drosophila)</i>
DPT	<i>Dermatopontin</i>
D4S234E	<i>DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FANCA	<i>Fanconi anemia, complementation group A</i>
FANCD2	<i>Fanconi anemia, complementation group D2</i>
FBXL	<i>F-box and leucine-rich repeat protein</i>
FBXO	<i>F-box only protein</i>
FMO1	<i>flavin containing monooxygenase 1</i>
FSHR	<i>follicle stimulating hormone receptor</i>
GAK	<i>cyclin G associated kinase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
HEPH	<i>Hephaestin</i>
HLA-DPA1	<i>major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1</i>
HPRT	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase</i>
HSD3B2	<i>3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase</i>
HSD17B6	<i>17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase</i>
IL-32	<i>Interleukin 32</i>
KCNE	<i>potassium voltage-gated channel, Isk-related family</i>
KCNQ1	<i>potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily 1</i>
LDHC	<i>Laktatdehydrogenase C</i>
LHCGR	<i>luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor</i>
MEG3	<i>maternally expressed 3</i>
MS4A7	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7</i>
MSY2	<i>murines Y-Box-Protein 2</i>
NOPE	<i>likely ortholog of mouse neighbor of Punc E11</i>
ODF	<i>outer dense fiber of sperm tails</i>
PDHA2	<i>Pyruvat-Dehydrogenase2</i>
PFNIV	<i>Profilin IV</i>
PGK2	<i>Phosphoglyceratkinase2</i>

---

PIWIL2	<i>piwi-like 2</i>
PLEK2	Pleckstrin 2
PRKCA	$\alpha$ -Untereinheit der Proteinkinase C
PRM1/2	Protamin1 bzw. 2
PRRT1	<i>proline-rich transmembrane protein 1</i>
RAD54L	<i>RAD54-like</i>
RARRES2	<i>retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2</i>
RBMV	<i>RNA binding motif protein, Y-linked</i>
RBP1	<i>retinol binding protein 1</i>
RKHD	<i>ring finger and KH domain containing</i>
RNF	Ring-Finger-Protein
RPL37A	ribosomales Protein R37A
RPS27A	ribosomales Protein S27A
SAMD9L	<i>sterile alpha motif domain containing 9-like</i>
SLC1A3	<i>solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3</i>
SLC2A10	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10</i>
SPAM1	<i>sperm adhesion molecule 1</i>
STEAP4	<i>six transmembrane prostate protein 2</i>
SYCP	<i>synaptonemal complex protein</i>
TBSAB1	Tryptase alpha/beta 1
TESK2	<i>testis-specific kinase 2</i>
TNFSF13B	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b</i>
TNP1/2	Transitionsprotein1 bzw. 2
TRIM22	<i>tripartite motif-containing 22</i>
TSHZ2	<i>teashirt family zinc finger 2</i>
YBX2	humanes Y-Box-Protein 2

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Problem der männlichen Infertilität

Männliche Infertilität stellt ein Hauptgesundheitsproblem dar; ihre Häufigkeit ist mit der des *Diabetes mellitus* vergleichbar (Nieschlag und Behre, 2000). In den meisten europäischen Ländern sind 12-15 % aller Paare im reproduktionsfähigen Alter ungewollt kinderlos (Nieschlag und Behre, 2000; de Kretser, 1997). In ungefähr der Hälfte der Fälle ist ein so genannter „männlicher Faktor“ beteiligt (de Kretser und Baker, 1999), und in ca. 20 % der Fälle liegt die Ursache allein in der Unfruchtbarkeit des männlichen Partners (Herschlein und Lechner, 1974). Weiterhin sprechen klinische und epidemiologische Studien für eine Zunahme männlicher Fortpflanzungsstörungen (Skakkebaek, 2001). Das Spektrum männlicher Infertilität ist sehr vielfältig. Es kommen Umwelt- bzw. so genannte Lifestyle-Faktoren, endogene hormonelle Ursachen, entzündliche und immunologische sowie genetische Ursachen in Betracht (Foresta *et al.*, 2001). Genetische Defekte umfassen dabei z.B. numerische Chromosomenveränderungen wie im Falle des Klinefelter-Syndroms (Karyotyp 47XXY), strukturelle Chromosomenveränderungen wie z. B. die Mikrodeletionen des Y-Chromosoms und die zystische Fibrose, die aufgrund einer Mutation im CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)-Gen zu einem angeborenen Verschluss der ableitenden Samenwege führen kann (Hargreave, 2000). Eine häufig gestellte Diagnose ist auch die Varikozele (Krampfaderbildung der Hodenvenen), die bei infertilen Männern gehäuft auftritt und zur Infertilität beiträgt. Des Weiteren kann die Spermatogenese durch anatomische Ursachen gestört sein, wie im Falle eines Hodenhochstands (Kryptorchismus) in der frühen Jugend, der bei 1,7-7,8 % der infertilen Männer vorkommt (Rowe *et al.*, 2000).

Vereinfacht kann man Infertilität aufgrund fehlender Spermien, die auch als ejakulatorische Azoospermie bezeichnet wird, von einer Infertilität aufgrund von mangelhafter Spermienfunktion unterscheiden. Keine oder nur wenige Spermien im Ejakulat haben 1% aller Männer und 10-15 % der infertilen Männer. Eine Azoospermie des Ejakulats kann zum einen aufgrund von Defekten des Hodenparenchyms bestehen. Diese kann mit chromosomalen, hormonellen oder anderen Störungen assoziiert sein. Dabei werden in vielen Fällen, in denen die Spermienproduktion gestört ist, durchaus noch Areale mit spermatogenetischer Aktivität im Hoden gefunden. Zum anderen kann ein Verschluss oder das Fehlen der ableitenden Samenwege die Ursache sein. Diese Störung kann unter anderem genetisch bedingt sein (zystische Fibrose) oder entzündliche Ursachen haben.

Die oben aufgeführten Ursachen männlicher Infertilität sind jedoch als Einzelursachen eher selten und betreffen in vielen Kliniken weniger als 1 % aller Patienten. Bei ca. 40-70 % aller

Patienten lässt sich dagegen keine Ursache feststellen, so dass die am häufigsten gestellte Diagnose die so genannte „idiopathische“ männliche Infertilität darstellt, d.h. eine Spermatogenesestörung unbekannter Ursache (de Kretser, 1997; Foresta *et al.*, 2001). Diese Männer weisen meist eine ejakulatorische Azoospermie oder eine schwere Oligozoospermie (< 5 Millionen Spermien/ml) auf. Ähnlich wie andere häufige Krankheitsbilder des Menschen wird die idiopathische männliche Infertilität heute als heterogene, multifaktorielle Störung (vgl. Abschnitt 1.6.3) angesehen, an deren Entstehung eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beteiligt ist.

Viele Aspekte männlicher Infertilität sind bisher kaum verstanden. Dementsprechend existieren meist keine kausalen therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit ejakulatorischer Azoospermie. Die hormonelle Behandlung idiopathischer männlicher Infertilität mit GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*)-Analogen, Gonadotropinen, Androgenen, Anti-Östrogenen und Glukocorticoiden gehört zu den so genannten empirischen Ansätzen, die in einer unselektierten Patientenklientel jedoch nur wenig Erfolg versprechen (Nieschlag *et al.*, 1999; Liu und Handelsman, 2003). Eine kausale Therapie ist gegenwärtig nur bei einer Minderheit von Patienten (< 3 %) möglich und stellt die Gonadotropin-Behandlung in den seltenen Fällen eines hypogonadotropem Hypogonadismus dar.

Aus diesem Grund wird das Problem der männlichen Infertilität heute operativ umgangen. Mehr als 5 % der Patienten unterziehen sich in spezialisierten Zentren, wie der Abteilung für Andrologie in Hamburg, einer Testisbiopsie mit dem Ziel einer testikulären Spermienextraktion (TESE). Die durch TESE gewonnenen testikulären Spermien werden dann in einer künstlichen Befruchtung mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) in eine aus der Partnerin gewonnenen Eizelle injiziert. Diese assistierten Reproduktionstechniken stellen für viele infertile Männer die einzige Möglichkeit dar, ein Kind zu zeugen. Dennoch dürfen die damit verbundenen Risiken und Nachteile nicht außer Acht gelassen werden. Zum einen ist die künstliche Befruchtung mit invasiven und nicht ungefährlichen Eingriffen in den Körper der vermutlich gesunden Frau verbunden. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Übertragung unerkannter genetischer Defekte auf die durch ICSI gezeugten Kinder. Schließlich ist nach erfolgreicher ICSI-Behandlung, Schwangerschaft und Geburt der Mann zwar Vater, aber genauso unfruchtbar wie vorher. Obwohl sich die Hodenbiopsie als therapeutisches Verfahren zur Isolierung testikulärer Spermatozoen etabliert hat (Salzbrunn *et al.* 1996; Schulze *et al.* 1997), werden bei ca. 25 % der operierten Patienten keine ICSI-tauglichen Spermien gefunden.

## 1.2 Die Organisation des Hodens

Die beiden Hauptfunktionen des adulten Hodens sind die Bildung von Spermien in der Spermatogenese und die Synthese der Geschlechtshormone. Die Spermatogenese findet in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) des Hodens statt. Im Mittel enthält der menschliche Hoden etwa 600 solcher Samenkanälchen, die eine Länge von 30-70 cm und einen Durchmesser von 180-280  $\mu\text{m}$  haben. Diese Tubuli seminiferi sind stark aufgewundene Schläuche, deren Enden mit dem ausführenden Tubulussystem, dem Rete testis, verbunden sind. Der Hoden weist dementsprechend zwei Kompartimente auf: das tubuläre Kompartiment, das aus den Samenkanälchen besteht und das interstitielle Kompartiment (Interstitium), dem Raum zwischen den Samenkanälchen. Die Leydigzelle ist der Zelltyp, in dem die Testosteronproduktion stattfindet. Neben den Leydigzellen enthält das Interstitium noch lockeres Bindegewebe, Zellen des Immunsystems (Mastzellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Lymphozyten), Blut- und Lymphgefäße. Das Kompartiment der Samenkanälchen wird durch eine Lamina propria vom Interstitium getrennt, die aus einer Basalmembran, einer Kollagenfaserschicht und peritubulären Zellen (Myofibroblasten) besteht. Die Auskleidung der Samenkanälchen besteht aus dem Keimepithel, das zwei Zelltypen enthält, die Keimzellen und die somatischen Sertolizellen. Die auf der Basalmembran fußenden Sertolizellen, die im adulten Zustand teilungsinaktiv sind, umgeben mit ihren charakteristischen zytoplasmatischen Fortsätzen sämtliche Keimzellstadien und ragen bis ins Tubuluslumen hinein. Deswegen werden sie auch als Stützgerüst des Keimepithels angesehen. Des Weiteren produzieren und sezernieren sie Proteine und Flüssigkeit und bilden dadurch das Tubuluslumen. Die Sertolizellen sind über spezielle interzelluläre Kontakte untereinander und mit den Keimzellen verbunden. Sertoli-Sertoli-Kontakte unterteilen das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment, so dass eine Blut-Hoden-Schranke ausgebildet wird (Pelletier und Byers, 1992). Im basalen Kompartiment befinden sich die Spermatogonien und Spermatozyten bis zum Stadium der frühen Leptotän-Phase der Meiose (Russell, 1977 und 1978), während im adluminalen Bereich die weiter entwickelten und ausgereiften Keimzellen ihren Platz haben. Diese effektive Barriere hat zwei Hauptfunktionen: Isolierung der antigenen Keimzellen, um deren Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern (Prävention einer Autoimmunreaktion) sowie die Bereitstellung eines speziellen Milieus für den Ablauf der Meiose und der Spermienentwicklung. Da die Spermatogenese erst mit der Pubertät einsetzt, wenn das „Erlernen“ der Selbst-Toleranz abgeschlossen ist, muss ein Kontakt der Immunzellen mit den Spermatogenesezellen verhindert werden. Während ihrer Entwicklung von den basalen

Spermatogonien zu den luminalen Spermatozoen müssen die Keimzellen diese Blut-Hoden-Schranke überwinden, indem sich die Sertolizell-*junctions* öffnen und den Keimzellen eine Passage ins adluminale Kompartiment ermöglichen.

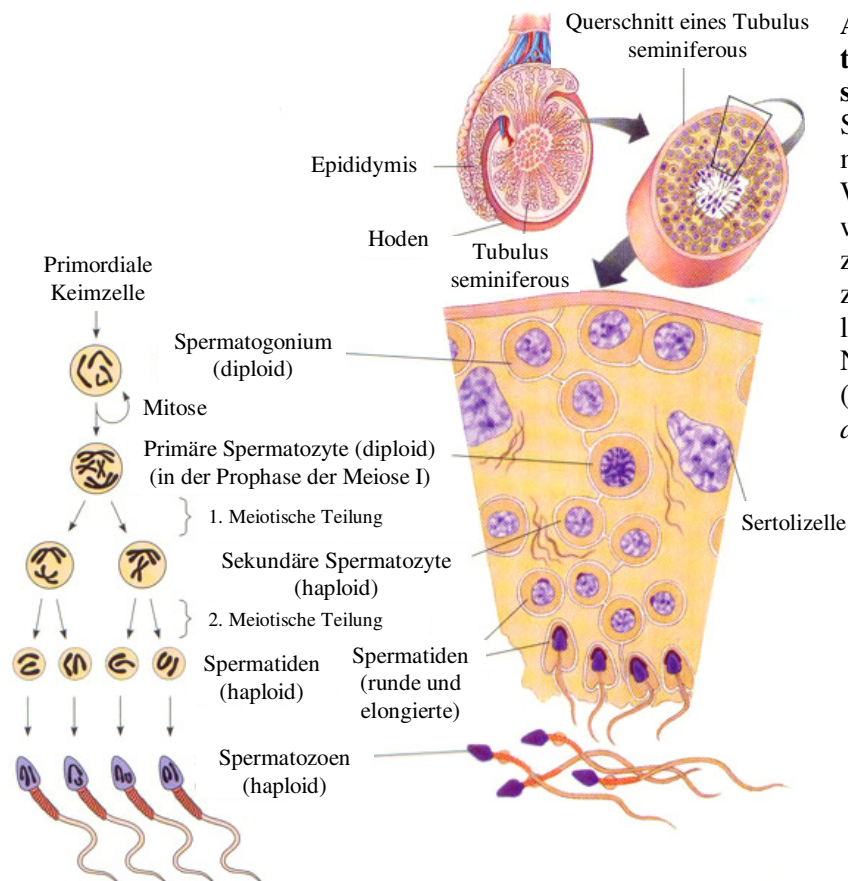
## 1.3 Die Spermatogenese

Die Spermatogenese in den Samenkanälchen des Hodens ist ein komplexer Differenzierungsprozess, bei dem aus diploiden Stammzellen (Spermatogonien) unter dramatischen morphologischen und biochemischen Veränderungen befruchtungsfähige Spermien entstehen. Dieser Prozess ermöglicht über fortlaufend wiederholte Mitosen die Erhaltung der Stammzellpopulation und sichert über den Vorgang der Meiose die Halbierung des Genoms in den Spermatozyten für die Befruchtung mit der ebenfalls haploiden Eizelle.

### 1.3.1 Phasen der Spermatogenese

Die Spermatogenese lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen: 1) die Proliferationsphase, die durch zahlreiche mitotische Teilungen der Spermatogonien gekennzeichnet ist, 2) die meiotische Phase, in der das genetische Material der Spermatozyten rekombiniert und halbiert wird, und schließlich 3) die Spermiogenese, in der, ausgehend von runden, haploiden Spermatiden, die morphologische Umgestaltung zum befruchtungsfähigen Spermatozoon stattfindet (Abbildung 1.1). Der gesamte Prozess dauert beim Mann ca. 74 Tage (Heller und Clermont, 1963).

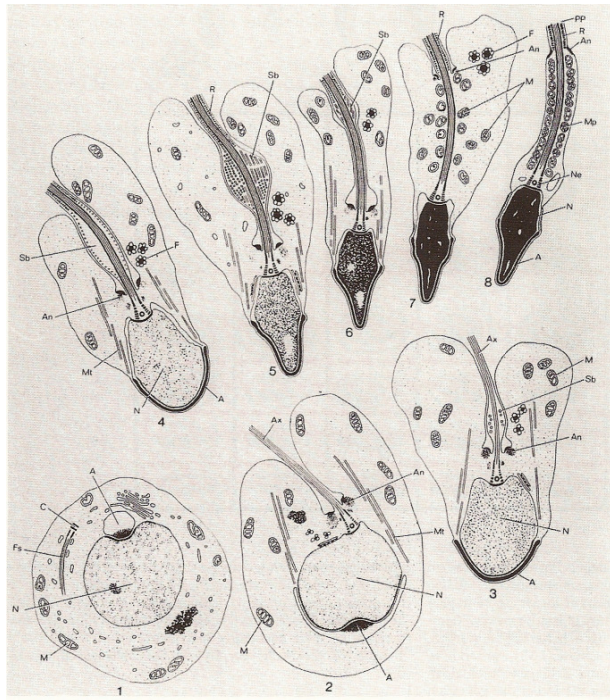
Die Spermatogenese beginnt in der basalen Region des Keimepithels mit den mitotischen Zellteilungen der Spermatogonien, die in Zellen des Typs A und des Typs B klassifiziert werden. Bei den A-Spermatogonien werden zwei Formen unterschieden: Die A(*dark*)-Spermatogonien (Ad) und die A(*pale*)-Spermatogonien (Ap). Die Ad-Spermatogonien zeigen unter normalen Umständen keine oder nur sehr geringe Proliferationsaktivität (Schlatt und Weinbauer, 1994) und können als Stammzellen der Spermatogonien angesehen werden. Die Ap-Spermatogonien hingegen teilen sich und differenzieren in B-Spermatogonien. Aus diesen entstehen im letzten Schritt der proliferativen Phase die präleptotänen Spermatozyten, womit die Prophase der Meiose I und damit die zweite Phase der Spermatogenese eingeleitet wird.



**Abbildung 1.1: Die Spermatogenese findet in den Tubuli seminiferi des Hodens statt.** Spermato gonien an der Basalmembran teilen sich mitotisch. Während der Differenzierung wandern die von den Sertolizellen umgebenden Keimzellen in Richtung Tubuluslumen, von wo aus sie in den Nebenhoden entlassen werden (modifiziert nach Campbell *et al.*, 1999).

Im ersten Schritt der Meiose beginnen die Spermatozyten mit der DNA-Synthese zum 4C-Stadium und lösen sich von der Basalmembran. Die Mutterzelle und die daraus resultierenden Tochterzellen bleiben über interzelluläre Brücken miteinander in Kontakt (Alastalo *et al.* 1998). Dieser „klonale“ Modus der Keimzellentwicklung ist möglicherweise Grundlage und Voraussetzung für die koordinierte Reifung der Gameten im Keimepithel. Die primären Spermatozyten durchlaufen die Prophase, in der es zur Paarung mit anschließendem Austausch des genetischen Materials zwischen den homologen Chromosomen kommt. Nach den sich anschließenden Schritten der Metaphase, Anaphase und Telophase ist die erste meiotische Teilung abgeschlossen, aus der die sekundären Spermatozyten hervorgehen. Im Verlauf der zweiten meiotischen Teilung teilen sich die sekundären Spermatozyten in die haploiden Spermatisen. Die Prophase der Meiose I dauert ein bis drei Wochen, während die restlichen Phasen der Meiose I und die gesamte Meiose II innerhalb von ein bis zwei Tagen ablaufen.

Während der Spermiogenese erfahren die runden, unreifen Spermatisen komplexe morphologische Strukturveränderungen, aus denen schließlich ausdifferenzierte, elongierte Spermatisen (testikuläre Spermatozoen) hervorgehen. Beim Menschen werden insgesamt acht verschiedene Differenzierungsphasen der Spermiogenese unterschieden (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Spermatidendifferenzierung im humanen Hoden.** 1: Golgi-Phase, 2-4: Kappenphase, 5-6: Akrosomphase, 7-8: Reifungsphase. A = Akrosom, An = Annulus, Ax = Axonem, C = Zentriol, F = *Flower*-Strukturen, FS = flagellare Strukturen, M = Mitochondrien, Mp = Mittelstück, Mt = Manschette, Ne = Hasl, N = Nukleus, PP = Hauptstück, Sb = spindelförmiger Körper (aus Holstein und Roosen-Runge, 1981).

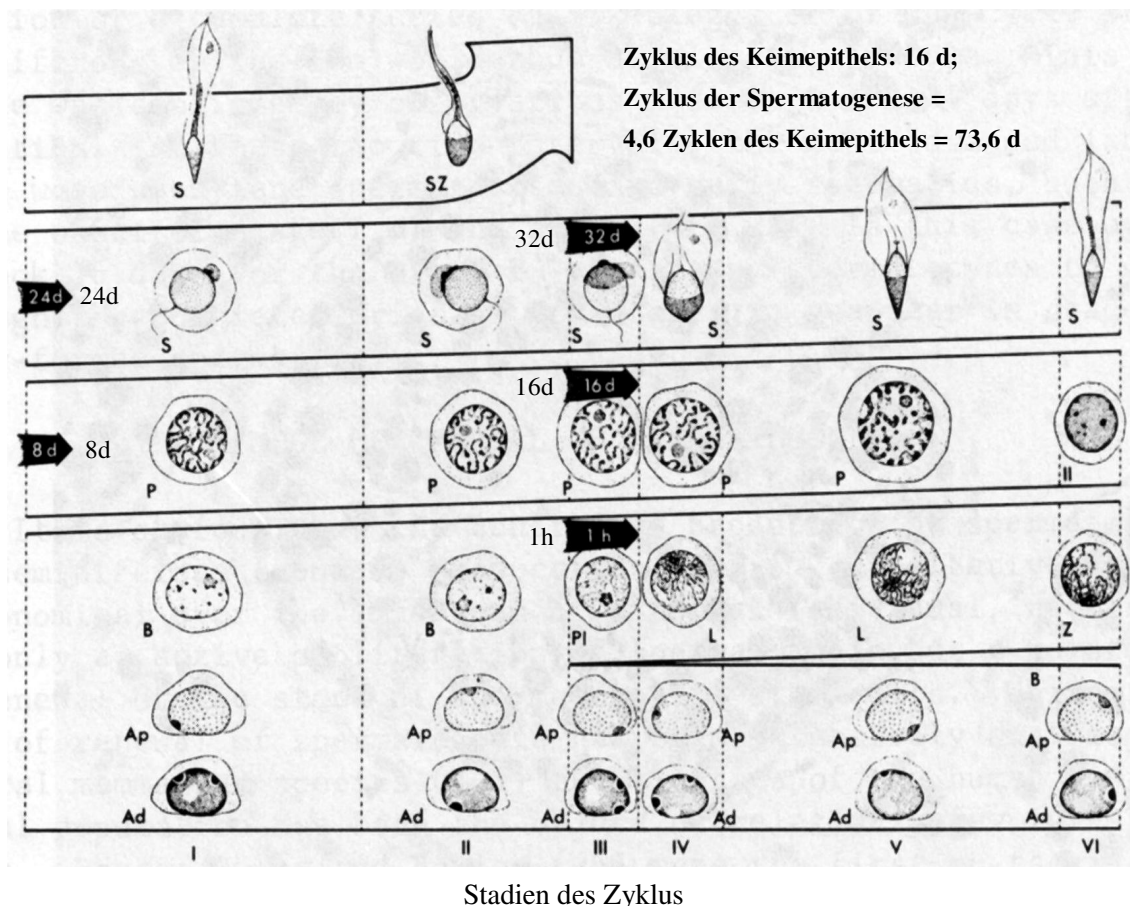
Diese Vorgänge umfassen die Elongation und Kondensation des Zellkerns sowie seine Wanderung an die Zelloberfläche, die Entwicklung des Akrosoms, die Ausbildung des Flagellums und die Abstoßung großer Cytoplasmaanteile als so genannte Residualkörper. Der gesamte Prozess ist qualitativ bei allen Säuger-Spezies identisch und endet, wenn die reifen testikulären Spermatozoen aus dem Verband des Keimepithels in das Lumen abgegeben werden. Bei diesem als Spermiation bezeichneten Prozess werden die *Junctions*, welche Sertolizellen und Keimzellen verbinden, in einem komplexen Prozess eliminiert, an dem die Sertolizellen aktiv teilnehmen (Fawcett und Phillips, 1969; Russell, 1984). Die testikulären Spermatozoen erfahren während der Passage durch den Nebenhoden ihre vollständige Befruchtungsfähigkeit (de Kretser *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Synchronisation der spermatogenetischen Stadien

Der zyklisch wiederholte Prozess der Spermatogenese unterscheidet sich grundsätzlich von dem ebenfalls zyklischen Vorgang der Oogenese des weiblichen Organismus. Spermatozoen werden ständig neu gebildet und in das Tubulussystem abgegeben. Zur gleichen Zeit, zu der aus einem Spermatogonium über Teilungen und Differenzierungen neue Spermatozoen entstehen, starten andere Spermatogonien in demselben Areal des Keimepithels mit der Spermatogenese in einer zeitlich kontrollierten Sequenz. Der synchronisierte Ablauf der Spermatogenese bedingt eine Verlagerung der Keimzellen innerhalb des Keimepithels. Die reiferen Keimzellstadien befinden sich dabei weiter entfernt von der Basalmembran und in spezifischen Assoziationen mit jüngeren Zellen, die sich noch teilen und heranreifen müssen.



Diese synchronisierte Evolution des Keimepithels über die Zeit lässt einen Zyklus entstehen, durch den die unterschiedlichen Keimzellen innerhalb der Samenkanälchen in charakteristischer Zellassoziation angeordnet sind. Somit ist die Spermatogenese nicht nur ein zeitlich, sondern auch ein räumlich hoch organisierter Prozess. Durch diese räumliche Koordination verschiedener Keimzellklone entstehen im Keimepithel ständig wiederkehrende Muster, die als Stadien des Keimepithelzyklus bezeichnet werden. Beim Menschen wird der Keimepithelzyklus in sechs Stadien eingeteilt (Clermont, 1963). In Abbildung 1.3 werden die möglichen Zellassoziationen des Keimepithels zusammengefasst. Dabei ist die fortschreitende Keimzellendifferenzierung von links nach rechts dargestellt, wobei am Ende der Reihe die Entwicklung „eine Etage“ weiter oben fortläuft. Die übereinander liegenden Keimzellstadien spiegeln die im Tubulusquerschnitt gefundenen Zellassoziationen im Keimepithel wider, wobei beim Menschen meist zwei bis drei verschiedene Stadien in einem Tubulusquerschnitt zu erkennen sind.



**Abbildung 1.3: Zusammenstellung der Keimzellassoziationen in den 6 Stadien des Keimepithelzyklus beim Menschen.** Ad = A(*dark*)-Spermatogonien, Ap = A(*pale*)-Spermatogonien, B = Spermatogonien, Pl = Präleptotän-Spermatozyten, L = Leptotän-Spermatozyten, Z = Zygotän-Spermatozyten, P = Pachytän-Spermatozyten, II = 2. meiotische Teilung, S = Spermatozoen, h = Stunde, d = Tag (modifiziert nach Heller und Clermont, 1964).

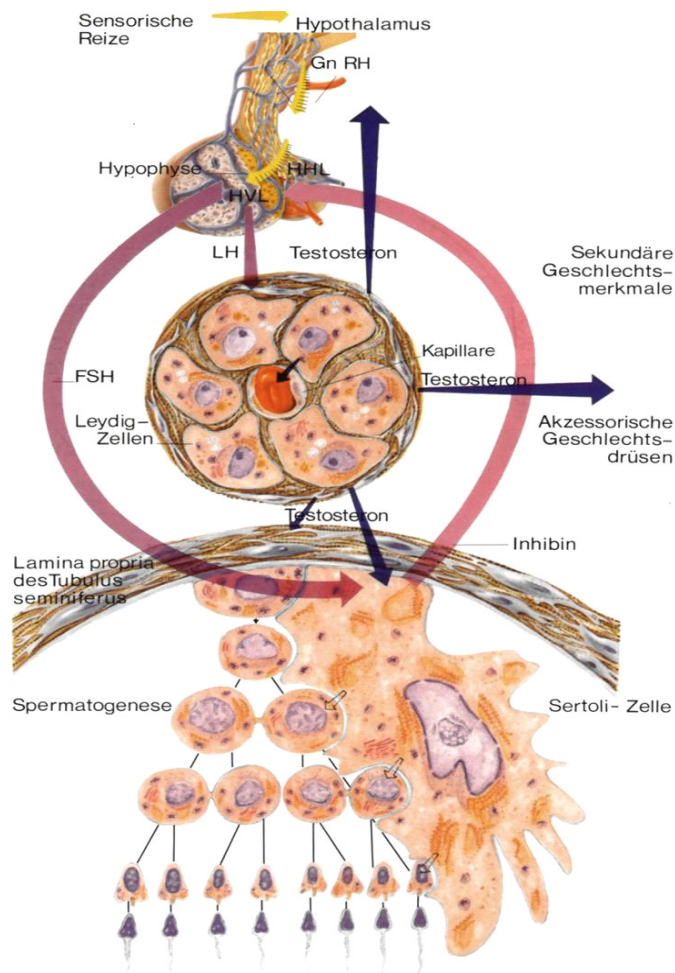
Bei der Entwicklung und Differenzierung eines einzelnen Spermatogoniums in ein reifes Spermatozoon (Zyklus der Spermatogenese) werden exakt 4,6 Zyklen des Keimepithels durchlaufen. Bei einer Zyklusdauer von 16 Tagen errechnet sich daraus die Gesamtdauer der menschlichen Spermatogenese (74 Tage). Das Prinzip dieser zeitlichen und räumlichen Abfolge bezeichnet man als Synchronisation der Spermatogenese.

## 1.4 Hormonelle Kontrolle der Spermatogenese

Die Funktion des Hodens wird primär von Strukturen des Zwischenhirns (Hypothalamus) und der Hirnanhangdrüse (Hypophyse) beeinflusst (endokrine Regulation). Darüber hinaus spielen lokale Steuerungsmechanismen (parakrine und autokrine Regulation) eine wichtige Rolle. Für die Spermatogenese der Säuger sind vor allem das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH), sowie das Testosteron essentiell. An der hormonellen Regulation sind Leydigzellen, Sertolizellen und peritubuläre Zellen beteiligt. Jeder dieser Zelltypen ist ein direktes Ziel für ein oder mehrere Hormone, deren Signale für die Initiierung und den korrekten Ablauf der Spermatogenese wichtig sind (Holdcraft und Braun, 2004). Die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse wird durch das *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) aus dem Hypothalamus gesteuert. LH regt die Synthese und Sekretion des Testosterons in den Leydigzellen an. Neben Leydigzellen besitzen Sertolizellen und peritubuläre Myoidzellen Rezeptoren für Testosteron und sind so für die Vermittlung des Testosteronsignals verantwortlich. Das Testosteron ist für die Initiierung der Spermatogenese und für ihr lebenslanges Bestehen verantwortlich (Sharpe *et al.*, 1994). Die Wirkung auf die Keimzellen erfolgt indirekt, da diese keine Rezeptoren für Testosteron exprimieren. Die Wirkung des FSH auf die Keimzellen erfolgt ebenfalls indirekt und wird von den Sertolizellen vermittelt, die an ihrer Oberfläche FSH-Rezeptoren besitzen. Die Regulation der LH- und FSH-Sekretion erfolgt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus von Hypothalamus und Hypophyse. Testosteron wirkt hemmend auf die Ausschüttung von LH und FSH. Für das FSH existiert darüber hinaus noch ein weiterer Regulator, das Glykoprotein Inhibin B, das unter FSH-Einfluss hauptsächlich von den Sertolizellen aber auch von den Keimzellen gebildet wird. Es kontrolliert bzw. unterdrückt selektiv die Ausschüttung von FSH aus der Hypophyse.

Neben den Leydigzellen werden den im Interstitium des gesunden, adulten Hodens vertretenen Zellen des Immunsystems ebenfalls regulatorische Funktionen zugeschrieben (Hedger, 1997 und 2002). Makrophagen stellen nach den Leydigzellen den zweithäufigsten Zelltyp im interstitiellen Kompartiment dar, aber auch Mastzellen gehören zu den residenten

Immunzellen des adulten Hodens (Nistal *et al.*, 1984; el-Demiry *et al.*, 1987). Die Funktion von Mastzellen im Hoden unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist bisher nicht geklärt. Wahrscheinlich sind Mastzellen an der komplexen lokalen Regulation von Hodenfunktionen beteiligt (Hedger, 1997).



**Abbildung 1.4: Endokrine Steuerung der Spermatogenese (aus Breckwoldt *et al.*, 1991).**

## 1.5 Genexpression im Testis

Die Spermatogenese ist ein komplexer Differenzierungsprozess, der eine präzise gesteuerte Gentranskription und -translation erfordert, um die morphologischen und funktionellen Veränderungen zu ermöglichen, die die Keimzellen erfahren. Über die molekularen Mechanismen, die den koordinierten Ablauf der Spermatogenese kontrollieren, ist im Vergleich zu anderen Entwicklungsprozessen bis heute relativ wenig bekannt. Annähernd 1000-2000 Gene scheinen den Prozess der Spermatogenese zu steuern (Hargreave, 2000). Von diesen sind eine Reihe von Genen bekannt, die spezifisch in den männlichen Keimzellen exprimiert werden. Diese stellen häufig Paraloge von somatisch exprimierten Genen dar. Vordergründig erscheint es „ineffizient“ für die männlichen Keimzellen, anstelle eines

existierenden Gens ein neues Gen zu exprimieren, das schließlich für ein fast identisches Protein kodiert. Es gibt aber auch Vorteile, ein „eigenes“ Gen zu exprimieren. In männlichen Keimzellen wird das X-Chromosom während der Meiose inaktiviert, so dass viele dort lokalisierten Gene nicht mehr exprimiert werden können. Die Keimzellen kompensieren diesen Zustand durch die Expression eines autosomalen Paralogs. Beispiele für Gene, die über ein autosomal lokalisiertes Gen der X-chromosomalen Inaktivierung entgehen, sind z. B. solche, die für wichtige Enzyme kodieren, wie Pyruvat-Dehydrogenase (Fitzgerald *et al.*, 1992) und Phosphoglyceratkinase (McCarrey *et al.*, 1996). Ein weiterer Vorteil Keimzell-spezifischer Isoformen ist die spezifische Anpassung von Proteinen. Das Keimzellprodukt erfüllt dieselbe Rolle des somatischen Zellproduktes, kann aber noch zusätzliche strukturelle oder funktionelle Ergänzungen aufweisen, die eine spezifische Funktion in Keimzellen unterstützen. Beispielsweise besitzt die Keimzell-spezifische Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase nur in Keimzellen eine prolinreiche N-terminale Domäne, über die das Enzym an Flagellum-Komponenten gebunden ist (Bunch *et al.*, 1998). Des Weiteren gibt es Keimzell-spezifische Isoformen somatischer Proteine, die von Transkriptvarianten translatiert werden, die von denselben Genen wie die somatischen Transkripte stammen. Sie unterscheiden sich von diesen allerdings in ihrer Länge oder in ihrer Gesamtsequenz. Diese Unterschiede entstehen durch Ausnutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartstellen, durch alternatives Spleißen oder über die Benutzung alternativer Initiationsstellen für die Polyadenylierung (Eddy, 2002). Zu den Transkriptvarianten, die durch alternatives Spleißen entstehen, gehört zum Beispiel der Transkriptionsfaktor CREM (*cAMP-responsive-element-modulator*), der bei der Regulation postmeiotischer Genexpression eine entscheidende Rolle spielt. Über eine Bindung an ein spezifisches *cis*-aktivierendes Element, das *cAMP-responsive element* (CRE), das in vielen Promotorsequenzen postmeiotisch exprimierter Gene vorhanden ist, reguliert CREM spezifisch die Expression dieser Zielgene. Das CREM-Gen kodiert dabei sowohl Repressoren (CREM  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) als auch Aktivatoren (CREM  $\tau$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) der cAMP-induzierten Transkription. Testikuläre CREM-Expression wechselt in haploiden Keimzellen von der Expression von Repressoren zur Expression von Aktivatoren (De Cesare *et al.*, 2000). Die Steuerung der transkriptionellen Aktivität von CREM erfolgt in Keimzellen im Gegensatz zu somatischen Zellen phosphorylierungsunabhängig über einen Testis-spezifischen Koaktivator ACT (*activator of crem in testis*), der spezifisch in haploiden runden und elongierenden Spermatischen Keimzellen exprimiert wird (Fimia *et al.*, 1999).

Viele Keimzell-spezifisch exprimierten Gene haben jedoch keine somatischen Paraloge. Sie werden oft erst postmeiotisch in haploiden Keimzellstadien transkribiert, wenn die speziellen

Strukturen der reifenden Spermien gebildet werden. Während der Spermiogenese werden beispielsweise die nukleären Histone durch kleine, basische arginin- und cysteinreiche Proteine, die Protamine, ersetzt, um eine dichtere Packung der DNA zu erreichen. Diese Kondensation des Zellkerns erfolgt zunächst über einen intermediären Austausch der Histone durch Transitionsproteine. Protamine und Transitionsproteine sowie die Strukturproteine des Spermienflagellums sind haploid exprimierte Genprodukte.

Mit zunehmender Chromatinkondensation stellen die reifenden Spermatiden ihre Transkriptionsaktivität irgendwann ein (Sassone-Corsi, 2002). Dennoch ist eine *de novo*-Proteinsynthese für die spezifische morphologische Differenzierung des elongierenden Spermiums weiterhin notwendig. Das Problem wird umgangen, indem viele Gene zu einem früheren Zeitpunkt transkribiert und die mRNAs in einer vor dem Abbau geschützten Form in so genannten Ribonukleoprotein-Partikeln (RNPs) im Cytoplasma gelagert werden (Kleene *et al.*, 1984). Erst in späteren Stadien der Spermiogenese werden diese gespeicherten mRNAs dann translatiert. Trotzdem werden nachweislich noch viele Gene in späten Stadien der Spermiogenese transkribiert wie beispielsweise das Testis-spezifische Succinyl-Coenzym A (*3-Oxo acid CoA transferase*, Tanaka und Baba, 2005). Über die Mechanismen dieser „späten“ Transkription ist sehr wenig bekannt. Reife Spermatozoen sind transkriptionell und translationell dagegen inaktiv. Dennoch tragen sie eine bestimmte Anzahl verschiedener mRNAs mit sich, die unter bestimmten Bedingungen *de novo* translatiert werden können, wahrscheinlich an mitochondrialen Polysomen (Ostermeier *et al.*, 2002; Miller und Ostermeier, 2006). Somit könnte das Genexpressionsprofil der Spermatozoen quasi als eine „nicht-invasive Hodenbiopsie“ dazu dienen, infertile von fertilen Ejakulaten zu unterscheiden. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese paternellen mRNAs während der Fertilisation auf die Eizelle übertragen werden (Ostermeier *et al.*, 2004). Die Frage, ob diese Transkripte wichtig für den sich entwickelnden Embryo sind, bleibt zu klären.

## 1.6 Mikroarray-Technologie

### 1.6.1 Das Prinzip

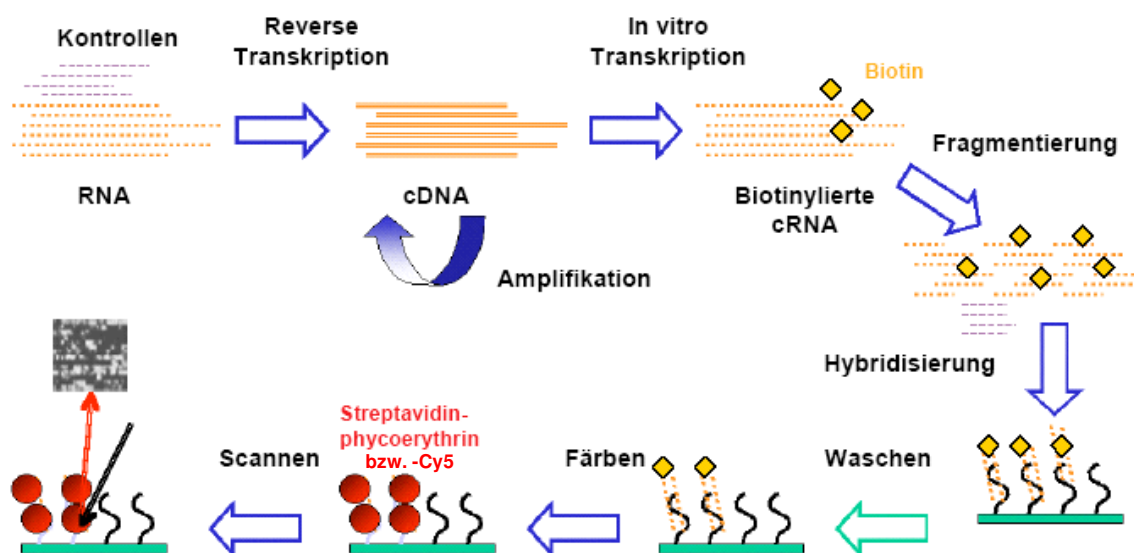
Die Mikroarray-Technologie (Fodor *et al.*, 1991; Fodor *et al.*, 1993) ermöglicht die massenhafte, simultane Durchführung von Hybridisierungsreaktionen an der Oberfläche einer Festphase (*array*). Sie beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung von markierten DNA- oder RNA-Molekülen (*target*) an genspezifische Sequenzen (Sonden), die auf der Oberfläche der Festphase immobilisiert sind. Die Bildung der Doppelstränge setzt voraus, dass die Bindungspartner zueinander komplementär sind, also eine Watson-Crick-Basenpaarung miteinander eingehen können. Mikroarrays zeichnen sich durch eine Spotgröße von weniger als 250 µm im Durchmesser aus, so dass auf einem einzelnen Mikroarray im Prinzip über 1.000.000 Spots aufgebracht werden können. Deshalb werden sie auch als *high-density microarrays* (Gershon, 2002) bezeichnet. Nach Entfernen der flüssigen Phase bleiben die Doppelstränge an der Festphase zurück und können dort nach Art und Menge vermessen werden. Somit kann man das Prinzip der Mikroarrays als eine Umkehrung des *Southern Blots* (Southern, 1975) bzw. des *Northern Blots* (Alwine *et al.*, 1977) betrachten (Freeman, 2000), bei dem die zu untersuchende Probe (DNA oder RNA) auf einer Membran immobilisiert wird und mit den freien, markierten Sonden hybridisieren kann. Im Unterschied zu diesen traditionellen Methoden, die in üblichen Ansätzen nur Daten zu einzelnen bzw. wenigen Genen liefern, ermöglichen Mikroarrays die parallele Ausführung und weitgehend automatische Auswertung tausender Hybridisierungsexperimente bei geringem Material-, Platz- und Zeitbedarf (Brown und Botstein, 1999).

Je nach Anwendung unterscheidet man zwischen Array-Typen für Gen- oder Genexpressionsanalysen. Für Genanalysen werden PCR-Produkte genomischer DNA aus dem interessierenden Chromosom/Gen auf den Mikroarray aufgebracht. Solche DNA-Arrays werden benutzt, wenn schnell sehr viele Gene parallel untersucht werden sollen (*highthroughput gene mapping*), um Polymorphismen, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) oder kleinere Deletionen/Insertionen aufzufinden (Shalon *et al.*, 1996).

Die verbreitetste Anwendung der Technologie stellt zweifelsohne die globale Analyse der Genexpression, des Transkriptoms von Geweben oder Zellen dar, deren Entwicklung und Nutzung in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt ist (Hedenfalk *et al.*, 2001; Hippo *et al.*, 2002). Durch den Vergleich der Genexpression in verschiedenen Geweben, Zellpopulationen oder Entwicklungsstadien lassen sich differentiell exprimierte Genexpressionsmuster (molekulare Signaturen) entdecken sowie die Komplexität multifaktorieller Erkrankungen abschätzen (vgl. Abschnitt 1.6.3, Schena *et al.*, 1995). Somit

erlauben Mikroarrays Einblicke in den molekularen Phänotyp von Erkrankungen oder erkranktem Gewebe. Sie sind heute zu einem wichtigen Bestandteil in der biomedizinischen Grundlagenforschung und auch der klinisch-orientierten Forschung geworden.

Herstellungstechnisch werden zwei verschiedene Array-Arten unterschieden, cDNA-Arrays und Oligonukleotid-Arrays. Bei den cDNA-Arrays wird zumeist auf eine spezifische Fragestellung des Anwenders hin eine ausgesuchte Zahl an Gensequenzen als cDNA-Fragmente (500 bis 5000 Basen lang) durch sog. *Spotting* auf speziell beschichtete Träger aufgebracht (Duggan *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich meist um PCR-Fragmente aus Klonen einer speziellen cDNA-Bank, die neben bekannten Sequenzen auch unbekannte Klone enthält. Bei den Oligonukleotid-Mikroarrays werden genspezifische Sequenzen in Form von Oligonukleotiden (25-60 Basen lang) verwendet, die komplementär zu einem bestimmten Sequenzbereich am 3'-Ende der mRNA der jeweiligen Gene sind. Zusätzlich wird mit Mikroarrays die Expression von ESTs (*Expressed Sequence Tags*) untersucht, also von Produkten der Transkription, deren Sequenz bekannt, aber deren Zuordnung zu einem Gen oder Protein noch nicht definiert ist (Schuler, 1997). Der Ablauf eines typischen Mikroarray-Experimentes zur Analyse der Genexpression ist in Abbildung 1.5 dargestellt, wobei die einzelnen Schritte im Material- und Methodenteil näher erläutert werden.



**Abbildung 1.5: Ablauf eines typischen Mikroarray-Experimentes.** Es umfasst die cRNA-Herstellung ausgehend von Gesamt-RNA über cDNA, die Hybridisierung mit einem Mikroarray, das Waschen der Mikroarrays nach der Hybridisierung mit gleichzeitiger Fluoreszenz-Markierung sowie die Laser-induzierte Detektion.

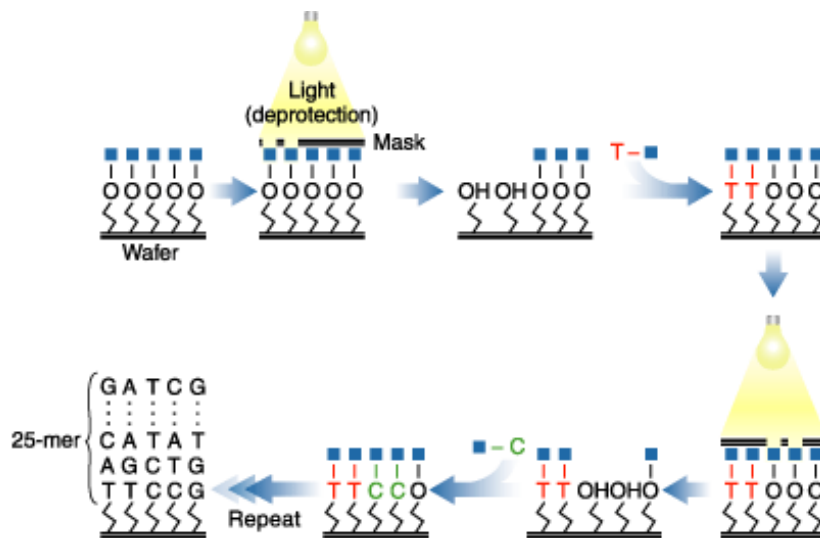
## 1.6.2 Verschiedene Mikroarray-Plattformen

Zu Beginn der 90er Jahre wurde mit dem GeneChip<sup>®</sup> von Affymetrix der erste kommerzielle Array für Genexpressionsanalysen auf den Markt gebracht (Fodor *et al.*, 1991). Angetrieben durch diese Entwicklung haben Mikroarrays seitdem Einzug in das methodische Repertoire der Naturwissenschaften erhalten (Schena *et al.*, 1995). Im Jahre 1999 hat die Firma Agilent Technologies ihren ersten DNA-Mikroarray präsentiert und 2001 wurde das CodeLink *Bioarray System* von der Firma Motorola (heute von GE Healthcare vertrieben) auf den Markt gebracht. Die einzelnen Technologien unterscheiden sich unter anderem in der verwendeten festen Oberfläche (z. B. Quarz, Glas oder Nylonmembran) und dem davon abhängigen Verfahren der Nukleinsäure-Immobilisierung, in der Länge der Sonden, in deren Dichte – also in der Anzahl der pro Array gleichzeitig messbaren Sonden – und in der Detektionsmethode (z. B. Ein- oder Zwei-Farben-Fluoreszenz). Nicht zuletzt unterscheiden sich die Mikroarrays in den zugrunde liegenden Sequenzinformationen (Art der Gendatenbank, Version der Gendatenbank, Selektionsverfahren der Sonden, usw.). Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt die Herstellung und der Aufbau derjenigen Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> und CodeLink *Bioarrays* erläutert, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden. In beiden Fällen handelt es sich dabei um Oligonukleotid-Mikroarrays.

### 1.6.2.1 Aufbau und Herstellung der Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>

Bei Affymetrix erfolgt die Synthese der Oligonukleotide *in situ*, d.h. direkt auf der Oberfläche über ein photolithographisches Verfahren, das in Abbildung 1.6 dargestellt ist. Auf silanisierte Quarzobjektträger werden synthetische Verbindungsstücke aufgebracht, die mit photolabilen Schutzgruppen, meist Carbonaten, modifiziert sind, die bei Bestrahlung CO<sub>2</sub> eliminieren. Nach partieller Abdeckung mit einer entsprechenden Maske werden die Schutzgruppen an den gewünschten Stellen photochemisch - also durch Licht – entfernt, so dass das erste Nukleotid, das seinerseits ebenfalls eine photolabile 5'-Schutzgruppe trägt, an die nicht mehr geschützte Position binden kann. Diese Prozedur wird nun mit wechselnden Masken und Nukleotiden so lange wiederholt, bis alle Oligonukleotide eine Länge von 25 Basen erreicht haben. Dann werden sämtliche verbleibenden Schutzgruppen abgespalten, und der Chip ist gebrauchsfertig.



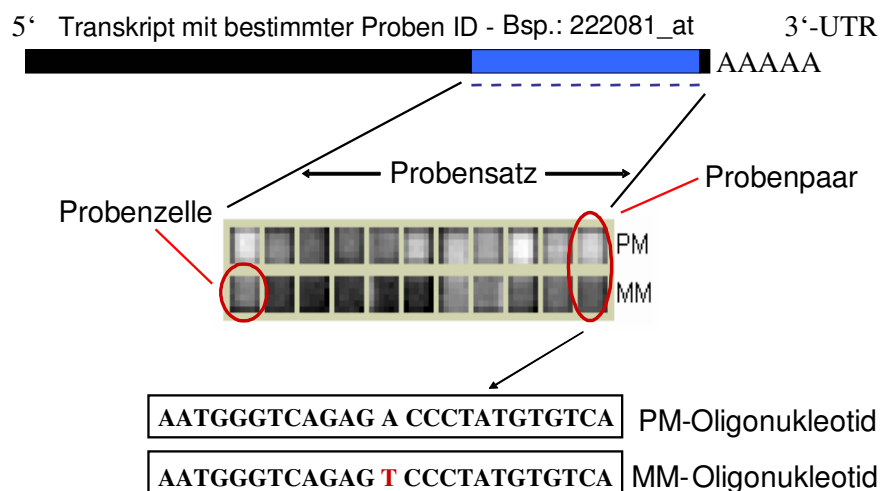


**Abbildung 1.6: Photolithographische Synthese der Oligonukleotide (Quelle: Affymetrix, <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>).**

Die Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> *Human Genome* U133 Plus 2.0 (HG-U133 Plus 2.0), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, enthalten in etwa 1.300.000 Oligonukleotide auf jedem Chip. Dies entspricht 54.671 Probensätzen und umfasst ca. 47.400 Transkripte bzw. 38.500 gut charakterisierte humane Gene. Einige der Gene sind mehrfach repräsentiert. Auf jedem Array sind zusätzlich SONDENSÄTZE für Kontrollen aufgebracht, so genannte *Hybridization Controls* (*bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre*). Dabei handelt es sich um RNAs prokaryotischer Gene. Sie dienen als quantitative Kontrolle für die Hybridisierung und werden vor der Hybridisierung in verschiedenen Konzentrationen zur Probenlösung gegeben. Da es schon bei der Probenvorbereitung zu Fehlern kommen kann, werden den Proben Poly-A<sup>+</sup> RNA-Kontrollen, so genannte *Spike Controls*, beigelegt. Die als *dap*, *lys*, *phe*, und *thr* bezeichneten Kontrollen sind Teile aus Genen des *B. subtilis* und dienen als Kontrolle der cDNA-Synthese, Amplifikation und Markierung. Niedrige Signale dieser Kontrollen deuten dabei auf ein Problem während der Probenvorbereitung hin. Weiterhin befinden sich auf jedem Mikroarray Sonden für verschiedene *Housekeeping Controls*. Für alle Kontrollen (*Hybridization Controls*, *Spike Controls* und *Housekeeping Controls*) finden sich mehrere SONDENSÄTZE auf dem Array, die aus unterschiedlichen Bereichen der RNA stammen. In der Regel werden sowohl Sequenzteile vom 5'-, 3'-Ende und aus der Mitte (M') der mRNA genommen. Dadurch kann die Qualität der Proben-RNA und die Effizienz der cDNA-Synthese zusätzlich beurteilt werden. Aufgrund des Syntheseweges vom 3'- zum 5'-Ende sollten die Detektionen vom 3'-Ende wesentlich höher sein als die vom 5'-Ende.

Um eine hohe Robustheit gegenüber Hybridisierungsfehlern zu bieten, wurde bei Affymetrix ein spezielles Design entwickelt. Auf einem Array der Fläche von 1,28 cm x 1,28 cm gibt es

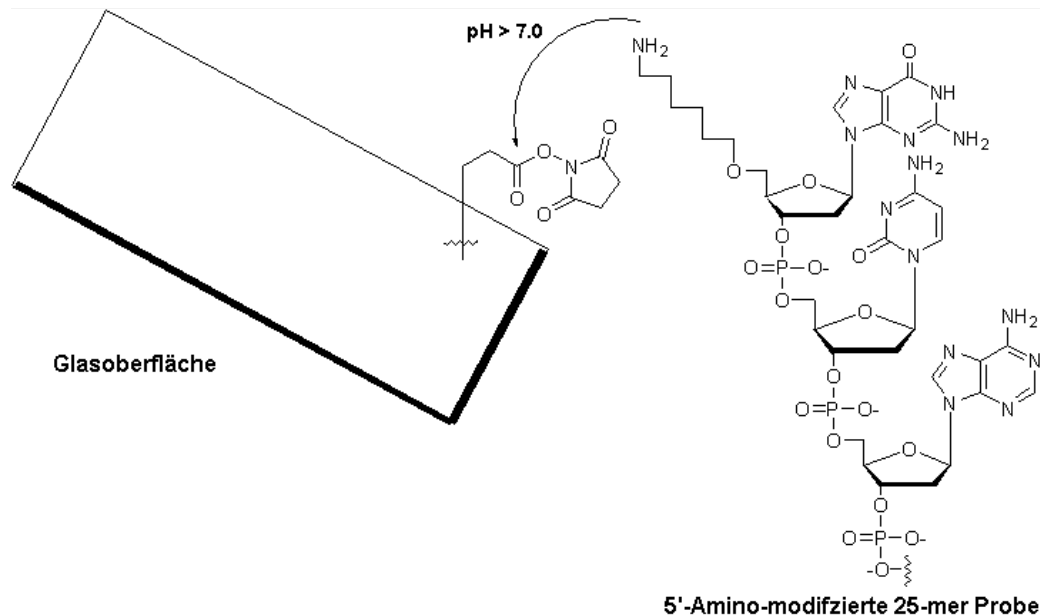
kleine Quadrate (ca. 24 x 24  $\mu\text{m}$ ), so genannte Probenzellen (*probe cells*). Jedes Gen bzw. Transkript wird dabei durch elf Probenzellen repräsentiert. Eine Probenzelle bzw. Sonde enthält  $1 \times 10^7$  Kopien von 25-mer langen Oligonukleotiden, die komplementär zu einer Sequenz am 3'-Ende der zugehörigen mRNA ist. Elf Quadrate decken so elf verschiedene 25-mer lange Sequenzbereiche am 3'-Ende der mRNA ab, wobei diese unter anderem so ausgewählt sind, dass sie sich, wenn möglich, nicht überlappen. Zu jeder Probenzelle (*Perfect Match-Sonde*) gehört eine Probenzell-Negativkontrolle (*Mismatch-Sonde*), die bis auf eine Fehlpaarung in der Mitte des Oligonukleotids die gleiche Sequenz des jeweiligen Oligonukleotids enthält, wobei die Fehlpaarung jeweils die komplementäre Base zur perfekten Sequenz darstellt. Somit kommt es an dieser Position zu keiner oder einer wesentlich schwächeren Bindung. Die Idee dieser *Mismatch*-Sonden ist, Hintergrundsignale (zum Beispiel durch Eigenschaften des Scanners verursachtes Rauschen der Signale) oder unspezifische Interaktionen (z.B. Kreuzhybridisierungen oder unspezifische Hybridisierungen) zu quantifizieren und mit den *Perfect Match*-Signalen zu verrechnen (Lockhart *et al*, 1996). Diese beiden Oligonukleotide bilden zusammen ein Probenpaar (*probe pair*). Jedes Gen ist somit durch elf Probenpaare (*Perfect Match* und *Mismatch*) repräsentiert, welche zusammen als Probensatz (*probe set*) bezeichnet werden (Abbildung 1.7) und auf dem Array an unterschiedlichen Positionen angeordnet sind. Dadurch werden Seiteneffekte durch die Hybridisierung sowie eine Beeinträchtigung mehrerer Probenpaare eines Probensatzes durch größere räumlich begrenzte Störungsquellen (Flusen, Ausfällungen) verhindert.



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des PM-MM-Prinzips der Affymetrix-Technologie.** Jedes Gen wird durch elf Zellen repräsentiert, deren Oligonukleotide perfekt zu einem 25-mer langen Sequenzabschnitt am 3'-Ende des entsprechenden Gens hybridisieren (PM = *Perfect Match*). Jede Probenzelle hat ihre eigene Negativkontrolle, nämlich eine zugehörige Probenzelle, in der dieselben Oligonukleotide mit einem zentralen *Mismatch* (MM) angeordnet sind. Die elf Probenpaare aus *Perfect Match* und *Mismatch* sind auf dem Chip an unterschiedlichen Positionen angeordnet.

### 1.6.2.2 Aufbau und Herstellung der CodeLink *Bioarrays*

Die CodeLink-Mikroarrays bestehen aus Glas, einem Material mit geringer Grundfluoreszenz und hoher Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen. Die aktivierten Glasobjektträger der Größe 25 mm x 75 mm x 1 mm enthalten eine gel-ähnliche, dreidimensionale Oberfläche, die aus einem langkettigen, hydrophilen Polymer besteht. Dadurch wird eine unspezifische Bindung reduziert mit dem Resultat geringerer Hintergrundsignale. Das Polymer, das mit sich selbst sowie mit der Oberfläche quervernetzt ist, orientiert die immobilisierten Proben und hält sie von der Oberfläche des Glasträgers entfernt. Die für die Bindung der Oligonukleotid-Proben reaktiven Gruppen stellen dabei N-Hydroxysuccinimid-Ester dar. Vorher synthetisierte und funktionell validierte 30-mer Oligonukleotide werden in einem kontaktlosen, piezoelektrischen Verfahren auf die dreidimensionale Gelmatrix aufgebracht. Dabei erfolgt die Verknüpfung über eine kovalente Kondensationsreaktion (über eine Schiff'sche Base als Zwischenprodukt) zwischen der Amino-modifizierten Gruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids und der aktivierten funktionellen Gruppe auf der Glasoberfläche (Abbildung 1.8). Die dreidimensionale Matrix liefert eine biologisch wässrige Umgebung sowie Flüssigphasen-Kinetiken, was die Assay-Sensitivität erhöht.



**Abbildung 1.8:** Prinzip der Bindung eines Oligonukleotids an eine CodeLink aktivierte Glasoberfläche (Quelle: <http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/resources/microarrays/details.php>).

Die CodeLink *UniSet Human 20K I Bioarrays*, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, enthalten 20.289 Oligonukleotide, die 19.881 entdeckte Gene repräsentieren. Dabei wird ein Gen in der Regel durch ein einziges Oligonukleotid mit der Länge von 30 Basen

repräsentiert. Weiterhin enthalten die Arrays 300 negative und 108 positive bakterielle Kontrollen sowie etwa 100 *Housekeeping Gene* und *Fiducials*. Negative Kontrollen sollten kein Signal bei der Hybridisierung ergeben und dienen als ein Maß für den Hintergrund. Falls sie doch ein Signal ergeben, waren die Hybridisierungsbedingungen nicht stringent genug. Die als Positiv-Kontrollen eingesetzten bakteriellen Kontroll-mRNAs, die so genannten *Spike Controls* *araB*, *entF*, *fixB*, *gnd*, *hisB* und *leuB* werden in unterschiedlichen Konzentrationen zu Beginn der cDNA-Synthese zugesetzt und dienen wiederum dazu, die Effizienz der Probenvorbereitung und Hybridisierung zu beurteilen (siehe oben).

### **1.6.3 Die Mikroarray-Technologie in der Untersuchung multifaktorieller Krankheiten**

Bei vielen Erkrankungen wirken mehrere Gene mit Schadstoffen aus der Umwelt sowie individuelle Lebensgewohnheiten zusammen, die in unterschiedlicher Kombination an der Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt sind. Diese Erkrankungen werden deshalb als polygen und komplex oder auch als multifaktoriell bezeichnet. Die zugrunde liegenden vielfältigen Veränderungen im Netzwerk der Zelle sind noch weitgehend unbekannt. Die beteiligten Gene sind gegenwärtig noch sehr schwer zu identifizieren, da sie – einzeln betrachtet – häufig das Krankheitsrisiko nur geringfügig beeinflussen. Im Falle männlicher Infertilität gibt es verschiedene Krankheitsbilder, bei deren Entstehung genetische Ursachen und Umweltfaktoren vermutlich eine unterschiedlich große Gewichtung haben. Das Spektrum reicht dabei von monogenen, angeborenen Erkrankungen bis hin zu erworbenen Störungen, wobei in nur einer kleinen Minderheit der Fälle männliche Infertilität monogenetisch begründet zu sein scheint wie beispielsweise im Falle des Kallmann-Syndroms (Abbildung 1.9). Die idiopathische männliche Infertilität kann als heterogene, multifaktorielle Störung angesehen werden, bei der in der Mehrheit der Patienten neben den oben genannten Faktoren epigenetische Ereignisse und *de novo*-Gendefekte eine Rolle spielen.

Während in der Vergangenheit die molekularen Ursachen zahlreicher monogener Erkrankungen nach jahrelanger Arbeit aufgeklärt wurden, können komplexe Krankheitsbilder mit den Methoden der klassischen genetischen Forschung dagegen nicht effektiv ermittelt werden.

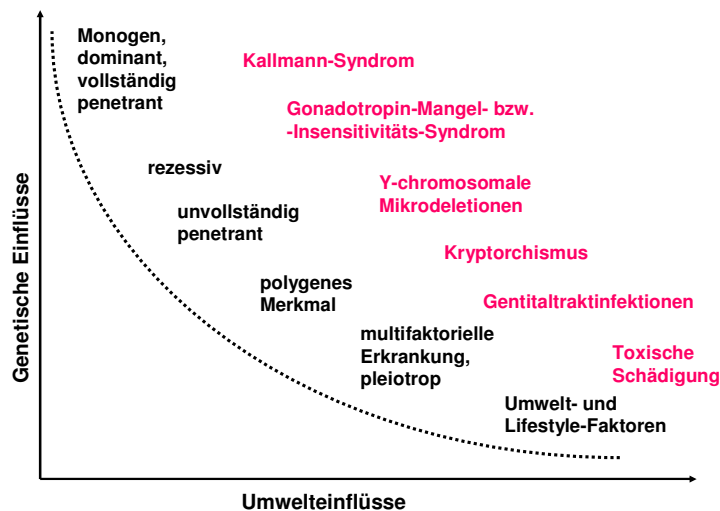


Abbildung 1.9: Männliche Infertilität als heterogene, multifaktorielle Störung.

Die Entschlüsselung des humanen Genoms und die Etablierung von Mikroarray-basierten Hochdurchsatzverfahren in der Transkriptomforschung bestimmt inzwischen die Art und Weise, wie komplexe Pathologien diagnostiziert und Krankheitsmechanismen untersucht werden. Dabei stellen globale Genexpressionsanalysen mit Hilfe der Mikroarray-Technologie eine weit verbreitete Methode zur Erstellung von Genexpressionsprofilen dar, die mit Krebserkrankungen und vielen anderen Erkrankungen assoziiert sind (Brown und Botstein, 1999). Diese Technologie offenbart somit neue Möglichkeiten für die Analyse komplexer Krankheitsbilder. Bei Expressionsanalysen wird dabei vom momentanen Expressionsstatus aller Gene einer Zellpopulation bzw. eines Gewebes ein „molekularer Fingerabdruck“ erstellt. Es kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Gen zum jeweiligen Zeitpunkt an- oder abgeschaltet war. Es lassen sich aber vor allem auch quantitative Unterschiede messen. So kann die Expressionsstärke eines Gens bzw. mehrerer Gene eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielen. Im Gegensatz zur traditionellen Gen-für-Gen-Analyse ist die Mikroarray-Technologie somit in der Lage, den Zeitpunkt der Genexpression während der Entwicklung sowie den Einfluss von Krankheiten auf Änderungen des Expressionsverhaltens einer Vielzahl von Genen zu beschreiben.

Obwohl die Anwendung der Mikroarray-Technologie für Genexpressionsanalysen sehr vielseitig ist, lassen sich die Ziele aus statistisch methodischer Sicht in der biomedizinischen Forschung grob in folgende drei Bereiche einteilen:

- Untersuchung auf Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Proben aus verschiedenen Gruppen und Suche nach differentiell exprimierten Genen (*class comparison*)

- Clusteranalyse von Genen/Proben zur Entdeckung von Gruppen oder Strukturen in einem Datensatz (*class discovery*)
- Einordnung von Proben in durch Expressionsmuster typisierte Klassen zur Klassifikation von Krankheitsentitäten (*class prediction*)

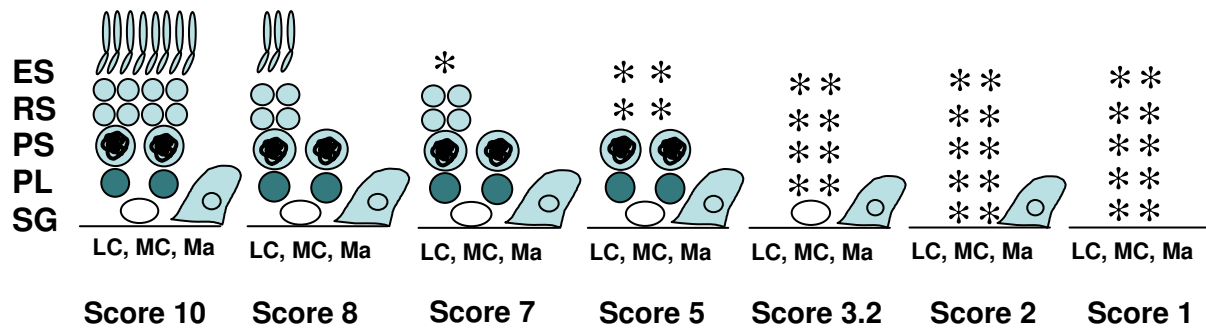
Bei der Untersuchung auf Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen Gruppen interessiert dabei der Vergleich von Genexpressionsstärken und -profilen in Patientengeweben gegenüber Kontrollgeweben. Ziel ist die Entdeckung von molekularen Ursachen für komplexe Krankheiten, die als Ansatzpunkte für (kausale) Therapien dienen können (Gu *et al.*, 2002). In der Clusteranalyse wird nach Gengruppen oder Subgruppen gesucht, die ähnliche Expressionsmuster zeigen (Eisen *et al.*, 1998; Tamayo *et al.*, 1999). Eine Anwendung ist zum Beispiel die Differenzierung neuer Tumorsubtypen und die Identifizierung von Gengruppen, deren Expression den Subtypen gemeinsam ist (Alizadeh *et al.*, 2000; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001). In der Klassifikation verschiedener Krankheitsentitäten liegt eine der für die Klinik viel versprechenden Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse. Ihr Ziel liegt in der Zuordnung von Proben zu bekannten Gruppen anhand ihrer Expressionsprofile. Dabei wird versucht, eine minimale Gruppe von Genen zu identifizieren, die so genannten Diskriminatoren, anhand derer man die Gruppen mit ausreichender Sicherheit unterscheiden kann. So konnten zum Beispiel Patientinnen mit Brustkrebs in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen eingeteilt werden, so dass sie entsprechend dieser Einteilung therapiert werden könnten (van de Vijver *et al.*, 2002).

#### **1.6.4 Klassifizierung unterschiedlicher Testispathologien als eine notwendige Voraussetzung für globale Genexpressionsstudien**

Ansätze zur Ursachenforschung sind nach Einführung der assistierten Reproduktionstechniken häufig mit der Meinung konfrontiert, dass die Problematik der idiopathischen männlichen Infertilität nun gelöst sei. Dementsprechend gibt es nur wenige Versuche, die aus „therapeutischen“ Gründen durchgeführte Hodenbiopsie auch für eine umfassende Diagnose zu nutzen. Eine solche Differentialdiagnose des Testis kann aber durchaus Aufschluss über die Ursachen der Infertilität liefern. Die gegenwärtige klinische Klassifizierung ejakulatorischer Azoospermie, die hauptsächlich die nicht-obstruktive Azoospermie von Obstruktionen des männlichen Genitaltraktes unterscheidet, ist für den Zweck der molekularen Ursachenforschung nicht ausreichend, da sie verschiedene Spermatogenesestörungen des Hodens umfasst. Nicht-invasive Methoden, wie zum Beispiel

die Bestimmung von Hormonwerten im Blut, sind für eine Unterscheidung verschiedener Pathologien in der Regel zu unempfindlich. Obwohl der Serum-FSH-Wert positiv mit dem Prozentsatz von *Sertoli cell-only* (SCO)-Tubuli in einer Hodenbiopsie korreliert (Martin-du Pan und Bischof, 1995; Yaman *et al.*, 1999), ist er nicht als Prognosefaktor für die Anwesenheit von Spermatozoen geeignet (Seo und Ko, 2001). Gleiches gilt für das LH, Testosteron und Prolaktin (Hauser *et al.*, 2002). Auch Inhibin B allein sowie in Kombination mit FSH kann die Anwesenheit von Spermatozoen nicht mit Sicherheit vorhersagen (von Eckardstein *et al.*, 1999). Tatsächlich ist eine differentielle Feindiagnose unterschiedlicher Testispathologien gegenwärtig nur auf der Grundlage einer genauen histopathologischen Untersuchung des Hodengewebes selbst möglich (Schulze *et al.*, 1999). Der Klassifizierung liegt dabei ein von Johnsen (1970) entwickeltes und von de Kretser und Holstein (1976) modifiziertes morphologisches Beurteilungsschema zugrunde, das die in den Hodenkanälchen vorhandenen Zelltypen beschreibt und quantifiziert, der so genannte „Johnsen Score“. Anhand von histologischen Schnittpräparaten wird der Spermatogenesestatus in der Biopsie bewertet, in dem die Zelltypen in den Tubuli seminiferi ausgezählt werden. Hierzu werden in der Regel 40-50 Tubulusquerschnitte beurteilt und jedem Hodenkanälchen je nach spermatogenetischem Status ein Wert von 1 (keine Zellen in den Tubuli) bis 10 (normale Spermatogenese) zugeteilt. Das ausschlaggebende Entscheidungskriterium bei dieser Methode ist die Anzahl und der Differenzierungsgrad der Keimzellen in einem Tubulus (Abbildung 1.10). Bei fortschreitender Degeneration des Keimepithels, die mittels des abnehmenden Johnsen Scores beschrieben wird, gehen sukzessive Zelltypen aus den Hodenkanälchen verloren. Dabei kommt es meist zum Verlust der jeweils am weitesten differenzierten Keimzellstadien, d.h. zunächst gehen die elongierten Spermatiden (testikulären Spermatozoen) zugrunde, gefolgt von den runden Spermatiden, Spermatozyten und schließlich Spermatogonien bis hin zur *Sertoli cell-only* Symptomatik (SCO-Symptomatik). Die somatischen Zellen des Keimepithels, die Sertolizellen verschwinden zuletzt, woraus eine komplette Tubulusatrophie resultiert.

Abbildung 1.10 zeigt schematisch die häufigsten Testispathologien mit der Zusammensetzung der Zelltypen im Keimepithel und ihre Klassifizierung mittels des modifizierten Johnsen Scores. Intakte Spermatogenese liegt vor, wenn über 20 reife Spermatiden pro Tubulusanschnitt vorhanden sind. Intakte Spermatogenese zeichnet sich weiterhin durch das Vorhandensein von Spermiationszonen aus, in denen die reifen testikulären Spermien in das Lumen entlassen werden.



**Abbildung 1.10: Schematische und nicht-quantitative Darstellung der Zelltypen, wie sie bei der morphologischen Klassifizierung mittels des modifizierten Johnsen Scores zur Bewertung des Spermatogenesestatus in Testispathologien vorkommen.** Score 10: intakte Spermatogenese, Score 8: Hypospermatogenese, Score 7: Spermatogenese-arrest auf der Stufe der runden Spermatiden, Score 5: Spermatogenese-arrest während der Meiose, Score 3.2: vereinzelt Spermatogonien bei überwiegender SCO-Symptomatik, Score 2: SCO-Symptomatik, Score 1: Tubulusatrophie, ES = elongierte Spermatiden (testikuläre Spermatozoen), LC = Leydigzellen, Ma = Makrophagen, MC = Myoidzellen, PL = Präleptotän-Spermatozyten, PS = Pachytän-Spermatozyten, SG = Spermatogonien, RS = runde Spermatiden.

Eine sorgfältige histologische Befundung des Hodenparenchyms, die neben dem Keimepithel auch den intertubulären Raum berücksichtigt, ist für die globale Genexpressionsanalyse des Hodens eine notwendige Vorbedingung, um Gene zu identifizieren, die in bestimmten Spermatogenesestadien und Zelltypen exprimiert werden.



## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Unter Verwendung von Nagetiermodellen und verschiedenen Mikroarray-Plattformen wurden in den letzten Jahren Genexpressionsstudien zur Analyse der Spermatogenese durchgeführt. Sie lieferten Informationen über den zeitlichen Ablauf der Genexpression in männlichen Keimzellen (Schultz *et al.*, 2003; Almstrup *et al.*, 2004; Schlecht *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2004). Es wird oft suggeriert, dass man mit diesem Ansatz in der Lage wäre, Kandidatengene aufzudecken, die eine Rolle bei der Entstehung von Spermatogenesestörungen im humanen Hoden spielen und die als Zielmoleküle für innovative Methoden der männlichen Kontrazeption dienen könnten (Wrobel und Primig, 2005). Bislang wurden nur wenige Studien durchgeführt, die die globalen Genexpressionsmuster von gesunden und pathologisch veränderten humanen Hoden mittels der Mikroarray-Technologie untersucht haben (Fox *et al.*, 2003; Rockett *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004). Aufgrund der geringen Probenanzahl und einem „Poolen“ unterschiedlicher Patientenproben haben diese Untersuchungen nur wenige Erkenntnisse über die humane Spermatogenese und ihre Störungen ergeben. Das Hauptproblem lag aber zweifelsohne in der ungenauen Klassifizierung verschiedener Hodenpathologien und der damit verbundenen Unkenntnis der vorhandenen Keimzellstadien neben den verschiedenen Typen somatischer Zellen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluss verschiedener Spermatogenesestörungen auf die Genexpression des humanen Hodens zu untersuchen. Dazu sollten globale Genexpressionsmuster verschiedener Hodenpathologien mit Hilfe von zwei unabhängigen Mikroarray-Plattformen verglichen werden, um eine Differentialdiagnose dieser Krankheitsbilder auf der Ebene der jeweils korrespondierenden Expressionsmuster zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die verwendeten individuellen Patientenproben zunächst auf der Grundlage stringenter morphologischer Kriterien gemäß des modifizierten Johnsen Scores (siehe oben) in phänotypisch einheitliche Subgruppen eingeteilt.

Bisher wurden nur wenige in humanen Keimzellen exprimierte Gene identifiziert und charakterisiert, während über die Mehrheit der Gene sowie ihrer Funktionen kaum etwas bekannt ist. Über die molekularen Mechanismen, die den koordinierten Ablauf der humanen Spermatogenese kontrollieren, ist ebenfalls relativ wenig bekannt. Der fortschreitende Verlust bestimmter Spermatogenesestadien, der die verschiedenen Subtypen humaner Hodenpathologien in erster Linie kennzeichnet, sollte in dieser Arbeit zur Aufdeckung Stadien-spezifischer Genexpressionsmuster im Hoden ausgenutzt werden. Durch Clusteranalysen sollten Gene mit gleichem oder ähnlichem Expressionsmuster „gefiltert“ werden, die für bestimmte Spermatogenesestadien des Mannes charakteristisch sind.

Weiterhin lässt sich die Aufdeckung von „somatischen“ Expressionsmustern im Hoden erwarten. Eine Störung der Genexpression in den verschiedenen somatischen Zelltypen könnte ebenfalls eng mit dem Verlust bestimmter Spermatogenesestadien korreliert sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bzw. als für die Molekularbiologie geeignet von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung von Lösungen wurde Wasser von einer Reinstwasseranlage von Seradest bezogen.

Agarose <i>Electrophoresis Grade</i>	Invitrogen
Anti-streptavidin <i>antibody (goat), biotinylated</i>	Vector Laboratories
Biotin-16-UTP	Roche
<i>Bovine Serum Albumin solution (50 mg/ml)</i>	Invitrogen
Chloroform	Merck
Cy5 <sup>TM</sup> -Streptavidin	GE Healthcare
DMSO	Sigma
dNTP Mix (10 mM <i>solution, PCR Reagent</i> )	Sigma
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
<i>Goat IgG, Reagent Grade</i>	Sigma
Glycerol	Merck
Guanidinisothiocyanat (GITC)	Gibco BRL
Isopropanol	Roth
2-Mercaptoethanol	Merck
MES Hydrat	Sigma
MES Natriumsalz	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl)	Invitrogen
QMT <i>Blocking Solution (4x)</i>	PeqLab
RNase ZAP	Ambion
RNAPure	PeqLab
RNALater	Ambion
SYBR <i>Green I</i>	Molecular Probes

Streptavidin-Phycoerythrin	Molecular Probes
Tartrazine	Sigma
Tris	Sigma
Tween 20	Merck
Wasser, <i>Molecular Biology Grade</i>	Eppendorf

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Nunc (Kamstrup, Dänemark), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

CodeLink <i>UniSet Human 20K I Bioarrays</i>	GE Healthcare
50 ml Vakuumfilter-System 0,22 µm Steriflip <sup>®</sup>	Millipore
150 ml Vakuumfilter-System 0,22 µm Stericup <sup>™</sup>	Millipore
Einmalpipetten	Becton Dickinson
Falcon-Röhrchen	Greiner
GeneChips <sup>®</sup> <i>Human Genome U133 Plus 2.0</i>	Affymetrix
Kimwipes <sup>®</sup> Lite	Kimberly-Clark
LightCycler <sup>™</sup> Kapillaren	Roche
PCR <i>Softtubes</i>	Biozym
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Spitzen	Biozym

### 2.1.3 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
CodeLink 12- <i>Shaker</i> Einsatz	GE Healthcare
CodeLink <i>Parallel Processing Kit</i>	GE Gealthcare
CodeLink <i>Flex Chamber</i>	GE Healthcare
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik
Feinwaage 1615 MP	Sartorius
428 <sup>™</sup> Array Scanner	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> Scanner	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> <i>Fluidics Station 450</i>	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> <i>Hybridization Oven 640</i>	Affymetrix

Heizrührer Ikamag RH	Janke & Kunkel
Horizontale Gelkammern <i>Easy-Cast Electrophoresis System</i>	PeqLab
HP <i>GeneArray</i> Scanner	Affymetrix
Hybridisierungsschüttler	Infors AG
Inkubator Kelvitron® t	Heraeus
LightCycler™ 1	Roche
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Witec AG
Peltier <i>Thermal Cycler</i> PTC-200	Biozym
Reine Werkbank „Hera Safe“	Heraeus
Schüttelwasserbad	GFL
Standard Power Pack P25	Biometra
<i>Thermocycler Cyclone Gradient</i>	PeqLab
ThermoStat Plus	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Tischzentrifuge Millifuge	Millipore
Ultraturrax	Micra
UV-Durchlichttisch <i>Imago Compact Imaging System</i>	B & L Systems
UV-Spektrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Vakuumzentrifuge Univapo 150 H	Univapo
Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus

#### 2.1.4 Software und Internetadressen

- Affymetrix Microarray Suite (MAS) 5.0  
(<http://www.affymetrix.com/products/software/index.affx>)
- AMEN (Chalmel *et al.*, eingereicht, <http://www2.biozentrum.unibas.ch/primig/amen/>)
- BioConductor (<http://www.bioconductor.org>)
- Genesis 1.7.0 (Sturn *et al.*, 2002, <http://genome.tugraz.at>)
- GeneSpring GX 7.3.1 (<http://www.chem.agilent.com/scripts/pds.asp?lpage=27881>)
- GNF SymAtlas v1.1.1 Datenbank (Su *et al.*, 2004, <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas>)
- GraphViz (<http://www.graphviz.org/>)
- Inkscape (<http://www.inkscape.org/>)
- Jaguar 2.0 Software
- LightCycler™ Quantifizierungs-Software (<http://www.roche-applied-science.com>)

- Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000, <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>)
- Statistiksoftware-Paket R (Ihaka und Gentleman, 2002, <http://www.r-project.org>)
- RACE (Psarros *et al.*, 2005, <http://race.unil.ch/>)
- REST-Software (Pfaffl *et al.*, 2002, <http://www.gene-quantification.de/rest.html>)

### 2.1.5 Reaktions-Kits

CodeLink™ <i>Expression Bioarray System</i>	GE Healthcare
<i>NucleoSpin Tissue Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>Eukaryotic Sample and Array Processing Kit</i>	Affymetrix
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen
<i>RNA 6000 Nano LabChip® Kit</i>	Agilent Technologies
Superscript™ II RNase H – Reverse Transcriptase	Invitrogen
TaKaRa Ex-Taq™ <i>Hot Start Version</i> (HS)	TaKaRa Biomedicals

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

#### 2.1.6.1 Allgemeine Lösungen

TAE-Puffer	4,84 g Tris, 1,142 ml Essigsäure, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8.0, ad 1 l bidest H <sub>2</sub> O, pH 8.0 mit HCl einstellen, autoklavieren
Phosphatpuffer	57,7 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 42,3 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, entspricht 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 7.0 bei 25 °C (Daten von ISCO (1982))
DNA-Probenpuffer	50% Glycerol, 1 Spatelspitze Tartrazine
RNA-Probenpuffer	50 % Formamid, 6,5 % Formaldehyd, 10% Glycerol, 1 Spatelspitze Tartrazine

## 2.1.6.2 Für Mikroarray-Experimente verwendete Lösungen

### 2.1.6.2.1 Affymetrix-Plattform

5x Fragmentierungspuffer	200 mM Tris-Acetat, 500 mM Kaliumacetat, 150 mM Magnesiumacetat, pH 8.1
12x MES Puffer	64,61 g MES Hydrat, 193,3 g MES Natriumsalz, ad 1 l <i>Molecular Biology Grade</i> Wasser, pH 6.5-6.7, steril filtriert, bei 2 – 8 °C und im Dunkeln gelagert
2x Hybridisierungspuffer	8,3 ml 12x MES Stock Puffer, 17,7 ml 5 M NaCl, 4 ml 0,5 M EDTA, 0,1 ml 10 % Tween 20, ad 50 ml H <sub>2</sub> O bidest., bei 2 – 8 °C und im Dunkeln gelagert
20x SSPE	3 M NaCl, 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,02 M EDTA, (BioWhittaker Molecular Applications)
Waschpuffer A (n. stringent)	300 ml 20x SSPE, 1 ml 10 % Tween 20, ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest., steril filtriert
Waschpuffer B (stringent)	83,3 ml 12x MES Puffer, 5,2 ml 5 M NaCl, 1 ml 10 % Tween 20, ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest., steril filtriert, bei 2 – 8 °C und im Dunkeln gelagert
2x Färbe-Puffer	41,7 ml 12x MES Puffer, 92,5 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 10% Tween 20, ad 250 ml H <sub>2</sub> O bidest., bei 2 – 8 °C und im Dunkeln gelagert
SAPE-Lösung	600 µl 2x Färbe-Puffer, 48 µl 50 mg/ml BSA, 12 µl 1 mg/ml Streptavidin-Phycoerythrin, ad 1200 µl H <sub>2</sub> O bidest.
Antikörper-Lösung	300 µl 2x Färbe-Puffer, 24 µl 50 mg/ml BSA, 6 µl 10 mg/ml Goat IgG Stock, 3,6 µl 0,5 mg/ml biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper, ad 600 µl H <sub>2</sub> O bidest.

### 2.1.6.2.2 CodeLink-Plattform

TNT-Puffer	12,1 g Tris, 8,77 g NaCl, 500 µl Tween 20, ad 1 l bidest. H <sub>2</sub> O, pH 7.6 mit HCl eingestellt, steril filtriert
TNB-Puffer	12,1 g Tris, 8,77 g NaCl, 0,5 % QMT Blocking Solution (4x), ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest., pH 7.6 mit HCl eingestellt, steril filtriert
1:500 Cy5 <sup>TM</sup> -Streptavidin	6,8 µl einer Cy5-Streptavidin Stock-Lösung auf 3393,2 µl TNT-Puffer
20x SSC-Puffer	0,3 M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0, steril filtriert
0,1x SSC / 0,05 % Tween 20	5 ml 20x SSC-Puffer, 0,5 ml Tween 20, ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest.

### 2.1.7 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
0,24-9,5 kb RNA Ladder	Invitrogen
φX174 RF DNA/Hae III <i>Fragments</i>	Invitrogen
RNA 6000 Ladder	Ambion

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) als Lyophilisat bezogen und mit autoklaviertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Stocks wurden bei -20 °C gelagert. Die Sequenzabschnitte aller benutzten Primer sind in 5'→3'-Richtung auf dem Plus-Strang dargestellt. Die für die real-time RT-PCR verwendeten Primer besaßen eine Länge von 23 – 25 Nukleotiden und wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) ausgewählt. Die PCR-Produktgröße lag in allen Fällen zwischen 200-300 Basenpaaren, um eine Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Produktmenge zu gewährleisten.



### 2.1.8.1 Primer für Referenzgene

Primer	Sequenz	T <sub>M</sub> [°C]
RPS27A-forward	CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC TG	64,24
RPS27A-reverse	CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG	64,31
RPL19-forward	GTC TGG TTA GAC CCC AAT GAG ACC	64,24
RPL19-reverse	GCA AAA TCC TCA TTC TCC TCA TCC	64,31

### 2.1.8.2 Primer für die Mikroarray-Validierung ausgewählter Gene

Primer	Sequenz	T <sub>M</sub> [°C]
ACT-forward	CAT TCT GCA TGG ACT GCT ACA ACC	65,08
ACT-reverse	CCA CAT TTT TGG CAG AAG ATT TCC	64,88
ARHGEF6-forward	GCT TGC AAT AAA TGT GCA AAC TGC	64,90
ARHGEF6-reverse	ACA ACA CAA CTA TGG CGA CAC TGC	65,57
AKAP3-forward	TCT TCT CTC ATG GAA GCC AAA AGG	65,01
AKAP3-reverse	CCC CTC TTT GAT AAT GTG CTC ACC	65,04
AKAP4-forward	GAT CAG GAC CGG AAA GTG ATA TGC	65,07
AKAP4-reverse	TCA GAG GGA GCT TGT TTG AAA AGG	65,01
ATP8B4-forward	AAG TGC TCA TCA ACA GCA AAC TGC	65,00
ATP8B4-reverse	CAC AGA CAA CAA TCC CAT CAA ACC	64,74
CALB2-forward	ACA CAG ACA GGA GTG GCT ACA TCG	64,92
CALB2-reverse	TAC AGA TCC TTC AAA AGG GCA TCC	64,60
Calicin-forward	CCA GTT CAA TGA TGG AGT GTT TGC	64,96
Calicin-reverse	AAC TTG GTC CAG GAG TTG TCA TCC	64,79
CAPPA3-forward	TTT GTG CAA GCT CAC TTC TTC AGG	65,05
CAPPA3-reverse	TCC TGT GCC AGT CAA TAA GAG TGC	64,87
CPA3-forward	TTT TTA TGG ATT GTG GCA TTC ACG	64,85
CPA3-reverse	ATG GGT CAT TGG TGT TAG GAA TGG	65,03
COL27A1-forward	AAT TCC CCA AAC TTT GTC ATT TGG	64,16
COL27A1-reverse	TTG CTA CCT CCC ACT GTG AAA TCG	66,52
Croc4-forward	TGG ATT CCC TCT GAT AAG CCT TCC	65,74
Croc4-reverse	GGA CTT CCA ACT CAG AGG ATG TGG	65,45
CTSC-forward	CGG CTT CCT GGT AAT TCT TCA CC	65,12
CTSC-reverse	CCA TAA CCG AGC AGT TGA CAT CG	65,93
DPT-forward	AGG AGC AAC AAC CAC TTT CTC TGC	65,21
DPT-reverse	AGC TCA GGG AGA AGG AAA GAG AGC	64,89
FMO1-forward	TCA TAG CCG GCA ATA TAA GCA TCC	65,15
FMO1-reverse	AAG CCG TAA TTT GCA TGA TTG AGC	64,40
FSHR-forward	ACT CAG GCT AGG GGT CAG AGA TCC	65,34
FSHR-reverse	GCA CTA TGA TGT TCC CAG TGA TGG	64,87

GAK- <i>forward</i>	CTT TGT GGC TCA CGC CTA TAA TCC	65,00
GAK- <i>reverse</i>	AGA CAG GGT CTC CAC TCT GTC ACC	65,33
HOOK1- <i>forward</i>	GTT GGA TGG CTC TTT TGA TGA TCC	65,06
HOOK1- <i>reverse</i>	TTT CAG GGC TCT TGT TTC TTC TGC	65,13
INSL3- <i>forward</i>	CAG AGA TGC GTG AGA AGT TGT GC	64,55
INSL3- <i>reverse</i>	CTT GTT GGG TAC AGC CAC TGA GG	65,19
KCNQ1- <i>forward</i>	GGA AAT GCT TCG TTT ACC ACT TCG	64,99
KCNQ1- <i>reverse</i>	CGA TCT CCA TCC AGA AGA GAG TCC	64,79
LHCGR- <i>forward</i>	TCT CAT GTG CAA TCT CTC CTT TGC	64,98
LHCGR- <i>reverse</i>	CAG CTT TTG GTC CAG GTG AAT AGC	65,24
MEG3- <i>forward</i>	CTC ACA ACA GCC CTG TGA GGT AGG	66,41
MEG3- <i>reverse</i>	CAT CTG CAA CTG TGT CTC TCT CAG C	64,94
MSRB2- <i>forward</i>	TCT AGG TCA CGT GTT TCC TGA TGG	64,63
MSRB2- <i>reverse</i>	GCA AAT TCA GCC CAG TTT TAT TGC	64,87
Osteopontin- <i>forward</i>	GTA AGT CCA ACG AAA GCC ATG ACC	65,05
Osteopontin- <i>reverse</i>	ACC TGG AGT GAA AAC TTC GGT TGC	64,85
PNFIV- <i>forward</i>	TTG TTA GAC ACC CTC TTG GGA ACC	64,62
PNFIV- <i>reverse</i>	CCA CAC CAG TGT TCT CAT TTT TGG	64,82
PRKAR2A- <i>forward</i>	GTT CTC GAT GCC ATG TTT GAA AGG	65,98
PRKAR2A- <i>reverse</i>	AGC CTT CTG AGG TAG CAA CAA TGG	64,95
PRKCA- <i>forward</i>	CCA TGG TAG AAA AGC GAG TCT TGG	65,01
PRKCA- <i>reverse</i>	GAA CAA TCC GAT GGA AAT CTC TGC	65,23
RND2- <i>forward</i>	ACT ATG ATA ATG TCC GGC CTC TGG	64,51
RND2- <i>reverse</i>	TAA CAG GGA TAA GCC TCT GCT TGG	64,78
ROCK- <i>forward</i>	ATT GAC GCA AGA AAG CAA GAA AGC	65,02
ROCK- <i>reverse</i>	AAC AGC CTG TGT TTT AAG GGT TCG	64,60
SRD5A1- <i>forward</i>	TGC TGA TGA CTG GGT AAC AGA TCC	64,65
SRD5A1- <i>reverse</i>	CCA CAC CAC TCC ATG ATT TCT CC	65,00
SRD5A2- <i>forward</i>	AAA TGG CGA CAG TTG CTT CTT AGC	64,92
SRD5A2- <i>reverse</i>	CAA GAA AAA GGA AGC CAT GAC TGG	65,20
STEAP4- <i>forward</i>	CCT GGC TCA GTG ATT CAT ATG TGG	64,95
STEAP4- <i>reverse</i>	ACA CGT AGG CTG CAG GAA GAT ACC	64,87
SPAM1- <i>forward</i>	AAT GAT GAT CTC AGC TGG TTG TGG	64,65
SPAM1- <i>reverse</i>	GTT ATA TGC AAA AAC CGG AAG TGG	64,56
Tektin1- <i>forward</i>	AGA TAT TCT GAG AAC GCC GTG AGG	64,95
Tektin1- <i>reverse</i>	CTG GCA TCC TTT GTA TCC TCC AGC	65,24
TRIF- <i>forward</i>	CTC CAG AAA CCA GCA CCA ACT ACC	65,28
TRIF- <i>reverse</i>	GAT GAT GAT TCC AGG GAG GAA GG	65,18
TRIM21- <i>forward</i>	AGC TAG CCA ACA TGG TGA ACA ACC	64,86
TRIM21- <i>reverse</i>	GAG CTT CTC CTG GTA CTC CTG TGC	64,81
TSKS- <i>forward</i>	AAG ACT CCA TCA CCA GCT TGA AGG	65,09
TSKS- <i>reverse</i>	CAA GAC GTT GGT TTT GAT TTC AGC	64,06

## 2.1.9 Humanes Gewebematerial

Alle Testisbiopsien entstammten dem TESE-Programm der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Schulze). Im Regelfall wurde dazu jedem Patienten eine Hodengewebprobe von jeder Seite in Reiskorn-Größe (ca. 30 mg) entnommen. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission unter folgender Nummer genehmigt: OB/X/2000. Zum Schutz der RNA vor Degradation und zur Konservierung des RNA-Expressionsmusters zum Zeitpunkt der operativen Entnahme wurden die Biopsien unmittelbar nach Entnahme in das Stabilisierungsreagenz RNAlater gegeben und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Dabei dienten etwa  $\frac{3}{4}$  der Biopsie der RNA-Extraktion, während der Rest zur Isolierung genomischer DNA verwendet wurde. Im Zeitraum vom 01.07.2004 – 01.07.2006 wurden eine RNA- sowie eine DNA-Bank aus 700 Biopsien erstellt, entsprechend einer ungefähren Patientenzahl von etwa 300.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Gewebeproben

Für die Analyse der Genexpression mittels der Mikroarray-Technologie wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den humanen Gewebeproben isoliert. RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNasen kommen ubiquitär vor und sind sehr stabil, so dass bei der Aufreinigung sehr sorgfältig und stets mit Handschuhen gearbeitet wurde. Zur Isolierung von RNA aus Gewebeproben existieren dabei mehrere Methoden, die sich in der Art der Zell-Lyse und der Inaktivierung von RNasen unterscheiden. Nach einer Optimierungsphase erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Testisbiopsien mit Hilfe einer Flüssig-Extraktionsmethode mittels RNAPure™. Es handelt sich dabei um eine Modifikation der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987), die auf dem Prinzip der sauren GITC-Phenol-Chloroform-Extraktion basiert. Dazu wurden 3 ml RNAPure™-Lösung zu je 30 mg Gewebe gegeben und 30 sek im UltraTurrax homogenisiert. Nach Zusatz von 600 µl Chloroform zur besseren Phasentrennung und kräftigem Schütteln erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand mit der wässrigen Phase wurde in einen neuen 15 ml Gefäß überführt und durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol für 1 h bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (1 h, 4 °C und 4000 rpm) wurde das Pellet in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst und mittels des *RNeasy Mini Kits* nach Angaben des Herstellers weiter aufgereinigt, wobei das *RNeasy Mini* Protokoll für RNA *Cleanup* verwendet wurde. Bei diesem Verfahren wird die selektive Bindungseigenschaft der

RNA an eine Silikagel-Membran in Kombination mit der Mikrosäulenzentrifugations-Technik ausgenutzt. Nach Aufnahme der Gesamt-RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung sowie zur Qualitätsbestimmung neben der Agarose-GITC-Gelelektrophorese die Bioanalyzer-Messung. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

#### **2.2.1.2.1 Photometer Ultrospec 3000**

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem Ultrospec 3000 bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Dabei wurde die RNA in einer 1:50-Verdünnung in Phosphatpuffer eingesetzt. Eine Absorption von  $A_{260\text{nm}}=1$  entspricht dabei einer Konzentration an einzelsträngiger RNA von ca. 40 µg/ml. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation wurde das Verhältnis der  $A_{260\text{nm}}$  zur  $A_{280\text{nm}}$ , dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste der Proteine, bestimmt. Eine reine RNA-Lösung, gemessen in Phosphat-Puffer, besitzt einen  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ -Wert im Bereich von 2,1 – 2,3.

#### **2.2.1.2.2 NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer**

Alternativ wurde die Konzentrationsbestimmung mittels des NanoDrop-Photometers durchgeführt. Dieses Gerät wurde in erster Linie für die Messung der cRNA-Konzentrationen (siehe 2.2.2.3.1) in Anspruch genommen. Dabei wurden für die Messung je 1,2 µl RNA-Lösung eingesetzt. Im Falle einer reinen RNA sollte der Absorptionsquotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  einen Wert von 1,9 - 2,1 aufweisen.

Das NanoDrop-Spektrophotometer bietet zusätzlich die Option, das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen 220 nm bis 350 nm graphisch darzustellen. In diesem Wellenlängenbereich können Kontaminationen, die die Absorption der isolierten RNA beeinflussen, wie z.B. Lösungsmittel- oder Protein-Verunreinigungen, detektiert werden.

### **2.2.1.3 Agarose-GITC-Gelelektrophorese zur Überprüfung von Gesamt-RNA-Extraktion**

Die Überprüfung der Integrität der RNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von GITC (20 mM), bei der die 28S (etwa 4 kb) und 18S (etwa 2 kb) ribosomale RNA als zwei getrennte Banden laufen und somit als interne Marker für die Integrität der isolierten RNA dienen. Dazu wurden die Proben vor der Elektrophorese mit denaturierendem

RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 70 °C erhitzt und anschließend 3 min auf Eis inkubiert.

#### 2.2.1.4 Bioanalyzer-Messung

Zur Bestimmung der Integrität und Reinheit der Gesamt-RNA-Extrakte wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem RNA 6000 Nano Assay Protokoll und mit Hilfe der Komponenten des RNA 6000 Nano *LabChip*<sup>®</sup> *Kits*. Dieses *Lab-On-Chip* Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und der Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *PicoGreen*. Es ermöglicht eine automatisierte, parallele Bestimmung von zwölf RNA-Proben hinsichtlich ihrer Größenverteilung und Konzentration. Dazu wird der Chip mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-Gemisch beladen und die zuvor denaturierten RNA-Proben (1 µl) sowie ein Größenstandard (Marker) in die entsprechenden Vertiefungen (*Wells*) auf dem Chip pipettiert. Anschließend bewegen sich die Proben durch Anlegen eines elektrischen Feldes über in Glas eingezogene Mikrokapillaren fort. Automatisch werden sie in einen Separationskanal weitergeleitet, um dort entsprechend ihrer Fragmentgröße durch den Molekularsiebeffekt mit Hilfe eines Polymers aufgetrennt zu werden. Über einen Fluoreszenzdetektor werden die RNA-Proben und deren Laufzeiten registriert. Die Ergebnisse lassen sich sowohl als Densitogramm als auch als Bandenabbildung darstellen und können mit Hilfe der Agilent 2100 Bioanalyzer Software analysiert werden. Dabei wird mit einem speziellen Algorithmus das gesamte Densitogramm analysiert und daraus eine so genannte *RNA integrity number* (RIN) berechnet, wobei die Werte auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (optimale Qualität) liegen. Dies ermöglicht eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Qualität der RNA. Diese neue Technik gestattet eine bessere Bewertung der RNA-Qualität als dies mit dem üblichen 28S/18S-Quotienten bisher möglich war, da zur Berechnung der RIN-Werte das gesamte Densitogramm einer Probe in die Beurteilung einfließt (Mueller *et al.*, 2004). So werden RNA-Proben durch die Beurteilung über den RIN-Wert laborunabhängig vergleichbar (Imbeaud *et al.*, 2005). Für die Mikroarray-Studien wurden lediglich RNA-Proben verwendet, die einen RIN-Wert von  $\geq 7,5$  aufwiesen.

### 2.2.1.5 cDNA-Synthese

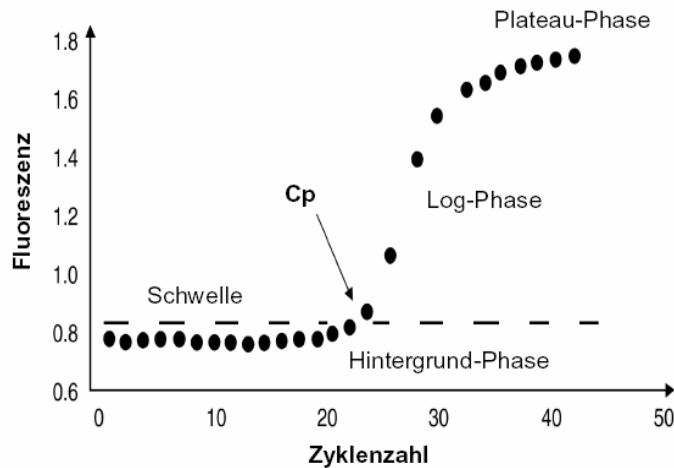
Die Reverse Transkription von RNA in komplementäre cDNA erfolgte unter Verwendung des Superscript<sup>TM</sup> II RNase H – Reverse Transcriptase Systems nach Angaben des Herstellers. Ausgangsmengen waren dabei 400 ng bzw. 1000 ng Gesamt-RNA, die mit H<sub>2</sub>O bidest. auf ein Gesamtvolumen von 11 µl gebracht wurden. Nach Zugabe von 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl) wurde die RNA-Primer-Mischung 5 min bei 70 °C erhitzt, um linearisierte, einzelsträngige RNA zu erhalten. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden dem Ansatz 4 µl Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP Mix (10 mM) sowie 1 µl Superscript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase (50 U/µl) zugegeben und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Die cDNA wurde mit 80 µl H<sub>2</sub>O bidest. auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.6 Real-time RT-PCR mit dem LightCycler<sup>TM</sup>

Die quantitative real-time RT-PCR (deutsch: quantitative Echtzeit-PCR) stellt eine Weiterentwicklung der im Jahre 1986 von K. B. Mullis (Mullis *et al.*, 1986) entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar und wurde hier für die Validierung der Mikroarray-Ergebnisse eingesetzt. Die PCR ermöglicht die Amplifikation einer Zielsequenz durch eine spezifisch primerdefinierte, enzymatische *in vitro*-Reaktion.

Mit Hilfe von PCR-Automaten, die eine simultane Amplifikation, Detektion von PCR-Produkten mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und Quantifizierung in einem Reaktionsgefäß ermöglichen, konnten die PCR-Produkte in Echtzeit detektiert werden. Mit dieser Technik wurde ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur zuverlässigen und exakten Quantifizierung von spezifischen mRNAs entwickelt. Auf der Grundlage dieses Prinzips wurden verschiedene Techniken sowie Detektionsmethoden entwickelt, wobei im Rahmen dieser Arbeit die real-time RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers<sup>TM</sup> durchgeführt wurde. Im LightCycler<sup>TM</sup> kann die Menge der PCR-Produkte unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR *Green* I in Echtzeit bestimmt werden, indem nach jeder Elongationsphase, nach der eine maximal amplifizierte Menge an dsDNA vorliegt, die Fluoreszenz gemessen wird. Dabei wird der Fluorophor über eine blaue LED (*Light Emitting Diode*, 470 nm) angeregt und emittiert nach Interkalation in die dsDNA Licht einer Wellenlänge von 521 nm. Während der nächsten Denaturierungsphase löst sich der SYBR *Green* I-Farbstoff wieder aus der dsDNA heraus. Freie Farbstoffmoleküle senden eine geringe Hintergrundfluoreszenz aus, die computergestützt vom eigentlichen Signal subtrahiert wird. Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenzen mit jedem neuen PCR-Zyklus ist proportional zur

Menge an gebildeter dsDNA. Mit Hilfe der LightCycler™-Software wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt. Der Verlauf der PCR lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase (log-lineare Phase) und eine Plateau-Phase (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Phasen der PCR-Amplifikation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl; CP = *Crossing Point*.**

In der frühen Phase übertreffen die Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. Abhängig von der Anfangsmenge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert. Der so genannte *Crossing Point* (CP) ist definiert als die Zyklenzahl, die zu einer Fluoreszenz mit zwei Standardabweichungen über dem Hintergrund führen. Am *Crossing Point* befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Über die *Crossing Points* lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge der Ziel-DNA machen.

Im Anschluss an jede PCR wird zusätzlich die Spezifität der Produkte über eine Schmelztemperatur-Analyse ermittelt. Dies ist erforderlich, da bei der SYBR *Green*-Methode auch unspezifische Produkte bzw. Primer-Dimere ein Fluoreszenzsignal erzeugen können (Ririe *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998). Dazu wird das PCR-Produkt, die dsDNA, über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung von 40 °C bis 98 °C aufgeschmolzen, wobei die Länge und Sequenz des DNA-Doppelstranges seine Schmelztemperatur bestimmen. Am Fluoreszenzmaximum, dem Schmelzpunkt, liegt die Hälfte der DNA doppelsträngig vor. Im Falle mehrerer Schmelztemperaturkurven, meist mit einer geringeren Temperatur als die des erwarteten Zielgens, liegen unspezifische Produkte und/oder Primer-Dimere vor.

Die Ergebnisse jeder quantitativen RT-PCR-Methode werden durch spezifische Faktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge oder Qualität an RNA, schwankende Effektivität in der reversen Transkription in den einzelnen Proben oder den PCR-Effizienzen entscheidend beeinflusst. Diese Faktoren können zu einer Fehlinterpretation der ermittelten Expressionsprofile führen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wird die Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem nicht regulierten *Housekeeping*-Gen bestimmt (Thellin *et al.*, 1999). Bei diesem Referenzgen sollte es sich um ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen handeln (Bustin, 2000). Dieser Vorgang wird als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet und ist Bestandteil der relativen Quantifizierung der real-time RT-PCR, die sich in diesem Punkt grundsätzlich von der absoluten Quantifizierung unterscheidet (Pfaffl, 2001). Die relative Quantifizierung lässt sich weiter optimieren, indem die unterschiedlichen real-time PCR-Effizienzen der untersuchten Faktoren mit berücksichtigt werden. Die effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels real-time RT-PCR stellt derzeit die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar (Pfaffl, 2001) und wurde hier zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse eingesetzt.

In der praktischen Durchführung wurde die fragliche mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben, die dann in der real-time RT-PCR als *Template* diente. Zur Vorbereitung der PCR wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das alle essentiellen Komponenten beinhaltet und im Folgenden aufgeführt ist:

#### PCR-Reaktionsansatz:

cDNA	2 µl
10x Ex Taq Puffer	2 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	2 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol)	1 µl
BSA (20 mg/ml)	0,25 µl
SYBR <i>Green</i> I (1:1000 in DMSO)	0,5 µl
TaKaRa Ex Taq <sup>TM</sup> HS (5 U/µl)	0,2 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	11,05 µl

Die in der RT-PCR eingesetzten Oligonukleotide sind mit ihren jeweiligen Sequenzen und Schmelzpunkten unter 2.1.8 aufgelistet.



Der gesamte Ansatz wurde in den Kapillarkopf pipettiert und bei 1000 rpm 2 min in die Kapillare hinein zentrifugiert. Die Kapillare wurde verschlossen, in das Karussell des LightCyclers™ überführt und das Programm gestartet. Die Einstellung der Zyklus-Parameter erfolgte über die mitgelieferte Software. Das zur Amplifikation verwendete RT-PCR-Programm ist im Folgenden aufgeführt:

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I	1	Denaturierung	5 min	95 °C
II	40	Denaturierung	10 sek	95 °C
		Primer-Anlagerung	10 sek	55 °C – 60 °C
		Synthese	30 sek	72 °C
III	1	Abkühlungsschritt	2 min	40 °C
IV	1	Schmelzkurve	20 sek	98 °C

**Tabelle 2.1: Programm für die real-time RT-PCR**

Nach dem PCR-Lauf wurde der Inhalt der Kapillaren bei 1000 rpm 2 min in ein leeres Eppendorf-Gefäß zentrifugiert und elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Bei richtiger Fragmentgröße wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt und anschließend sequenziert (MWG).

### **Auswertung der real-time RT-PCR-Ergebnisse**

Für die Quantifizierung der Ausgangsmenge wurden die CP-Werte herangezogen, die über die *Fit Points* Methode mit Hilfe der LightCycler™ Quantifizierungs-Software ermittelt wurden. Die Normalisierung der Expressionswerte der Zielgene erfolgte mit dem ribosomalen Protein S27 als Referenzgen. Die relative Expression der zu untersuchenden Zielgene in den Proben der verschiedenen pathologischen Subgruppen wurden auf Kontrollproben bezogen. Hierbei dienten die Score 10-Proben, die eine intakte Spermatogenese aufweisen, als Kontrollgruppe. Die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede (Ratio) zwischen zwei Score-Gruppen erfolgte dann über das so genannte  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Berechnungsmodell, das sich aus dem folgenden mathematischen Zusammenhang ergibt:

- (1)  $\Delta\text{CP} = \text{CP}_{\text{Zielgen}} - \text{CP}_{\text{Referenzgen}}$
- (2)  $\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP}_{\text{Score 10-Gruppe}} - \Delta\text{CP}_{\text{Score-Gruppe } x}$  mit  $x = \text{Score-Gruppe } 8, 5 \text{ bzw. } 2$
- (3)  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der REST-Software (*relative expression software tool*, Pfaffl *et al.*, 2002). Diese Software fasst die Proben der jeweiligen Score-Gruppen als

Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede zwischen den Score-Gruppen, normalisiert über das *Housekeeping*-Gen, sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse wurden statistisch auf ihre Signifikanz über einen Randomisierungstest überprüft, und die Expressionsunterschiede mit ihren Signifikanzleveln (p-Werte) angegeben. Das obige Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. Es kann aber nicht angenommen werden, dass stets eine ideale PCR-Effizienz von zwei vorliegt und dass die Effizienzen einer Zielgen- sowie einer Referenzgen-PCR stets übereinstimmen. Die Effizienz ändert sich während der PCR und man erhält eine nachlassende Effizienz in den späteren Zyklen, da die steigenden Mengen an PCR-Produkten um eine DNA-Polymerase-Bindung konkurrieren (Kainz, 2000). Aus diesem Grund wurde in Anlehnung an Ramakers *et al.* (2003) mit einem in S-Plus™ geschriebenen Programm für jedes Gen die tatsächliche PCR-Effizienz berechnet, die im Bereich von 1,7 bis 1,9 lag. Bei dieser Methode wird die PCR-Effizienz im linearen Bereich bestimmt, indem ein „gleitendes“ Fenster über die Kurve gelegt wird, das Punkt für Punkt über diese hinweg „wandert“. Der Punkt, an dem der Korrelationskoeffizient am größten ist, also die beste Linearität gegeben ist, wird zur Bestimmung der PCR-Effizienz verwendet.

## 2.2.2 Mikroarray-Analyse

Die globalen Genexpressionsstudien an humanen testikulären Biopsien wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Mikroarray-Systemen durchgeführt. Dabei erfolgten die Mikroarray-Experimente mit dem CodeLink-System in der Abteilung für Andrologie bei Herrn Prof. Dr. med. Schulze am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, während die Experimente mit der Affymetrix-Plattform im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Primig am Biozentrum & Swiss Institute of Bioinformatics in Basel durchgeführt wurden. Nach einer kurzen Beschreibung eines typischen Mikroarray-Experimentes sowie nach einigen allgemeinen Anmerkungen zur Datenauswertung wird in den folgenden Abschnitten erläutert, wie bei der praktischen Durchführung eines Mikroarray-Experimentes mittels der Affymetrix- und CodeLink-Plattform sowie dessen Datenauswertung vorgegangen wurde.

### 2.2.2.1 Genereller Ablauf eines Mikroarray-Experimentes

Ein typisches Mikroarray-Experiment umfasst die cRNA-Herstellung ausgehend von der Gesamt-RNA über cDNA als Zwischenstufe, die Hybridisierung mit den Proben auf dem Mikroarray, das Waschen der Mikroarrays nach der Hybridisierung mit gleichzeitiger

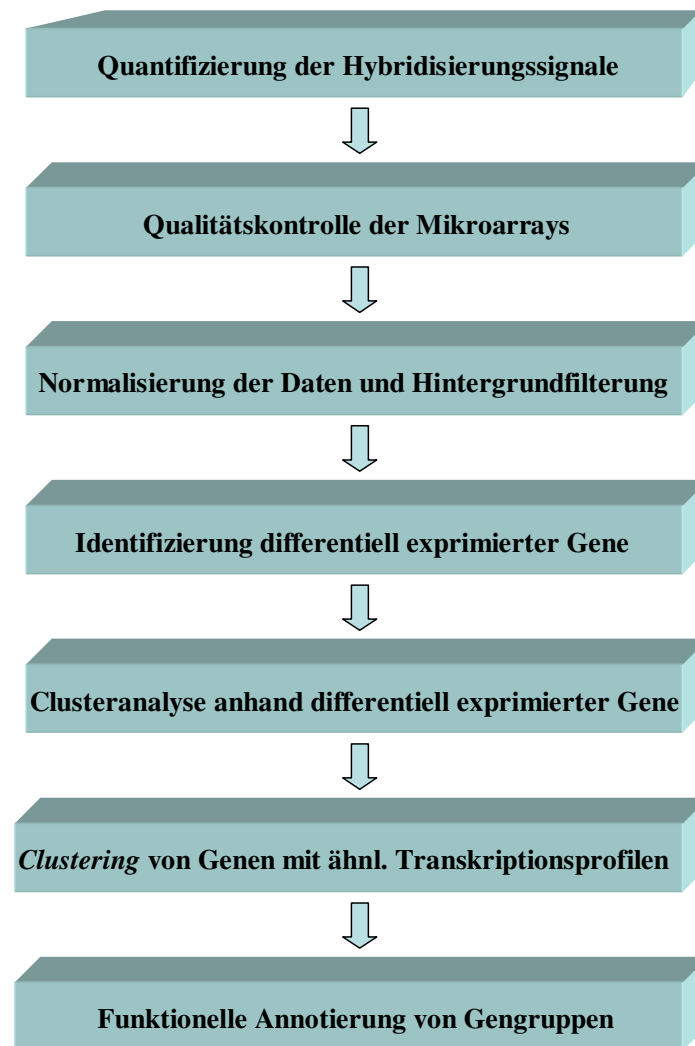
Fluoreszenz-Markierung sowie die Laser-induzierte Detektion der Hybridisierungssignale (vgl. Abbildung 1.5).

Den Hintergrund der Mikroarray-Technologie bildet die Annahme, dass sich die relativen Mengen von zehntausenden einzelner mRNAs anhand von Hybridisierungssignalstärken parallel zueinander bestimmen lassen. Hierbei können jedoch nur relative Transkriptionsniveaus und keine absoluten Mengen oder Kopienzahlen bestimmt und miteinander verglichen werden. Eine Voraussetzung stellt dabei die Linearität aller experimentellen Schritte dar. Nur dann können reproduzierbare Aussagen über die Expressionslevel hoch oder niedrig exprimierter Gene getroffen und diese miteinander verglichen werden. Bei den Syntheseschritten zur Erst- und Zweit-Strang Synthese handelt es sich um 1:1 Umschreibungen. Die *in vitro*-Transkription (IVT) stellt dagegen eine lineare Amplifikation dar, deren Prinzip erstmals bei Van Gelder *et al.* (1990) beschrieben wurde. Ebenso besteht zwischen der Menge an fluoreszenzmarkierter Probe und der detektierten Signalintensität ein linearer Zusammenhang (Freeman, 2000). Damit ist die Voraussetzung der Linearität erfüllt.

#### **2.2.2.2 Allgemeine Informationen zur Auswertung von Mikroarray-Daten**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde durch die Verwendung der beiden Mikroarray-Plattformen sehr große Datensätze generiert, die, bedingt durch die beiden Plattformen, zum Teil unterschiedlich ausgewertet wurden. Die grundlegenden Schritte der Mikroarray-Auswertung waren bei beiden Plattformen aber gleich; Unterschiede gab es lediglich in den verwendeten Algorithmen oder Software-Paketen. Eine gleiche Vorgehensweise war auch von entscheidender Bedeutung, um anschließend die Ergebnisse beider Plattformen miteinander vergleichbar zu machen. Die im Folgenden kurz beschriebene Auswertungs-Strategie ist somit Plattform-unabhängig und erläutert, wie im Rahmen dieser Dissertation bei der Mikroarray-Analyse prinzipiell vorgegangen wurde:

Nach Visualisierung der Mikroarrays erfolgte die Umwandlung der Hybridisierungssignale in numerische Daten. Die eigentliche Auswertung der Mikroarray-Daten begann mit der Qualitätskontrolle und der Normalisierung der Daten. Anschließend wurden mit Hilfe von statistischen Methoden differentiell exprimierte Gene zwischen den zu vergleichenden pathologischen Subgruppen identifiziert. Nach der anschließenden Clusteranalyse zur Visualisierung der Daten wurden, ausgehend von den differentiell exprimierten Genen, Gene aufgrund von ähnlichen Transkriptionsprofilen in Gruppen eingeteilt, sowie über- oder unterrepräsentierte biologische Prozesse in diesen Gruppen identifiziert (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Allgemeines Schema zur Auswertung der Mikroarray-Daten.** Die Qualitätskontrolle der Mikroarrays wurde nur für die Affymetrix-Arrays durchgeführt, da für die CodeLink-Arrays bislang keine Software-Pakete existieren. Aus dem gleichen Grund wurden die funktionellen Analysen von Gengruppen ebenfalls nur anhand der Affymetrix-Ergebnisse durchgeführt.

Für die Auswertung der Mikroarray-Daten wurde die kommerziell erworbene GeneSpring GX 7.3.1 Software sowie die frei verfügbaren Programme AMEN (*Annotation, Mapping and Expression Network Tool*, Chalmel *et al.*, Manuskript eingereicht) und Genesis 1.7.0 (siehe 2.1.4) verwendet. Weiterhin wurde für statistische Analysen sowie zur Visualisierung von Mikroarray-Daten das frei verfügbare Statistiksoftware-Paket R (Version R 2.3.1) verwendet, das eine Anwendung der Programmiersprache S darstellt (R: *A Language for data analysis and graphics*, Ihaka und Gentleman, 1996). Für die Auswertung der Affymetrix-Daten kamen zusätzlich BioConductor-Pakete der BioC 1.8-Version (erschieden am 27.04.2006) zum Einsatz. BioConductor ist eine auf R basierende Plattform, die kostenfrei zugängliche Programme für die Auswertung von Mikroarray-Daten zur Verfügung stellt. Neben der

Auswertung erleichtert es auch die Integration biologischer Metadaten in die Analyse experimenteller Daten.

### 2.2.2.3 Affymetrix-Plattform (Santa Clara, USA)

Für die Expressionsanalysen wurden die Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> *Human Genome U133 Plus 2.0* (HG-U133 Plus 2.0) verwendet, die in etwa 1.300.000 Oligonukleotide auf dem Array enthalten. Dieser Mikroarray enthält 54.671 Probensätze und umfasst ca. 47.400 Transkripte bzw. 38.500 gut charakterisierte humane Gene basierend auf den *GenBank*<sup>®</sup>, *dbEST* und *RefSeq* Datenbanken. Die Sequenz-Cluster wurden mittels der *UniGene* Datenbank erstellt (*Build 133*, April, 2001) und zusätzlich mit Daten aus zwei weiteren, öffentlich zugänglichen Datenbanken ergänzt (*Washington University EST Trace Repository* und *University of California, Santa Cruz Golden-Path Human Genome Database*). Einige der Gene sind mehrfach auf dem Mikroarray repräsentiert.

In den folgenden Abschnitten wird die genaue Durchführung eines Mikroarray-Experimentes gemäß des *Eukaryotic Sample and Array Processing Manuals* von Affymetrix sowie dessen Datenanalyse beschrieben.

#### 2.2.2.3.1 cRNA-Herstellung

Ausgehend von 2 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung eines Oligo(dT)<sub>24</sub>-Primers, an dessen 5'-Ende die Sequenz des Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase Promotors angehängt ist, die Erststrang cDNA-Synthese durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 20 U/µl SuperScript II Reverse Transkriptase katalysiert und erfolgte bei 42 °C für 60 min. In diesem Schritt wurden ebenfalls die bakteriellen RNA-Kontrollen, denen künstlich ein Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz angehängt wurde, in verschiedenen Konzentrationen zur Probe gegeben: *dap* (1:6.667), *thr* (1:25.000), *phe* (1:50.000), *lys* (1:100.000). Für die anschließende Zweitstrang-Synthese wurde folgendes Enzymgemisch eingesetzt: 13,3 U/ml *E.coli* RNase H, 66,6 U/ml *E.coli* DNA-Ligase und 266,7 U/ml *E.coli* DNA-Polymerase-I. Während der 2-stündigen Inkubation bei 16 °C erfolgte der RNase H-Verdau und gleichzeitig die Synthese des zweiten, komplementären cDNA-Stranges durch die DNA-Polymerase I. Zum Abschluss dieses Schrittes wurden die Fragmente des zweiten Stranges mit einer DNA-Ligase verknüpft, so dass doppelsträngige cDNA entsteht, die an einem Ende den Bakteriophagen T7-Promotor enthält. Durch die Zugabe von 33,3 U/ml T4-Polymerase (5 min bei 16 °C) wurden eventuell vorhandene einzelsträngige Enden der cDNA aufgefüllt („Polishing“). Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 M EDTA gestoppt, und die cDNA mittels des *Qiaquick PCR*

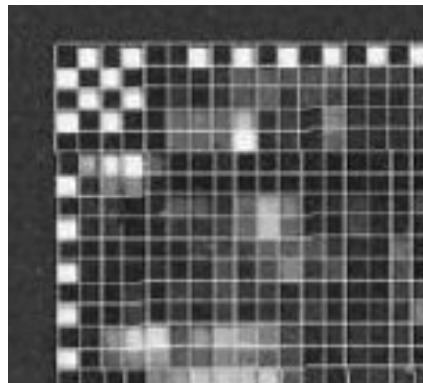
*Purification Kits* aufgereinigt. Die cDNA diente als *Template* bei der nachfolgenden *in vitro*-Transkription (IVT) mit T7 RNA-Polymerase, bei welcher Biotin-markiertes UTP in die synthetisierte cRNA eingebaut wird. Diese Transkriptionsreaktion (16 h bei 37 °C) liefert eine 100- bis 500-fache lineare Amplifikation der Ausgangs-RNA, da ein cDNA-Molekül mehrere Male als Matrize dienen kann. Anschließend wurde die biotinylierte cRNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* nach Herstellerangaben aufgereinigt, die Konzentration photometrisch ermittelt (siehe 2.2.1.2) sowie die Qualität und durchschnittliche Transkriptgröße mittels der GITC-Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) und/oder an einem Bioanalyzer bestimmt (siehe 2.2.1.4). Mittels einer Metall-katalysierten Hydrolyse in 5x Fragmentierungspuffer und Hitze (94 °C, 35 min) wurde die cRNA (10 µg) auf eine durchschnittliche Länge von 100-200 Nukleotide fragmentiert. Bevor diese für die Hybridisierung eingesetzt wurde, erfolgte erneut eine Längenkontrolle am Bioanalyzer.

### **2.2.2.3.2 Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays**

Nach der Fragmentierung wurden je 15 µg der Biotin-markierten cRNA mit den Oligonukleotiden auf den Arrays in einem speziellen Hybridisierungssofen (*GeneChip Hybridization Oven*, Affymetrix) hybridisiert (16 h, 45 °C und 60 U/min). Dazu wurde der folgende Hybridisierungsmix hergestellt, für 5 min auf 99 °C erhitzt und auf den Mikroarray aufgebracht: fragmentierte cRNA (0,05 µg/µl), Kontroll-B2-Oligonukleotide (50 pM), eukaryotische Hybridisierungskontrollen (*bioB*: 1,5 pM, *bioC*: 5 pM, *bioD*: 25 pM, *cre*: 100 pM), nicht biotinylierte Heringssperma DNA (0,1 mg/ml), acetyliertes BSA (0,5 mg/ml) und 1x Hybridisierungspuffer (siehe 2.1.6.2.1). Nach der Hybridisierung wurden die Mikroarrays in einer *Fluidics-Station*, einem automatischen Chip-Waschmodul, bei 25 °C mit nicht stringentem Waschpuffer A (10 Zyklen) und dann bei 50 °C mit stringentem Waschpuffer B (4 Zyklen) gewaschen. Anschließend wurden die Arrays für 10 min bei 25 °C mit 10 µg/ml Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin in Färbepuffer gefärbt (SAPE-Lösung) und nochmals mit nicht-stringentem Waschpuffer A gewaschen. In zwei weiteren 10-minütigen Färbeschritten mit der Antikörper-Lösung (siehe 2.1.6.2.1) und der SAPE-Lösung bei 25 °C wurde das durch Phycoerythrin erzeugte Fluoreszenzsignal verstärkt. Vor dem Einscannen erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Waschpuffer A bei 30 °C (15 Zyklen).

### 2.2.2.3.3 Scannen der Mikroarrays

Die Fluoreszenz des Phycoerythrin wurde mit einem HP GeneArray Scanner (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm gemessen, und eine Datei mit den Bilddaten erzeugt. Bei einer Größe der Probenzelle von ca. 24 x 24  $\mu\text{m}$  und einer Auflösung von 3  $\mu\text{m}$ /Pixel wird jede Probenzelle durch 64 Pixel (8 x 8 Pixel) repräsentiert. Da die Intensitäten aufgrund von Randeffekten u.ä. auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, wurde aus den Rohdaten eine durchschnittliche Intensität der Bildpixel pro Probenzelle berechnet und als so genannte CEL-Datei (*Cell Intensity File*) gespeichert. Dies erfolgt über spezielle Probenzellen, die zu den so genannten *Quality Features* gehören. Hierzu zählen die Kontroll B2-Oligonukleotide, die sich auf jedem Array befinden. Mit Hilfe dieser Biotin-markierten B2-Oligonukleotide, die am Rand, in den Ecken als ein so genanntes Schachbrettmuster sowie als Kreuz in der Mitte des Arrays hybridisieren, wird ein virtuelles Gitter auf die Bilddaten gelegt und anschließend für jede Probenzelle eine CEL-Datei mit den Intensitätsdaten erstellt.



**Abbildung 2.3: B2-Oligonukleotide für die Ausrichtung des Leserasters (Gitters) im Affymetrix-System**

Mittels einer speziell von Affymetrix hergestellten Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) Software wird aus den Einzelintensitäten der Probenzellen eine CHP-Datei (*Chip File*) mit den Maßzahlen der Primäranalyse für das entsprechende Probenet berechnet, bei der die MM-Signale (*Mismatch*) von den PM-Signalen (*Perfect Match*) subtrahiert werden. Qualitätskriterien und andere Eigenschaften eines Experimentes werden zusätzlich in einer Berichtdatei zusammengefasst. Da 30 % der MM-Probenzellen in der Regel höhere Intensitäten als ihre korrespondierenden PM-Probenzellen aufweisen (Naef *et al.*, 2002), wurden für die weitere Mikroarray-Auswertung die CEL-Dateien verwendet und durch Anwendung eines speziellen Algorithmus die MM-Intensitäten vernachlässigt (siehe 2.2.2.3.5).

#### 2.2.2.3.4 Qualitätskontrolle

Für die Überprüfung der Qualität der Affymetrix-Arrays wurde der RACE (*Remote Analysis Computation for Gene Expression Data*, Psarros *et al.*, 2005) Webserver verwendet, der eine Kollektion von bioinformatischen Tools für die Analyse von Mikroarray-Daten anbietet. Die *Data Quality Checks* Funktion verwendet dabei Methoden, die im BioConductor Paket *affy* (Gautier *et al.*, 2004) enthalten sind. Mit diesem in R geschriebenen Paket wurden Dichte- und Boxplot-Plots aller Arrays erstellt, um mögliche Intensitätsunterschiede zwischen den Arrays zu identifizieren. Weiterhin wurden vor der Normalisierung RNA-Degradations-Plots erstellt, um mögliche Differenzen in der RNA-Qualität zu detektieren.

#### 2.2.2.3.5 Normalisierung der Daten und Hintergrundfilterung

Bevor die tatsächliche differentielle Expression von Genen ermittelt werden kann, müssen die Signalintensitäten aller Proben „normalisiert“ werden. Die Normalisierung dient dazu, Differenzen in den Markierungs- und Detektionseffizienzen zu regulieren und Unterschiede in der Quantität der Ausgangs-RNA zu kompensieren. Dafür existieren verschiedene Methoden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Intensitäten aller Gene für die Normalisierung zu verwenden. Dieser globalen Normalisierung liegt die Annahme zugrunde, dass die Mehrzahl der auf dem Array dargestellten Gene unter den untersuchten Bedingungen unverändert bleibt (Quackenbush, 2002). Bei diesem Ansatz wird durch Division des höchsten Medians aller Expressionswerte eines Arrays und der Mediane aller anderen Arrays ein Normalisierungsfaktor gebildet. Jeder einzelne Intensitätswert wird anschließend damit multipliziert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass pro Array nur ein Parameter (der Median) zur Angleichung benutzt wird und intensitätsabhängige Effekte unberücksichtigt bleiben. Eine Alternative stellt die Quantilnormalisierung dar, die eine gleiche Verteilung der Intensitäten für jeden Array zugrunde legt (Bolstad *et al.*, 2003). Sie ist Bestandteil des im BioConductor-Paket enthaltenen *Robust Multi-Array Analysis* (RMA)-Algorithmus (Irizarry *et al.*, 2003). Die Grundidee dieser Normalisierung ist, dass die Histogramme aller Arrays gleich aussehen sollten. Dies stellt eine „Verschärfung“ der Hypothese dar, die der Medianzentrierung bei der globalen Normalisierung zugrunde liegt. Es wird angenommen, dass nicht nur das 50 %-Quantil (Median), sondern alle Quantile über allen Arrays einer Studie in etwa gleich sind. Des Weiteren wurde beim RMA-Algorithmus aus den Einzelintensitäten der Probenzellen je ein Signalwert pro Probenatz berechnet, wobei jeweils nur die Intensitäten der PM-Probenzellen, nicht aber die der MM-Probenzellen berücksichtigt wurden (siehe oben). Somit



unterscheidet sich dieser PM-basierte Algorithmus vom Standard-Algorithmus von Affymetrix (MAS 5.0), der zusätzlich auch die MM-Signale berücksichtigt.

Anschließend wurden ausgehend von 54.671 Probensätzen diejenigen herausgefiltert, deren Signalintensität nahe am Hintergrundsignal lag. Dies wurde mittels des Programms AMEN über die Funktion *Filtration on Expression Level* durchgeführt, wobei die Mediane aller Gruppen bezüglich der Rohdaten mindestens einen Wert von 50 aufweisen mussten, um als signifikantes Signal angesehen zu werden. Daraus resultierte ein Datensatz mit 25.268 positiven Probensätzen bzw. Transkripten, der für die weitere Auswertung verwendet wurde.

#### **2.2.2.3.6 Identifizierung differenziell exprimierter Gene**

Für die Identifikation differentiell exprimierter Gene wurden in einem ersten Schritt die Gene herausgefiltert, die in ihren Expressionsprofilen die größte Varianz über alle Proben aufwiesen, indem ein minimaler SD (*Standard Deviation*)-Wert von eins gewählt wurde. Anschließend wurden die Proben einer morphologischen Score-Gruppe als Replikate definiert und mittels des Programms AMEN ein ANOVA-Test (parametrischer F-Test) mit einer FDR (*false discovery rate*, Benjamini und Hochberg, 1995) als multiple Testkorrektur durchgeführt. Gene wurden als statistisch signifikant zwischen den Score-Gruppen angesehen, wenn ihr p-Wert nach der multiplen Testkorrektur kleiner als 0,001 war. Dies war der Fall für 2960 Gene. Basierend auf dem ANOVA-Test wurde dann ein Permutationstest durchgeführt, der nicht von einer Normalverteilung des Datensatzes abhängt. Dabei wird die Zuordnung der Daten zufällig verändert. Dies wurde 10.000-fach durchgeführt, um festzustellen, ob die ursprüngliche Datenerhebung von einer zufällig erwarteten abweicht.

#### **2.2.2.3.7 Clusteranalyse der Proben**

Zur Identifizierung von molekularen Mustern in dem gefilterten Datensatz wurden die Proben der verschiedenen morphologischen Score-Gruppen in einem hierarchischen *Clustering* dargestellt, das eine Methode des *unsupervised Clusterings* ist. Bei diesem Verfahren erfolgt eine Einteilung der Proben nach der Ähnlichkeit ihrer Expression in Gruppen, den so genannten Clustern. Das Ziel ist es, die Proben so zusammenzufassen, dass sie innerhalb einer Gruppe einen minimalen Abstand haben, also möglichst ähnlich sind, und zwischen den Gruppen einen großen Abstand aufweisen und demnach möglichst unähnlich sind (Quackenbush, 2001; Brazma und Vilo, 2000). Dazu ist die Wahl eines Distanzmaßes erforderlich, um die Unähnlichkeiten bzw. den Abstand zwischen Clustern bestimmen zu können. Hier wurde für den Abstand zweier Cluster der *average linkage*-Abstand zugrunde

gelegt und zur Bestimmung des Abstandes zwischen den Proben die Manhattan-Distanz verwendet. Das *Clustering* wurde ausgehend von den 2960 differentiell exprimierten Transkripten mit Hilfe der Statistiksoftware R durchgeführt.

Des Weiteren wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA, Yeung und Ruzzo, 2001) durchgeführt, deren Ziel es ist, die Dimension einer Datenmatrix mit  $m$  Proben und  $n$  Genen auf einen Wert  $x$  zu reduzieren, wobei  $x$  meist nicht größer als drei ist (den *Principal Components*), so dass der neue Datensatz graphisch dargestellt werden kann (Dysvik und Jonassen, 2001). Um die Hauptkomponenten (*Principal Components*, PC) zu bestimmen, werden die Eigenwerte und Eigenvektoren der Datenmatrix mit Hilfe der *Single Value Decomposition* (SVD) berechnet. Diese Eigenvektoren können nun als Hauptkomponenten angenommen werden. Bei der graphischen Darstellung werden die ersten drei PC, die auch die größten Eigenwerte besitzen, in ein dreidimensionales Koordinatensystem aufgetragen. Die Expression einer Probe kann dann durch eine Linearkombination aus den PC eindeutig beschrieben werden. Proben, die im dreidimensionalen Raum einen geringen Abstand zueinander aufweisen, sind auch ähnlich in ihrer Expression. Die Hauptkomponenten wurden ausgehend von den 2960 differentiell exprimierten Transkripten mit Hilfe des Programms Genesis 1.7.0 (Sturn *et al.*, 2002) berechnet.

#### **2.2.2.3.8 Clustering von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen**

Zur Identifizierung Stadien- bzw. Zelltyp-spezifischer Transkripte wurden Gene gemäß ihren Transkriptionsprofilen und unabhängig von ihren Signalintensitäten in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dies erfolgte über den PAM-Algorithmus (*Partitioning around medoids*, Kaufmann und Rousseeuw, 1990) ausgehend von den differentiell exprimierten Transkripten. Dazu wurden die Werte für jedes Gen auf null zentriert, auf einen SD-Wert von eins skaliert, und anschließend die transformierten Werte über die Funktion *PAM* im Paket *cluster* in R analysiert. Dieses Verfahren gehört zu den so genannten *supervised Clustering*-Methoden, bei der neben der Distanzmatrix auch die gewünschte Anzahl der Cluster vorgegeben wird. Mit Hilfe des mittleren *Silhouette-Width*-Wertes kann die ideale Anzahl der Cluster und deren Qualität bestimmt werden, wobei sich die optimale Anzahl durch den größten, durchschnittlichen *Silhouette-Width*-Wert auszeichnet. Diese Cluster bzw. Gengruppen wurden anschließend in virtuellen, funktionellen Analysen eingesetzt.

### 2.2.2.3.9 Funktionelle Annotierung der PAM-Cluster

Das im Jahre 1998 gegründete *Gene Ontology* (GO)-Konsortium (<http://www.geneontology.org>) hat es sich zur Aufgabe gemacht, Gene bzw. Genprodukte kontrolliert zu annotieren sowie durch einen einheitlichen Gebrauch und der Standardisierung von Annotationen die virtuelle, funktionelle Analyse von Genprodukten entscheidend zu erleichtern (Ashburner *et al.*, 2000). Die drei Organisationsprinzipien bzw. Annotations-Möglichkeiten beruhen auf der Beschreibung der molekularen Funktion eines Genproduktes (z.B. Enzym), dem biologischen Prozess, an dem ein Genprodukt beteiligt ist und der durch eine oder mehrere molekulare Funktionen gesteuert wird (z.B. Zellwachstum) sowie einer Zuordnung der zellulären Lokalisation. Beim letzteren werden anatomische Strukturen (z. B. Zellkern) ebenso erfasst wie makromolekulare Komplexe bzw. Genproduktgruppen (z. B. Ribosom). Einem Genprodukt können mehrere molekulare Funktionen zugeordnet sein und eine molekulare Funktion kann als Attribut bei mehreren Genprodukten annotiert werden. Das gleiche gilt für die beiden anderen Ontologien.

Um den verschiedenen Gengruppen bestimmte biologische Prozesse sowie zelluläre Kompartimente zuzuordnen, wurden Über- sowie Unterrepräsentationsanalysen von GO-Begriffen mit Hilfe des Programms AMEN durchgeführt. Dies erfolgte über die Funktion *Over/Under-representation on statistic data*. Dabei wurde unter *p cutoff* sowie *n cutoff* die Stringenz der funktionellen Analyse gewählt, die bei allen Anwendungen bei  $p = 0,001$  und mindestens bei  $n = 3$  lag. Über folgende Formel wurde dann die zu erwartende Anzahl von Genen ( $rExp$ ) berechnet, die in einem PAM-Cluster einem bestimmten GO-Begriff wie zum Beispiel *cell division* zugeordnet werden kann:

$$rExp = \frac{R * n}{N}$$

mit

R = Anzahl der Gene aus einer Gengruppe, für die GO-Begriffe vorhanden sind;

n = Anzahl der Gene im Genom, denen ein speziell ausgewählter GO-Begriff zugeordnet wird;

N = Anzahl der Gene im Genom, für die GO-Begriffe vorhanden sind.

Wenn nun der tatsächlich ermittelte Wert  $r$  größer als der zu erwartende Wert  $rExp$  ist, dann wäre der GO-Begriff in der untersuchten Gengruppe überrepräsentiert, ist er dagegen kleiner, dann wäre er unterrepräsentiert.

#### 2.2.2.4 CodeLink-System (GE Healthcare, Piscataway, NJ)

Für die Genexpressionsanalysen wurden die CodeLink *UniSet Human 20K I Bioarrays* verwendet, die 20.289 Oligonukleotide enthalten und basierend auf den *UniGene* und *RefSeq* Datenbanken 19.881 entdeckte Gene repräsentieren. Die Sequenzen für das Probedesign stammen aus den *Incyte's LifeSeq<sup>TM</sup> Gold and Foundation* Datenbanken. Dabei wird ein Gen im Unterschied zum Affymetrix-System in der Regel durch ein einziges Oligonukletotid mit der Länge von 30 Basen repräsentiert. In den folgenden Abschnitten wird die Durchführung eines Mikroarray-Experimentes gemäß des *CodeLink Expression Assay Reagent Manuals* von GE Healthcare sowie dessen Datenanalyse beschrieben.

##### 2.2.2.4.1 cRNA-Herstellung

Die Probenvorbereitung von der cDNA-Synthese über die *in vitro*-Transkription bis hin zur Fragmentierungsreaktion, erfolgte im Wesentlichen analog zum Affymetrix-System (siehe 2.2.2.3.1). Jegliche Abweichungen werden im Folgenden aufgeführt.

Die bakteriellen Kontroll-mRNAs wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt: *araB* (1:1.000), *entF* (1:4.000), *fixB* (1:16.000), *gnd* (1:64.000), *hisB* (1:256.000), *leuB* (1:1.024.000). Bei der Zweitstrang-Synthese wurde ein Enzymgemisch aus *E.coli* DNA-Polymerase I und RNase H eingesetzt. Das Auffüllen von eventuell vorhandenen einzelsträngigen Enden der cDNA entfiel beim CodeLink-System. Die *in vitro*-Transkription erfolgte im Unterschied zum Affymetrix-System (16 h bei 37 °C) nur für 4 h bei 37 °C (Spiess *et al.*, 2003). Die Magnesium-induzierte Hydrolyse wurde ebenfalls bei 94 °C in 5x Fragmentierungspuffer durchgeführt, allerdings nur für 20 min. Die Qualität der cRNA und der fragmentierten cRNA wurde ebenfalls mit Hilfe der Agarose-GITC-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) und des Bioanalyzers (siehe 2.2.1.4) überprüft.

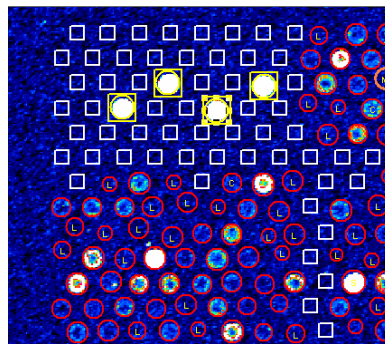
##### 2.2.2.4.2 Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays

Nach der Fragmentierung wurden je 10 µg der Biotin-markierten cRNA mit 78 µl Hybridisierungspuffer A und 130 µl Hybridisierungspuffer B gemischt und mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Volumen von 260 µl gebracht. Die Lösung wurde 5 min bei 95 °C erhitzt, auf den Array aufgebracht und für 16 h bei 37 °C in einem Schüttler mit 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Mikroarrays zunächst für 20 min bei Raumtemperatur und anschließend für 1 h bei 46 °C in 0,75x TNT-Puffer gewaschen, bevor der Färbeschritt mit der 1:500 Cy5<sup>TM</sup>-Streptavidin-Lösung (siehe 2.1.6.2.2, 30 min, RT) erfolgte. Nach

erneutem zweimaligen Waschen in 1x TNT (je 20 min, RT) wurden die Arrays zweimal für je 30 sek in 0,1x SSC / 0,05 % Tween inkubiert.

#### 2.2.2.4.3 Scannen der Mikroarrays

Nach Abzentrifugation (2000 rpm) der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Arrays bei einer Anregungswellenlänge von 649 nm in einem 428<sup>TM</sup> Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, USA) mittels der Jaguar 2.0 Software eingelesen und die einzelnen Fluoreszenzemissionen des Cy5<sup>TM</sup> ermittelt. Die Bilddaten-Analyse wurde mit Hilfe der *CodeLink<sup>TM</sup> Expression Analysis Software* durchgeführt und der Intensitätswert für jeden *Bildpunkt* ermittelt. Bei der Quantifizierung werden dabei die Signalintensitäten in numerische Daten umgewandelt. Dies geschieht über die Ausrichtung eines virtuellen Gitters mit speziellen Kontrollproben, den so genannten *Fiducials*.



**Abbildung 2.4: Kontroll-Oligonukleotide (*Fiducials*) für die Ausrichtung des Leserasters (Gitters) im CodeLink-System**

#### 2.2.2.4.4 Hintergrundfilterung und Normalisierung der Daten

Zunächst wurden die Gene, deren Signalintensität nahe am Hintergrund lag, herausgefiltert. Dabei wurden Signale als signifikant angesehen, wenn die Median-Fluoreszenz über dem dreifachen Median von 300 negativen bakteriellen Kontrollen lag. Das war der Fall für 15.119 von 20.289 Genen. Anschließend wurden die Signalintensitäten aller Proben logarithmiert ( $\log_2$ ) und mittels der *cyclic loess*-Normalisierung (Bolstad *et al.*, 2003) vergleichbar gemacht. Diese Normalisierung berücksichtigt wie die Quantilnormalisierung den vollständigen Datensatz aller Arrays für die Angleichung. Der *Loess*-Ansatz ist eine Methode der lokal-gewichteten Regression (Cleveland und Devlin, 1988) und verwendet für jeden Intensitätsabschnitt einen anderen Gewichtungsfaktor der Gesamtdatenmenge. Im Vergleich zur Quantilnormalisierung ist dieses Verfahren rechenintensiver. Der gefilterte und normalisierte Datensatz wurde für die anschließende statistische Analyse eingesetzt.

#### 2.2.2.4.5 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Viele statistische Verfahren setzen voraus, dass die Daten annähernd normalverteilt sind. Um diese Voraussetzung zu prüfen, wurden zwei statistische Tests angewendet, der Kolmogorov-Smirnov- und der Shapiro-Wilk-Test. Sie bestätigten die Normalverteilung der logarithmierten Daten. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen den verschiedenen morphologischen Score-Gruppen wurde ausgehend von den 15.119 Genen ein ANOVA-Test durchgeführt. Dieser erfolgte über die im *stats*-Paket enthaltene *anova* Funktion in R, wobei die Funktion auf ein lineares Modell angewendet wurde (*lm* Funktion in R) und die verschiedenen Proben einer morphologischen Score-Gruppe als Replikate definiert wurden. Gene wurden als statistisch signifikant zwischen den Score-Gruppen angesehen, wenn ihr p-Wert vor Anwendung der konservativen Bonferroni-Korrektur (Bonferroni, 1936) kleiner als  $3,3 \cdot 10^{-6}$  war. Die multiple Testkorrektur wurde für das Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  angewendet und es wurden insgesamt 1874 Gene herausgefiltert, deren p-Werte kleiner als 0,05 waren. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Varianzanalyse wurden wiederum Permutationsanalysen durchgeführt, die unabhängig von der Normalverteilung sind und deshalb realistischere statistische Schätzwerte liefern. Dazu wurde ein globaler Permutationstest mit 20.000 Permutationen auf dem gesamten Datensatz durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit dafür zu berechnen, dass dieser Satz von Genen durch Zufall erhalten wurde.

#### 2.2.2.4.6 Clusteranalyse der Proben

Die Clusteranalyse wurde analog zum Affymetrix-System durchgeführt (siehe 2.2.2.3.7) und erfolgte ausgehend von den 1874 differentiell exprimierten Genen. Des Weiteren wurden die Gene aus dem gesamten Datensatz gefiltert, die die größte Varianz über alle Proben aufwiesen, um zu zeigen, dass die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen (Perou *et al.*, 2000). Das Ergebnis wurde ebenfalls in einem hierarchischen *Clustering* (*average linkage*-, Manhattan-Distanz) über die *heatmap*-Funktion in R dargestellt.

#### 2.2.2.4.7 Clustering von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen

ANOVA-Tests dienen der Untersuchung, ob ein Gen eines komplexen Datensatzes in den zu testenden Gruppen statistisch signifikant differentiell exprimiert ist oder nicht. Da mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, geben die resultierenden p-Werte keine Information darüber, welche Gruppen sich jeweils signifikant unterscheiden und welche nicht.

Um diese Unschärfe auszugleichen, wurde ein *Post Hoc* Test verwendet und ausgehend von den differentiell exprimierten Genen multiple paarweise Vergleiche (*multiple pairwise comparison analysis*) unter Verwendung des *multcomp*-Paketes in R durchgeführt. Multiple Vergleiche testen dabei die paarweisen Unterschiede und geben deren Lokalisierung an. Beim hier verwendeten Tukey-Kramer-Test, der sich für ungleiche Gruppengrößen eignet, wurden alle Gruppen miteinander verglichen. Als Ergebnis wurden Gene mit ähnlichen Expressionsunterschieden über alle morphologischen Score-Gruppen zu einer Gengruppe zusammengefasst. Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass man Gruppen von Genen erhält, die nicht nur einen Unterschied in ihrem Transkriptionsprofil aufweisen, sondern auch eine statistisch signifikante Änderung von einer Score-Gruppe zur anderen zeigen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Etablierung eines „molekularen Archivs“ individueller humaner Testisbiopsien**

#### **3.1.1 Einführung**

Das Sammeln und Archivieren von individuellen humanen Hodenbiopsien war die Grundlage, um geeignete Proben für die globale Genexpressionsanalyse des humanen Hodens mittels der Mikroarray-Technologie auszuwählen. Als Klinik mit einem der größten TESE-Programme in Europa verfügt die Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf über ein sehr großes Patienten-Aufkommen. Darunter findet sich ein hoher Prozentsatz an Patienten mit Spermatogenesestörungen unbekannter Ursache, die sich einer TESE unterziehen (Schulze *et al.*, 1999).

Es zeigte sich, dass nur frisch entnommene Biopsien die gleich bleibend hohe RNA-Qualität lieferten, die eine wichtige Voraussetzung für eine Mikroarray-Analyse ist. Kryokonservate zeigten dagegen Qualitäts-Schwankungen, die mit dieser Methode unvereinbar sind. Aus diesem Grund wurden in einem Zeitraum von ca. zwei Jahren Hodenbiopsien von Patienten gesammelt und aus diesen Gesamt-RNA sowie genomische DNA aufgereinigt. So wurde eine RNA- sowie genomische DNA-Bank aufgebaut, wobei nach diesem Zeitraum insgesamt knapp 700 Proben aufgearbeitet und archiviert wurden, was einer ungefähren Patientenzahl von 300 entspricht. Dabei wurden Biopsien aus dem linken und rechten Hoden eines Patienten stets gesondert behandelt und nie vereinigt, da der pathologische Zustand auf der einen Seite nicht dem Zustand der kontralateralen Gonade entsprechen muss.

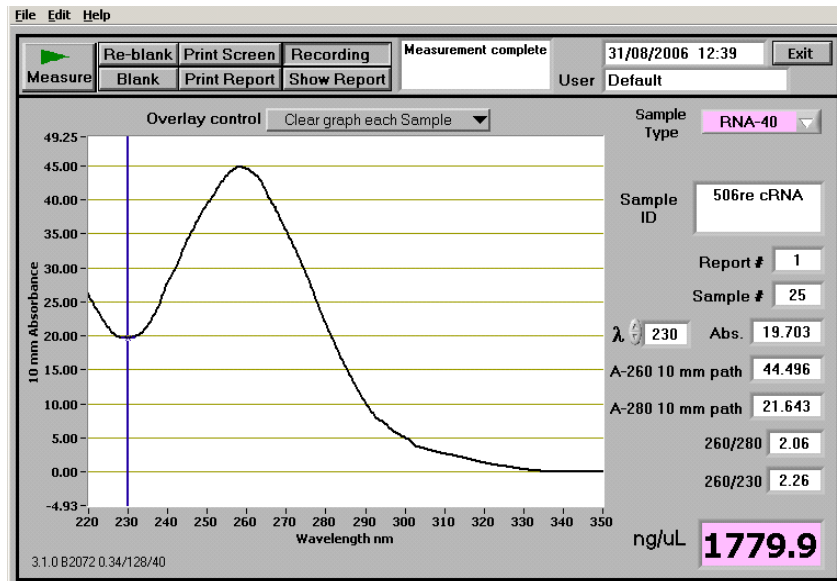
#### **3.1.2 RNA-Qualität**

Für die RNA-Herstellung wurde das Biopsiematerial neben einer Phenol-Chloroform-Extraktion noch zusätzlich über *RNeasy*-Säulen aufgereinigt, da das Hodengewebe relativ reich an Lipiden, Proteinen sowie genomischer DNA ist und ein Aufreinigungsschritt alleine keine RNA in der gewünschten Reinheit liefern würde.

Eine absolute Vorbedingung für Mikroarray-Studien ist, dass die zu vergleichenden Proben auch in gleicher Weise aufgearbeitet wurden, und dass die RNA hinsichtlich Konzentration, Reinheit sowie Integrität vergleichbar ist. Ansonsten können Mikroarray-Ergebnisse zu einer Fehlinterpretation führen. Die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der RNA-Messungen mit dem eingesetzten konventionellen UV-Spektrophotometer Ultrospec 3000 wurden mittels des NanoDrop ND-1000-Spektrophotometers durch Vergleichsmessungen überprüft. Das



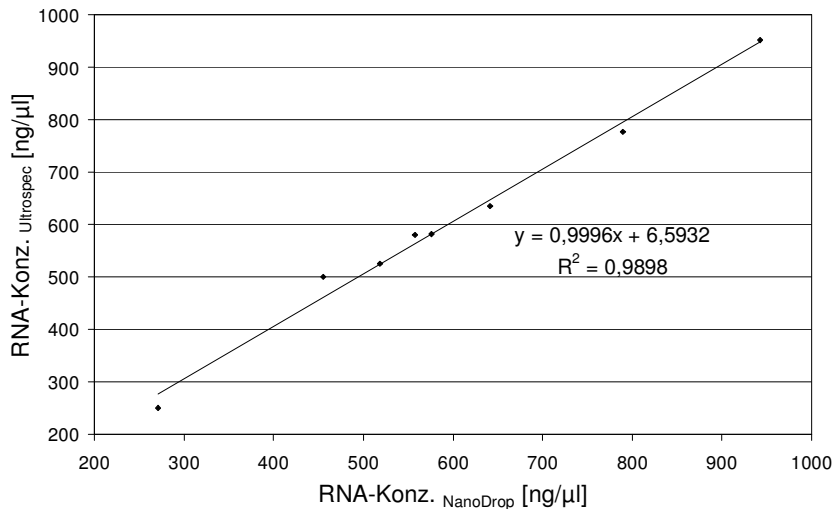
NanoDrop-Spektrophotometer bot zusätzlich die Möglichkeit, das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen 220 nm bis 350 nm graphisch darzustellen. In diesem Wellenlängenbereich konnten die Absorptionsmessung beeinflussende Substanzen wie Lösungsmittel- sowie Protein-Verunreinigungen der isolierten RNA detektiert werden. In der folgenden Abbildung ist das Absorptionsspektrum einer RNA von einer Patientenprobe mit einem Johnsen Score 10 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Bildschirmsicht einer RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer einer isolierten RNA-Probe aus humanem Hodengewebe.** Darstellung des RNA-Absorptionsspektrums von 220 nm bis 350 nm. Die Konzentration beträgt 1779,9 ng/ $\mu$ l und die  $OD_{260nm/280nm}$  liegt bei 2,06; gemessen wurden 1,2  $\mu$ l RNA-Lösung.

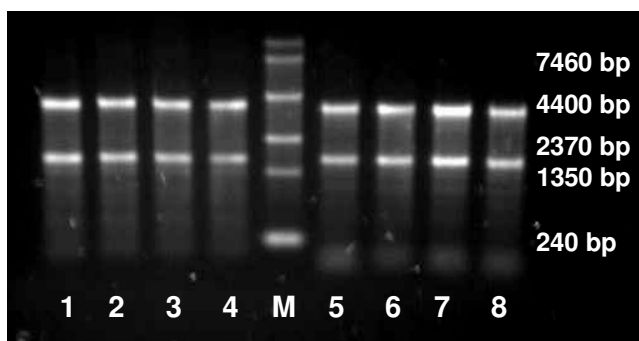
Das Spektrum zeigt weder Lösungsmittel- noch Protein-Verunreinigungen in der isolierten Gesamt-RNA. Der Absorptionsquotient  $A_{260nm}/A_{280nm}$  weist einen Wert von 2,06 auf und liegt somit in dem für eine reine Präparation charakteristischen Bereich von 1,9 – 2,1.

Des Weiteren wurden die Konzentrationswerte, die aus Vergleichsmessungen derselben RNA-Proben an beiden Photometern resultierten, graphisch gegeneinander aufgetragen. Die daraus resultierende Regressionsgerade macht deutlich, dass die RNA-Konzentrationen beider Messungen übereinstimmen und bestätigt somit die Zuverlässigkeit der jeweiligen RNA-Bestimmungen.



**Abbildung 3.2: Vergleich der RNA-Bestimmungen mit zwei unabhängigen Messgeräten.** Vergleich der RNA-Konzentrationen von acht Score 10-Proben am UV-Spektrophotometer Ultraspec 3000 (Ordinate) gegenüber dem NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer (Abszisse). Die Regressionsanalyse nach dem Verfahren von Passing und Bablok (1983) ergibt folgende Geradengleichung:  $Y_{\text{Konz. Ultraspec}} = 0,9996 \cdot X_{\text{Konz. NanoDrop}} + 6,5932$  ( $R^2 = 0,9898$ ).

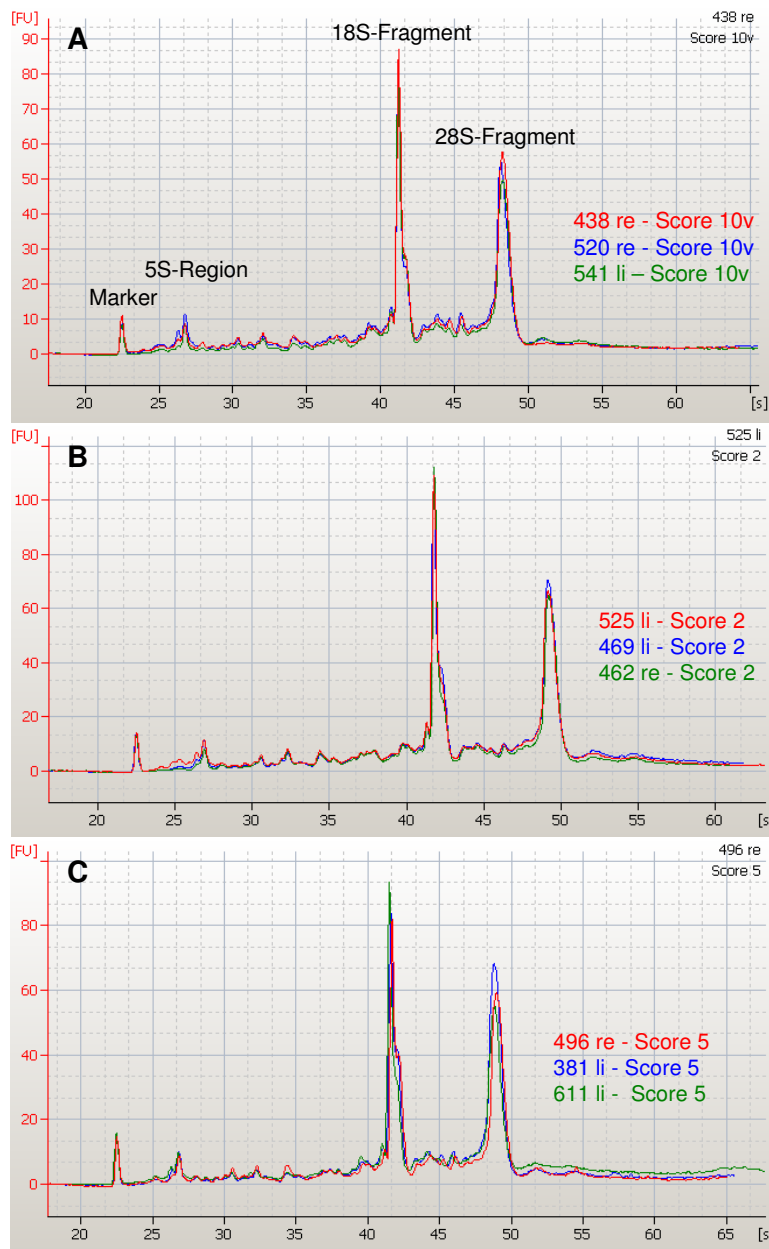
Diese Ergebnisse waren im Hinblick auf nachfolgende Genexpressionsstudien mittels der Mikroarray-Technologie wichtig, da mRNA-Level verschiedener Patienten nur miteinander vergleichbar sind, wenn bei den Ausgangsbedingungen gleiche Mengen an RNA vorliegen. Nach der Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde diese standardmäßig auf 1%-ige Agarose-GITC-Gele aufgetragen, bei der die 28S (ca. 4 kb) und 18S (ca. 2 kb) ribosomale RNA als zwei getrennte Banden laufen und somit als interne Marker für die Integrität der isolierten RNA dienen. Durch das Verhältnis von 28S rRNA zu 18S rRNA konnten weiterhin Rückschlüsse auf den Grad der Degradation der RNA gezogen werden.



**Abbildung 3.3: 1%-iges Agarose-GITC-Gel humaner Gesamt-RNA aus testikulären Biopsien.** Spuren 1-8 stellen die 28S sowie 18S ribosomale RNA von Patienten mit verschiedenen Johnsen Scores dar. Als Marker (M) wurde die 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen) verwendet; aufgetragen wurden je 500 ng.

Anhand Abbildung 3.3 ist festzustellen, dass das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA nicht gleich zwei ist, sondern in der Regel zwischen 1,0 – 1,3 liegt. In der Tat kann dieses Verhältnis je nach Art des Gewebes, der untersuchten Spezies oder Zelllinie variieren. Entscheidend war, dass alle miteinander zu vergleichenden RNA-Proben die gleiche Qualität

sowie das gleiche Verhältnis aufweisen. Um dies zu gewährleisten, wurden die für Mikroarray-Studien eingesetzten RNA-Proben zuvor mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers untersucht und deren Qualität über die so genannten RIN-Werte bestimmt. Die resultierenden Densitogramme der Gesamt-RNA verschiedener Patienten einer Score-Gruppe wurden überlagert, um eine Aussage über deren Ähnlichkeit treffen zu können.



**Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Peaks der 18S rRNA (bei ca. 40 sek) und 28S rRNA (bei ca. 48 sek) in Form von Densitogrammen.** Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz der Fragmente, auf der Abszisse die Zeit in Sekunden dargestellt. Aufgetragen wurden je 200 ng RNA in einem Volumen von 1  $\mu$ l. Als Marker wurde die RNA 6000 Ladder (Ambion) verwendet. Überlagerung dreier Profile von vasktomierten (v) Score 10-Patienten (A), Überlagerung dreier Profile von SCO-Patienten (Score 2) (B) und dreier Score 5-Patienten (C).

Abbildung 3.4 zeigt eine gute Übereinstimmung der RNA-Profile, die auch keine Kontamination mit genomischer DNA aufwiesen (vgl. rechte Seite der Profile). Die dazugehörigen RIN-Werte sowie rRNA-Ratios sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Sie zeigten für alle Proben ähnliche Werte. Für die Genexpressionsstudien wurden nur RNA-Proben verwendet, die einen RIN-Wert im Bereich von 7,5 – 10 aufwiesen.

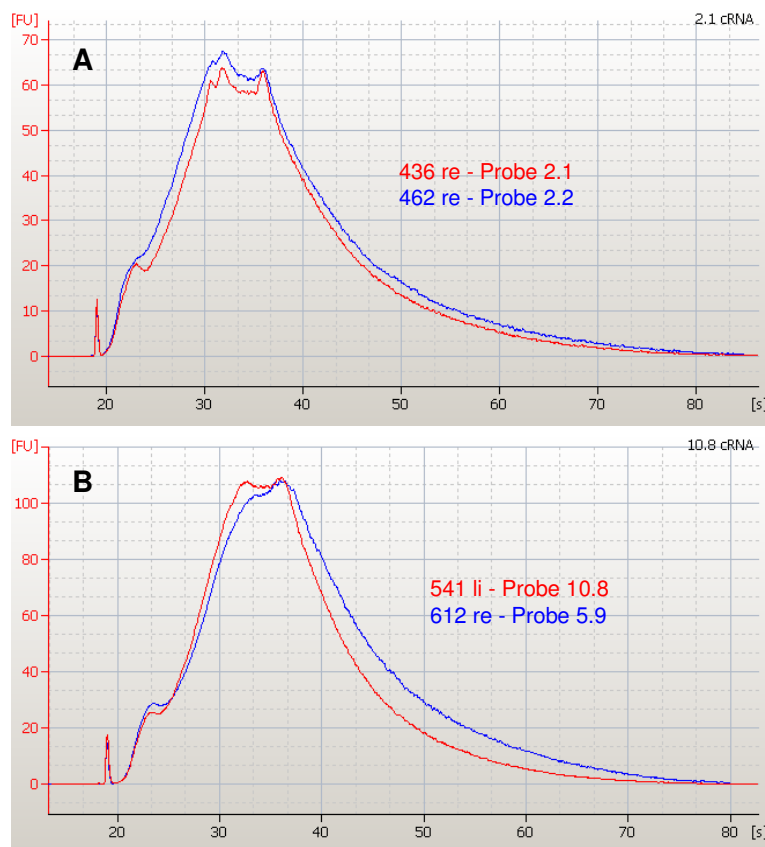
Probe	RIN	Ratio
438 re	8,3	1,1
520 re	7,9	1,0
541 li	8,5	1,0

Probe	RIN	Ratio
525 li	7,9	0,8
469 li	8,3	1,0
462 li	7,9	0,9

Probe	RIN	Ratio
496 re	8,5	1,0
381 li	8,9	1,2
611 li	8,7	0,8

**Tabelle 3.1:** RIN-Werte sowie rRNA-Ratios der in Abbildung 3.4 dargestellten Gesamt-RNAs aus Score 10-Patienten (links), SCO-Patienten (mitte) und Score 5-Patienten (rechts).

Die Größenverteilung Biotin-markierter cRNA wurde ebenfalls mittels des Bioanalyzers überprüft. Dabei wurden die Profile der cRNA verschiedener Patienten sowohl einer Score-Gruppe als auch unterschiedlicher Score-Gruppen überlagert. Es zeigte sich, dass die durchschnittliche Transkriptgröße in allen cRNA-Proben bei ca. 1,6 kb (entsprechen ca. 32 Sekunden in Abbildung 3.5) lag.



**Abbildung 3.5:** Densitogramme Biotin-markierter cRNA, die aus humaner testikulärer Gesamt-RNA mit dem Affymetrix *One-Cycle Kit* hergestellt wurde. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz der Fragmente, auf der Abszisse die Zeit in Sekunden dargestellt. Aufgetragen wurden je 1  $\mu$ l cRNA. Als Marker wurde die RNA 6000 Ladder (Ambion) verwendet. Die durchschnittliche Transkriptgröße betrug ca. 1,6 kb. Überlagerung zweier Profile von SCO-Patienten (Score 2) (A) sowie von einer Score 10-Probe gegenüber einer Score 5-Probe (B).

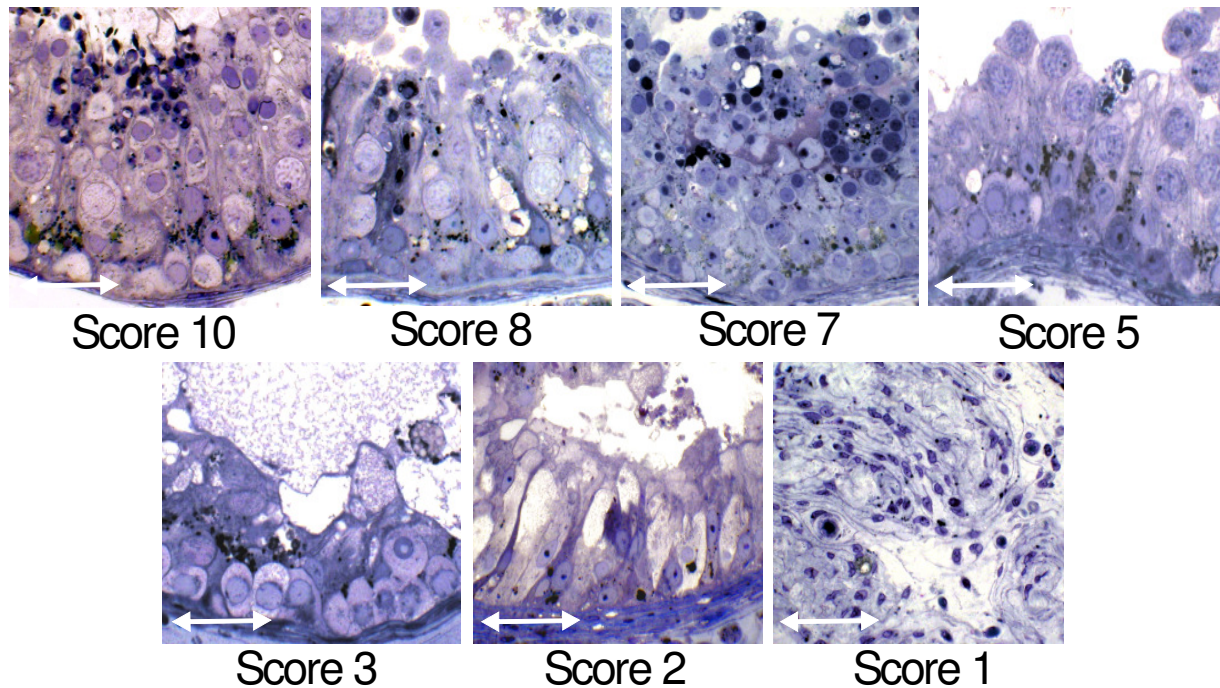
### 3.2 Auswahl geeigneter Biopsien für die globale Genexpressionsanalyse des humanen Testis

Ziel dieser Dissertation war es, das Genexpressionsmuster bestimmter humaner Hodenpathologien mit Hilfe der Mikroarray-Technologie zu untersuchen. Der Hoden selbst stellt ein sehr komplexes Gewebe dar und besteht aus zahlreichen verschiedenen Zelltypen und -stadien, die alle zum humanen testikulären Transkriptom beitragen. Je nach Hodenpathologie kommt es dabei zum Verlust verschiedener Keimzellstadien. Die Schwierigkeit bestand nun darin, aus dem „molekularen Archiv“ geeignete Biopsien mit klar definierten Zellzusammensetzungen auszuwählen und eine möglichst einheitliche Zellzusammensetzung innerhalb der Replikatgruppen zu erhalten. Dabei war es von großem Vorteil, dass die humanen Patientenproben anhand einer zweiten, unabhängigen Biopsie zuvor in phänotypisch einheitliche Subgruppen eingeteilt wurden. Dies geschah auf der Grundlage stringenter morphologischer Kriterien gemäß des modifizierten Johnsen Scores (Tabelle 3.2). Dabei wurden hier möglichst nur solche Biopsien ausgewählt, die in der Semidünnschnitt-Histologie eine homogene Morphologie des Hodenparenchyms, also einen einheitlichen Johnsen Score aufwiesen (Ausnahme in Tabelle 3.2). Fälle von Hypospermatogenese mit so genannter *mixed atrophy* („bunte“ Atrophie, Sigg und Hedinger, 1981), bei denen einzelne Hodenkanälchen unterschiedliche Zellzusammensetzungen aufwiesen und mit einem anderen Score bewertet wurden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. In der folgenden Tabelle sind die in den Hodenkanälchen vorhandenen Keimzelltypen jener morphologischen Subgruppen dargestellt, die in dieser Arbeit mittels der Mikroarray-Technologie untersucht wurden.

<b>Johnsen Score</b>	<b>vorhandene Zelltypen in den Hodenkanälchen</b>
1	Tubulusatrophie; keine Keim- oder Sertolizellen
2	keine Keimzellen, nur Sertolizellen $\equiv$ SCO ( <i>Sertoli cell-only</i> )-Symptomatik
3.2	vereinzelte Spermatogonien neben überwiegender SCO-Symptomatik
5	viele Spermatozyten, keine runden Spermatozoen
7	viele runde Spermatozoen, keine elongierten Spermatozoen (testikuläre Spermien)
8	Hypospermatogenese mit wenig elongierten Spermatozoen
10	intakte Spermatogenese

**Tabelle 3.2: Zellzusammensetzung humaner Hodenbiopsien, die anhand des modifizierten Johnsen Scores in morphologisch klar definierte Gruppen eingeteilt wurden (nach de Kretser und Holstein, 1976).**

In Abbildung 3.6 sind die dazugehörigen Semidünnschnitt-Mikroskopaufnahmen von Tubulusquerschnitten ausgewählter Patienten mit verschiedenen Hodenpathologien dargestellt.



**Abbildung 3.6: Morphologische Klassifizierung von humanen Hodenbiopsien anhand des modifizierten Johnsen Scores zur Beurteilung der spermatogenetischen Aktivität.** Mikroskopaufnahmen von Semidünnschnitten von Tubulusquerschnitten, die verschiedene Hodenpathologien zeigen; Maßstabsmarke ~ 50  $\mu$ m.

Weiterhin wurden für die Auswahl der Patientenproben die Ergebnisse einer postoperativen Test-TESE berücksichtigt, die an mindestens einer weiteren, meist sogar an mehreren unabhängigen Biopsien des gleichen Hodens durchgeführt wurde. Dieses Auswahlverfahren diente dazu, jegliche Abweichungen zwischen der histologischen Untersuchung der einen Biopsie und der in der TESE beobachteten Anzahl an gefundenen testikulären Spermatozoen in den anderen Biopsien auszuschließen. Als Beispiel seien hier Patienten mit einer SCO-Symptomatik erwähnt, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Zum einen gibt es Patienten, in deren Hodenkanälchen neben den Sertolizellen noch wenige Keimzellen vorhanden sind und bei denen postoperativ manchmal sogar noch vereinzelt Areale mit testikulären Spermatozoen gefunden werden. Zum anderen existieren Patienten mit kompletter SCO-Symptomatik. Nur letztere wurden für die Genexpressionsanalysen verwendet.

Für die endgültige Auswahl geeigneter Biopsien wurden zusätzliche Parameter wie bestimmte Hormonwerte im Blut der Patienten berücksichtigt. Tendenziell wird die Wahrscheinlichkeit, Areale mit spermatogenetischer Aktivität im Hoden zu finden, umso geringer, je höher die

FSH-Konzentration im Serum eines Patienten ist. Somit sinken bei Patienten mit hypergonadotroper Azoospermie (FSH-Konzentration  $> 8$  IU/ml) die Erfolgchancen, testikuläre Spermatozoen zu finden. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass bei Patienten mit normogonadotroper Azoospermie (FSH-Konzentration  $< 8$  IU/ml) in der Regel ein homogenes Verteilungsmuster der spermatogenetischen Aktivität im Hoden vorliegt, und die Biopsien dieser Patienten somit einen einheitlichen Johnsen Score aufweisen. Bei Patienten mit partieller (Score 3.2) sowie kompletter SCO-Symptomatik (Score 2) ist der FSH-Spiegel dagegen immer deutlich erhöht.

Hinsichtlich der Hormone LH sowie Testosteron lassen sich im Allgemeinen keine eindeutigen Beziehungen zwischen der Serumkonzentration und dem Spermatogenesestatus im Hoden erkennen. In den folgenden Tabellen sind die durchschnittlichen Serumkonzentrationen und das durchschnittliche Alter der Patientengruppen dargestellt, die für die Mikroarray-Studien mit der CodeLink- (Tabelle 3.3) sowie der Affymetrix-Plattform (Tabelle 3.4) verwendet wurden. Für das CodeLink-System wurden vier verschiedene Subgruppen (Score-Gruppe 10, 8, 5 und 2) mit insgesamt 28 individuellen Testisbiopsien verwendet, während in der zweiten Studie mit dem Affymetrix-System sieben unterschiedliche Subgruppen (Score-Gruppe 10, 8, 7, 5, 3.2, 2 und 1) mit insgesamt 35 individuellen Testisbiopsien untersucht wurden. Von diesen zeigten zwölf (CodeLink-Studie) bzw. acht Patienten (Affymetrix-Studie) eine Verschluss-Azoospermie mit kompletter Spermatogenese im Hoden. Im Falle der CodeLink-Studie handelte es sich bei sechs Proben um einen Verschluss aufgrund von Entzündungen, Ductusaplasie oder aus unbekannter Ursache. Sechs weitere Proben waren dagegen nach vorangegangener Vasektomie (Unterbrechung des Samenleiters) entnommen worden. Bei der Affymetrix-Studie handelte es sich bei allen Score 10-Proben um Gewebe aus vasktomierten Patienten. Für diese Proben war das Expressionsmuster des normalen humanen Hodens mit einer normalen individuellen Schwankungsbreite zu erwarten, so dass sie dementsprechend als Positivkontrollen dienen. Bei allen anderen Proben handelte es sich dagegen um Patientengewebe, bei denen aufgrund von Defekten des Hodenparenchyms eine Azoospermie des Ejakulats besteht (sog. nicht-obstruktive oder primäre Azoospermie).

Anhand der Tabellen ist weiterhin zu erkennen, dass die Score 2-Gruppe die einzige Gruppe darstellt, bei der die Serum-FSH-Konzentration bei den einzelnen Patienten immer deutlich erhöht war. Die Score 10- sowie die Score 5-Gruppe waren hinsichtlich der Hormonwerte sehr homogen, wie anhand der sehr geringen Standardabweichungen zu erkennen ist. Die Hormonwerte der einzelnen Patienten lagen alle im normalen Bereich (FSH  $< 8$  IU/ml, LH =

1,7 – 8,6 IU/ml, Testosteron = 2,8 – 8 ng/ml). Patienten, die einen Score 7 oder 8 aufwiesen, zeigten innerhalb der jeweiligen Score-Gruppe die größten Schwankungen bezüglich der FSH-Konzentration. Der Patient mit der niedrigsten FSH-Konzentration wies einen Wert von 3 IU/ml auf, der mit der höchsten Konzentration dagegen einen Wert von 54 IU/ml. Generell waren die Schwankungen innerhalb der Gruppen im Falle der für die Affymetrix-Studie ausgewählten Proben größer.

Johnsen Score	10	8	5	2
Anzahl der Proben	12*	6	5	5
Alter der Patienten	39.1 ± 7.0	34.7 ± 3.9	32.5 ± 7.6	30.3 ± 7.0
FSH Konz. [IU/ml]	5.0 ± 3.2	5.7 ± 3.9	5.6 ± 0.8	13.5 ± 6.2
LH Konz. [IU/ml]	3.5 ± 1.4	3.9 ± 2.2	3.7 ± 1.8	8.2 ± 2.3
Testosteron Konz. [ng/ml]	5.0 ± 3.2	6.4 ± 4.0	3.4 ± 1.5	4.8 ± 1.6

**Tabelle 3.3: Beziehung zwischen der histologischen Bewertung der Biopsien anhand des Johnsen Scores und hormoneller Parameter sowie Alter der 28 Patienten, die für die Mikroarray-Studie mit dem CodeLink-System verwendet wurden.** Dabei wurde jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung für jede Patientengruppe ermittelt. \* bei den Score 10-Patienten handelte es sich bei sechs Proben um eine obstruktive Azoospermie aufgrund von Entzündung, Ductusaplasie oder idiopathischem Verschluss, während sechs weitere Proben eine obstruktive Azoospermie nach vorangegangener Vasektomie aufwiesen.

Johnsen Score	10	8	7	5	3.2	2	1
Anzahl der Proben	8*	7	4	5	3	7	1
Alter der Patienten	45,0 ± 8,2	36,6 ± 6,7	33,8 ± 4,9	30,8 ± 4,8	36,7 ± 1,2	33,9 ± 2,9	46
FSH Konz. [IU/ml]	3,2 ± 1,0	14,3 ± 9,4	16,5 ± 25,2	5,0 ± 1,4	11,2 ± 8,2	24,8 ± 14,4	34,4
LH Konz. [IU/ml]	2,9 ± 0,8	5,6 ± 1,7	7,1 ± 6,7	4,2 ± 1,4	7,1 ± 5,7	8,7 ± 4,8	13,6
Testosteron Konz. [ng/ml]	5,5 ± 1,2	3,5 ± 1,2	4,1 ± 1,0	3,8 ± 1,0	5,3 ± 0,8	4,9 ± 1,3	2,8

**Tabelle 3.4: Beziehung zwischen der histologischen Bewertung der Biopsien anhand des Johnsen Scores und hormoneller Parameter sowie Alter der 35 Patienten, die für die Mikroarray-Studie mit dem Affymetrix-System verwendet wurden.** Dabei wurde jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung für jede Patientengruppe ermittelt. Da für die Studie nur ein Score 1-Patient zur Verfügung stand, konnte für diese Gruppe kein Mittelwert ± Standardabweichung gebildet werden. \* bei allen acht Proben handelte es sich um vasektomierte Patienten.



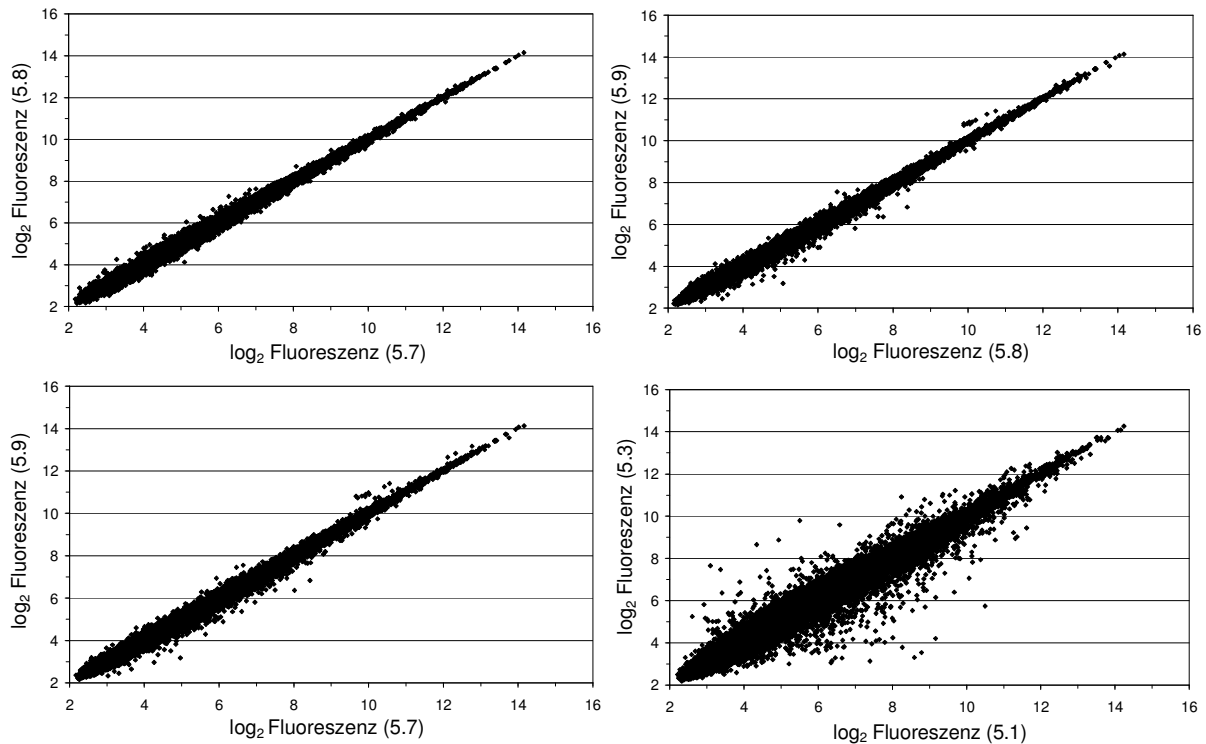
Diese Zusammenstellung zeigt, dass hormonelle Parameter allein für eine Unterscheidung verschiedener Testispathologien in der Regel zu unempfindlich sind. Dies liegt zum einen daran, dass die Hormonkonzentrationen im Blut starken Schwankungen unterliegen und sich im Jahresrhythmus (Testosteron) oder sogar im Stundenrhythmus (FSH) ändern können. Zum anderen werden letztendlich die Serumkonzentrationen gemessen, die den intratestikulären Konzentrationen nicht entsprechen müssen.

Abschließend sei noch erwähnt, dass im Rahmen dieser Dissertation die Identifizierung molekularer Signaturen verschiedener testikulärer Pathologien mit Hilfe der Mikroarray-Technologie im Vordergrund stand und nicht der Vergleich zweier unabhängiger Mikroarray-Technologien. Da die Versuchsdurchführung durch das zeitliche Vorhandensein geeigneter Patientenproben limitiert war, konnten nicht alle hier aufgeführten Patientengruppen mit beiden Plattformen untersucht werden. Da es sich gerade bei Patienten, die einen Score 7, 3.2 oder 1 aufweisen, um selten vorkommendes und somit sehr wertvolles Probenmaterial handelt, sollte in dieser Arbeit erstmalig die Möglichkeit genutzt werden, diese zumindest mittels einer Mikroarray-Plattform zu untersuchen.

### 3.3 Verteilungsmuster der spermatogenetischen Aktivität im Testis

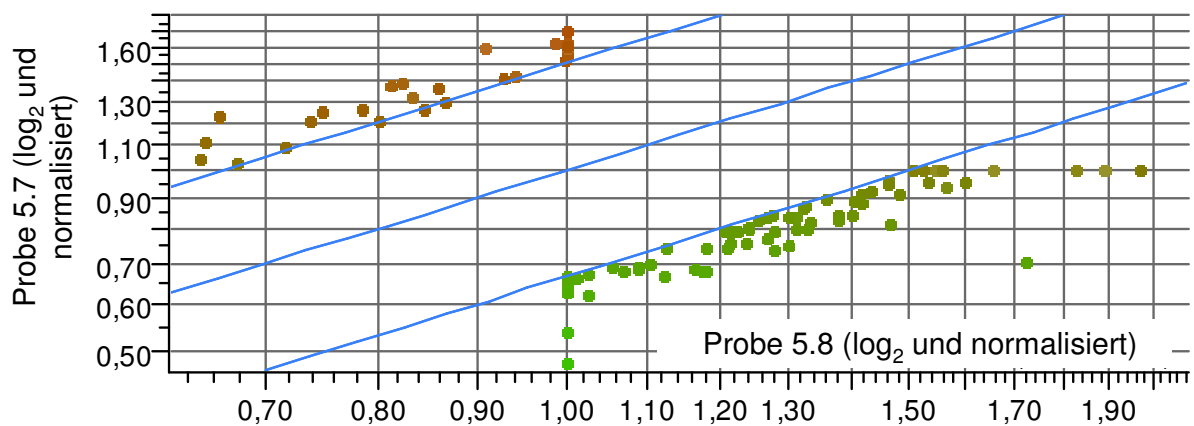
Zur Bewertung der spermatogenetischen Aktivität wurden letztendlich pro Patient bzw. pro Hoden mindestens vier Biopsien entnommen, die repräsentativ für den Spermatogenesestatus im kompletten Hoden sein sollten. Wie oben erwähnt, kann man davon ausgehen, dass bei Patienten mit normalen Hormonwerten in der Regel ein homogenes Verteilungsmuster der spermatogenetischen Aktivität im Hoden vorliegt. Ausgenommen sind Patienten mit SCO-Symptomatik, deren FSH-Spiegel in der Regel deutlich erhöht ist. Zur Bestätigung wurde hier zusätzlich ein technisches Experiment durchgeführt, um zu zeigen, dass die Verwendung einer einzigen Biopsie aus dem Hoden repräsentativ und somit für die Mikroarray-Analyse ausreichend war. Um dies im Falle von normogonadotropen Spermatogenesearresten experimentell zu zeigen, wurde ein Mikroarray-Experiment mit biologischen Replikaten durchgeführt. Bei einem Patienten, der einen Arrest auf der Stufe der Spermatozyten aufwies, konnten drei Gewebsfragmente aus verschiedenen Arealen des gleichen Hodens gewonnen werden. Das Genexpressionsmuster dieser drei unabhängigen RNAs wurde mittels der Affymetrix-Plattform untersucht. Diese drei Proben wiesen alle einen Johnsén Score von 5 auf und wurden mit 5.7, 5.8 und 5.9 bezeichnet.

Zum paarweisen Vergleich dieser drei Arrays wurden die Expressionsprofile graphisch in Form von Scatterplots dargestellt. Dazu wurden die logarithmierten und normalisierten Expressionswerte eines Arrays gegen die eines anderen Arrays aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert dabei den Expressionsquotient eines Transkripts, wobei sich solche mit gleichen Expressionswerten auf der Winkelhalbierenden befinden. In Abbildung 3.7 wird deutlich, dass die Arrays 5.7, 5.8 und 5.9 sehr ähnliche Expressionsprofile zeigen und dass nahezu alle Transkripte gleiche Werte aufweisen. Im Unterschied dazu war bei einem Vergleich der Arrays 5.1 und 5.3, bei denen es sich um Score 5-Proben aus verschiedenen Patienten handelte, die Streuung viel größer. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, da verschiedene Individuen von Natur aus eine gewisse molekulare Heterogenität aufweisen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass bei entsprechender Selektion der Patienten tatsächlich eine Biopsie repräsentativ für den gesamten Hoden ist.



**Abbildung 3.7:** Scatterplots zum paarweisen Vergleich der Expressionsprofile der drei Score 5-Proben (5.7, 5.8 und 5.9), die aus dem gleichen Hoden stammen gegenüber zwei unabhängigen Score 5-Proben (5.1 und 5.3) verschiedener Patienten. Jedes Transkript wird als Punkt repräsentiert; Transkripte mit gleichen Expressionswerten befinden sich auf der Winkelhalbierenden.

Zur Ermittlung von Unterschieden in der Genexpression zwischen zwei Proben wurde das Verhältnis ihrer logarithmierten und normalisierten Expressionssignale gebildet. Dabei zeigte sich beim Vergleich der Proben 5.7 und 5.8, dass von insgesamt 25.268 Probensätzen lediglich zwei Transkripte einen zweifachen bzw. 94 Transkripte einen höchstens 1,5-fachen Expressionsunterschied aufwiesen (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Scatterplot der Proben 5.7 und 5.8. Der Plot wurde mit der GeneSpring-Software sowie mit denjenigen Transkripten erstellt, die einen höchstens 1,5-fachen Expressionsunterschied zwischen beiden Proben zeigten.

Unter Berücksichtigung der technischen Varianz von Experiment zu Experiment hat der minimale Expressionsunterschied dieser 94 Transkripte biologisch keine Bedeutung, so dass die drei Replikate aus dem gleichen Hoden praktisch keinerlei Expressionsunterschiede aufweisen. Wenn die spermatogenetische Aktivität ungleichmäßig im Hoden verteilt wäre und die verschiedenen Areale dramatisch unterschiedliche Zellpopulationen aufgewiesen hätten, hätte sich dies auch im Genexpressionsprofil dieser drei Proben widerspiegelt. Dieses Ergebnis lieferte somit den Beweis, dass die Entnahme einer Biopsie an einer Stelle des Hodens für globale Expressionsanalysen mittels der Mikroarray-Technologie ausreichend war. Dies war eine wichtige Voraussetzung für Rückschlüsse aus den weiteren Studien. Das Ergebnis steht im Einklang mit den Aussagen von Silber *et al.* (1997) und Hauser *et al.* (1998), dass bei nicht-obstruktiver Azoospermie der vorherrschende Status der Spermatogenese in den meisten Fällen ein gleichmäßiges Verteilungsmuster über den gesamten Hoden aufweist.

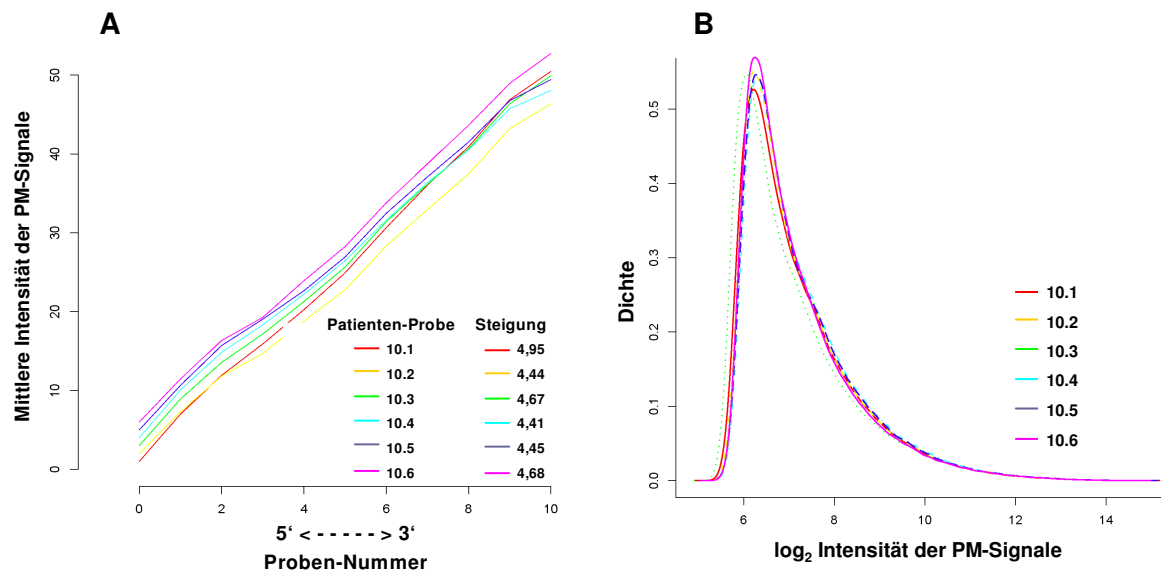
### 3.4 Qualitätskontrolle der Arrays vor der Normalisierung

Vor der Normalisierung der Daten wurde zunächst die Qualität der Mikroarrays kontrolliert, da nur anhand von Arrays mit vergleichbarer und guter Qualität zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können. Dazu existieren speziell für Affymetrix-Arrays im BioConductor Paket *affy* (Gautier *et al.*, 2004) verschiedene Qualitätskriterien, um mögliche Abweichungen zwischen den insgesamt 35 hybridisierten Proben zu visualisieren. Über den reinen Aspekt der Qualitätsbeurteilung hinaus ergeben die Qualitätskriterien auch mögliche Hinweise auf Varianzquellen.

#### 3.4.1 RNA-Degradations- und Dichteplots der Affymetrix-Arrays

Ausgehend von den 35 Affymetrix-Arrays wurden RNA-Degradations- und Dichteplots miteinander verglichen. Aus Gründen der Übersicht wurden je sechs Proben in einem Diagramm abgebildet und jeweils nur eine Abbildung dieser beiden Plots dargestellt (Abbildung 3.9), da letztendlich alle Arrays die gleichen Ergebnisse zeigten. RNA-Degradationsplots dienen dazu, Differenzen in der RNA-Qualität zu ermitteln. Bei der Affymetrix-Studie wurden pro Probensatz insgesamt elf Oligonukleotide am 3'-Ende der zugehörigen mRNA ausgewählt. Die Graphen in Abbildung 3.9 A zeigen die durchschnittliche Intensität als Funktion der 5'-3'-Position der Proben. Dabei ist jene, die dem 5'-Ende am nächsten liegt, ganz links und jene, die dem 3'-Ende am nächsten liegt, ganz rechts auf der Abszisse dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass Proben in einem Probensatz, die näher zum 5'-Ende binden, eine geringere Intensität aufweisen als jene, die näher am 3'-Ende binden. Weiterhin sind die Verläufe der Graphen sehr ähnlich und verlaufen parallel zueinander. Generell ist eine Probe umso stärker degradiert, je größer die Steigung ist. Die Steigungen und Verläufe können je nach Array-Art aufgrund von Differenzen in deren Architektur sehr variieren. Dabei ist der tatsächliche Wert der Steigung weniger wichtig als die Übereinstimmung zwischen den Arrays, die in Anbetracht der Tatsache, dass es sich hier um humane Gewebeproben handelte, außerordentlich gut war.

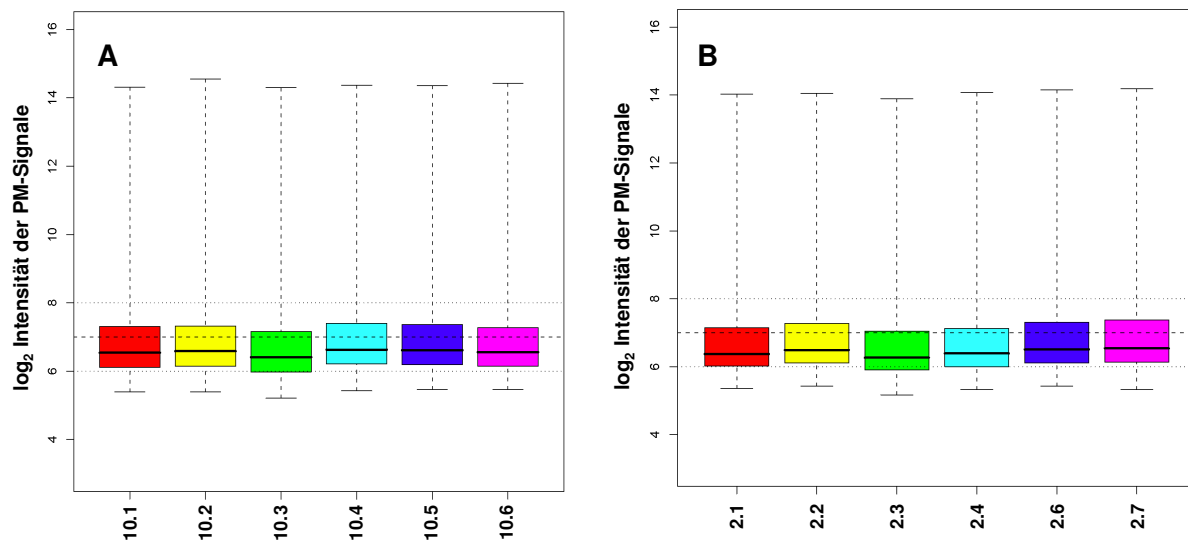
Abbildung 3.9 B zeigt die zugehörigen Dichteplots dieser Arrays. Dabei handelt es sich um geglättete Histogramme der Intensitätsverteilung für jeden einzelnen Array, um mögliche Differenzen zu visualisieren. Dabei wurden nur die PM-Signale (*Perfekt Match*) berücksichtigt. Es ist zu erkennen, dass erwartungsgemäß nur wenige Transkripte hohe Expressionslevel aufweisen und dass auch hier die Übereinstimmung zwischen den Arrays sehr gut war.



**Abbildung 3.9: RNA-Degradations- (A) sowie Dichteplots (B) von sechs der insgesamt 35 Affymetrix-Arrays zur Qualitätskontrolle.** Bei den sechs Proben handelt es um vasektomierte Score 10-Patienten; PM = *Perfect Match*.

### 3.4.2 Boxplots der Affymetrix-Arrays

Zur Charakterisierung der Verteilung der PM-Intensitäten der Affymetrix-Arrays vor der Normalisierung wurde der Boxplot verwendet. Dabei handelt es sich um eine graphische Darstellung beruhend auf den empirischen Quartilen. Die Box selber stellt dabei den Interquartilsabstand (IQR) dar, also die Differenz zwischen dem 3. und dem 1. Quartil. Der Median wird in der Box durch eine Linie gekennzeichnet. Die Länge der vertikalen Linien, die als *Whisker* bezeichnet werden, beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands und wird immer durch einen Wert aus den Daten bestimmt. Werte, die diese Grenze überschreiten, werden als Ausreißer bezeichnet. Gibt es keine Werte außerhalb der *Whisker*, wie es hier der Fall war, so wird die Länge der *Whisker* durch den maximalen bzw. minimalen Wert festgelegt. Mit dem Boxplot konnten Intensitätsunterschiede zwischen den Arrays identifiziert werden. In der folgenden Abbildung ist eine ähnliche Verteilung über alle Arrays erkennbar, eine wichtige Vorbedingung für die anschließende Anwendung der Quantilnormalisierung, da diese von einer gleichen Verteilung aller Arrays ausgeht. Es wurden je sechs Replikate der Score 10-Gruppe sowie der Score 2-Gruppe nebeneinander dargestellt, um zu zeigen, dass die Verteilung gruppenunabhängig zwischen allen Arrays ähnlich ist. Weiterhin liegen die log<sub>2</sub>-Fluoreszenzwerte aller Mediane im Bereich von 6-8, was für eine gute Qualität spricht. Insgesamt zeigten alle 35 Mikroarrays der Affymetrix-Studie das gleiche Ergebnis.



**Abbildung 3.10: Boxplots der Intensitätsverteilung der PM-Signale von zwölf der insgesamt 35 Affymetrix-Arrays vor der Normalisierung.** Bei den Proben 10.1 – 10.6 handelt es sich um vasektomierte Score 10-Patienten (A), bei den Proben 2.1 – 2.7 um Patienten mit SCO-Symptomatik (B).

### 3.4.3 Anteil der detektierten Signale auf den Arrays

In der mittels Affymetrix-Software erstellten Berichtdatei wurde für jeden einzelnen Mikroarray der prozentuale Anteil der Signale unter allen Probensätzen ermittelt, die als *absent*, *marginal* oder *present* angesehen werden. Dabei lag der mittlere Prozentsatz der detektierten Signale für alle 35 Mikroarrays bei  $54,1 \pm 2,8 \%$ . Die geringe Standardabweichung von  $2,8 \%$  spiegelt sich in den Boxplots wider und zwar in der Gestalt, dass der Prozentsatz der vorhandenen Signale unabhängig von den Score-Gruppen bei allen 35 Arrays etwa gleich war. Im Unterschied dazu lag bei der CodeLink-Studie ausgehend von allen 20.289 Oligonukleotiden der mittlere Prozentsatz der Signale für alle 28 Mikroarrays bei  $70,0 \pm 11,7 \%$ . Die größere Streuung war durch den unterschiedlichen Anteil der vorhandenen Signale in den Score-Gruppen bedingt. Zur Übersicht sind in Tabelle 3.5 für beide Plattformen die mittleren prozentualen Anteile der detektierten Signale für jede Replikatgruppe aufgeführt.

Plattform	Score 10	Score 8	Score 7	Score 5	Score 3.2	Score 2	Score 1
Affymetrix	55,7	55,4	57,3	54,3	52,7	50,4	48,3
CodeLink	80,3	78,5	/	62,7	/	58,4	/

**Tabelle 3.5: Vergleich des mittleren prozentualen Anteils der detektierten Signale pro Replikatgruppe zwischen den Affymetrix- und CodeLink-Arrays.**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Prozentsatz der detektierten Signale bei der CodeLink-Plattform generell höher war. Im Vergleich zur Affymetrix-Plattform zeigte sich weiterhin eine stärkere Abhängigkeit von der Score-Gruppe. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass die CodeLink-Arrays mit insgesamt 20.289 Oligonukleotiden deutlich weniger Proben aufwiesen als die Affymetrix-Arrays, die 54.671 Probensätze enthielten. Dies führt möglicherweise dazu, dass sich Komplexitätsunterschiede in den RNA-Proben im CodeLink-System stärker auswirken. Aus diesem Grund war es auch sinnvoll, für die CodeLink-Arrays statt einer Quantilnormalisierung eine *cyclic loess* Normalisierung durchzuführen. Die Tendenz, dass Proben mit geringerer Komplexität wie die Score 2-Proben im Mittel weniger detektierte Signale aufwiesen als Proben mit hoher RNA-Komplexität bei intakter Spermatogenese (Score 10), war auch mit der Affymetrix-Plattform zu erkennen.

Abschließend sollte erwähnt werden, dass der prozentuale Anteil der detektierten Signale nicht notwendigerweise ein Indiz für die Komplexität der RNA-Proben ist. Auch technische Varianz kann ein Grund für unterschiedliche Detektionsraten sein.



### 3.5 Die molekulare Klassifizierung verschiedener humaner Testispathologien

Insgesamt wurden mit der CodeLink- sowie der Affymetrix-Plattform 63 humane Hodenbiopsien untersucht. Dabei wurden für beide Systeme jeweils Biopsieproben verschiedener Patienten verwendet. Im Folgenden handelt es sich z.B. bei Probe 10.1 um eine Probe der CodeLink-Studie, bei Probe 10\_1 hingegen um eine der Affymetrix-Studie. Die gesamten Datensätze beider Studien sind in den Datenbanken *ArrayExpress* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, Affymetrix-Arrays: E-TABM-234) und *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, CodeLink-Arrays: GSE797) gespeichert und können dort eingesehen werden.

Die statistische Auswertung der Mikroarray-Daten erfolgte ausgehend von den Transkripten, deren Signalintensität über dem Hintergrundsignal lag. Bei der CodeLink-Studie war dies für 15.119, bei der Affymetrix-Studie für 25.268 Transkripte der Fall.

Der Hintergrund für die globale Genexpressionsanalyse verschiedener Testispathologien war die Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen diesen Pathologien. Damit verbunden war der Versuch einer Differentialdiagnose dieser Krankheitsbilder auf der Grundlage der korrespondierenden Expressionsmuster. Dazu wurden morphologisch klar unterscheidbare Biopsieproben verwendet, die eine fortschreitende Degeneration der Spermatogenese aufwiesen. Die damit verbundene Abnahme der Komplexität in der Keimzellausstattung wird durch den abnehmenden Score beschrieben. Die Score-Gruppen weisen also unterschiedliche Zellzusammensetzungen und Keimzellstadien auf, Unterschiede, die sich massiv auf ihre Genexpression auswirken sollten.

#### 3.5.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Eine zentrale Aufgabe bei der Analyse der Daten bestand darin, eine Definition für die differentielle Expression zu finden. Die einfachste Möglichkeit besteht in der Festlegung eines Schwellenwertes, wie z.B. die zweifache Änderung der Expression zwischen zwei Score-Gruppen (*two-fold change*, Schena *et al.*, 1996). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass sie die Varianz der Expressionswerte der Proben derselben Gruppe ignoriert und den detektierten Genen auch kein statistisches Konfidenzmaß zuordnet (Quackenbush, 2001). Um Gene zu detektieren, die statistisch signifikant zwischen den verschiedenen pathologischen Gruppen exprimiert sind, wurde deshalb die Varianzanalyse, kurz ANOVA (*Analysis of variance*, Kerr *et al.*, 2000) genannt, verwendet. Varianzanalysen sind parametrische Mehrstichprobentests, die Verallgemeinerungen der t-Tests auf mehr als zwei

Stichproben darstellen und die Normalverteilung der Daten voraussetzen. Bei diesen Tests wird dabei ein p-Wert für jedes Gen kalkuliert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Varianz in diesem Gen zufällig auftritt. Je kleiner der p-Wert ist, desto signifikanter ist die Varianz zwischen den Gruppen.

Für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen den verschiedenen morphologischen Score-Gruppen wurden für beide Mikroarray-Systeme geringfügig unterschiedliche statistische Testverfahren angewendet. Allen statistischen Tests ist dabei gemeinsam, dass sie eine gewisse Irrtumswahrscheinlichkeit haben. Ein so genannter Fehler 1. Art besteht darin, dass ein Gen als differentiell exprimiert eingeordnet wird, obwohl dies nicht der Fall ist (falsch-positives Ergebnis). Fehler 2. Art führen dazu, dass ein tatsächlich differentiell exprimiertes Gen unentdeckt bleibt (falsch-negatives Ergebnis). Demnach wurde bei jedem Test zuvor ein Signifikanzniveau  $\alpha$  (Fehler 1. Art) festgelegt, das die Irrtumswahrscheinlichkeit des Tests angibt.

Beim CodeLink-System wurde bei der Anwendung des ANOVA-Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % getestet, d.h. das Signifikanzniveau betrug  $\alpha = 0,05$ . War der p-Wert für ein bestimmtes Gen kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau, wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angesehen, d.h. das fragliche Gen war innerhalb der vier morphologisch unterscheidbaren Gruppen differentiell exprimiert.

Da man bei der Auswertung von Mikroarray-Daten mit der Schwierigkeit konfrontiert ist, eine hohe Anzahl von Genen bei einer meist sehr viel geringeren Anzahl an Proben zu untersuchen, ist die Wahrscheinlichkeit, Gene falsch-positiv zu detektieren, sehr hoch. Um diesem Problem des „multiplen Testens“ entgegenzuwirken, wurde der gewählte p-Wert an die multiple Testsituationen angepasst. Bei der CodeLink-Studie wurde die konservative Bonferroni-Korrektur (Bonferroni, 1936) als multiple Testkorrektur für das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  angewendet und der beim ANOVA-Test ermittelte p-Wert mit der Anzahl der durchgeführten Tests, also der Anzahl der getesteten Gene, multipliziert. Somit wurden nur Expressionsunterschiede mit einem p-Wert  $< 3,3 \cdot 10^{-6}$  als statistisch signifikant betrachtet. Dies war der Fall für 1874 Transkripte, entsprechend einem Prozentsatz von 12,4 % bezogen auf die 15.119 Transkripte. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des Ergebnisses wurde ein globaler Permutationstest mit 20.000 Permutationen auf dem gesamten Datensatz durchgeführt. Bei diesem Test werden die Daten immer wieder neu zusammengesetzt, indem man aus dem beobachteten Datensatz wiederholt Zufalls-Stichproben zieht (Edgington, 1995). Die Anwendung dieses Tests diente dazu, die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, eine über einen bestimmten p-Wert definierte Anzahl von Genen durch Zufall zu erhalten. Dabei war

die Wahrscheinlichkeit, mindestens 1874 Gene mit einem p-Wert  $< 3,3 \cdot 10^{-6}$  durch Zufall zu erhalten gleich null.

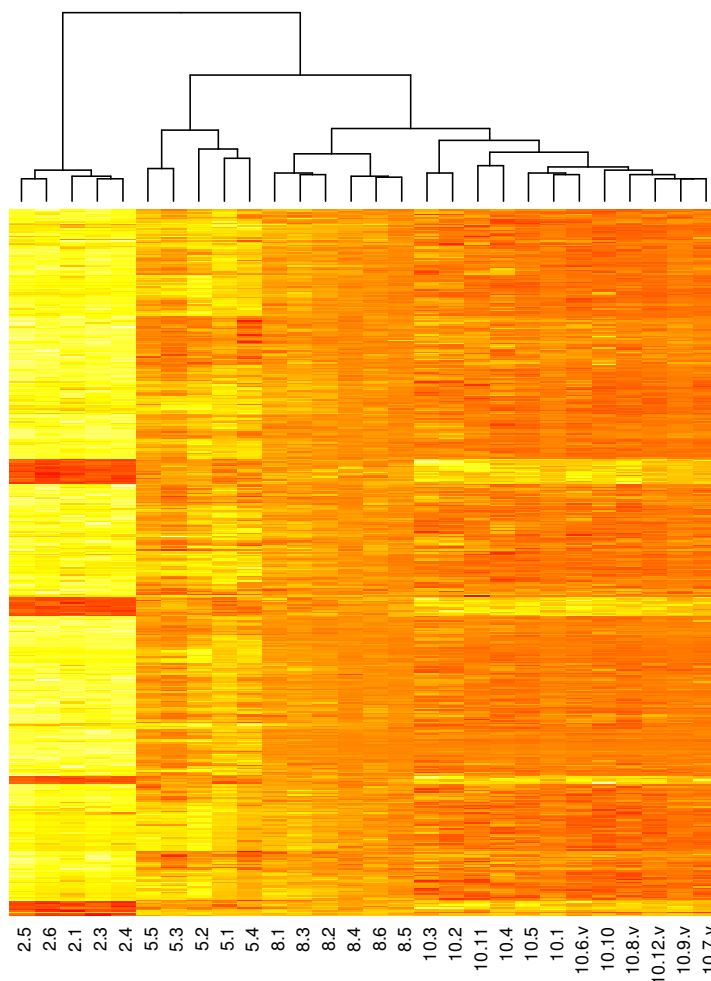
Bei der Auswertung der Affymetrix-Arrays wurde wegen der höheren Anzahl an Oligonukleotiden auf dem Array anders vorgegangen. Wenn man nämlich ausgehend von den 25.268 Probensätzen bzw. Transkripten einen statistischen Test durchführen würde, hätte man als Ergebnis trotz stringentem Konfidenzmaß über 12.000 differentiell exprimierte Gene zwischen den verschiedenen morphologischen Gruppen erhalten. Aus diesem Grund wurden zunächst die Transkripte herausgefiltert, die in ihren Expressionsprofilen die größte Varianz über alle 35 Proben aufwiesen, indem ein minimaler SD-Wert von eins gewählt wurde. Dadurch wurden sowohl unzuverlässige als auch invariante Transkripte zuvor aus dem Datensatz eliminiert. Für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen den Score-Gruppen wurde anschließend auf diesem vorgefilterten Datensatz ein ANOVA-Test mit der FDR (*false discovery rate*, Benjamini und Hochberg, 1995) als multiple Testkorrektur durchgeführt. Dabei wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % getestet und nur solche Transkripte als statistisch signifikant zwischen den Gruppen angesehen, deren p-Wert nach der multiplen Testkorrektur kleiner als 0,001 war. Die FDR stellt einen Schätzwert des prozentualen Anteils an falsch-positiv detektierten Genen unter allen differentiell exprimierten Genen dar. Diese multiple Testkorrektur ist zwar weniger stringent als die Bonferroni-Korrektur, lieferte aber nach der Vorfilterung einen guten Kompromiss zwischen einer erhöhten Anzahl falsch-positiver und zu wenig signifikanter, also falsch-negativer Ergebnisse. Gerade für die Anwendung der multiplen Testkorrektur war es wichtig, den Datensatz zuvor zu minimieren, da diese durch die Anzahl der zu testenden Gene direkt beeinflusst wird. Weiterhin wurde basierend auf dem statistischen Test wiederum ein Permutationstest mit 10.000 Permutationen pro Gen durchgeführt. Letztendlich wurden ausgehend von den 25.268 Probensätzen 2960 Transkripte als differentiell exprimiert zwischen den sieben untersuchten Score-Gruppen herausgefiltert. Dies entspricht einem Prozentsatz von 11,7 % bezogen auf die 25.268 Probensätze. Der prozentuale Anteil der gefilterten Gene war somit zwischen den Plattformen gut vergleichbar (siehe oben).

### **3.5.2 Clusteranalyse anhand der differentiell exprimierten Gene**

Um Informationen über die molekulare Struktur in den gefilterten Datensätzen zu erhalten, wurden die 28 verschiedenen Proben der CodeLink-Studie bzw. die 35 verschiedenen Proben der Affymetrix-Studie in einem hierarchischen *Clustering* dargestellt. Bei diesem Verfahren werden Proben, die ein ähnliches Expressionsprofil aufweisen, in Gruppen, den so genannten

Clustern, zusammengefasst (Quackenbush, 2001; Brazma und Vilo, 2000). Das Ergebnis ist als *Heatmap* in Kombination mit einem Dendrogramm (Abbildung 3.11 und 3.12) visualisiert, bei dem die Länge der einzelnen Äste die Ähnlichkeit der Proben zueinander darstellt.

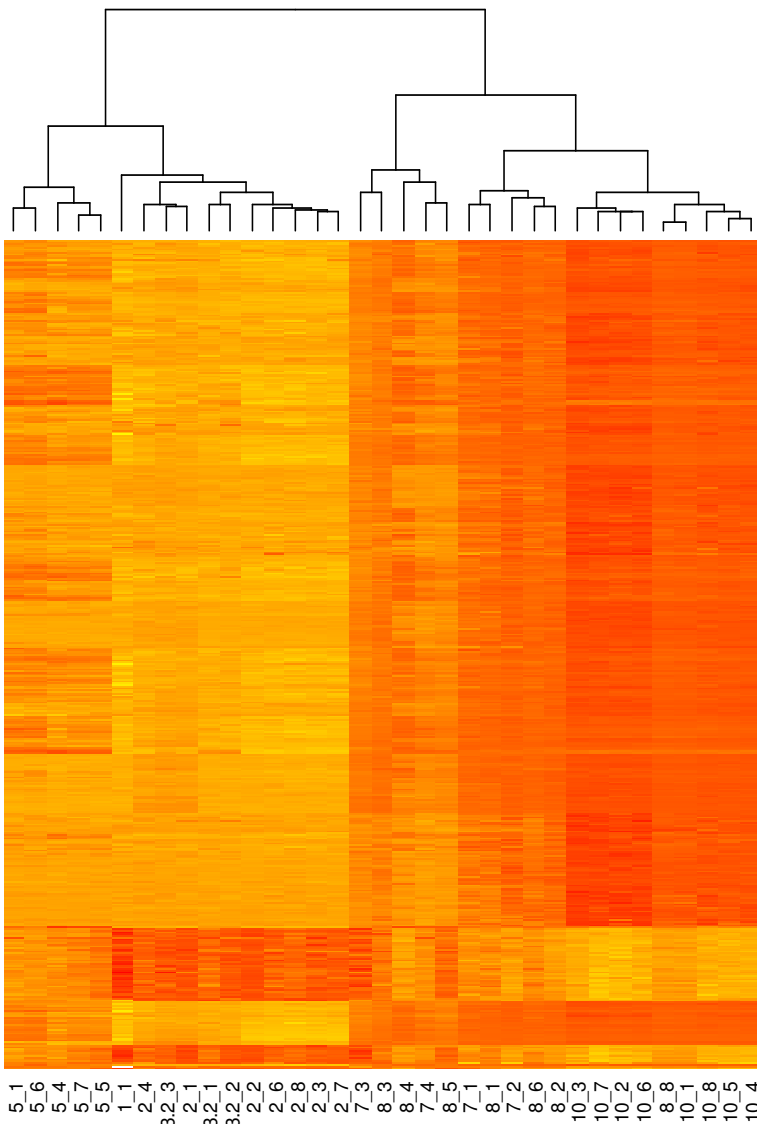
Das Ergebnis des *Clusterings* der CodeLink-Studie (Abbildung 3.11) zeigt deutlich, dass die 28 Proben anhand ihres Expressionsprofils in vier verschiedene Cluster eingeteilt werden, und dass alle Proben gemäß des modifizierten Johnsen Scores in die morphologisch vorklassifizierten Score-Gruppen clustern. Somit konnte gezeigt werden, dass sich Unterschiede im morphologischen Phänotyp der Biopsie im individuellen Expressionsprofil widerspiegeln. Hinsichtlich der Expressionsstärke ist festzustellen, dass die überwiegende Mehrheit der Transkripte mit abnehmendem Score, also mit fortschreitender pathologischer Veränderung abnimmt. Dies war zu erwarten, da mit sinkendem Score sukzessive Zelltypen aus dem Keimepithel des Hodens verloren gehen. Zusätzlich scheint es aber auch Transkripte zu geben, deren Level mit abnehmendem Score zunehmen und die somit nicht Keimzell-spezifisch exprimiert sind. Tatsächlich sind diese „Pathologie-induzierten“ Transkripte in den Proben mit normaler Spermato-genese unterrepräsentiert (Abbildung 3.11: gelb-farbiger Bereich).



**Abbildung 3.11: Hierarchisches Clustering (average linkage- und Manhattan-Distanz) der Genexpressionsprofile der 28 humanen Testisproben, die mit der CodeLink-Plattform analysiert wurden.** Das Clustering wurde mit Hilfe der Statistiksoftware R und ausgehend von den 1874 differenziell exprimierten Genen zwischen den verschiedenen Score-Gruppen 10, 8, 5 und 2 erstellt. Dabei nimmt die Expressionsstärke von gelb bis dunkel-orange zu. Score 10-Proben, die mit einem „v“ gekennzeichnet sind, wiesen eine obstruktive Azoospermie nach vorangegangener Vasektomie auf. Die anderen Score 10-Proben zeigten eine obstruktive Azoospermie aufgrund von Entzündung, Ductusaplasie oder idiopathischem Verschluss.

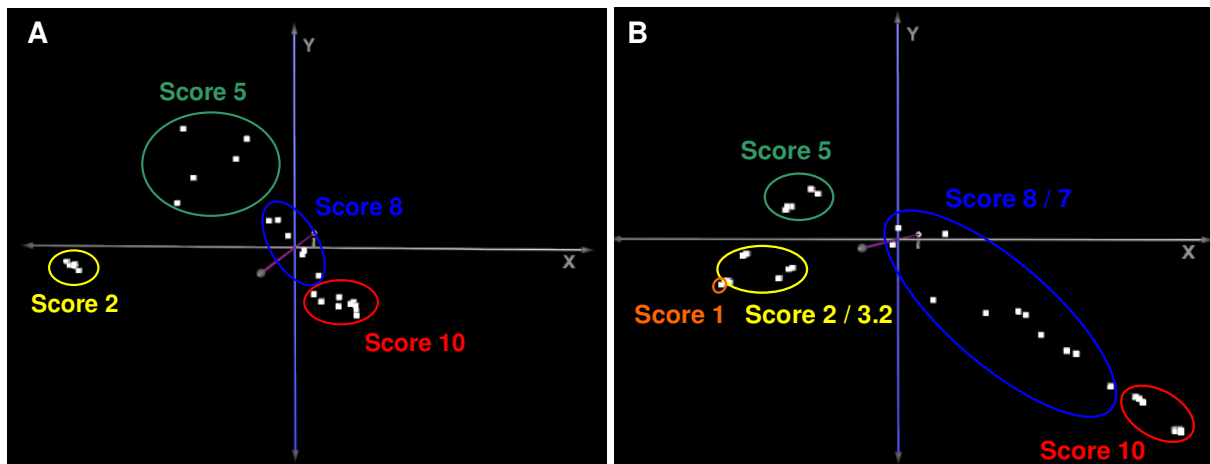
Das Ergebnis des hierarchischen *Clusterings* der 35 Proben der Affymetrix-Studie (Abbildung 3.12) stimmt im Wesentlichen mit dem der CodeLink-Studie überein; die zusätzlich analysierten Score-Gruppen bilden weitere Äste im Dendrogramm. Es zeigt sich, dass die Proben der Score-Gruppen 1, 2 sowie 3.2 eine verwandte Gruppe bilden, wobei die Score 1-Probe einen eigenen Ast bildet und sich von allen anderen Proben unterscheidet. Das war auch zu erwarten, weil das Gewebe des Score 1-Patienten im Unterschied zu den anderen Proben weder Sertolizellen noch Keimzellen enthielt. Bei den Score 3.2-Proben handelte es sich um Patienten, die neben vereinzelt Spermatozoen überwiegend eine SCO-Symptomatik aufweisen, so dass diese Proben nahe den Score 2-Proben, die eine komplette SCO-Symptomatik zeigen, clustern. Score 5- sowie Score 10-Proben bilden dagegen eindeutig jeweils eigene Cluster, während die Score 7- und Score 8-Proben nicht eindeutig voneinander separiert werden konnten. Die Proben 7\_1, 7\_2, 8\_1, 8\_2 und 8\_6 sowie 7\_3, 7\_4, 8\_3, 8\_4 und 8\_5 bildeten jeweils eine Gruppe, wobei die Expressionsprofile der ersten Gruppe den Profilen der Score 10-Gruppe ähnlicher waren. Die Probe 8\_8 clustert in die Score 10-Gruppe. Da in Score 8- sowie Score 10-Proben die gleichen Keimzellstadien vorhanden sind und letztendlich nur ein quantitativer Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen besteht, liegt die Vermutung nahe, dass diese Probe mehr elongierte Spermatozoen enthielt. Analog zum *Clustering* der CodeLink-Proben nimmt die Expression der Mehrzahl der Transkripte mit fortschreitender pathologischer Veränderung ab. Dennoch ist auch hier wieder eine Gruppe von Genen zu verzeichnen, deren Expressionslevel mit abnehmendem Score zunehmen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass man beim *Clustering* der fünf Score-Gruppen 10, 8, 5, 2 und 1 fünf eindeutig voneinander getrennte Cluster erhielt, die wie bei der CodeLink-Studie mit der morphologischen Klassifizierung korrelierten (Abbildung nicht dargestellt).



**Abbildung 3.12: Hierarchisches Clustering (average linkage- und Manhattan-Distanz) der Genexpressionsprofile der 35 humanen Testisproben, die mit der Affymetrix-Plattform analysiert wurden.** Das Clustering wurde mittels der Statistiksoftware R und ausgehend von den 2960 differentiell exprimierten Genen zwischen den verschiedenen Score-Gruppen 10, 8, 7, 5, 3.2, 2 und 1 erstellt. Dabei nimmt die Expressionsstärke von gelb bis dunkel-oranger zu.

Zur Visualisierung der Ähnlichkeit des Genexpressionsmusters in den verschiedenen Proben wurde ein weiteres Clusterverfahren, die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA, Yeung und Ruzzo, 2001) verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Dimension einer Datenmatrix mit  $m$  Proben und  $n$  Genen auf drei Hauptkomponenten reduziert und das Ergebnis in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Dabei sind Proben, die einen geringen Abstand zueinander aufweisen, auch ähnlich in ihrer Expression. Die folgende Abbildung zeigt im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie das hierarchische Clustering. In der CodeLink-Studie befanden sich alle Proben einer Score-Gruppe in räumlicher Nähe zueinander. Ähnliches zeigte sich für die Proben der Affymetrix-Studie, wobei die Proben der Score 3.2- und Score 2-Gruppe räumlich nicht eindeutig voneinander zu trennen waren, und die Proben der Score 8- sowie Score 7-Gruppe im dreidimensionalen Raum eine größere Streuung aufwiesen als die anderen Proben.

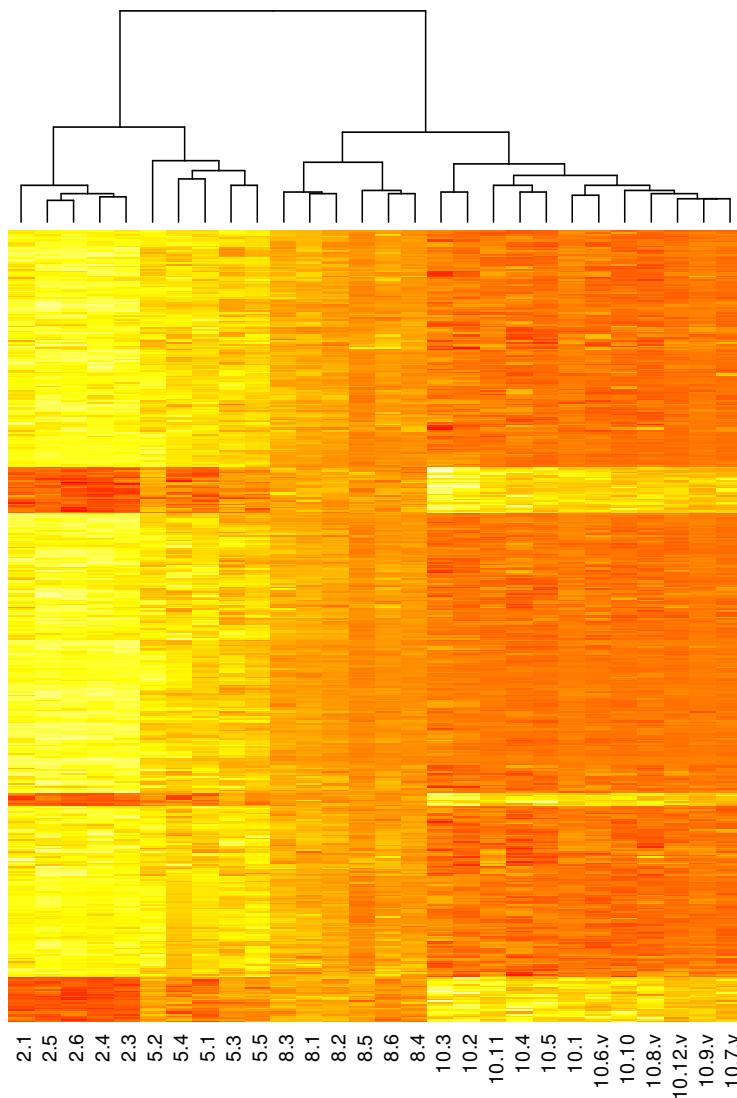


**Abbildung 3.13: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile verschiedener humaner Hodenbiopsien.** Die drei Hauptkomponenten wurden ausgehend von den differentiell exprimierten Genen mit Hilfe des Programms Genesis 1.7.0 berechnet und für die 28 Proben der CodeLink-Studie (A) bzw. für die 35 Proben der Affymetrix-Studie (B) dargestellt.

Anhand dieser verschiedenen Methoden des *Clusterings* konnte gezeigt werden, dass das Genexpressionsmuster der verschiedenen pathologischen Subgruppen im Wesentlichen mit der morphologischen Klassifizierung korrelierte. Die molekularen Kategorien entsprechen also den morphologischen Subtypen.

### 3.5.3 Clusteranalyse nach größter Varianz

Die Problematik der in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Vorgehensweise war, dass es sich nicht um ein *unsupervised Clustering* im strengen Sinne handelt, da zur Ausführung eines ANOVA-Tests zuvor die zu testenden Gruppen mit ihren jeweiligen Replikaten definiert werden mussten. Um zu zeigen, dass die in den Datensätzen vorhandene molekulare Struktur auch ohne diese Vorgabe mit der morphologischen Klassifizierung der Biopsieproben assoziiert ist, wurden am Beispiel der CodeLink-Daten die Gene herausgefiltert, die die größte Varianz über alle 28 Proben zeigten (Perou *et al.*, 2000). Dies erfolgte ausgehend von den 15.119 Transkripten über die Standardabweichung aller Proben vom Median. Für das *unsupervised Clustering* wurden die 400 Gene mit der größten Standardabweichung verwendet. Da diese Methode keine zuvor definierte Einteilung der Proben in Gruppen voraussetzt, konnte somit die Anzahl der vorhandenen Gruppen in dem gefilterten Datensatz ermittelt werden. In Abbildung 3.14 ist das Ergebnis der Clusteranalyse dargestellt, das eindeutig vier klar voneinander getrennte Cluster zeigt, bei denen es sich wieder um die verschiedenen morphologischen Score-Gruppen handelt. Ferner clustern alle 28 Proben in die vorklassifizierten Score-Gruppen.



**Abbildung 3.14:** *Unsupervised hierarchisches Clustering (average linkage und Manhattan Distanz) der Genexpressionsprofile der 28 humanen Testisproben, die mit der CodeLink-Plattform analysiert wurden.* Das Clustering wurde mittels der Statistiksoftware R und ausgehend von den 400 Genen erstellt, die die größte Streuung über alle Proben aufwiesen. Dabei nimmt die Expressionsstärke von gelb bis dunkel-orange zu. Score 10-Proben, die mit einem „v“ gekennzeichnet sind, wiesen eine obstruktive Azoospermie nach vorangegangener Vasektomie auf. Die anderen Score 10-Proben zeigten eine obstruktive Azoospermie aufgrund von Entzündung, Ductusaplasie oder idiopathischem Verschluss.

Dieses Ergebnis lieferte den Beweis dafür, dass die Varianz zwischen den Score-Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen, was auch für eine außerordentlich hohe Qualität und Homogenität bei der histologischen Klassifizierung der pathologischen Proben spricht. Würden sich Replikate einer Gruppe in ihrer Zellzusammensetzung deutlich unterscheiden, würde sich das im Expressionsprofil widerspiegeln. Somit handelt es sich bei den hier beobachteten molekularen Signaturen letztendlich um Johnsen Score-assoziierte Genexpressionsmuster. Es werden große Unterschiede der Transkriptmengen zwischen den morphologisch unterscheidbaren Gruppen, aber geringe, individuelle Unterschiede zwischen Patienten der gleichen Score-Gruppe beobachtet. Bezüglich der Affymetrix-Studie zeichnete sich ein ähnliches Ergebnis ab, wobei durch die annähernd dreifach erhöhte Zahl der Gene sowie die größere Zahl untersuchter Score-Gruppen eine größere Streuung hinsichtlich der Clusterbildung zu verzeichnen war, da auch individuelle Unterschiede zwischen den Patienten zu beobachten waren.

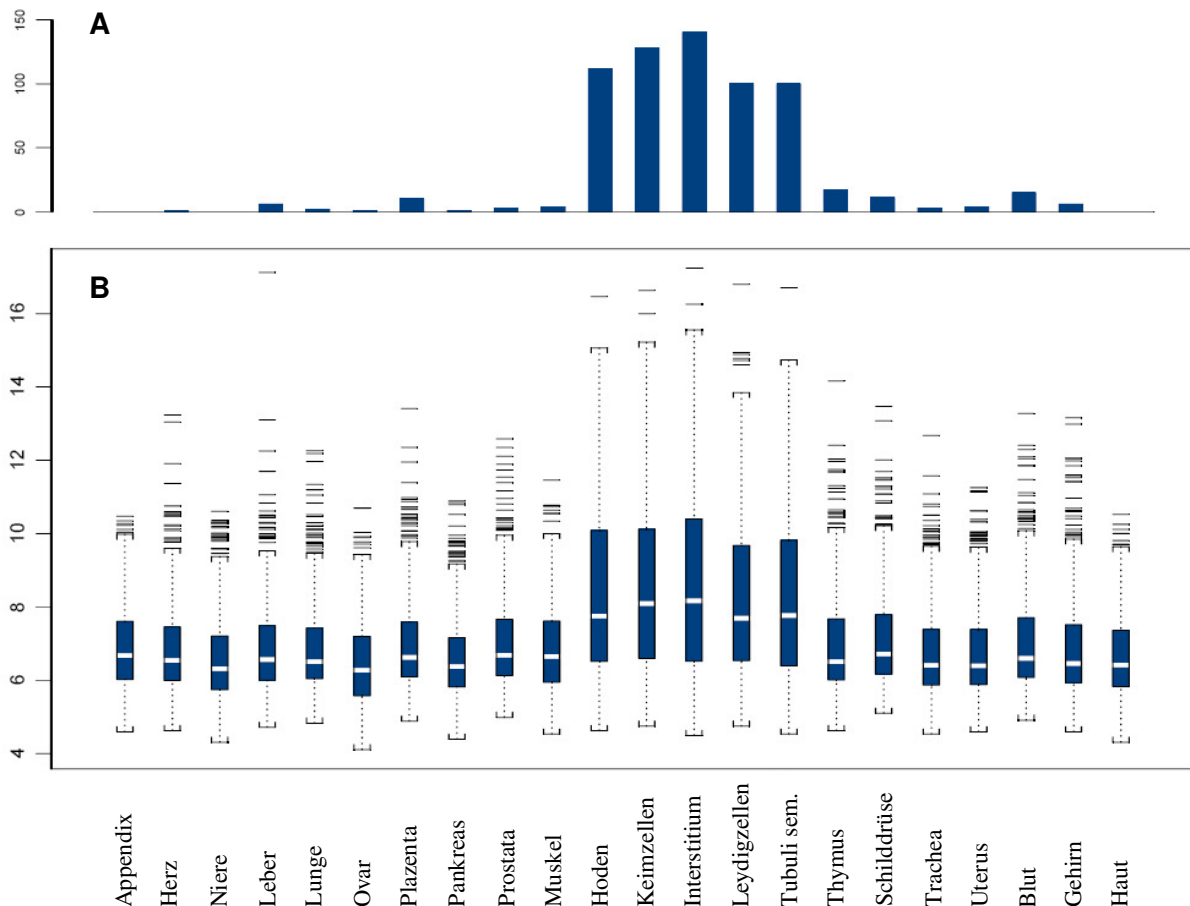


## **3.6 Die globale Erfassung der humanen Spermatogenese**

In Tiermodellen werden Keimzell- und Spermatogenesestadien-spezifische Expressionsprofile häufig durch Auftrennung der verschiedenen Zelltypen des Hodens erhalten (Schultz *et al.* 2003; Almstrup *et al.* 2004; Schlecht *et al.* 2004; Shima *et al.* 2004). Humanes Gewebematerial steht dagegen nur in geringen Mengen und oft in verminderter Qualität zur Verfügung. Deshalb ist eine solche Vorgehensweise für den humanen Hoden weniger geeignet. Aus diesem Grund wurde für die globale Erfassung der humanen Spermatogenese statt dessen eine indirekte Methode gewählt (vgl. Feig *et al.*, 2007). Den Gewebeproben verschiedener morphologischer Score-Gruppen fehlen im Vergleich zur intakten Spermatogenese im normalen Hoden ganz bestimmte Spermatogenesestadien. In direkter Beziehung damit sollten die entsprechenden Stadien-spezifischen Transkripte fehlen. Dieser Annahme liegt die Vermutung zugrunde, dass es sich bei den gefilterten, differentiell exprimierten Genen überwiegend um Keimzell-spezifische Gene handelt.

### **3.6.1 Gewebeverteilung der differentiell exprimierten Transkripte**

Um Informationen über die Gewebeverteilung der differentiellen Transkripte zu erhalten, wurden am Beispiel der CodeLink-Studie alle 1874 Transkripte mittels der GNF SymAtlas-Datenbank (Su *et al.*, 2004) untersucht. Diese Datenbank enthält gewebespezifische Genexpressionsprofile basierend auf umfassenden Mikroarray-Daten einer Vielzahl verschiedener Humangewebe. Das Ergebnis der Analyse ist als relative Anzahl der Gene, die eine maximale Expression in einem bestimmten Gewebe zeigen, dargestellt (Abbildung 3.15 A). Ferner wurde die Verteilung aller Expressionssignale über eine Vielzahl verschiedener humaner Gewebe bestimmt und in Form von Boxplots dargestellt (Abbildung 3.15 B). Es zeigte sich, dass ein sehr hoher Anteil der differentiell exprimierten Gene seine maximale Expression im Hoden hat. Ca. 80% dieser Transkripte sind somit Testis-spezifisch oder zumindest in diesem Gewebe hoch angereichert. Dieser Befund spricht dafür, dass es sich bei den gefilterten, differentiell exprimierten Genen überwiegend um Keimzell-spezifische Gene handelt oder zumindest um Gene, die sehr eng mit bestimmten Keimzellstadien verknüpft sind. Ein geringerer Anteil an Transkripten zeigt neben der Expression im Hoden ebenfalls eine Expression in anderen Geweben. Dabei dürfte es sich vor allem um Produkte der somatischen Zellanteile des Hodens handeln.



**Abbildung 3.15: Gewebeverteilung der mRNA Expression der 1874 differentiell exprimierten Gene gemäß der SymAtlas v1.1.1 Datenbank.** (A) Relative Anzahl an Genen, die eine maximale Expression in einem bestimmten Gewebe zeigen; (B) Verteilung aller Expressionssignale über eine Vielzahl verschiedener humaner Gewebe.

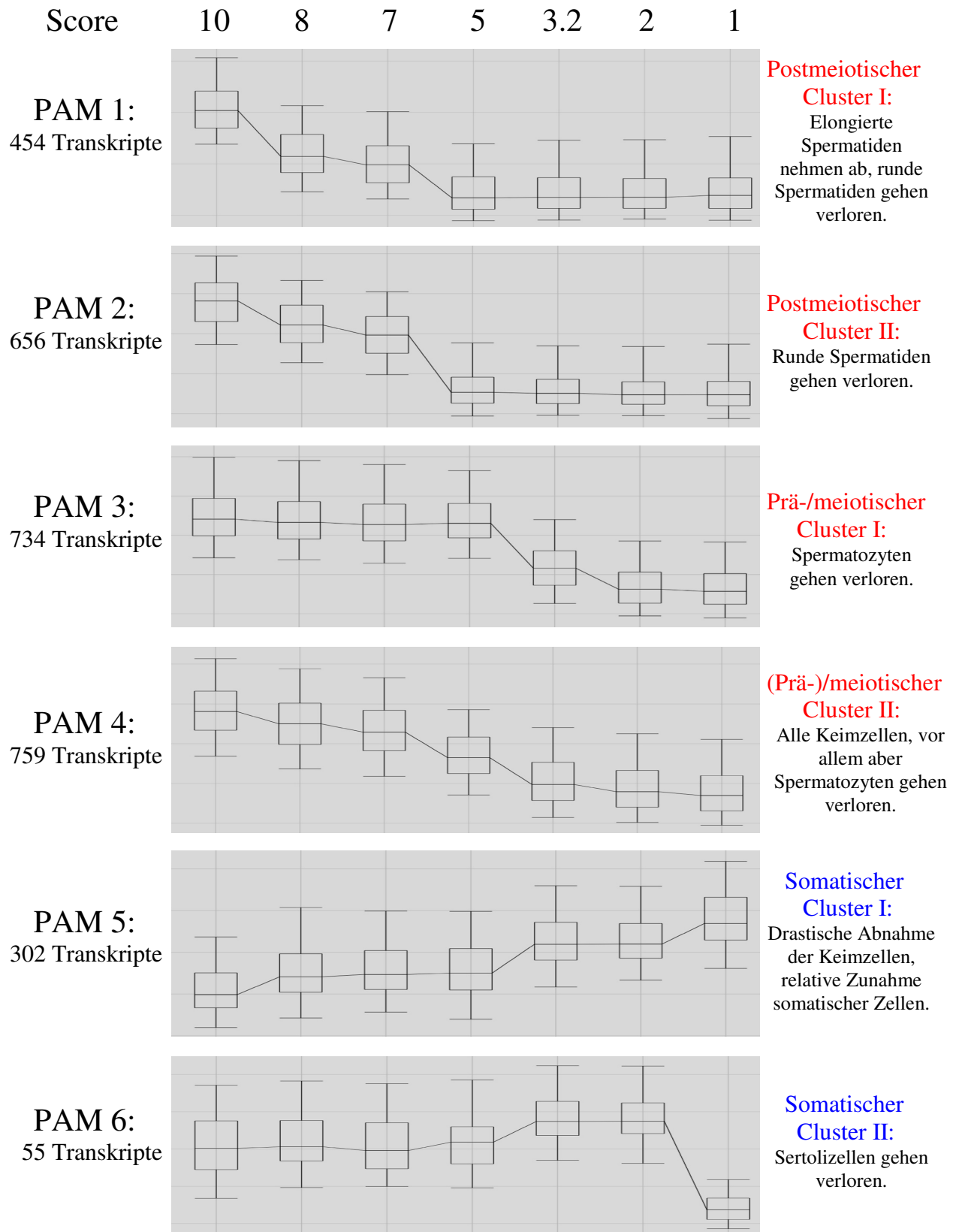
### 3.6.2 Clustering von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen

Des Weiteren wurden Subgruppen-spezifische Genexpressionsmuster entdeckt, die mit der An- bzw. Abwesenheit von bestimmten Keimzellstadien in den verschiedenen Hodenpathologien korrelierten. Die Bedeutung dieser Subgruppen lag in der Identifizierung Stadien- bzw. Zelltyp-spezifischer Transkripte, die den molekularen Verlauf der humanen Spermatogenese widerspiegeln. Ausgehend von den differentiell exprimierten Genen wurden die Gene dazu gemäß ihrer Transkriptionsprofile in verschiedene Gruppen eingeteilt. Gene, die ein ähnliches Expressionsprofil über alle Score-Gruppen aufwiesen, wurden dabei zu einer Gengruppe zusammengefasst.

Bei der Affymetrix-Studie erfolgte die Einteilung der 2960 differentiell exprimierten Transkripte in verschiedene Gruppen über den PAM-Algorithmus (Kaufmann und Rousseeuw, 1990). Als Ergebnis wurden sechs verschiedene PAM-Gruppen erhalten, die eindeutig unterschiedliche Expressionsprofile von Score 10 nach Score 1 aufwiesen

(Abbildung 3.16). Die ersten vier Profile zeigten dabei eine Abnahme der Transkriptlevel mit fortschreitender Degeneration der Spermatogenese bzw. abnehmendem Johnsen Score.

PAM-Gruppe 1 zeigt den größten Expressionsunterschied zwischen Biopsieproben mit intakter Spermatogenese (Score 10) sowie Hypospermatogenese (Score 8). PAM-Gruppe 2 enthält Transkripte, deren Mengen in Verbindung mit dem Verschwinden von Spermatisiden von Score 7 nach Score 5 am meisten abnehmen. PAM-Gruppe 3 zeichnet sich durch eine drastische Abnahme der Expressionslevel von Score 5- nach Score 3.2-Proben aus. Diesen drei Gengruppen ist gemeinsam, dass ihre Expressionsprofile durch das jeweilige Verschwinden von spezifischen Keimzellstadien charakterisiert sind. Sie spiegeln also verschiedene Stadien der humanen Keimzellentwicklung wider. PAM-Gruppe 4 ist durch variierende Expressionsmengen zwischen allen Score-Gruppen charakterisiert, die stetig von Score 10 bis Score 1 abnehmen. Zusammen mit PAM-Gruppe 3 enthält diese Gruppe die meisten Transkripte. Die letzten beiden Gengruppen zeigen gegenläufige Profile. PAM-Gruppe 5 zeigt insgesamt ein umgekehrtes Expressionsprofil. Es wird eine Zunahme der Transkriptmengen mit fortschreitender pathologischer Veränderung beobachtet. Diese Gruppe unterscheidet sich von den vorherigen vier Gengruppen dadurch, dass die zu beobachtenden Expressionsunterschiede umgekehrt mit dem Verlust von spezifischen Keimzellstadien korreliert sind. Die letzte und kleinste Gruppe (PAM 6) enthält dagegen Transkripte, deren Level zunächst steigen, die dann aber von Score 2 nach Score 1 drastisch abnehmen. Es handelt sich dabei also um Transkripte, deren Nachweis an das Vorhandensein von Sertolizellen in den Biopsien gebunden ist.



**Abbildung 3.16: PAM-Clustering der 2960 differentiell exprimierten Transkripte der Affymetrix-Studie.** Es wurden sechs verschiedene PAM-Gruppen erhalten, die eindeutig unterschiedliche Expressionsprofile von Score 10 nach Score 1 aufweisen. Die ersten vier Profile zeigen eine Abnahme der Transkriptlevel mit zunehmender pathologischer Veränderung, während PAM-Gruppe 5 ein umgekehrtes Expressionsprofil zeigt. PAM-Gruppe 6 zeichnet sich durch eine drastische Abnahme der Expression von Score 2 nach Score 1 aus.

Bei der CodeLink-Studie wurden zur Einteilung der Gene in Gruppen mit ähnlichem Profil multiple paarweise Vergleiche durchgeführt (Feig *et al.*, 2007). Die Analyse ergab fünf Gengruppen mit statistisch signifikant unterschiedlichen Expressionsprofilen, die im Wesentlichen den ersten fünf PAM-Clustern der Affymetrix-Studie entsprechen. Da für die CodeLink-Studie keine Score 1-Probe zur Verfügung stand, ergaben sich nur fünf Profile. Im Folgenden sind diese fünf Profile mit ihrer jeweiligen Anzahl an Genen aufgelistet:

Profil 1: Transkripte, deren Level von Proben mit intakter Spermatogenese nach Proben mit Hypospermatogenese abnehmen (38 Gene)

Profil 2: Transkripte, die bereits zusammen mit elongierten Spermatischen verschwinden (313 Gene)

Profil 3: Transkripte, deren Nachweis an das Vorhandensein von Keimzellen gebunden ist (731 Gene)

Profil 4: Transkripte, deren Mengen stetig von Score 10 nach Score 2 abnehmen (327 Gene)

Profil 5: Transkripte, deren Level mit fortschreitender Degeneration der Spermatogenese geringfügig, aber signifikant zunehmen (312 Gene)

Analog zur Affymetrix-Studie stellte Profil 3 mit 731 Genen die größte Gengruppe dar. Insgesamt zeigten 88 % (2603 Transkripte der Affymetrix-Studie) bzw. 83 % (1562 Transkripte der CodeLink-Studie) aller differentiell exprimierten Transkripte eine Abnahme ihrer Level in Verbindung mit einer fortschreitenden Degeneration der Spermatogenese.

### **3.6.3 Virtuelle, funktionelle Analysen der Affymetrix PAM-Cluster**

Die sechs Gengruppen aus der PAM-Analyse wurden in funktionelle Analysen eingesetzt, um Informationen von über- sowie unterrepräsentierten biologischen Prozessen und zellulären Kompartimenten in diesen Gruppen zu erhalten.

Wie bereits erwähnt, enthält der Affymetrix Array HG-U133Plus2.0 54.671 Probensätze, die einer gleichen Anzahl von Transkripten bzw. EST-Sequenzen entsprechen. Da bei diesem Array einige Gene durch mehrere Probensätze repräsentiert sind, korrespondiert die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte mit einer geringeren Anzahl an aktuellen Genen. Um für die verschiedenen PAM-Gruppen Über- und Unterrepräsentationsanalysen von GO-Begriffen mit Hilfe des Programms AMEN (Chalmel *et al.*, Manuskript eingereicht) durchführen zu können, wurden die *UniGene* IDs aus der *UniGene*-Datenbank verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). Jeder *UniGene*-Eintrag beinhaltet einen Satz von

Sequenzen, die dasselbe Gen repräsentieren und die zu einem nicht-redundanten Gen-orientierten Cluster zusammengefasst wurden. Jeder Cluster repräsentiert somit maximal ein menschliches Gen, viele Cluster bestehen aber auch nur aus einer oder wenigen EST-Sequenzen und sind noch undefiniert. Für die funktionellen Analysen mittels des Programms AMEN wurde der Sequenzcluster *UniGene Build 197* verwendet, welcher insgesamt 85.590 *UniGene* Cluster enthält. Die für die Herstellung der Cluster verwendeten annotierten Gene entstammen dabei der Sequenzdatenbank *GenBank* (Stand: 29.10.2006) und die EST-Sequenzen der *dbEST* Datenbank (Stand: 29.10.2006), eine redundante Datenbank, die alle beim NCBI, EBI und in Japan eingereichten cDNA-Sequenzen beinhaltet.

Für die einzelnen PAM-Gruppen wurde die Anzahl der Transkripte ermittelt, die im Sequenzcluster *UniGene Build 197* enthalten sind und denen folglich eine *UniGene* ID zugeordnet werden konnte. Dabei wurden Probensätze mit derselben *UniGene* ID zusammengefasst, um die Anzahl einmalig vorkommender *UniGene* IDs in den jeweiligen PAM-Gruppen zu ermitteln und somit die Redundanz zu entfernen. Mit Hilfe des Programms AMEN wurden ferner jene Transkripte ermittelt, die von bekannten Genen kodiert und annotiert sind, bzw. solche, die EST-Sequenzen repräsentieren und noch nicht definiert sind (Tabelle 3.6). Zusammenfassend entsprechen die 2960 differentiell exprimierten Probensätze 2242 *UniGene* Cluster, von denen 1266 annotiert sind. Somit ist für etwa 44 % der Transkripte bisher noch gar keine Funktion bekannt, wodurch die Vermutung bestätigt wird, dass gerade das Gewebs-spezifische Expressionsmuster des humanen Hodens durch zahlreiche bisher noch unbekannte Transkripte charakterisiert ist.

<b>PAM-Gruppe</b>	<b>Anzahl der Probensätze</b>	<b>Anzahl einmaliger <i>UniGene</i> IDs</b>	<b>annotierte Transkripte</b>	<b>nicht annotierte Transkripte</b>
1	454	380	164	216
2	656	514	224	290
3	734	577	392	185
4	759	610	285	325
5	302	232	169	63
6	55	46	32	14

**Tabelle 3.6: Anzahl der Probensätze sowie Anzahl der Transkripte mit einmalig vorkommenden *UniGene* IDs in den sechs PAM-Gruppen, von denen einige annotiert bzw. noch nicht annotiert sind.**

Ausgehend von den annotierten Transkripten wurden virtuell anhand der *Gene Ontology* (GO) die biologischen Prozesse ermittelt, die in den verschiedenen PAM-Gruppen überrepräsentiert sind. Bei der Berechnung der zu erwartenden Anzahl von Genen (rExp) eines PAM-Clusters, die einem bestimmten GO-Begriff zugeordnet werden konnte, wurde ein stringenter p-Wert

von 0,001 mit einer FDR gewählt, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. War nun der tatsächlich ermittelte Wert  $r$  größer als der zu erwartende Wert  $r_{Exp}$ , so war der GO-Begriff in der untersuchten PAM-Gruppe überrepräsentiert (Abbildung 3.17).

In den ersten vier PAM-Gruppen waren Transkripte enthalten, die in Prozessen wie Reproduktion, Gametogenese und Spermatogenese deutlich überrepräsentiert sind. Sie enthielten zahlreiche aus der Literatur bekannte Keimzell-spezifische Gene. Ein wesentlicher Unterschied zu den übrigen PAM-Clustern war, dass die Expressionsunterschiede viel drastischere Werte annehmen. Zum Beispiel ist das Transitionsprotein1 (TNP1, Steger *et al.*, 1998) in Score 10-Proben gegenüber Score 2-Proben 300-fach stärker exprimiert. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass diese Transkripte in bestimmten Stadien der Spermatogenese eine essentielle Rolle spielen.

In PAM-Gruppe 2 sind unter anderem biologische Prozesse wie Zelldifferenzierung, Spermatidenentwicklung und -differenzierung überrepräsentiert. Diese Gruppe enthält überwiegend postmeiotisch exprimierte Gene, die in Verbindung mit der Anwesenheit von runden haploiden Spermatiden ab Score 7-Proben transkribiert werden. Darunter fallen unter anderem das TNP1 sowie die Protamine (PRM1 und 2), die bei der Kondensation des Zellkerns während der Spermiogenese eine essentielle Rolle spielen. Weiterhin enthält PAM-Gruppe 2 Gene wie ODF1 (*outer dense fiber of sperm tails*, Petersen *et al.*, 1999) und ODF4 (Kitamura *et al.*, 2003), die Strukturproteine des Spermienflagellums kodieren sowie solche, die für die Spermienmotilität (AKAP3 und AKAP4 (*A-kinase anchoring proteins*), Turner *et al.*, 1998; Vijayaraghavan *et al.*, 1999) von Bedeutung sind.

Im Wesentlichen sind die 164 annotierten Transkripte der PAM-Gruppe 1 ebenfalls mit diesen biologischen Prozessen assoziiert, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Zusätzlich enthält diese Gruppe jedoch auch Gene wie CRISP1 (*cysteine-rich secretory protein*, Krätzschmar *et al.*, 1996), CST8 (*cystatin-related epididymal specific*, Syntin und Cornwall, 1999) und SPAM1 (*sperm adhesion molecule*, Evans *et al.*, 2003), die bei der Fusion von akrosomreagierten Spermien mit der Eizelle beteiligt sind. Beispielsweise kodiert das Gen SPAM1 eine GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerte Hyaluronidase, die an die innere Akrosomenmembran gebunden ist und sich nach erfolgter Akrosomreaktion auf der Spermienoberfläche befindet. Die Hyaluronidase ermöglicht dem Spermium unter anderem das Durchdringen der die Oozyte umgebenden Cumuluszellschicht.

	unter			über						
					PAM 1	PAM 2	PAM 3	PAM 4	PAM 5	PAM 6
327 Reproduktion					19 (4)	43 (6)	54 (10)	21 (7)	4 (4)	0 (1)
208 Gametogenese					11 (3)	37 (4)	47 (6)	17 (5)	2 (3)	0 (1)
173 Spermatogenese					11 (2)	36 (3)	44 (5)	17 (4)	0 (2)	0 (0)
9 Fusion Spermium mit Eizelle					4 (0)	2 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
132 Zellentwicklung					4 (2)	13 (2)	7 (4)	3 (3)	1 (2)	2 (0)
570 Zelldifferenzierung					14 (7)	29 (10)	28 (17)	16 (13)	8 (8)	3 (1)
19 Spermatidenentwicklung					2 (0)	9 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)
20 Spermatidendifferenzierung					2 (0)	9 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)
11 Spermienmotilität					1 (0)	6 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
431 Zytoskelett Org. und Biog.					7 (6)	13 (8)	34 (13)	13 (10)	4 (6)	1 (1)
784 Zellzyklus					5 (10)	10 (14)	81 (24)	23 (17)	6 (10)	0 (2)
190 Zellteilung					2 (2)	4 (3)	43 (6)	9 (4)	0 (3)	0 (1)
227 Mitose					2 (3)	4 (4)	44 (7)	12 (5)	0 (3)	0 (1)
64 Interphase der Mitose					1 (1)	0 (1)	13 (2)	4 (1)	0 (1)	0 (0)
23 Cytokinese					0 (0)	1 (0)	6 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
55 Meiose					1 (1)	1 (1)	19 (2)	1 (1)	0 (1)	0 (0)
24 Meiose I					0 (0)	0 (0)	9 (1)	0 (1)	0 (0)	0 (0)
85 DNA-Rekombination					0 (1)	2 (2)	12 (3)	3 (2)	0 (1)	0 (0)
478 Ubiquitin-Zyklus					8 (6)	9 (8)	19 (15)	26 (11)	2 (6)	0 (1)
42 Komplementaktivierung					0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	8 (1)	0 (0)
919 Immunantwort					5 (12)	6 (16)	23 (28)	4 (20)	31 (12)	2 (2)
80 Innate Immunantwort					0 (1)	0 (1)	0 (2)	0 (2)	8 (1)	0 (0)
21 Antigenpräsentation					0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	4 (0)	0 (0)
1036 Abwehrantwort					5 (13)	6 (18)	24 (32)	4 (23)	33 (14)	4 (3)
683 Zelladhäsion					7 (9)	13 (12)	2 (21)	7 (15)	22 (9)	7 (2)

**Abbildung 3.17: Überrepräsentationsanalyse von GO-Kategorien für die verschiedenen PAM-Gruppen 1-6.** Die Analyse wurde mittels des Programms AMEN und ausgehend von den in Tabelle 3.6 aufgeführten annotierten Transkripten durchgeführt. Links ist die mit dem jeweiligen biologischen Prozess assoziierte Anzahl der Transkripte im Genom (n) dargestellt. Überrepräsentierte biologische Prozesse sind in rot dargestellt, wobei die erste Zahl (r) die tatsächliche und die zweite Zahl die erwartende Anzahl von Transkripten (rExp) angibt, die einer PAM-Gruppe einem bestimmten GO-Begriff zugeordnet werden konnte. Für die Stringenz der Analyse wurde  $p = 0,001$  und  $n = 5$  gewählt.

Die 392 annotierten Transkripte der PAM-Gruppe 3 sind einerseits solche, die bereits in sich mitotisch teilenden Spermatogonien exprimiert werden und somit bereits in Score 3-Proben nachgewiesen werden können (Abbildung 3.17: Mitose als überrepräsentierter biologischer Prozess). Bekannte molekulare Marker für Spermatogonien bzw. für spermatogoniale Stammzellen stellen unter anderem zwei RNA-Bindungsproteine des Y-Chromosoms dar, *Dazl* (*deleted in azoospermia-like*) und *RBM Y* (*RNA binding motif protein, Y-linked*). Ein weiterer Marker ist das *PIWIL2* (Nayernia *et al.*, 2006). Andererseits enthält diese Gruppe ebenfalls Transkripte, die erst mit Beginn der Meiose exprimiert werden. Darunter sind zum Beispiel Gene, die an der Ausbildung des Synaptonemalen Komplexes während der Prophase der Meiose beteiligt sind (*SYCP1*, 2 und 3) oder eine Rolle bei der DNA-Reparatur während



der homologen Rekombination spielen (RAD54L, Kanaar *et al.*, 1996). Letztere werden zuerst in Spermatozyten transkribiert und können somit in Score 3-Proben noch nicht nachgewiesen werden. Ferner enthält dieser Cluster Gene, die wichtige Enzyme des Spermien-Energiestoffwechsels kodieren, Laktatdehydrogenase C (LDHC) und Phosphoglyceratkinase2 (PGK2). Von ihnen ist bekannt, dass sie während der Meiose transkribiert werden (Li, 1990; McCarrey *et al.*, 1996). Der Testis-spezifische Transkriptionsfaktor CREM $\tau$ , ein Aktivator der postmeiotischen Genexpression, kann erstmals in Pachytän-Spermatozyten nachgewiesen werden (Steger *et al.*, 1999) und ist ebenfalls Bestandteil dieser PAM-Gruppe. Sein Koaktivator ACT (*activator of CREM in testis*) wird spezifisch in haploiden runden und elongierenden Spermatiden exprimiert und ist dementsprechend in PAM-Gruppe 2 enthalten.

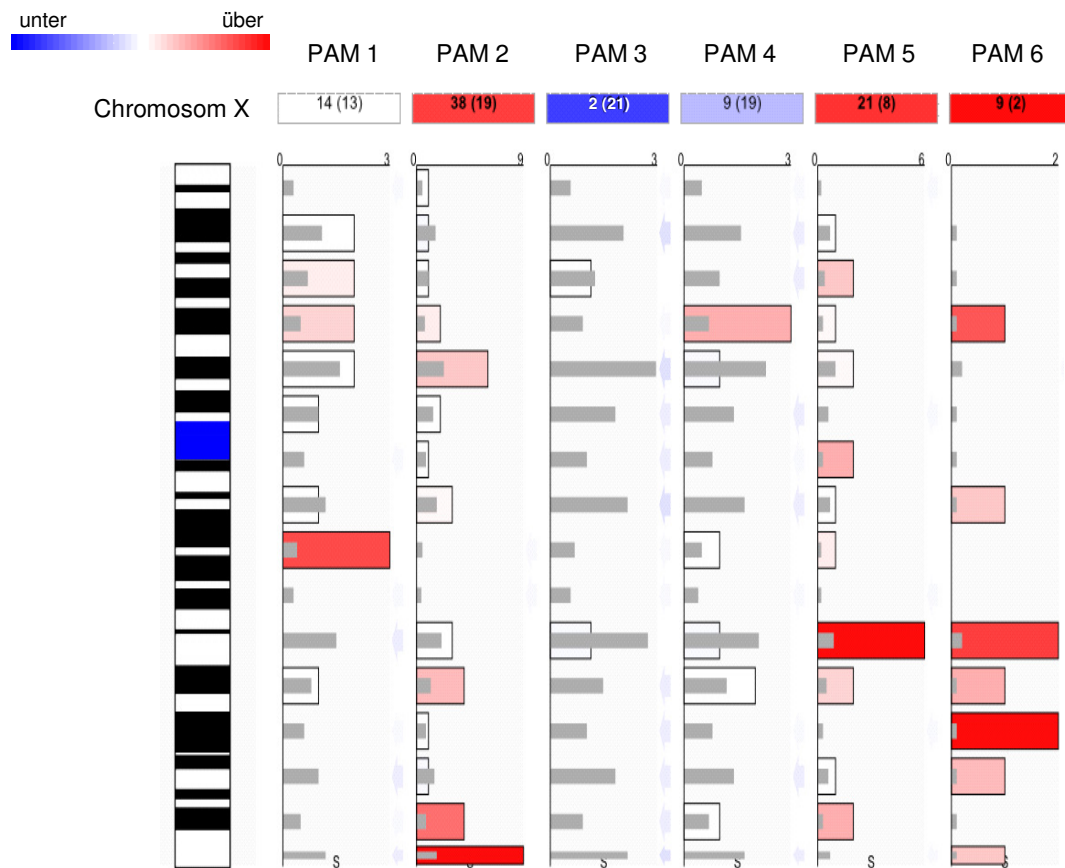
Mit Ausnahme der Ubiquitin-abhängigen Degradation von Proteinen sind mit dem Profil der PAM-Gruppe 4 keine weiteren charakteristischen, überrepräsentierten biologischen Prozesse assoziiert. Die in diesem Cluster vorhandenen fünf Ring-Finger Proteine (RNF6, RKHD2, RNF38, RKHD3 und RNF190) besitzen Ubiquitin-Ligase Aktivität und sind an der des proteasomalen Abbaus von Proteinen beteiligt. Des Weiteren sind vier Transkripte enthalten (FBXL13, FBXO31, FBXO25, FBXO36), die F-Box Proteine kodieren, die Bestandteil bestimmter Ubiquitin-Ligasen sind. Ansonsten wurde vielmehr eine Überschneidung mit den Expressionsprofilen der PAM-Gruppen 1-3 beobachtet.

Eine interessante Beobachtung ist, dass die Transkription von CATSPER1 (*cation channel of sperm*, PAM-Cluster 1) und CATSPER2 (PAM-Cluster 4), die Untereinheiten des gleichen Ca<sup>2+</sup>-Kanals ausbilden könnten, der für die Spermien-Motilität eine wichtige Rolle spielt, (Quill *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006), nicht zum gleichen Zeitpunkt während der Spermatogenese initiiert wird. CATSPER2 würde demnach bereits in Spermatozyten, CATSPER1 dagegen erst in elongierenden Spermatiden exprimiert.

PAM-Gruppe 6 enthält 32 annotierte Transkripte, deren Protein-Produkte eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielen. Bei diesen Transkripten handelt es sich vermutlich um Sertolizell-spezifische Transkripte, da ihre Mengen mit dem Verschwinden von Sertolizellen von Score 2 nach Score 1 drastisch abnehmen. Da Sertolizellen untereinander und mit den Keimzellen über Zell-Zell-Kontakte miteinander in Verbindung stehen, ist es nicht verwunderlich, dass Transkripte, die Zelladhäsionsproteine kodieren, in dieser Gruppe überrepräsentiert sind. Generell bestand aber die Schwierigkeit bei der funktionellen Analyse darin, dass man bei einer derart kleinen Gruppe von Genen meist keine signifikanten Ergebnisse erhielt.

Die mit den 169 Transkripten der PAM-Gruppe 5 assoziierten biologischen Prozesse unterscheiden sich von allen anderen Gruppen. Die überrepräsentierten Vorgänge wie die Komplementaktivierung, Immunantwort sowie innate Abwehr sind nicht für die Keimzellentwicklung charakteristisch, sondern stellen somatische Funktionen des Hodens dar. Weiterhin ist PAM-Gruppe 5 die einzige Gruppe, in der die extrazelluläre Matrix als zelluläres Kompartiment deutlich überrepräsentiert ist (Abbildung nicht dargestellt). Aus diesen und weiteren Beobachtungen kann vermutet werden, dass diese Transkripte eventuell bei der Entstehung der untersuchten Hodenpathologien eine Rolle spielen könnten. Sie werden deshalb im Abschnitt 3.7.2 näher betrachtet (siehe unten).

Weiterhin konnten über chromosomale Über- bzw. Unterrepräsentationsanalysen meiotisch induzierte Gene identifiziert werden, da in männlichen Keimzellen das X-Chromosom während der Meiose inaktiviert wird. Dies erfolgte wiederum mit Hilfe des Programms AMEN, wobei für die Bestimmung der Anreicherung bzw. Verarmung der Gene auf bestimmten Chromosomen ein stringenter p-Wert von 0,001 mit einer FDR gewählt wurde. Tatsächlich wurde auf diese Weise nur das X-Chromosom als Ergebnis erhalten. Die folgende Abbildung 3.18 repräsentiert die Anreicherung bzw. Verarmung der Gene aus jeder PAM-Gruppe auf dem X-Chromosom. Es zeigte sich, dass Gene der PAM-Gruppen 2, 5 und 6 deutlich auf dem X-Chromosom überrepräsentiert sind, während Gene vor allem der PAM-Gruppe 3, aber auch der PAM-Gruppe 4 unterrepräsentiert sind. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die PAM-Gruppen 3 und 4 überwiegend Gene enthalten, die während der Meiose transkribiert werden, dem Zeitraum also, in dem das X-Chromosom inaktiviert wird. Die X-chromosomale Inaktivierung können die Keimzellen durch die Expression eines autosomal lokalisierten Genhomologs wie zum Beispiel im Falle der Pyruvat-Dehydrogenase2 (PDHA2, Fitzgerald *et al.*, 1992) oder der Phosphoglyceratkinase2 (PGK2) kompensieren. Das Gen PDHA2 ist in PAM-Cluster 4, das Gen PGK2 in PAM-Cluster 3 enthalten.



**Abbildung 3.18: Anreicherung bzw. Verarmung von Genen aus den PAM-Gruppen auf dem X-Chromosom.** Die Analyse wurde mittels des Programms AMEN und ausgehend von den in Tabelle 3.6 aufgeführten annotierten Transkripten durchgeführt. PAM-Gruppen, die auf dem X-Chromosom überrepräsentiert sind, sind in rot, solche, die unterrepräsentiert sind, sind in blau dargestellt. Die erste Zahl ( $r$ ) gibt dabei die tatsächliche und die zweite Zahl die erwartete Anzahl von Genen ( $rExp$ ) an, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Für die Stringenz der Analyse wurde  $p = 0,001$  und  $n = 5$  gewählt.

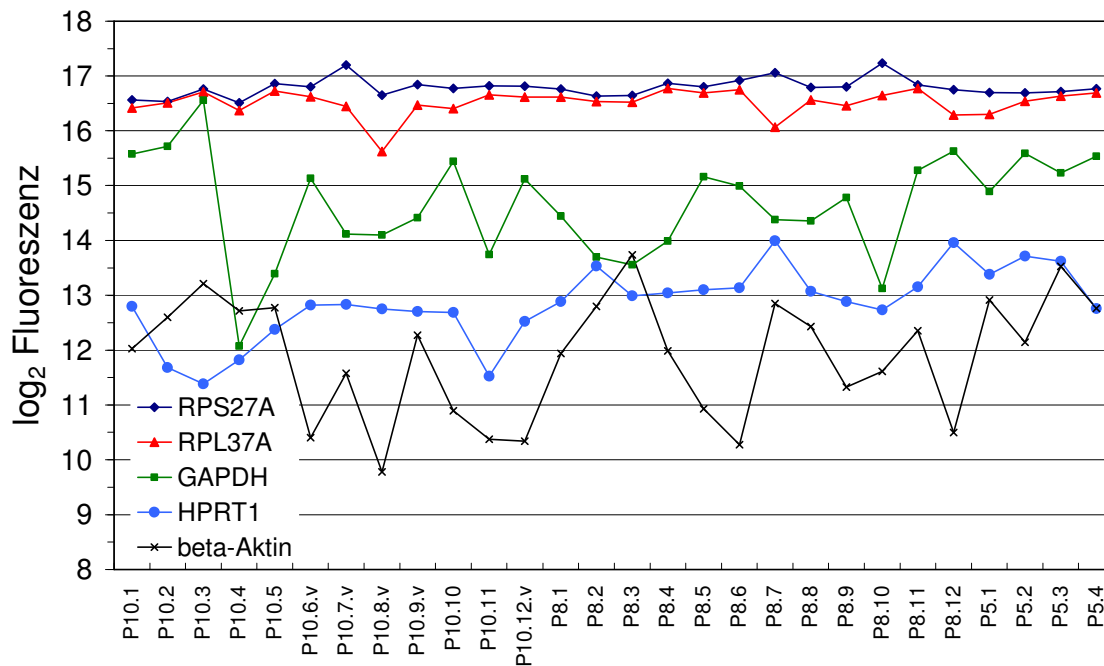
### 3.6.4 Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit Hilfe der real-time RT-PCR

Die Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit einer weiteren unabhängigen Methode erfolgte mittels quantitativer real-time PCR. Bei der effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung ausgewählter Transkripte (Pfaffl, 2001) aus den in Abschnitt 3.6.2 dargestellten Gengruppen muss zunächst ihre Expression mit der eines nicht regulierten *Housekeeping*-Gens normalisiert werden, bevor Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Score-Gruppen ermittelt werden können (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000).

### 3.6.4.1 Auswahl geeigneter Referenzgene

In der Literatur werden *Housekeeping*-Gene als solche Gene definiert, die in jeder Zelle auf relativ konstantem Niveau exprimiert werden, da sie für grundlegende Stoffwechselprozesse jeder Zelle und damit zur Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig sind (Thellin *et al.*, 1999). Da verschiedene Studien jedoch gezeigt haben, dass *Housekeeping*-Gene unter bestimmten Bedingungen durchaus aktiv reguliert sein können und ihre Expression in unterschiedlichen Zelltypen bzw. Geweben variieren kann (Giulietti *et al.*, 2001), wurde anhand der Mikroarray-Ergebnisse zunächst ein geeignetes Referenzgen für das Testisgewebe gesucht. Von entscheidender Bedeutung war dabei, dass das Referenzgen unter den angewandten experimentellen Bedingungen sowie in allen Proben der verschiedenen Score-Gruppen homogen exprimiert war. Es wurden die Expressionsprofile von drei in der Literatur geläufigen Referenzgenen untersucht: GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Enzym aus dem Glucose-Stoffwechsel,  $\beta$ -Aktin, ein Bestandteil des Zytoskeletts sowie HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase), ein Enzym des Purin-Synthese-Wegs. Des Weiteren wurde die Expression von zwei ribosomalen Transkripten, RPS27A aus der kleinen 40S Untereinheit und RPL37A aus der großen 60S Untereinheit des Ribosoms untersucht. In der folgenden Abbildung 3.19 sind die Expressionsprofile dieser fünf Gene für alle 28 Proben der CodeLink-Studie dargestellt. Es ist offensichtlich, dass die Expression von GAPDH und  $\beta$ -Aktin innerhalb der individuellen Patientenproben großen Schwankungen unterliegt, die unabhängig von der Score-Gruppe sind. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer von Neuvians *et al.* (2005) durchgeführten Studie, in der die beiden Gene in normalen Hodengewebe-Proben als auch in Seminom-Proben unterschiedlich stark exprimiert waren. Die Expression von HPRT1 zeigt innerhalb der 28 Proben zwar geringere Schwankungen, ist aber im Unterschied zu der Expression der Transkripte RPS27A und RPS37A bei weitem nicht so homogen. Ein weiteres Kennzeichen der ribosomalen Transkripte ist, dass sie im Testisgewebe hoch exprimiert sind (Abbildung 3.19).

Das Referenzgen sollte wenn möglich nicht nur homogen, sondern auch in ähnlicher Menge wie die zu untersuchenden Zielgene exprimiert sein. Dies war in diesem Fall schwer zu bewerkstelligen, da verschieden stark exprimierte Transkripte validiert wurden (siehe 3.6.4.2) und es nicht möglich war, für jedes zu untersuchende Transkript ein individuelles Referenzgen zu verwenden. Hinsichtlich der 35 Biopsieproben der Affymetrix-Studie zeichnete sich das gleiche Ergebnis ab. Die ribosomalen Proteine waren in allen Proben gleich stark exprimiert. Somit wurde in der real-time RT-PCR das Gen RPS27A als Referenzgen zur Normalisierung der Expressionsergebnisse eingesetzt.



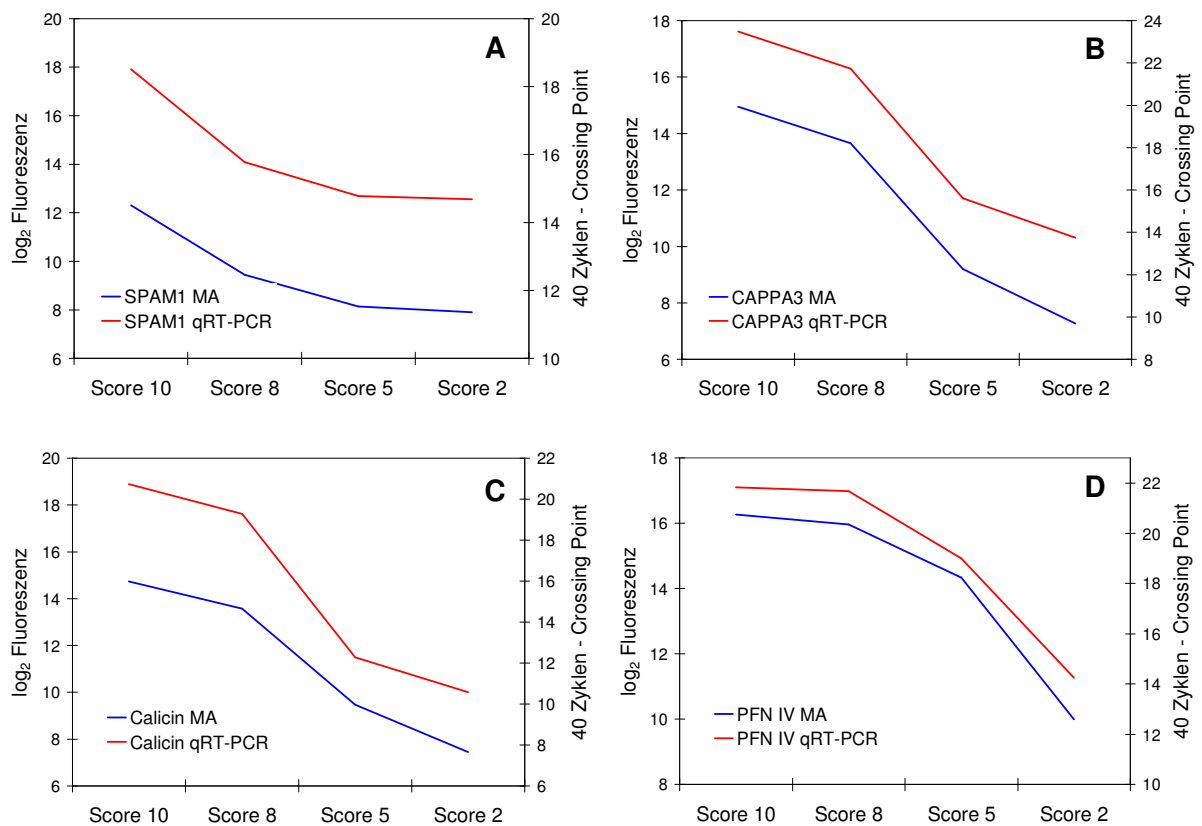
**Abbildung 3.19: Expressionsprofile von fünf verschiedenen Genen, die mögliche Kandidaten für Referenzgene in der real-time RT-PCR darstellen.** Die Profile wurden aus den Mikroarray-Ergebnissen der CodeLink-Studie erhalten und über alle insgesamt 28 Proben dargestellt

### 3.6.4.2 RT-PCR-Profile ausgewählter Gene

Die real-time RT-PCR erfolgte für 15 ausgewählte Transkripte der oben beschriebenen Gengruppen 1-3 der CodeLink-Studie. Dabei wurden genau diejenigen Patientenproben verwendet, die bereits in der Mikroarray-Analyse mit dem CodeLink-System eingesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der REST-Software (Pfaffl, 2002). Über den CP-Wert wurde die relative Transkriptmenge in den Proben ermittelt. Je höher dieser Wert war, desto geringer war das Gen in der Probe exprimiert. Zur grafischen Darstellung wurde der CP-Wert für jede Probe von der Gesamtzahl der Zyklen pro PCR (40 Zyklen) abgezogen, so dass sich die Zyklenzahl auf der linken Ordinate in Abbildung 3.20 proportional zur Transkriptmenge verhält.

In Abbildung 3.20 A-D sind die RT-PCR-Expressionsprofile (rote Linie) von vier ausgewählten Genen im Vergleich mit den Ergebnissen aus der CodeLink-Studie (blaue Linie) dargestellt. Die Expressionsprofile zeigten in allen Fällen eine sehr gute Übereinstimmung mit beiden unabhängigen Techniken. Der Expressionsverlauf des SPAM1-Gens (Abbildung 3.20 A) bestätigt seine bereits in Abschnitt 3.6.3 näher erläuterte Funktion als relevantes Produkt für die Befruchtung. Die Gene CAPP3 (Abbildung 3.20 B) und Calicin (Abbildung 3.20 C) kodieren Testis-spezifische Proteine, die bei der Bildung der Zytoskelettstruktur von Spermien eine essentielle Rolle spielen (Hess *et al.*, 1993; Miyagawa *et al.*, 2002). Calicin ist ein basisches Strukturprotein der perinukleären Kalyxstruktur der

Spermienköpfe, während CAPP3 eine  $\alpha$ -Untereinheit F-Aktin-bindender *Capping*-Proteine ist, die bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts eine Rolle spielen. Bei diesen Genen handelt es sich um solche aus der Gengruppe 2, die postmeiotisch exprimiert werden und deren Nachweis an das Vorhandensein haploider Keimzellen gebunden ist. Profilin IV (PFN IV), das zur Familie kleiner Aktin-bindender Proteine gehört, scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung des Akrosoms zu spielen (Obermann *et al.*, 2005). Während die genaue Funktion des Proteins in der Spermio-genese bisher noch unbekannt ist, zeigt der Verlauf der Transkriptmengen in Abbildung 3.20 D, dass die mRNA bereits in Spermatozyten bis hin zu runden Spermiden exprimiert wird. Es handelt sich somit um ein Gen der Gengruppe 3, die prä- bzw. meiotisch exprimierte Transkripte enthält.



**Abbildung 3.20: Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels real-time RT-PCR.** Die RT-PCR wurde mit den gleichen 28 Proben durchgeführt, die in der Mikroarray-Analyse mit dem CodeLink-System eingesetzt wurden. Es sind die Expressionsprofile von vier ausgewählten Genen dargestellt, die aus den Mikroarray- (blaue Linie) und den real-time RT-PCR-Daten (rote Linie) erhalten wurden. Das entspricht den Expressionsprofilen von einem bzw. zwei Genen der Gengruppe 1 (A), der Gengruppe 2 (B und C) sowie der Gengruppe 3 (D).

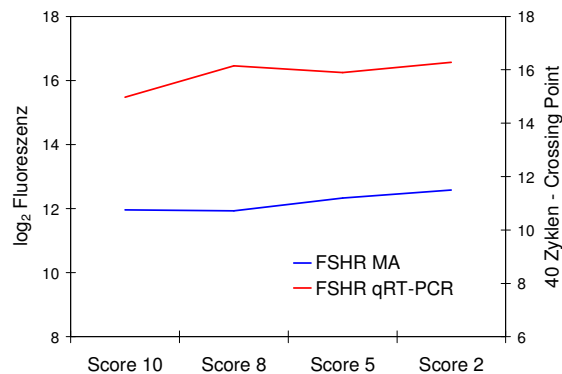
### 3.7 Expressionsprofile somatisch exprimierter Gene

In einer Untersuchung von Gesamt-Gewebefragmenten mit unterschiedlichen zellulären Anteilen sind nur indirekte Rückschlüsse auf die jeweilige Herkunft der Transkripte möglich. Es leuchtet ein, dass das Verschwinden bestimmter Spermatogenesestadien zu einer Abnahme Stadien-spezifischer Keimzelltranskripte führt. Umgekehrt ist eine Zunahme von bestimmten Transkripten, die mit dem Verschwinden von Keimzellen einhergeht, ein Indiz für ihre somatische Herkunft. Die Ursachen für eine Zunahme somatischer Transkripte sind vielfältig. Zunächst einmal gibt es einen allgemeinen Einfluss der Verschiebung zellulärer Bestandteile, den es zu erfassen gilt. Zum anderen können bestimmte Zelltypen im Verlauf einer Erkrankung in den Hoden einwandern wie beispielsweise Immunzellen (Jezek *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000). Schließlich kann eine Erkrankung auch zur krankhaften Überexpression bestimmter Gene führen. Diese Einflüsse werden im Folgenden näher beleuchtet.

#### 3.7.1 Verschiedene Anteile somatischer Zelltypen und Transkripte in unterschiedlichen Testispathologien

Die Expressionslevel der meisten im Hodengewebe detektierten Gene änderten sich durch die Abwesenheit von spezifischen Keimzelltypen in den verschiedenen pathologischen Biopsieproben nicht. Dies trifft nicht nur auf *Housekeeping*-Gene zu, die in allen Zelltypen des Hodens vorkommen, sondern betrifft auch einige Gene, die spezifisch in verschiedenen somatischen Zelltypen des Hodens exprimiert sind. Beispiele für Gene, von denen bekannt ist, dass sie spezifisch in Sertolizellen transkribiert werden, sind der FSH-Rezeptor, der an der Oberfläche der Sertolizellen, nicht aber der Keimzellen lokalisiert ist, die Testis-spezifische Kinase TESK2 (*testis-specific kinase*, Toshima *et al.*, 2001) sowie der Transkriptionsfaktor GATA6 (Ketola *et al.*, 1999). Ihre Transkriptmengen waren in allen Proben der verschiedenen Score-Gruppen nahezu gleich. Die Expressionslevel des Androgenrezeptor-Gens, das in verschiedenen somatischen Zelltypen wie Sertolizellen, peritubulären Myoidzellen und Leydigzellen des Hodens exprimiert wird, waren ebenfalls nahezu konstant. Wie Abbildung 3.21 am Beispiel des FSH-Rezeptors zeigt, wird eine leichte relative Erhöhung lediglich in Proben mit SCO-Symptomatik beobachtet, die sich eindeutig durch das Fehlen von Keimzell-Transkripten in diesen Gesamt-RNAs erklären lässt. Da die PAM-Gruppe 6 (vgl. Abbildung 3.16) Transkripte enthält, deren Level mit dem Verlust der Sertolizellen von Score 2 nach Score 1 drastisch abnehmen, sollte es sich bei diesen unter anderem um Sertolizell-spezifische

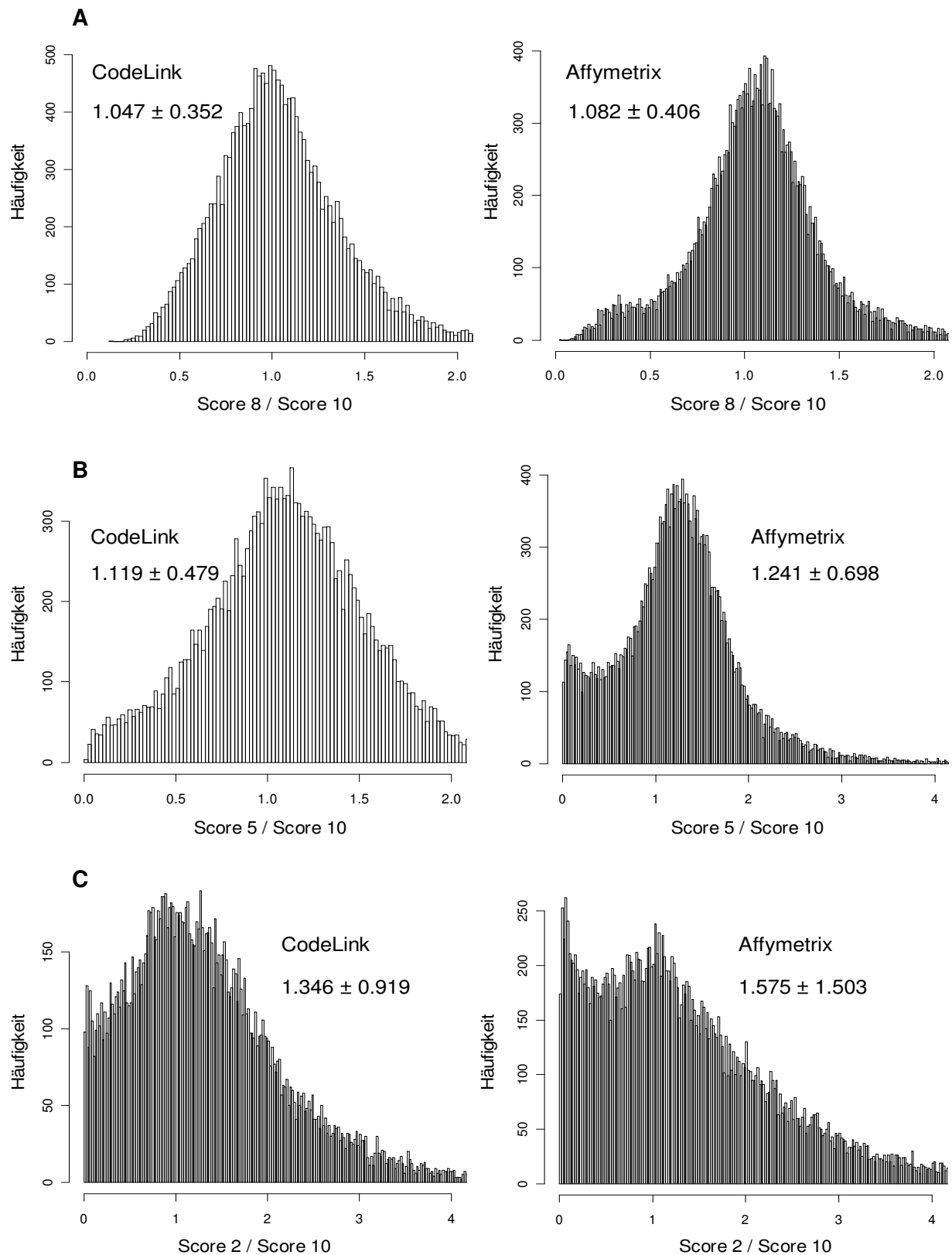
Transkripte handeln. Beispielsweise war das GATA6-Gen in dieser Gengruppe enthalten und zeigte den gleichen Verlauf wie der FSH-Rezeptor.



**Abbildung 3.21: Expressionsprofile des FSH-Rezeptor-Gens, die aus den Mikroarray-Ergebnissen der CodeLink-Studie (blaue Linie) und den real-time RT-PCR-Daten (rote Linie) erhalten wurden.** Die RT-PCR wurde mit den gleichen 28 Proben durchgeführt, die in der Mikroarray-Analyse mit dem CodeLink-System eingesetzt wurden.

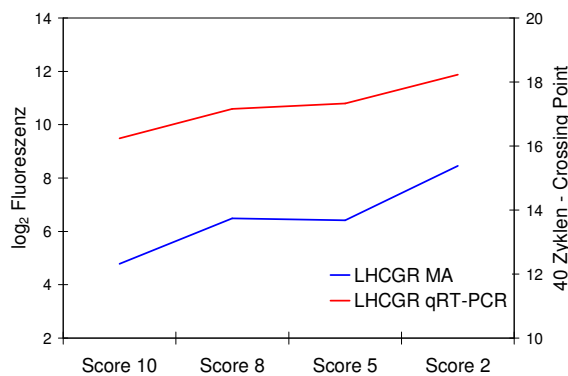
Die leichte relative Zunahme dieser Sertolizell-Transkripte lässt sich durch eine relative Verschiebung der Zellanteile in Proben mit SCO-Symptomatik erklären, die als Folge des Verlustes der Keimzellen auftritt. Um diesen „Verdünnungseffekt“ quantitativ zu bestimmen, wurden für beide Mikroarray-Plattformen die Verhältnisse aller logarithmierten und normalisierten Fluoreszenzintensitäten zwischen den verschiedenen morphologischen Gruppen gebildet. Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis in Form von Histogrammen, wobei jeweils das mittlere Verhältnis aller Expressionssignale zwischen den Proben mit verschiedenen Spermatogenesestörungen gegenüber den Proben mit intakter Spermatogenese herausgehoben ist. Es zeigte sich, dass das mittlere Verhältnis aller Expressionssignale zwischen Score 8- und Score 10-Proben annähernd eins ist. Dies bestätigt, dass eine Verschiebung zellulärer Anteile in diesen Proben vernachlässigbar klein ist. Im Unterschied dazu liegen die mittleren Expressionsunterschiede der anderen Score-Gruppen in einem Bereich zwischen 1,1 und 1,5. Dies zeigt, dass sich vor allem in Biopsieproben der Score 2-Gruppe die zellulären Anteile im Vergleich zu Proben mit intakter Spermatogenese deutlich verschieben, wobei der Verdünnungsfaktor jedoch eindeutig unter zwei liegt.





**Abbildung 3.22: Histogramme der jeweiligen mittleren Expressionsunterschiede zwischen den Proben mit verschiedenen Spermatogenesestörungen gegenüber Proben mit intakter Spermatogenese.** (A) zeigt das Verhältnis zwischen Score 8- und Score 10-Proben, (B) das zwischen Score 5- und Score 10-Proben und (C) das zwischen Score 2- und Score 10-Proben. Dabei ist der Expressionsunterschied mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. In den linken Abbildungen sind die Ergebnisse der CodeLink-Plattform, in den rechten die Ergebnisse der Affymetrix-Plattform dargestellt.

Hinsichtlich der Expression Leydigzell-spezifischer Marker wurde ein schwieriger zu deutendes Phänomen beobachtet. Die Transkriptlevel einiger Gene, die bekannte Leydigzell-spezifische Marker kodieren, waren bei den verschiedenen Spermatogenesestörungen im Vergleich zu Proben mit intakter Spermatogenese deutlich erhöht. Beispiele sind unter anderem die Gene des LH-Rezeptors, des Cytochrom P450<sub>scc</sub> Enzyms (*scc = side-chain-cleavage*, CYP11A1) und der 3-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD3B2). Die Zunahme der Transkriptlevel war dabei in Patienten mit SCO-Symptomatik am drastischsten (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23: Expressionsprofile des LH-Rezeptor-Gens, die aus den Mikroarray-Ergebnissen der Affymetrix-Studie (blaue Linie) und den real-time RT-PCR-Daten (rote Linie) erhalten wurden.** Die RT-PCR wurde mit den gleichen 28 Proben durchgeführt, die in der Mikroarray-Analyse mit dem CodeLink-System eingesetzt wurden; die Unterschiede sind dabei weniger dramatisch als beim Mikroarray-System.

Anhand der Ergebnisse der Mikroarray- und der real-time RT-PCR-Daten kann nicht gesagt werden, ob die Erhöhung der mRNA-Level des LH-Rezeptor-Gens durch die Verschiebung der relativen zellulären Anteile bedingt ist oder ob der LH-Rezeptor auf mRNA-Ebene in Proben mit gestörter Spermatogenese tatsächlich hochreguliert ist. Weiterhin kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die Leydigzellen vermehren (Leydigzell-Hyperplasie) oder ob sich lediglich die relative Menge bzw. die Aktivität der Leydigzellen erhöht. In der Literatur wird berichtet, dass Tubulusschädigungen mit einer Hypertrophie der Leydigzellen einhergehen (de Kretser, 2004). Dieses Phänomen wird manchmal auch als „kompensierte Leydigzell-Dysfunktion“ bezeichnet und auf erhöhte LH-Spiegel im Serum infertiler Männer zurückgeführt. Es ist jedoch nicht berechtigt, aus den erhöhten mRNA-Mengen des CYP11A1-Gens und des HSD3B2-Gens auf eine erhöhte Steroidogenese bei Patienten mit Spermatogenesestörungen zu schließen. Es wurden nämlich auch erhöhte mRNA-Level beobachtet, die für verschiedene Enzyme kodieren, die Steroide metabolisieren bzw. in inaktive Formen umwandeln, so dass diese eine geringere Rezeptorbindung zeigen. Beispiel hierfür ist das HSD17B6-Gen, das für die 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase kodiert. Die Überexpression dieser Leydigzell-Transkripte könnte zum Teil ebenfalls durch eine Veränderung der zellulären Anteile in den pathologisch veränderten Hodenproben erklärt

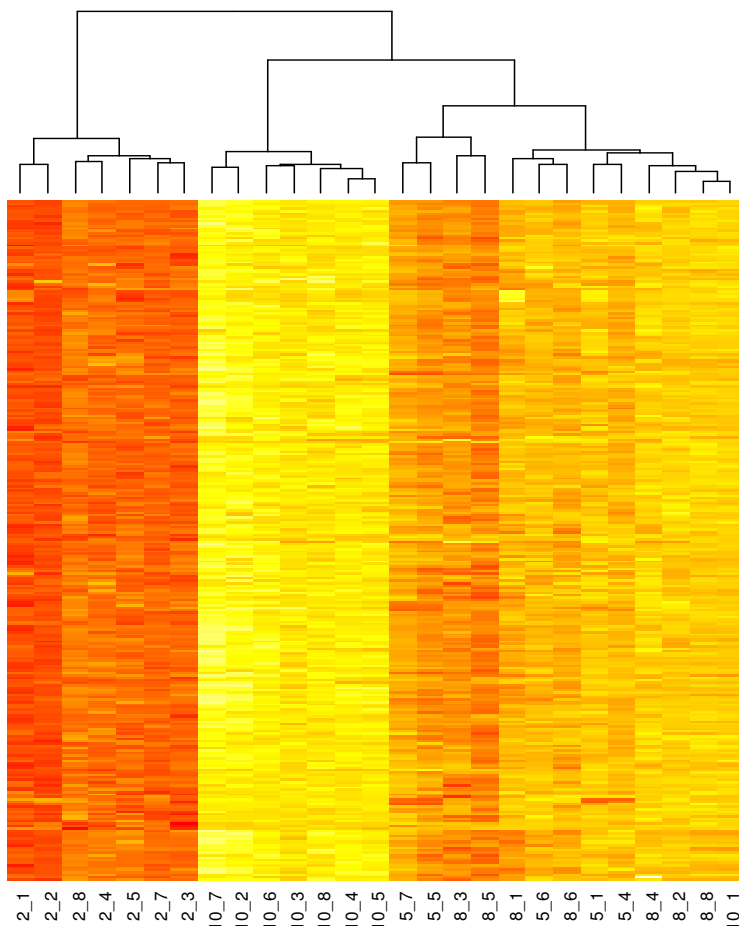
werden. Dabei erhöht sich der relative Anteil der Leydigzellen; der absolute Anteil der Leydigzellen bleibt dagegen gleich oder wird geringer (Tash *et al.*, 2002; Holm *et al.*, 2003). Holm *et al.* (2003) beobachteten zudem eine zweifache Vermehrung des interstitiellen Materials im Verhältnis zum tubulären Kompartiment. Dies bestätigt, dass der relative Anteil der Sertolizellen im tubulären Kompartiment nicht so dramatisch zunimmt wie der Anteil der Leydigzellen im Interstitium, was eine Erklärung für die größeren Expressionsunterschiede sein könnte. Dies könnte letztendlich daran liegen, dass das tubuläre Kompartiment im pathologisch veränderten Hoden im Verhältnis zum Interstitium schrumpft.

### **3.7.2 Gene, deren Expressionslevel in Testispathologien zunehmen**

Die PAM-Gruppe 5 der Affymetrix-Studie bzw. Profil 5 der CodeLink-Studie enthalten Gene, deren Expression mit fortschreitender Degeneration der Spermatogenese, d.h. mit einem abnehmenden Johnsen Score, zwar geringfügig, aber signifikant zunimmt (vgl. Abbildung 3.11 und 3.12). Die mit diesen Genen assoziierten biologischen Prozesse sind nicht für die Keimzellentwicklung charakteristisch. Es handelt sich vielmehr um Expressionsmuster von Genen, die in somatischen Zelltypen des Hodens exprimiert werden. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Expressionsunterschiede nicht allein durch Veränderungen der zellulären Anteile bedingt waren (siehe oben, Abschnitt 3.7.1), wurden nur solche Transkripte berücksichtigt, die einen mindestens dreifachen Expressionsunterschied zwischen Score 2- gegenüber Score 10-Proben aufwiesen. Von den in PAM-Gruppe 5 enthaltenen 302 Transkripten galt das für insgesamt 298 Transkripte bzw. 229 nicht redundante Transkripte (mit einmalig vorkommenden *UniGene* IDs). Um diese 229 Transkripte mit den Ergebnissen der CodeLink-Studie vergleichen zu können, werden in diesem Abschnitt nur die Score-Gruppen 10, 8, 5 und 2 berücksichtigt und die Score-Gruppen 7, 3.2 und 1 außer Acht gelassen. Bei der CodeLink-Studie zeigten von den 1874 differentiell exprimierten Transkripten insgesamt nur 84 Transkripte eine mindestens dreifache Steigerung der Transkriptlevel zwischen der Score 2-Gruppe und der Score 10-Gruppe. Im Vergleich dazu erhält man, wenn der Schwellenwert für differentielle Expression von dreifach auf zweifach heruntersetzt wird, insgesamt 271 Transkripte, die in Score 2-Proben gegenüber Score 10-Proben stärker exprimiert sind.

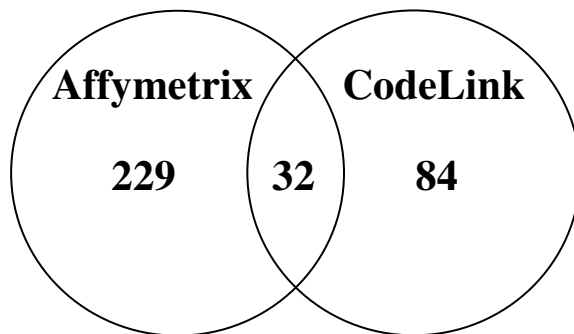
Die Anzahl dieser Transkripte entspricht bezüglich der Affymetrix-Studie ca. 2,5 % bzw. hinsichtlich der CodeLink-Studie weniger als 1 % aller Testis-exprimierten Transkripte. Sie repräsentieren dementsprechend eine sehr konservative Abschätzung. Somit kann man davon ausgehen, dass es sich bei diesen letztendlich um „zuverlässige“ Transkripte handelt, die in

allen Proben mit bestimmten Spermatogenesedefekten gegenüber in Proben mit intakter Spermatogenese höher exprimiert sind. Ausgehend von diesen 229 bzw. 84 Transkripten wurde ein hierarchisches *Clustering* mittels der Statistiksoftware R durchgeführt, um zu überprüfen, ob die individuellen Patienten-Proben bei der Verwendung dieser Transkripte ebenfalls in die morphologisch vorklassifizierte Score-Gruppe clustern (vgl. Abschnitt 3.5.2). Das Ergebnis des hierarchischen *Clusterings* war hinsichtlich beider Plattformen identisch, so dass es in der folgenden Abbildung beispielhaft anhand der Affymetrix-Studie dargestellt wird. Anhand der Baumstruktur und der Farbgebung ist zu erkennen, dass sich die Score 2-Gruppe am deutlichsten von allen anderen Score-Gruppen abhebt. Die Score 5- sowie Score 8-Proben bilden zusammen einen großen Cluster und zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihren Expressionsleveln. Dennoch heben sie sich eindeutig von den Proben mit intakter Spermatogenese sowie SCO-Symptomatik ab. Das *Clustering* zeigt mit Ausnahme der Probe 10\_1 eine klare Trennung zwischen Proben mit bestimmten Spermatogenesestörungen im Vergleich zu Proben mit intakter Spermatogenese. Diese Beobachtung bestätigt, dass es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Überexpression von bestimmten Genen und Störungen der Spermienproduktion im pathologischen Hoden gibt.

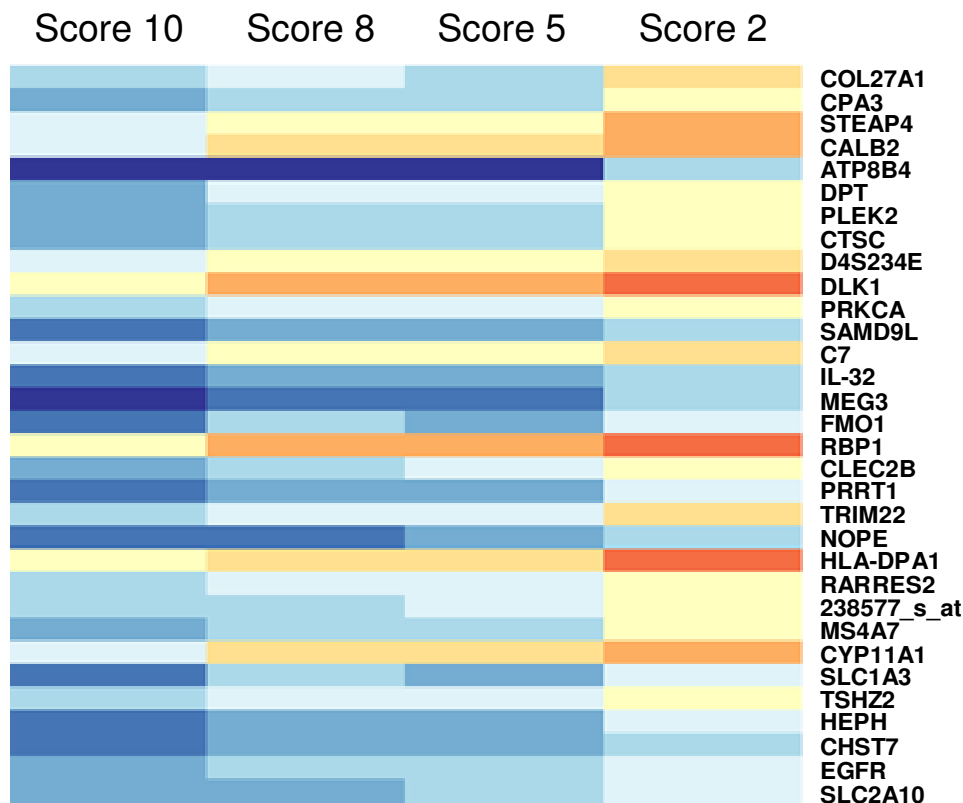


**Abbildung 3.24:** Hierarchisches *Clustering* (*average linkage*- und *Manhattan-Distanz*) von 27 humanen Testisbiopsien der Score-Gruppen 10, 8, 5 und 2, die mit der Affymetrix-Plattform analysiert wurden, ausgehend von 229 Transkripten, deren Expressionslevel mit sinkendem Score zunimmt. Das *Clustering* wurde mittels der Statistiksoftware R erstellt. Dabei nimmt die Expressionsstärke von gelb bis dunkel-orange zu.

Des Weiteren wurden basierend auf den *UniGene* IDs die Übereinstimmung beider Mikroarray-Studien ermittelt. Als Ergebnis wurden insgesamt 32 Gene erhalten, die in Proben mit SCO-Symptomatik gegenüber in Proben mit intakter Spermatogenese mindestens um den Faktor drei stärker exprimiert sind (Abbildung 3.25). Deren gemittelten Expressionsniveaus für jede Score-Gruppe sind in Form einer *Heatmap* in Abbildung 3.26 dargestellt.



**Abbildung 3.25: Venn-Diagramm der Anzahl der Transkripte, die in der Affymetrix- und in der CodeLink-Studie sowie in beiden Plattformen von Score 2 nach Score 10 mindestens um das dreifache stärker exprimiert sind.** Bei den Transkripten handelt es sich um nicht redundante Transkripte, die durch eine *UniGene* ID eindeutig definiert sind.



**Abbildung 3.26: Heatmap der 32 Gene, die sich in beiden Plattformen in ihrer Expressionsstärke von Score 2 nach Score 10 mindestens um den Faktor drei unterscheiden.** Die *Heatmap* wurde mit Hilfe des Programms AMEN durchgeführt, und es wurde jeweils der gemittelte Expressionswert für jede Score-Gruppe verwendet. Die Expression nimmt dabei von rot bis dunkelblau ab. Senkrechte Ausrichtung: Abkürzungen der Gennamen.

Analog zum hierarchischen *Clustering* ist zu erkennen, dass die meisten Gene den größten Expressionsunterschied von Score 5 nach Score 2 aufweisen. Mit Ausnahme des RBP1-Gens (*retinol binding protein*), welches in Sertolizellen exprimiert wird (Davis *et al.*, 1992), handelte es sich bei diesen Genen um solche, die in den verschiedenen Zelltypen des Interstitiums exprimiert werden.

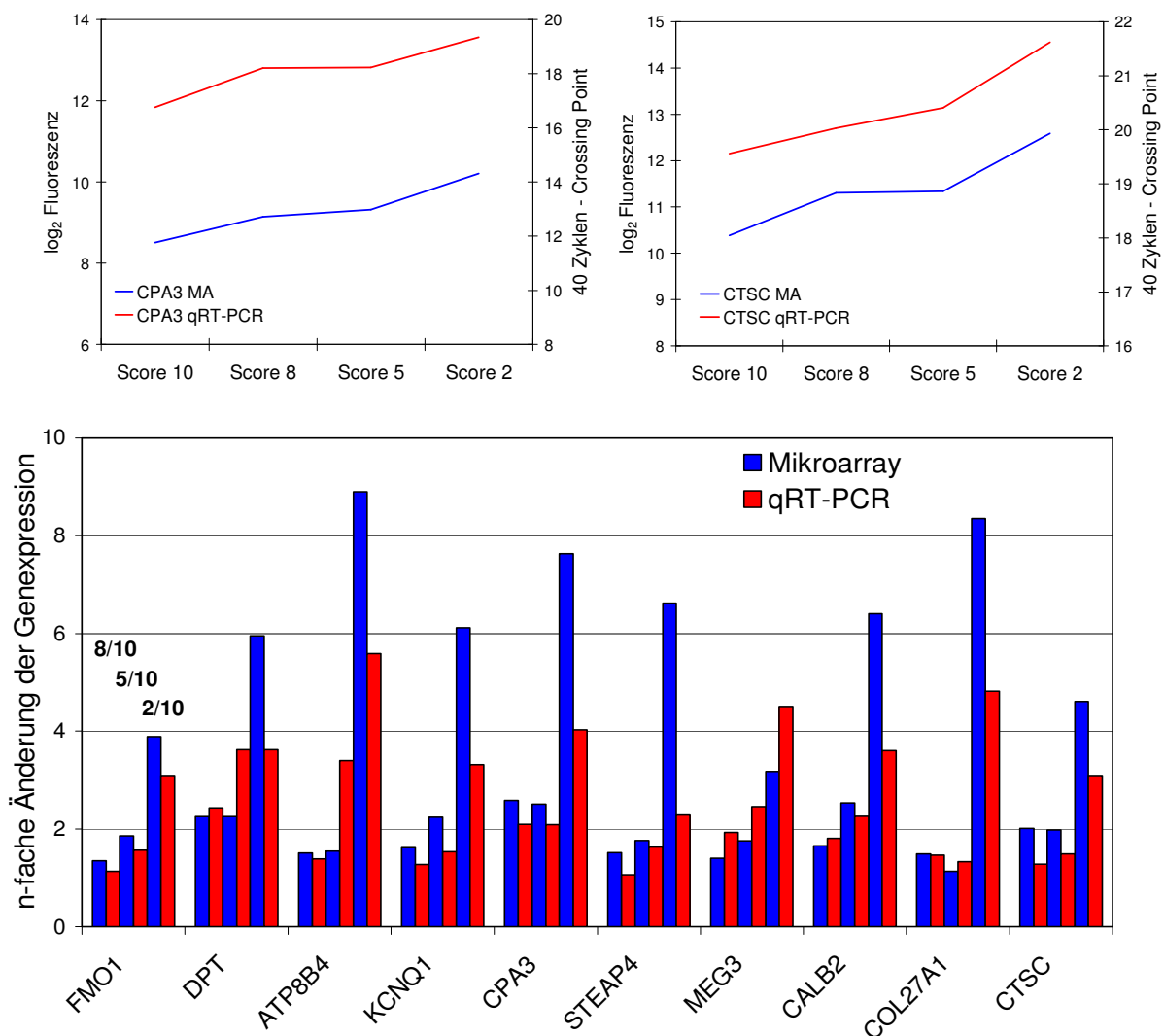
Da die Überexpression dieser 32 Gene in allen untersuchten Fällen der Spermatogenesestörung von Hypospermatogenese über Spermatogenese-arrest bis zur SCO-Symptomatik beobachtet wurde, könnte sie als eines der Kennzeichen männlicher Infertilität angesehen werden. Auf die Funktion dieser Gene und ihre Bedeutung für den Hoden wird näher in Abschnitt 4.3 der Diskussion eingegangen.

### 3.7.3 Validierung ausgewählter Gene mit Hilfe der real-time RT-PCR

Zur Bestätigung der Mikroarray-Ergebnisse mit einer weiteren unabhängigen Methode wurden neun von den 32 Genen mittels quantitativer real-time PCR validiert. Ferner wurde das Gen KCNQ1 (*potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily*) validiert, das ein Protein für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal kodiert und nur in Profil 5 der CodeLink-Studie enthalten war. Dieses Genprodukt kann Heteromultimere mit zwei anderen Kaliumkanal-Proteinen KCNE1 und KCNE3 (*potassium voltage-gated channel, Isk-related family*, Wu *et al.*, 2006) bilden, wobei letzterer in PAM-Gruppe 5 der Affymetrix-Studie enthalten war. Für die real-time RT-PCR wurden diejenigen Patienten-Proben eingesetzt, die ebenfalls in der CodeLink-Studie verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der REST-Software, wobei für die Normalisierung der Expressionsergebnisse wiederum das RPS27A-Gen als Referenzgen verwendet wurde.

In der folgenden Abbildung 3.27 sind als Vergleich die Ergebnisse der CodeLink-Studie und der real-time RT-PCR gegenübergestellt. Die oberen zwei Diagramme zeigen dabei die Expressionsprofile von zwei ausgewählten Genen, CPA3 (Carboxypeptidase A3) und CTSC (Cathepsin C), die aus den Mikroarray- (blaue Linie) und den real-time RT-PCR-Ergebnissen (rote Linie) erhalten wurden. Die Expressionsprofile weisen mit beiden Techniken exakt den gleichen Verlauf auf. Die Profile zeigen eine deutliche Zunahme von Score 10 nach Score 8, während das Niveau von Score-Gruppe 8 nach 5 unverändert bleibt und schließlich signifikant nach Score 2 weiter ansteigt. Dieser Verlauf war bei den meisten Genen zu beobachten, wie bereits anhand der Farbgebung in der *Heatmap* (vgl. Abbildung 3.26) zu erkennen ist. Der untere Teil der Abbildung 3.27 stellt die n-fache Änderung der Expression von zehn Genen als Verhältnis der Score-Gruppen 8, 5 und 2 zur Score-Gruppe 10 dar. Alle

Gene mit Ausnahme von STEAP4 zeigten mit beiden Techniken eine drei- bis neunfache Zunahme der Expression in Score 2-Proben im Verhältnis zu Score 10-Proben. Beim Vergleich der Score-Gruppen 5 und 8 im Verhältnis zur Score 10-Gruppe ist zu erkennen, dass die Expression der meisten Gene ebenfalls, aber meist nicht mehr als um das Doppelte erhöht ist. Eine weitere Beobachtung ist, dass die aus den Mikroarray-Ergebnissen ermittelten Expressionsunterschiede für die meisten Gene größere Werte annehmen als die der real-time RT-PCR-Ergebnisse. Dennoch korrelierten die Ergebnisse der beiden unabhängigen Methoden gut miteinander.



**Abbildung 3.27: Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels real-time RT-PCR.** Die RT-PCR wurde mit den gleichen 28 Proben durchgeführt, die in der Mikroarray-Analyse mit dem CodeLink-System eingesetzt wurden. Obere Abbildung: Expressionsprofile zweier ausgewählter Gene, die aus den Mikroarray- (blaue Linie) und den real-time RT-PCR-Daten (rote Linie) erhalten wurden. Man beachte den gleichartigen Verlauf. Untere Abbildung: n-fache Änderung der Expression von zehn Genen, die aus Ergebnissen der Mikroarray-Experimente (blaue Säulen) und der real-time RT-PCR Validierung (rote Säulen) erhalten wurden. 8/10 bezeichnet den n-fachen Expressionsunterschied zwischen Score 8 und Score 10, 5/10 den zwischen Score 5 und Score 10 und 2/10 den zwischen Score 2 und Score 10.

## 4 Diskussion

### 4.1 Molekulare Klassifizierung humaner Testispathologien

Um morphologisch klar definierte Testispathologien des Menschen auf molekularer Ebene zu beschreiben, wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Mikroarray-Plattformen insgesamt 63 individuelle Hodenbiopsien in Bezug auf ihren molekularen Phänotyp charakterisiert. 20 dieser Hodenbiopsien zeigten eine intakte Spermatogenese (Score-Gruppe 10); von denen handelte es sich bei 13 Proben um vasktomierte Patienten. Das Expressionsmuster dieser Proben wurde mit anderen, morphologisch unterscheidbaren Gruppen (Score-Gruppe 8, 7, 5, 3, 2, und 1) verglichen.

Mit Hilfe von statistischen Tests wurden 1874 Transkripte (CodeLink-Studie) bzw. 2960 Transkripte (Affymetrix-Studie) identifiziert, die sich statistisch signifikant zwischen normalem Testis und den verschiedenen Hodenpathologien unterscheiden, also differentiell exprimiert waren. Im Falle der CodeLink-Studie lagen die p-Werte dieser Transkripte unterhalb der konservativen Bonferroni-Grenze für multiples Testen. Bei der Affymetrix-Plattform erfolgte aufgrund der viel größeren Anzahl an Oligonukleotiden auf den Mikroarrays vor der Anwendung des statistischen Tests eine Vorfilterung des Datensatzes. Daher wurde anschließend als multiple Testkorrektur die weniger stringente FDR angewendet, wobei die p-Werte nach Anwendung der FDR aber immer noch kleiner als 0,001 waren. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse ist weitaus höher als alles, was derzeit bei Experimenten mit humanen Geweben in der Mikroarray-Literatur zu finden ist. Diese Besonderheit kann zum einen auf das Vorhandensein von verschiedenen Keimzelltypen in den morphologisch unterschiedlichen Hodenpathologien zurückgeführt werden, das sich massiv auf die Genexpression auswirkte. Zum anderen lag aufgrund der Vorklassifizierung eine hohe Homogenität der pathologischen Proben vor, die zu einer sehr geringen Varianz innerhalb einer Patientengruppe mit vergleichbarer Hodenmorphologie im Vergleich zur Intergruppen-Varianz führte. Letztendlich führte zudem die relativ große Anzahl an Replikaten einer Score-Gruppe dazu, dass statistisch hoch signifikante Ergebnisse erhalten wurden.

In der Literatur wird darüber diskutiert, ob die Entnahme einer Biopsie an einer Stelle des humanen Hodens repräsentativ für den Spermatogenesestatus im gesamten Hoden ist (Silber *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2000; Turek *et al.*, 2000). Um diese Debatte endgültig abzuschließen, wurden die Genexpressionsprofile von drei unabhängigen Biopsieproben des gleichen Hodens untersucht, der einen Spermatogenese-arrest auf der Stufe der Spermatozyten (Score 5) aufwies. Dabei zeigten sich keinerlei Expressionsunterschiede



zwischen den drei Proben aus unterschiedlichen Regionen. Mit diesem Ergebnis konnte erstmalig gezeigt werden, dass bei normogonadotroper, nicht-obstruktiver Azoospermie der Spermatogenesestatus ein homogenes Verteilungsmuster über den gesamten Hoden aufweist. Dabei gilt, dass diese Homogenität vor allem bei Patienten mit normalen Serum-FSH-Werten zu beobachten ist, während das Hodengewebe bei Patienten mit erhöhten FSH-Werten inhomogen sein kann, wie zum Beispiel in Fällen einer „bunten“ Atrophie. Diese Gewebe wurden daher in dieser Arbeit bewusst nicht verwendet.

Ein großer Teil der Biopsien mit kompletter Spermatogenese (Score-Gruppe 10) stammte von Vasektomie-Patienten, die nach Sterilisation ein Kind zeugen wollten. In der Literatur gehen die Meinungen weit auseinander, welchen Einfluss eine Vasektomie auf die spermatogenetische Aktivität im Hoden hat. Tatsache ist, dass diese Patienten vor dem Eingriff eine normale Fertilität besaßen und demnach keine endogenen Störungen der Fertilität aufweisen. Es gibt jedoch eine Reihe von Veröffentlichungen, die bei vasktomierten Patienten eine Beeinträchtigung der Spermatogenese beobachtet haben, die sich in einer deutlichen Reduktion der runden und elongierten Spermatoziden zeigte (Nistal *et al.*, 2003; Raleigh *et al.*, 2004; McVicar *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde berichtet, dass die Vasektomie eine Verdickung der Basalmembran sowie eine fokale Fibrose des Interstitiums zur Folge haben kann, die in einer signifikant geringeren Fertilitätsrate nach einer Refertilisierung resultierte (Jarow *et al.*, 1985; Shiraishi *et al.*, 2003). Gupta *et al.* (1975) beobachteten dagegen, dass die spermatogenetische Aktivität auch über drei Jahre nach der Vasektomie der Norm entsprach. In einer bisher weltweit größten Studie mit 264 refertilisierten Männern konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Vasektomie und das Alter der Patienten weder die intratestikuläre Spermatozidenanzahl noch die post-operative Schwangerschaftsrate beeinflussten (Hinz, 2004; Magheli, 2004). Unter den ca. 300 Patienten, deren Biopsien im Rahmen dieser hier vorliegenden Studie gesammelt wurden, waren insgesamt 42 vasktomierte Patienten. Fast 70 % wurden in der histopathologischen Untersuchung mit einem Johnsen Score von 10 bewertet. Über 21 % wiesen einen Johnsen Score von 9 auf, der neben einer intakten Spermatogenese eine Desorganisation des Keimepithels beschreibt. Weniger als 10 % der Vasektomie-Proben zeigten eine „bunte“ Atrophie mit variablen Hodenkanälchen, die mit verschiedenen Johnsen Scores bewertet wurden. Somit wurde in über 90 % der Fälle keine Abnahme der Zahl der reifen Spermatoziden beobachtet. Es scheint also, dass die Vasektomie in manchen Fällen die Spermatogenese beeinträchtigt, in der Mehrheit der Fälle aber nicht. Insgesamt stellten diese Patienten innerhalb der Score 10-Gruppe die wohl einheitlichste Subgruppe dar und im Falle der hier

verwendeten Biospien entsprach die spermatogenetische Aktivität morphologisch gesehen zweifelsohne der Norm. Somit war es gerechtfertigt, diese in den Genexpressionsstudien als Positivkontrollen zu verwenden. Es zeigte sich, dass alle Score 10-Proben einschließlich der sieben anderen Score 10-Proben der CodeLink-Studie, zusammen eindeutig einen eigenen Cluster bilden (vgl. Abschnitt 3.5.2).

Verschiedene Clustermethoden zeigten, dass die einzelnen Genexpressionsprofile im Wesentlichen die histologisch unterscheidbaren Krankheitsbilder widerspiegeln. Sogar mit Hilfe der gänzlich *unsupervised* Clusteranalyse, die keine zuvor definierte Einteilung in Gruppen voraussetzte und bei der nach der größten Varianz über alle Proben geclustert wurde, konnte anhand der Genexpressionsmuster eine Einteilung gemäß der morphologischen Klassifizierung beobachtet werden. Dies bestätigt wiederum, dass die Proben einer Score-Gruppe sehr homogen waren. Hinsichtlich der CodeLink-Studie clusterten alle Proben in die morphologisch vorklassifizierte Score-Gruppe. Bei der Affymetrix-Studie war aufgrund der größeren Anzahl an verschiedenen morphologischen Gruppen (sieben im Vergleich zu vier bei der CodeLink-Studie) die Trennung bei der Clusteranalyse nicht ganz so scharf. Da beispielsweise die Score 3.2-Proben neben sehr vereinzelt Spermatozoen überwiegend nur Sertolizellen in den Hodenkanälchen aufwiesen, konnten diese nicht klar von Proben der Score 2-Gruppe unterschieden werden. Die Tatsache, dass die Proben der Score 7- und Score 8-Gruppe ebenfalls nicht voneinander separiert werden konnten, kann man darauf zurückführen, dass die Score 7-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen sehr heterogen ist und daher bei der Clusteranalyse keine eigenen Cluster bildet. Dies spiegelt sich auch in den sehr uneinheitlichen Hormonwerten innerhalb dieser Gruppe wider (vgl. Tabelle 3.4). Ferner zeigten die einzelnen Dendrogramme auch innerhalb der Score-Gruppen verschiedene Untergruppen mit näher verwandten Expressionsprofilen, die zur Definition weiterer Sub-Phänotypen geeignet sein könnten.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der Mikroarray-Analyse eine Differentialdiagnose klar definierter Hodenpathologien auf der Grundlage der korrespondierenden Genexpressionsmuster durchgeführt werden konnte. Dabei zeigte sich, dass für eine Unterscheidung der morphologischen Subtypen männlicher Infertilität auf molekularer Ebene fünf Score-Gruppen (10, 8/7, 5, 2 und 1) ausreichen. Die Differentialdiagnose anhand dieses „molekularen Scores“ ist der histologischen Klassifizierung insofern überlegen, da sie viel leichter objektivierbar ist. Letztere ist dagegen sehr subjektiv und erfordert viel Erfahrung bei der morphologischen Beurteilung der Testisbiopsien. Das Ergebnis dieser Arbeit hat deshalb auch praktische Bedeutung und bietet

im Hinblick auf die andrologische Diagnostik viel versprechende Möglichkeiten. Ausgehend von den differentiell exprimierten Genen zwischen den verschiedenen Hodenpathologien kann man nun eine minimale Gruppe von Genen identifizieren, die so genannten Diskriminatoren, anhand derer man die verschiedenen Pathologien mit möglichst großer Sicherheit klassifizieren und unterscheiden kann. Diese Diskriminatoren können dann die Grundlage zur Entwicklung eines diagnostischen „Fertilitäts-Chips“ bilden. Dieser könnte die Möglichkeiten verbessern, anhand einer Testisbiopsie den Erfolg von TESE/ICSI im Vorfeld abzuschätzen, so dass beispielsweise eine unnötige Behandlung der Partnerin vermieden werden könnte, falls das Expressionsmuster in der Hodenbiopsie des Partners ein Scheitern von ICSI vorhersagt. Van de Vijver *et al.* (2002) zeigten bereits, dass es möglich ist, anhand von Diskriminatoren verschiedene Krankheitsentitäten auf molekularer Ebene zu klassifizieren. So konnten sie Patientinnen mit Brustkrebs in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen einteilen, so dass diese entsprechend dieser Einteilung spezifisch therapiert werden könnten.

Letztendlich muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier beobachteten molekularen Signaturen um Johnsen Score-assoziierte Genexpressionsmuster handelt. Bei dieser morphologischen Klassifizierung wird der Spermatogenesestatus in den Hodenkanälchen der Biopsie-Proben bestimmt. Jegliche Veränderungen des Hodenparenchyms, die mit Störungen der Spermienproduktion einhergehen können, wurden dabei nicht erfasst (vgl. Abschnitt 4.3).

## **4.2 Humane Testispathologien für die globale Charakterisierung der normalen Spermatogenese**

Über die molekularen Mechanismen, die den koordinierten Ablauf der humanen Spermatogenese kontrollieren, ist bis heute relativ wenig bekannt. Der komplexe Differenzierungsprozess erfordert eine präzise gesteuerte Gentranskription, um die morphologischen und funktionellen Veränderungen zu ermöglichen, die die Keimzellen während ihrer Entwicklung erfahren. In dieser Arbeit konnte der Verlust bestimmter Keimzellstadien in verschiedenen humanen Hodenpathologien ausgenutzt werden, Stadienspezifische Genexpressionsmuster im Hoden aufzudecken. Ziel dabei war, den molekularen Verlauf der normalen humanen Spermatogenese zu entschlüsseln.

Jongeneel *et al.* (2005) berichten, dass insgesamt 12.267 Gene im humanen Hoden exprimiert werden. Die 1874 differentiell exprimierte Transkripte der CodeLink-Studie bzw. 2242 nicht-redundanten Transkripte (ermittelt über die *UniGene* Datenbank) der Affymetrix-Studie entsprechen somit 15 % bzw. 18 % aller im humanen Hoden detektierten Gene. Von diesen

sind über 80 % Testis-spezifisch oder zumindest in diesem Gewebe hoch angereichert. Für etwa 44 % ist bisher noch gar keine Funktion bekannt, wodurch die Vermutung bestätigt wurde, dass gerade das Gewebs-spezifische Expressionsmuster des humanen Hodens durch zahlreiche bisher noch unbekannte Transkripte charakterisiert ist.

Durch die Bildung von Gengruppen mit unterschiedlichen Expressionsprofilen zwischen den verschiedenen morphologischen Score-Gruppen konnten Gene identifiziert werden, die für bestimmte Spermatogenesestadien charakteristisch sind. Obwohl unterschiedliche Clusteranalysen für beide Mikroarray-Systeme verwendet wurden, waren die Ergebnisse beider Plattformen deckungsgleich. Die funktionellen Analysen ergaben, dass die ersten vier PAM-Gruppen Gene enthalten, die für die humane Spermatogenese essentiell sind. Sie entsprechen einem hohen Prozentsatz aller differentiell exprimierten Gene: 88 % bezüglich der Affymetrix- bzw. 83 % bezüglich der CodeLink-Studie. Ferner zeigten die Ergebnisse der Überrepräsentationsanalysen, dass die PAM-Gruppen 1 und 2 überwiegend Gene enthalten, die für die postmeiotische Phase der Spermatogenese charakteristisch sind, während die Gene der PAM-Gruppe 3 für die prä- bzw. meiotische Phase charakteristisch sind.

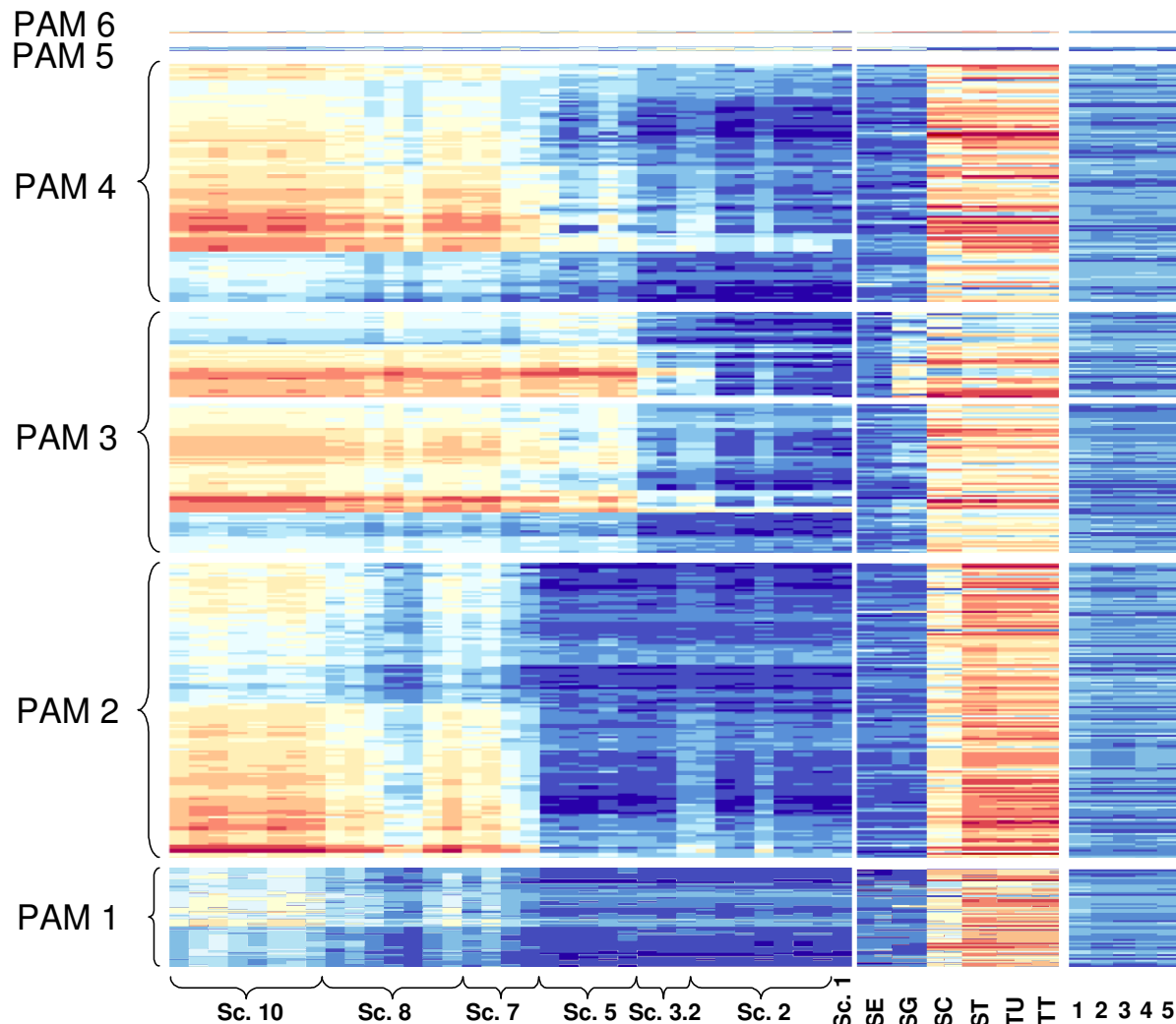
Es konnte gezeigt werden, dass viele Gene der PAM-Gruppe 2 erstmalig in den frühen Stadien der Spermatidenentwicklung exprimiert werden, da ihre Expressionslevel in Verbindung mit dem Verlust von runden Spermatiden von Score 7 nach Score 5 drastisch abnahmen. Ein Großteil der Gene der PAM-Gruppe 1 zeigte die eindeutig stärkste Expression in Score 10-Proben sowie größtenteils variable und schwache Expressionswerte in Score 8- und Score 7-Proben. Über den genauen Zeitpunkt der Transkription dieser Gene während der späten Spermatidendifferenzierung kann mit diesem Ansatz keine Aussage getroffen werden. Dies lag zum einen daran, dass zwischen Score 10- und Score 8-Proben nur ein quantitativer Unterschied hinsichtlich der Keimzellzusammensetzung besteht. Zum anderen wird in der Literatur beschrieben, dass die Transkription aufgrund der morphologischen Umstrukturierung und der zunehmenden Kernkondensation in den späteren Stadien der Spermatidenentwicklung zum Erliegen kommt, wobei über den genauen Zeitpunkt noch diskutiert wird (Kierszenbaum und Tres, 1975; Fimia *et al.*, 2001; Kleene, 2003; Dadoune *et al.*, 2004). Aus diesem Grund werden viele Gene in den früheren Stadien der Spermatidenentwicklung transkribiert und die mRNAs bis zur späteren Translation in Form von RNPs in *chromatoid bodies* im Cytoplasma gelagert (Kleene *et al.*, 1984; Biggiogera *et al.*, 1990). Somit konnte man mit diesen Score-Gruppen nicht zwischen stabilen, gespeicherten mRNAs aus früheren Spermatidenstadien und den neu hinzukommenden mRNAs späterer Spermatidenstadien unterscheiden. Nur durch die Isolierung einzelner

Spermatidenstadien wäre man in der Lage, Transkripte von runden, elongierenden und elongierten Spermatiden eindeutig zu unterscheiden. Diese Vorgehensweise ist aber technisch nicht realisierbar. Dennoch war der biologische Prozess „Fusion von Spermium mit Eizelle“ nur in PAM-Gruppe 1 überrepräsentiert, und es konnten tatsächlich vereinzelt Gene identifiziert werden, die laut Literatur erst in späteren Stadien der Spermatidendifferenzierung transkribiert werden. Ein Beispiel ist das CST8-Gen (*cystatin-related epididymal specific*), das bei der Maus erst in elongierenden Spermatiden exprimiert wird (Syntin und Cornwall, 1999). Dies bestätigt, dass es anscheinend bedingt möglich war, anhand der Expressionsmuster der verschiedenen morphologischen Score-Gruppen zwischen Transkripten verschiedener Spermatidenstadien zu unterscheiden.

Insgesamt konnten mit diesem Ansatz zahlreiche Spermatogenesestadien-spezifische Gene des Mannes identifiziert werden, die in vorangegangenen Mikroarray-Analysen von Ratte und Maus ähnliche Expressionsmuster gezeigt hatten (Schultz *et al.*, 2003; Almstrup *et al.*, 2004; Shima *et al.* 2004, Schlecht *et al.*, 2004). Vor allem die in den meiotischen und postmeiotischen Stadien exprimierten Testis-spezifischen Gene scheinen zwischen den verschiedenen Spezies sehr gut konserviert zu sein.

Zur Identifizierung konservierter Transkripte zwischen den beiden Spezies wurden die 2960 Transkripte der Affymetrix-Studie zu Maus-Daten in Beziehung gesetzt, die aus Mikroarray-Experimenten von isolierten Keimzellpopulationen erhalten wurden. Dies erfolgte über den direkten Link zwischen der *Entrez Gene* ID und der NCBI *HomoloGene* Datenbank, die ein System zur automatischen Detektion von Homologien innerhalb eukaryotischer Genome darstellt (Wheeler *et al.*, 2006). Ausgehend von den gemeinsamen Transkripten wurde ein hierarchisches *Clustering* durchgeführt. Dabei wurden nur Testis-spezifische Transkripte verwendet, die durch vorherige Subtraktion der Gene, die in fünf anderen Geweben (Plazenta, Auge, Gehirn, Herz und Lunge) exprimiert sind, erhalten wurden.

Abbildung 4.1 macht deutlich, dass die Gene der PAM-Gruppen 1 und 2 bei der Maus ebenfalls vor allem in Proben angereicherter Spermatiden sowie in Proben von Tubuli seminiferi und Gesamthoden hoch exprimiert sind. Dagegen zeigen Gene der PAM-Gruppe 3 eindeutig ebenfalls eine Expression in Spermatozyten und auch vereinzelt in Spermatogonien der Maus. Gene der PAM-Gruppe 4 weisen analog zum humanen System bei der Maus variierende Expressionslevel in allen Keimzelltypen mit Ausnahme der Spermatogonien auf.



**Abbildung 4.1:** Clustering der humanen Transkripte der Affymetrix-Studie, die potenzielle Orthologe in der Maus besitzen sowie Testis-spezifisch sind. Das Clustering wurde ausgehend von annähernd 150 gemeinsamen Genen mit Hilfe des Programms AMEN durchgeführt. SC = Score, SE = Sertolizellen, SG = Spermatogonien, SC = Spermatozyten, ST = Spermatozyten, TU = Tubuli seminiferi, TT = Gesamthoden (*Total Testis*); 1 = Plazenta, 2 = Auge, 3 = Gehirn, 4 = Herz, 5 = Lunge. Die Expressionsstärke nimmt von blau bis dunkelrot zu; (die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Primig vom Biozentrum Basel zur Verfügung gestellt).

Bei der Analyse zeigten die Gene der PAM-Gruppen 1-4 eine hohe Testis-Spezifität, während der Prozentsatz Testis-spezifischer Gene in den PAM-Gruppen 5 und 6 erwartungsgemäß sehr gering war. Bei den Genen der PAM-Gruppen 1-4 handelt es sich um überwiegend Keimzell-spezifische Gene, da kein Expressionssignal in Sertolizellen der Maus beobachtet wurde. Schultz *et al.* (2003) zeigten ebenfalls, dass ein hoher Prozentsatz der differentiell exprimierten Gene der meiotischen und postmeiotischen Cluster der Maus nur in der männlichen Keimbahn exprimiert zu sein scheinen, während Keimzell-spezifische Gene in der frühen Keimzellentwicklung eher selten waren. Somit wird die Mehrheit der in den Stammzellen und Spermatogonien detektierten Gene ebenfalls in anderen Geweben exprimiert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die in diesen Experimenten verwendeten

Spermatogonien aus neun Tage alten Mäusen isoliert wurden, und so nur die erste Welle der Spermatogenese erfasst wurde (Eddy, 2002). Da während der späten mitotischen Phase mehr als die Hälfte der Spermatogonien durch Apoptose zugrunde gehen, könnte dies der Grund dafür gewesen sein, dass nur relativ wenige Gene erfasst wurden, die für mitotische Teilungen der Spermatogonien spezifisch sind. Da es aufgrund der geringen Anzahl von Spermatogonien in den Score 3.2-Proben leider nicht möglich war, zwischen der prä- und meiotischen Phase der Keimzellentwicklung zu differenzieren (Abbildung 4.1), kann hier keine abschließende Aussage über den Anteil an Keimzell-spezifischen Genprodukten in humanen Spermatogonien getroffen werden. Mit diesem Spezies-Vergleich könnte man aber nun humane Spermatogonien-Marker identifizieren.

Im Folgenden wird auf die Expression einiger gut untersuchter Gene näher eingegangen. Die Transkription der Transitionsprotein- und Protamin-Gene wurde in der Vergangenheit in verschiedenen Spezies detailliert untersucht. Die Gene für die Protamine (PRM1 und PRM2) liegen in einem Gencluster zusammen mit dem Transitionsprotein2 auf ein und demselben Chromosom (Schlüter *et al.*, 1992). Das Gen für das Transitionsprotein1 ist dagegen auf einem anderen Chromosom lokalisiert (Engel *et al.*, 1992). Ihre Regulation in der humanen Spermatogenese scheint unabhängig von der chromosomalen Lokalisation zu erfolgen. Steger *et al.* (1998) konnten die TNP2-mRNA von Patienten mit normaler Spermatogenese nur in der quantitativen RT-PCR nicht aber in der *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten nachweisen. Analog dazu wurde hier in der Affymetrix-Studie eine schwache Expression des TNP2-Gens im PAM-Cluster 1 beobachtet. In der CodeLink-Studie zeigten sich dagegen eindeutig höhere Expressionslevel, was für eine höhere Sensitivität dieses Systems spricht (vgl. Abschnitt 4.4). Dennoch waren die Ergebnisse beider Mikroarray-Studien dahingehend übereinstimmend, dass das TNP2-Gen eindeutig postmeiotisch exprimiert wird. Das TNP1-Gen (PAM-Cluster 2) war in Verbindung mit der Anwesenheit von runden Spermatozoen in Score 7-Proben der Affymetrix-Studie hoch exprimiert. Anhand des Ergebnisses der CodeLink-Studie kann nicht eindeutig gesagt werden, ob das TNP1-Gen noch während der Meiose oder ebenfalls erst in postmeiotischen Keimzellen exprimiert wird, da zwei Score 5-Proben erhöhte Expressionslevel aufwiesen. Trotzdem unterschieden sich ihre Transkriptmengen deutlich von denen der Score 8- und der Score 10-Proben, die analog zur Affymetrix-Studie sehr hoch waren. Die Protamin-Gene, deren Produkte den Hauptbestandteil der DNA-bindenden Proteine in den reifen Spermatozoen bilden, sind eindeutig postmeiotisch exprimiert und werden zuerst in runden haploiden Spermatozoen transkribiert. Dies konnte anhand der Ergebnisse der Affymetrix-Studie bestätigt werden. Beide Protamin-Gene waren

in PAM-Cluster 2 enthalten und zeigten eine hohe Expression in Score 7-, Score 8- sowie Score 10-Proben. Ihre zeitlich und räumlich korrekte Expression ist für die Spermiendifferenzierung und männliche Fertilität von zentraler Bedeutung. Bei Männern mit gestörter Spermatogenese wurde im Unterschied zu Männern mit intakter Spermatogenese auf mRNA-Ebene ein verändertes Protamin1- zu Protamin2-Verhältnis beobachtet, ein Phänomen, das mit einer signifikant verminderten Fertilisierungsrate einherging (Steger *et al.*, 2001). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass das Verhältnis dieser beiden Protamin-mRNAs als möglicher Prognosefaktor für den Erfolg einer ICSI dienen könnte.

Über die Mechanismen, die die zeitliche Entkopplung von Transkription und Translation in haploiden Spermatiden steuern, ist noch sehr wenig bekannt. Zum Beispiel findet im Falle der humanen PRM1- und PRM2-Gene die Transkription in runden und elongierenden Spermatiden (Spermatidenstadien 1-4) statt, die Translation wird mit zeitlicher Verzögerung erst in elongierenden Spermatiden (Spermatidenstadien 4-8) aktiviert (Steger *et al.*, 2000). In der Literatur werden einige Proteine als RNA-bindende Translationsregulatoren diskutiert (Tanaka und Baba, 2005). Bislang konnte aber lediglich für zwei murine, Keimzell-spezifische Y-Box-Proteine, MSY2 und MSY4, überzeugend gezeigt werden, dass sie als Translationsregulatoren für die Aufrechterhaltung der Stabilität spezifischer mRNAs in männlichen Keimzellen verantwortlich sind (Giorgini *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). Das DNA/RNA-bindende Protein MSY2 ist in meiotischen und postmeiotischen Keimzellen vorhanden und bindet an eine Y-Box-Erkennungssequenz, die inzwischen in vielen Promotorsequenzen meiotisch und postmeiotisch exprimierter Gene gefunden wurde, einschließlich der Gene, die für die Transitionsproteine und Protamine kodieren (Yang *et al.*, 2005). MSY2-Knockout-Mäuse sind durch eine Arretierung der Spermatogenese auf der Stufe der postmeiotischen Keimzellen infertil (Yang *et al.*, 2007). Gu *et al.* (1998) beobachteten, dass die Expression der murinen MSY2-mRNA signifikant mit dem Auftreten von Pachytän-Spermatozyten ansteigt, wobei maximale Transkriptlevel in elongierenden Spermatiden erreicht werden. Das humane Ortholog YBX2 war in PAM-Gruppe 3 enthalten und wird ebenfalls erstmals während der Meiose transkribiert. Die zeitgleiche Transkription in beiden Säuger-Spezies lässt die Vermutung zu, dass das YBX2-Protein beim Menschen die gleiche Funktion ausübt und somit ebenfalls bei der Lagerung spezifischer mRNAs und deren translationalen Repression eine Rolle spielen könnte.

Durch die zeitliche Entkopplung von Transkription und Translation in haploiden Spermatiden erscheint es auch nicht widersprüchlich, dass die beiden Keimzell-spezifischen Gene CATSPER1 und -2, die für Proteine spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Spermien kodieren,



in unterschiedlichen Spermatogenesestadien transkribiert werden (vgl. Abschnitt 3.6.3). Beide Proteine sind in der Membran des Hauptstückes des Spermienflagellums lokalisiert und für die Spermienmotilität und Fertilität bei der Maus essentiell; sowohl CATSPER1- als auch CATSPER2-*Knockout*-Mäuse sind infertil (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2003). Nikpoor *et al.* (2004) fanden, dass die mRNA-Level dieser beiden Proteine ebenfalls in Patienten mit fehlender Spermienmotilität gegenüber fertilen Patienten signifikant reduziert waren.

Neben den bekannten Keimzell-spezifischen Genen, deren korrekte Expression für eine intakte Spermatogenese essentiell ist, konnten mit diesem Ansatz auch neue Gene identifiziert werden, die in der Literatur bisher nicht in Verbindung mit der Spermatogenese beschrieben worden sind. Beispiele hierfür sind die Gene BRCA1 und BRCA2, die im Zusammenhang mit Brustkrebs entdeckt wurden, sowie die Gene FANCA und FANCD2, die bei der Erbkrankheit Fanconi-Anämie eine Rolle spielen. Sie sind alle in DNA-Reparaturprozesse involviert, die als Antwort auf DNA-Schädigung eingeleitet werden (Kennedy und D'Andrea, 2005). Diese Gene waren alle Bestandteil der PAM-Gruppe 3 und werden im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Spermatozyten in Score 5-Proben exprimiert. Das könnte auf eine Funktion bei der Rekombination in der Prophase der Meiose hindeuten.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass man durch die Verwendung von verschiedenen Subtypen humaner Hodenpathologien in der Lage war, die normale Spermatogenese des Mannes auf molekularer Ebene zu rekonstruieren. Dies stellte einen großen Vorteil und ein Novum dar, da es in der Praxis meist nicht möglich ist, ausreichende Mengen an humanem Gewebematerial für die Isolierung verschiedener Keimzellstadien zu erhalten. Der Vorteil bei diesem Ansatz war, dass das komplexe Zusammenwirken aller Zelltypen in ihrer physiologischen Umgebung in den verschiedenen Hodenpathologien sowie während der Spermatogenese untersucht werden konnte. Diese Komplexität hatte aber im Vergleich zu Experimenten mit isolierten Keimzellfraktionen wiederum den Nachteil, dass man nicht immer in der Lage war, die für die Expressionsunterschiede verantwortlichen Keimzellstadien widerspruchsfrei auszumachen.

### **4.3 Gene, deren Expressionslevel in Testispathologien zunehmen**

Die Expressionsprofile der pathologischen Proben spiegeln nicht nur Unterschiede an vorhandenen Keimzellstadien wider, sondern erfassen auch Störungen in den somatischen Zellen des Hodens, die mit Spermatogenesestörungen assoziiert sind. Diese schließen unter anderem die testikuläre Fibrose und die Aktivierung bzw. Infiltration von Immunzellen einschließlich Mastzellen ein. Dies wird im Folgenden anhand der Gene beleuchtet, die im Zusammenhang mit Spermatogenesestörungen überexprimiert werden.

Die Genexpressionsanalysen ergaben, dass von allen Testis-exprimierten Genen annähernd 2,5 % bezüglich der Affymetrix- bzw. weniger als 1 % bezüglich der CodeLink-Studie in Proben mit Spermatogenesedefekten überexprimiert waren. Zusätzlich könnten weitere Gene betroffen sein, die durch die stringenten Filterungskriterien nicht erfasst wurden. In direkter Korrelation mit der Schwere der Spermatogenesestörung war die Zunahme der Expressionslevel am deutlichsten in Fällen von Patienten mit einer SCO-Symptomatik (Score 2), die durch das komplette Fehlen von Keimzellen gekennzeichnet sind. Im Vergleich zu Patienten mit intakter Spermatogenese war die Expression dieser Transkripte um etwa das drei- bis zehnfache erhöht. Hinsichtlich der 232 annotierten Gene der PAM-Gruppe 5 (Affymetrix-Studie) waren unter anderem folgende funktionellen Kategorien überrepräsentiert: innate und humorale Immunantwort, Abwehrantwort, Komplementaktivierung und Androgen-Metabolismus. Die Mehrheit dieser Transkripte stammt von somatischen Zelltypen des Interstitiums, wie Überrepräsentationsanalysen ergeben haben. Eine beträchtliche Anzahl dieser Gene zeigte ebenfalls eine geringere aber signifikante Zunahme der Expression in Patientenproben mit Hypospermatogenese (Score 8) und Spermatogenese-arrest (Score 5). Somit wurde die Überexpression dieser Gene in allen drei unterschiedlichen Fällen von Spermatogenesestörungen beobachtet, war also unabhängig von der Ätiologie der Infertilität und könnte folglich als allgemeines Kennzeichen unerklärter Spermatogenesedefekte angesehen werden.

Bei der morphologischen Klassifizierung anhand des modifizierten Johnsen Scores werden unterschiedliche Zustände der Spermatogenese erfasst. Es werden die in den Biopsien vorhandenen Keimzellstadien quantitativ bestimmt, während die verschiedenen somatischen Zelltypen sowohl des tubulären als auch des interstitiellen Kompartiments nicht bzw. kaum berücksichtigt werden. McLachlan *et al.* (2007) schlagen deshalb einen neuen, erweiterten Ansatz für die histologische Evaluation von testikulären Biopsien vor, bei dem neben der spermatogenetischen Aktivität im tubulären Kompartiment auch histologische Veränderungen

der somatischen Zellen berücksichtigt werden sollen. In diesem Zusammenhang ist es interessant festzustellen, dass die überexprimierten Gene auf molekularer Ebene gerade solche histologische Veränderungen der somatischen Zellen vor allem im Interstitium widerspiegeln, die in testikulären Pathologien beobachtet werden.

Beim Vergleich beider Mikroarray-Plattformen wurde eine geringe aber sehr robuste Anzahl von gemeinsamen überexprimierten Genen herausgefiltert. Im Folgenden wird auf die Funktion einiger dieser Gene näher eingegangen. Die beiden Gene CPA3 und CTSC, die eindeutig in allen Fällen von Spermatogenesestörungen überexprimiert waren, kodieren für die beiden Proteasen Carboxypeptidase 3 und Cathepsin C. Diese Proteasen werden in der Literatur in Verbindung mit entzündlichen oder fibrotischen Erkrankungen beschrieben (Laprise *et al.*, 2004). Beispielsweise wird eine Zunahme der CTSC-mRNA mit Asthma assoziiert, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege (Hansel und Diette, 2007). Das Gen TPSAB1, das für eine weitere Mastzell-spezifische Protease namens Tryptase kodiert, war ebenfalls in beiden Mikroarray-Studien eindeutig in allen drei verschiedenen Hodenpathologien überexprimiert. Dieses Gen war nicht in der Liste der 32 Gene (vgl. Abbildung 3.26), da sein p-Wert mit  $8,5 \cdot 10^{-6}$  knapp über der Bonferroni-Grenze ( $3,3 \cdot 10^{-6}$ ) lag. Tryptase und CPA3 sind zusammen mit der Protease Chymase Hauptprodukte der Speichergranula von Mastzellen. Mastzellen sind wiederum Effektorzellen bei allergischen Reaktionen sowie bei fibrotischen und chronisch entzündlichen Prozessen (Benoist, 2002; Gruber 2003). Im menschlichen Hoden sind Mastzellen vor allem im Interstitium lokalisiert. Es ist bekannt, dass bei Männern mit unterschiedlichen Spermatogenesestörungen vermehrt Mastzellen im Hoden vorkommen (Jezek *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000). Ferner zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass von diesen viele aktiviert und degranuliert erscheinen (Meineke *et al.*, 2000), so dass zu erwarten ist, dass ihre Produkte freigesetzt werden und lokal im Hoden wirken können. Bei den 28 Patienten der CodeLink-Studie wurde bei SCO-Symptomatik sowie Hypospermatogenese ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Mastzell-Zahlen im Vergleich zu Patienten mit intakter Spermatogenese beobachtet. *In vitro*-Studien zeigten, dass Tryptase das Fibroblastenwachstum im Interstitium stimuliert, eine Voraussetzung für Fibrose (Frungieri *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Proteasen der Mastzellen, vor allem aber die Tryptase, an der Entstehung der Fibrosierung des Interstitiums und der Tubuluswand beteiligt sein könnten.

Wie bereits erwähnt, sind fibrotische Umbauvorgänge im Hoden häufig mit gestörter Spermatogenese assoziiert, unabhängig von der Ursache der Infertilität (de Krester und Baker, 1996). Somit war es nicht weiter verwunderlich, dass weitere Gene in beiden Mikroarray-

Studien überexprimiert waren, die Proteine der extrazellulären Matrix kodieren wie beispielsweise Dermopontin (DPT, Okamoto und Fujiwara, 2006) oder fibrilläre Kollagene wie COL27A1. Bei weiteren Kollagen-Genen wie COL3A1, COL4A6 und COL6A3 lagen die p-Werte beim CodeLink-System wiederum geringfügig über der Bonferroni-Grenze, so dass sie nicht Bestandteil der Liste gemeinsamer Gene waren. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den bisherigen Beobachtungen überein, dass Störungen in der ECM (extrazellulären Matrix)-Homöostase ein allgemeines Kennzeichen humaner Testispathologien sind. Die fibrotischen Umbauvorgänge bringen sicherlich massive Störungen der parakrinen Regulation, der Ernährungssituation des tubulären Kompartimentes und der Blut-Hoden-Schranke mit sich. Vor diesem Hintergrund erscheint es durchaus sinnvoll, über die Möglichkeiten einer medikamentösen Intervention bei Fibrose im Hoden nachzudenken, wobei dies vor allem bei den „milderen“ Formen von Spermatogenesedefekten sinnvoll erscheint.

Mastzellen spielen nicht nur eine Rolle bei fibrotischen Prozessen. Neben Proteasen bilden und sezernieren Mastzellen eine Fülle weiterer, hochaktiver Mediatoren (wie Histamin, verschiedene Interleukine und TNF- $\alpha$ ), die z. B. für die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und anderen Immunzellen (wie T- und B-Lymphozyten, Granulozyten) wichtig sind. Eine Zunahme von Makrophagen und anderer Immunzellen (wie T-Lymphozyten) ist im Hoden infertiler Männer ebenfalls regelmäßig nachweisbar (Hedger; 1997; Meinhardt und Schippe, 2003). Mastzellen besitzen zudem Rezeptoren für Komplementfaktoren, die die Ausschüttung von Histamin induzieren. Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und besteht aus über 30 Serum- und Zelloberflächenproteinen, die in verschiedenster Weise eine Rolle bei Abwehr und Entzündung spielen. Gene, die für verschiedene Komplementkomponenten (C1, C1S, C1QB, C1R, C6 und C7) kodieren, waren in beiden Mikroarray-Studien in den verschiedenen Spermatogenesestörungen überexprimiert, wobei nur das C7-Gen Bestandteil der 32 robusten, gemeinsamen Gene war. Inwiefern sich die Überexpression von Komplementfaktoren auf den Hoden auswirkt, ist noch unbekannt.

Ob Mastzellen des Hodens letztendlich für die Aktivierung anderer Immunzellen (mit-) verantwortlich sind und wie ihre Produkte mit Zielzellen des Hodens interagieren, ist noch unbekannt. Eine logistische Regression mit den überexprimierten Genen der CodeLink-Studie zeigte aber, dass eine direkte Korrelation zwischen den Mastzell-Zahlen individueller Patienten und Expressionsleveln bestimmter Gene einschließlich der Mastzell-spezifischen Rezeptor-Gene besteht (Spiess *et al.*, Manuskript eingereicht). Ferner deuten Angaben aus der

Literatur daraufhin, dass eine erhebliche Anzahl der überexprimierten Gene aus Immunzellen einschließlich Mastzellen stammen könnten. So war zum Beispiel das Gen CLEC2B (*C-type lectin domain family*), das für ein Mitglied der C-Typ-Lektin-Familie kodiert und wahrscheinlich eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten spielt (Eichler *et al.*, 2001), eindeutig in allen pathologischen Proben beider Mikroarray-Studien überexprimiert. Zwei weitere Gene, IL-32 und TNFSF13B (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily*) wiesen ebenfalls erhöhte Transkriptmengen auf. Goda *et al.* (2006) zeigten, dass aktivierte T-Lymphozyten eine erhöhte Interleukin 32-Expression aufweisen. Das Gen TNFSF13B kodiert für ein Zytokin, das zur TNF-Liganden-Familie gehört und ein potenter Aktivator von B-Lymphozyten ist (Claudio *et al.*, 2002).

Ein Problem bei den hier durchgeführten Mikroarray-Studien war, dass die für die Überexpression der Gene verantwortlichen somatischen Zelltypen nur indirekt über die Genfunktion erschlossen werden konnten. Die Ergebnisse lassen aber die Vermutung zu, dass entzündungsähnliche Prozesse ein allgemeines Symptom in allen pathologischen Proben sein könnten. Vor diesem Hintergrund könnten antiinflammatorische, entzündungshemmende Therapien zumindest in den „milderen“ Formen von Spermatogenesestörungen erneut in Betracht gezogen werden, deren Erfolg in der Vergangenheit bisher fragwürdig geblieben ist. Letztendlich sind bisher weder die molekularen Mechanismen, durch die die somatischen Zellen den Prozess der Spermatogenese beeinflussen, noch die reziproken Effekte der Spermatogenese auf die Genexpression in dem somatischen Kompartiment komplett verstanden. Demnach könnte die Überexpression von diesen Genen lediglich ein Symptom der Spermatogenesestörungen sein. Auf der anderen Seite könnte die Überexpression aber auch Folge einer Dysfunktion von somatischen Zellen sein, die zur Entstehung von unerklärten Spermatogenesedefekten beiträgt.

#### **4.4 Direkter Vergleich der beiden Mikroarray-Plattformen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mikroarray-Analyse die geeignete Methode ist, das komplexe Genexpressionsmuster des humanen Hodens global zu erfassen sowie morphologisch unterscheidbare Hodenpathologien auf molekularer Ebene zu beschreiben. Dieses Ergebnis wurde anhand von zwei unterschiedlichen Plattformen erarbeitet. Bei der Auswertung der Daten kam es darauf an, die für die jeweilige Plattform geeigneten Algorithmen zu verwenden, um biologisch zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, die miteinander verglichen werden konnten. Obwohl sich die beiden Array-Typen in ihrem

Aufbau deutlich voneinander unterscheiden, zeigten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse eine große Übereinstimmung zwischen beiden Plattformen.

Ein grundlegender Unterschied zwischen den Plattformen besteht darin, dass beim CodeLink-System die 30-mer Oligonukleotide vorher synthetisiert und in einem kontaktlosen Verfahren auf eine dreidimensionale Gelmatrix aufgebracht werden. Im Gegensatz dazu erfolgt beim Affymetrix-System eine *in situ*-Synthese der 25-mer Oligonukleotide auf einer zweidimensionalen Oberfläche. Dies führte zu unterschiedlich starken Hybridisierungssignalen zwischen den beiden Plattformen (siehe unten). Weiterhin musste die Tatsache berücksichtigt werden, dass unterschiedlich umfangreiche Mikroarrays verwendet wurden. Während die hier verwendeten CodeLink *UniSet Human 20K I Bioarrays* ca. 20.000 Oligonukleotide enthalten, weisen die Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> *Human Genome U133 Plus 2.0* knapp 55.000 Oligonukleotide auf. Ein Nachteil der CodeLink-Arrays war somit, dass wichtige Testis-exprimierte Gene wie beispielsweise der LH-Rezeptor und die Protamin-Gene gar nicht auf den Arrays enthalten sind. Der Affymetrix-Array enthält demgegenüber oftmals verschiedene Transkriptvarianten für dasselbe Gen.

Während die CodeLink-Arrays in der Regel ein Oligonukleotid pro Gen enthalten, das zuvor validiert und aus drei Proben ausgewählt wurde, wird jedes Gen auf den Affymetrix-Arrays durch elf verschiedene Oligonukleotide repräsentiert. Ein Oligonukleotid pro Gen reicht nach Meinung von Hughes *et al.* (2001) aus, um differentielle Genexpression zu messen. Es ist insofern gegenüber multiplen Proben vorteilhaft, da mehrere Oligonukleotide pro Gen in ihrer Signalstärke übereinstimmen müssen, um als zuverlässiges Signal über dem Hintergrund detektiert zu werden. Auf der anderen Seite muss ein einzelnes Oligonukleotid sehr präzise gewählt werden, um gemeinsame Bereiche von Spleißvarianten abzudecken. Dies war bei den CodeLink-Arrays manchmal schwierig wie beispielsweise beim GAK (*cyclin G associated kinase*)- und CYP19A1-Gen (*cytochrome P450, family 19, subfamily A*), deren Oligonukleotide sich in der 3'-UTR des Gens befanden. Für beide gibt es Testis-spezifische Varianten, die nicht erfasst wurden.

Wie bei allen quantitativen Methoden ist auch bei Mikroarray-Experimenten die Stetigkeit der Methodik eine sehr wichtige Voraussetzung, um die technische Varianz möglichst gering zu halten und eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurden alle Bearbeitungsschritte für jede Patientenprobe auf die gleiche Weise durchgeführt. Ein Vorteil bei der Durchführung der Mikroarray-Experimente mit dem Affymetrix-System war, dass alle 35 Patientenproben parallel amplifiziert, markiert und hybridisiert wurden. Des Weiteren wurden für die cRNA-Herstellung die Reagenzien vereinigt und zum gleichen Zeitpunkt

verwendet. Anders war es im Falle der Studie mit der CodeLink-Plattform, in der es nicht möglich war, alle verwendeten Proben parallel zu bearbeiten, da die Hodenbiopsien zunächst während einer Periode von zwei Jahren gesammelt werden mussten. Des Weiteren wurde beim Affymetrix-System eine automatische Waschstation zum Waschen und Färben der Arrays verwendet. Dadurch war eine erhöhte Reproduzierbarkeit der Experimente im Vergleich zu den CodeLink-Arrays möglich, für die die Waschvorgänge manuell erfolgten. Ein weiterer Faktor für die höhere Reproduzierbarkeit bei der Affymetrix-Studie könnte die größere Homogenität individueller Patientenproben innerhalb der Replikatgruppen sein. So waren beispielsweise in der Affymetrix-Studie, wie bereits oben erwähnt, alle Patienten mit intakter Spermatogenese vasktomiert. Des Weiteren wiesen alle Score 5-Proben der Affymetrix-Studie einen kompletten Spermatogenese-arrest auf der Stufe der Spermatozyten auf, während in zwei Score 5-Proben der CodeLink-Studie in der Histologie auch ganz vereinzelt runde Spermatozoen beobachtet wurden. Da Score 5-Proben in der Praxis relativ selten vorkommen, wurden die beiden Proben trotzdem für die Analysen verwendet. Die größere Homogenität der Proben spiegelte sich tatsächlich in den Mikroarray-Ergebnissen wider. Die Streuung innerhalb der Score 10- und Score 5-Gruppe war im Falle der Affymetrix-Studie eindeutig geringer. Im Vergleich dazu zeigte die Varianz innerhalb der Score 8- und der Score 2-Gruppe keinen Unterschied zwischen beiden Mikroarray-Systemen. Aufgrund der im Affymetrix-System äußerst geringen Streuung hätte man bei der Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen den verschiedenen morphologischen Gruppen bei der Anwendung eines ANOVA-Tests ohne Vorfilterung der Daten (wie bei der CodeLink-Studie, vgl. Abschnitt 3.5.1) über 12.000 Transkripte erhalten, die trotz nachfolgender Bonferroni-Korrektur als statistisch signifikant zwischen den Score-Gruppen gegolten hätten. Dies macht deutlich, dass es sinnvoll und gerechtfertigt war, bei der Auswertung der Daten geringfügig unterschiedliche Statistikmethoden für beide Plattformen zu wählen.

In den letzten Jahren wurden einige Studien durchgeführt, die verschiedene kommerzielle Mikroarray-Plattformen miteinander vergleichen. Während ältere Studien eine beträchtliche Diskrepanz zwischen verschiedenen Plattformen beobachten (Kuo *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003), betonen neuere Studien eine hohe Korrelation zwischen unterschiedlichen Plattformen, speziell beim Vergleich von Affymetrix- mit CodeLink-Mikroarrays (Shippy *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; MAQC Consortium, 2006). Eine Erklärung dafür liegt darin, dass die älteren Studien die Mikroarray-Systeme miteinander verglichen haben ohne zuvor die Hintergrundsignale zu entfernen, was in einer großen Streuung zwischen den verschiedenen

Arrays resultierte. Nach Hintergrundfilterung wird dagegen eine deutlich bessere Korrelation zwischen dem Affymetrix- und CodeLink-System beobachtet, wobei im letzteren die Streuung im niedrigen Fluoreszenzbereich geringer war. Weiterhin wurde ein höherer Prozentsatz an detektierten Signalen über dem Hintergrund erhalten (Shippy *et al.*, 2004). Dies deutet wiederum auf eine erhöhte Sensitivität der CodeLink-Arrays hin. Dabei ist es besonders wichtig, dass für jedes System ein individueller Schwellenwert für die Hintergrundkorrektur definiert werden muss, um zuverlässige Signale über dem Hintergrund zu erhalten. Dies wurde in dieser Arbeit berücksichtigt und für beide Plattformen zwei unterschiedliche, in der Literatur empfohlene Methoden angewendet (vgl. Abschnitt 2.2.2.3.5 und 2.2.2.4.4). Dieses Vorgehen resultierte in einem mittleren Prozentsatz der detektierten Signale von über 50 % bei der Affymetrix- und von 70 % bei der CodeLink-Plattform. Da die Arrays hinsichtlich der Anzahl der Oligonukleotide unterschiedlich umfangreich sind, ist es schwierig, diese Prozentsätze miteinander zu vergleichen. Analog zu den Beobachtungen von Shippy *et al.* (2004) war bei den Affymetrix-Arrays die Streuung im niedrigen Fluoreszenzbereich (vgl. Abbildung 3.22) größer. Ferner konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Fluoreszenzintensitäten der CodeLink-Arrays ( $\log_2$ -Fluoreszenzwerte im Bereich von 7-16) höher waren als bei den Affymetrix-Arrays ( $\log_2$ -Fluoreszenzwerte im Bereich von 4-12). Dies kann zum einen an der Mikroarray-Qualität liegen (die verwendeten Affymetrix-Arrays waren älter als die CodeLink-Arrays). Zum anderen können unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen und -längen sowie unterschiedliche Array-Oberflächen in variablen Signalintensitäten für Proben resultieren, die mit der gleichen Ziel-mRNA hybridisieren. Religio *et al.* (2002) beobachteten, dass 30- und 35-mer Oligonukleotide zwei bis fünffach höhere Signale im Vergleich zu 25-mer Oligonukleotide ergaben. Dies könnte dafür sprechen, dass 30-mer Oligonukleotide den besten Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität darstellen. Auf jeden Fall machen die Ergebnisse deutlich, dass bei Cross-Plattform-Vergleichen nie die absoluten Expressionswerte, sondern stets relative Expressionsunterschiede betrachtet werden sollten. Generell waren die Expressionsunterschiede der Gene, die in den verschiedenen Hodenpathologien überexprimiert waren, im Affymetrix-System größer als im CodeLink-System. Hinsichtlich der herunterregulierten Gene, die in beiden Systemen viel drastischere Expressionsänderungen zwischen den Score-Gruppen aufwiesen, konnte dies jedoch nicht beobachtet werden.

Eine der größten Schwierigkeiten beim Vergleich verschiedener Mikroarray-Plattformen stellt ohne Zweifel die Annotation von Gensequenzen dar. Trotz der Tatsache, dass das humane Genom vollständig sequenziert ist, ist die tatsächliche Anzahl der Gene immer noch



unbekannt. Gensequenzen werden oft modifiziert, was zur Folge hat, dass bis heute keine beständigen Annotations-Informationen erhältlich sind. Bei der Auswertung wurden für die Affymetrix- und CodeLink-Arrays jeweils Sequenzinformationen verwendet, die von unterschiedlichen Versionen der Gendatenbanken stammten. Somit können Abweichungen der Ergebnisse unter Umständen durch Unterschiede in der Genannotation zwischen den beiden Plattformen bedingt sein. Dies wurde auch des Öfteren beim Vergleich beider Plattformen beobachtet. Somit sollte sich der Anwender nie nur auf computergestützte Auswertungen verlassen, sondern in wichtigen Einzelfällen auch die *RefSeq*, *UniGene*, und *Entrez Gene* IDs einzelner differentiell exprimierter Gene miteinander vergleichen. Des Weiteren musste beachtet werden, dass manche Oligonukleotide auf den Arrays alternative Spleißvarianten des gleichen Gens abdecken, die unter Umständen ein anderes Expressionsmuster aufweisen können. Durch die höhere Anzahl der Oligonukleotide auf dem Affymetrix-Array wurden generell mehr Transkriptvarianten desselben Gens erfasst. Somit war es von vornherein schwierig, die genaue Anzahl der in den Genexpressionsstudien detektierten Gene bei beiden Plattformen exakt zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden für die virtuellen funktionellen Analysen die *UniGene* IDs als eindeutiger Identifier verwendet, die alle Transkriptvarianten sowie EST-Sequenzen desselben Gens unter einer Nummer zusammenfassen. Zum Beispiel gibt es für das CREM-Gen unter der *UniGene* ID Hs.200250 insgesamt 39 mRNA-Sequenzen mit unterschiedlichen *RefSeq* IDs sowie viele verschiedene EST-Sequenzen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, die als Aktivatoren oder Repressoren dienen. Auf den CodeLink-Arrays ist ein einziges Oligonukleotid für das CREM-Gen vorhanden, das den gemeinsamen Bereich der Spleißvarianten abdeckt und somit keine Stadien-spezifischen Unterschiede zwischen den Score-Gruppen zeigte. Im Unterschied dazu sind auf den Affymetrix-Arrays fünf Probensätze für verschiedene Transkriptvarianten des CREM-Gens vertreten, von dem die CREM $\tau$ -Transkriptvariante eindeutig Stadien-spezifisch exprimiert war.

Trotz der Problematik der Genannotation wurde aber eine beträchtliche Überschneidung zwischen beiden Mikroarray-Plattformen beobachtet. Diese Überschneidung betrifft hunderte von differentiellen Genen, die sowohl spezifisch in verschiedenen Keimzellstadien exprimiert als auch statistisch signifikant in bestimmten Hodenpathologien überexprimiert waren.

Da die Firma Affymetrix die ersten kommerziellen Mikroarrays auf den Markt gebracht hat und auch bis heute Marktführer ist, wurden in den letzten Jahren einige frei zugängliche Softwareprogramme entwickelt, die speziell für die Auswertung von Affymetrix-Arrays geeignet sind, wie zum Beispiel das Software-Paket für die Qualitätskontrolle der Arrays vor

der Normalisierung (vgl. Abschnitt 3.4). Analog dazu verknüpft das frei zugängliche Programm AMEN, das in dieser Arbeit verwendet wurde, die Probensatz-Nummern der Affymetrix-Arrays direkt mit den *RefSeq*, *UniGene*, *Entrez Gene* und *Interpro* IDs, die Überrepräsentationsanalysen von biologischen Prozessen entscheidend erleichtern. Aus diesem Grund wurden die funktionellen Annotierungen anhand der Ergebnisse des Affymetrix-Systems durchgeführt. Dennoch erscheinen mittlerweile immer mehr Programme, die ebenfalls die Auswertung von CodeLink-Arrays sowie derjenigen von Agilent Technologies erleichtern.

Im Vergleich zu anderen Mikroarray-Plattformen (z.B. von Agilent Technologies, Applied Biosystems und Eppendorf) weisen die CodeLink- und Affymetrix-Plattform hinsichtlich der Oligonukleotid-Länge und der Probenherstellung die meisten Ähnlichkeiten auf. Bei der Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen zwei Gewebeproben zeigten sie im Vergleich zu anderen Systemen eine beträchtliche Inter-Plattform Übereinstimmung (MAQC Consortium, 2006). Analog zu den hier erzielten Ergebnissen zeigte sich ferner, dass CodeLink-Arrays hinsichtlich der Sensitivität den Affymetrix-Arrays überlegen sind, während letztere eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen (MAQC Consortium, 2006).

Die hohe Übereinstimmung der Resultate hinsichtlich verschiedener Mikroarray-Plattformen sollte es in Zukunft ermöglichen, Daten zwischen verschiedenen Plattformen auszutauschen und diese über Cross-Plattform-Vergleiche zu validieren. Somit eröffnen sich neue Möglichkeiten, das Verständnis komplexer biologischer Prozesse auf Transkriptom-Ebene zu erweitern.

Zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mit einer weiteren, unabhängigen Quantifizierungsmethode wurden in dieser Arbeit insgesamt 39 ausgewählte Gene mittels der real-time RT-PCR untersucht. Bei diesen Genen handelte es sich sowohl um solche, deren mRNA-Level mit fortschreitender pathologischer Veränderung ab- bzw. zunahmen (vgl. PAM-Gruppen 1-5) als auch um solche, deren mRNA-Mengen durch die An- bzw. Abwesenheit von Keimzellen nicht beeinflusst wurden (z.B. FSHR-Gen). Die in den Mikroarray-Analysen beobachteten Expressionsprofile konnten für über 80 % der Gene mit dieser unabhängigen Methode bestätigt werden. Der hohe Prozentsatz an Übereinstimmung beweist, wie robust und zuverlässig Mikroarrays für die Durchführung von globalen Genexpressionsstudien heute geworden sind. Dabei ließen sich alle Gene der Gengruppen 1-4, die große Expressionsunterschiede zwischen den morphologisch unterschiedlichen Score-Gruppen aufwiesen, validieren. Im Vergleich dazu zeigten manche Gene, deren mRNA-Level sich gar nicht oder nur geringfügig zwischen den Score-Gruppen unterschieden, in der real-

time RT-PCR ein abweichendes Ergebnis. Diese Abweichungen können verschiedene Ursachen haben. Generell sind geringe Expressionsunterschiede in einer quantitativen RT-PCR schwieriger zu erfassen, da technische Varianzen wie beispielsweise geringfügige Abweichungen bei der Herstellung der cDNA zu einer zufälligen Streuung der Messwerte um den tatsächlichen Wert führen können. Dennoch können gerade geringe Expressionsunterschiede biologisch von Bedeutung sein, wie die überexprimierten Gene in den verschiedenen Hodenpathologien gezeigt haben. Bei abweichenden Resultaten in der Validierung sollte im Einzelfall zudem überprüft werden, aus welchem Bereich des Gens das Oligonukleotid auf dem Mikroarray ausgewählt wurde und ob die Annotierung richtig ist.

Analog zu Hild *et al.* (2003) wurde hier beobachtet, dass die Mikroarray-Technologie im Vergleich zu anderen Methoden wie der *in situ*-Hybridisierung sensitiver ist. Beispielsweise konnte die mRNA des CRISP1-Gens bislang nur im Nebenhoden nachgewiesen werden (Krätzschar *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Gen in testikulären Biopsieproben von Patienten mit intakter Spermatogenese eindeutig wenn auch nur schwach exprimiert ist.

Abschließend soll betont werden, dass es in dieser Arbeit erstmalig möglich war, differentiell exprimierte Gene zwischen verschiedenen Hodenpathologien mit zwei unterschiedlichen Mikroarray-Plattformen zu erfassen und mit einer weiteren unabhängigen quantitativen Methode zu validieren, so dass zuverlässige Aussagen hinsichtlich der erhaltenen Ergebnisse auf Transkriptom-Ebene getroffen werden konnten.

## 4.5 Ausblick

Mittels der globalen Genexpressionsanalyse war eine molekulare Klassifizierung verschiedener humaner Hodenpathologien möglich, die zunächst einmal völlig unabhängig von der Proteinebene ist. Da die funktionelle Ebene jedoch die Proteinebene ist, sollten in einem nächsten Schritt Analysen auf Proteinebene durchgeführt werden, um zu untersuchen, in wie weit die Menge einzelner Transkripte mit der jeweiligen Proteinmenge im Hoden assoziiert ist. Über das quantitative Verhältnis zwischen „Transkriptom“ und „Proteom“ gibt es gegenwärtig nur wenig gesicherte Informationen. Es ist aber zu erwarten, dass in vielen Fällen keine direkte Korrelation besteht (Gronborg *et al.* 2006; Nissom *et al.*, 2006). Gründe hierfür sind beispielsweise unterschiedliche Umsatzraten von mRNAs, mögliche Regulationsvorgänge auf der Ebene der Translation oder unterschiedliche Stabilitäten von Proteinen mit verschiedenen Funktionen (z. B. Enzyme, Strukturproteine).

Ferner sollte eine weiterreichende Charakterisierung der Immunzellen im Hoden, vor allem der Mastzellen, ihrer Produkte und Zielzellen erfolgen, um ihre Funktionen im Hoden unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser zu verstehen. Dies wäre auch insofern wichtig, um mögliche Ansatzpunkte einer konservativen Therapie bei infertilen Männern in Zukunft besser abschätzen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Männliche Infertilität stellt ein Hauptgesundheitsproblem dar und betrifft weltweit 12-15 % aller Paare im reproduktionsfähigen Alter. In der Mehrheit der Fälle liegt eine Spermatogenesestörung unbekannter Ursache vor, und kausale Therapien sind gegenwärtig nur bei einer Minderheit von Patienten möglich. Bislang wurden nur wenige kleine Studien durchgeführt, um die globalen Genexpressionsmuster von gesunden und pathologisch veränderten humanen Hoden mittels der Mikroarray-Technologie zu erfassen. In dieser Arbeit wurde erstmals ein solcher Versuch im großen Maßstab durchgeführt. Um morphologisch klar definierte Hodenpathologien auf molekularer Ebene zu klassifizieren, wurden insgesamt 63 individuelle humane Hodenbiopsien mittels zweier unterschiedlicher Mikroarray-Plattformen charakterisiert. Verschiedene *Clustering*-Methoden zeigten, dass der molekulare Phänotyp bzw. die molekulare Signatur der verschiedenen Hodenpathologien mit der morphologischen Klassifizierung der Hodenbiopsien korrelierte.

Der fortschreitende Verlust bestimmter Keimzellstadien in den verschiedenen Hodenpathologien konnte zur Aufdeckung Stadien-spezifischer Genexpressionsprofile im humanen Hoden ausgenutzt werden. Mit Hilfe von statistischen Methoden (ANOVA und Permutationsanalysen) konnten tausende von Genen identifiziert werden, die mit hoher statistischer Signifikanz differentiell zwischen den verschiedenen Subtypen exprimiert waren. Die Mehrheit der Gene war Testis- bzw. Keimzell-spezifisch und nahm mit fortschreitender Degeneration der Spermatogenese ab. Dies spiegelte im Wesentlichen den Verlust der korrespondierenden mRNA-exprimierenden Zellen wider. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Gene eine wichtige Rolle für den zeitlichen Ablauf der humanen Spermatogenese spielen. Durch Clusteranalysen wurden Gengruppen mit unterschiedlichen Transkriptionsprofilen identifiziert, die charakteristisch für die prä-/meiotische und postmeiotische Phase der Spermatogenese sind. Es war sogar bedingt möglich, zwischen Genen verschiedener Spermatidenstadien zu unterscheiden.

Eine kleinere Anzahl von Genen zeigte eine Zunahme der Transkriptmengen in Hodenpathologien im Vergleich zu intakter Spermatogenese. Diese überexprimierten Gene spiegelten auf molekularer Ebene histologische Veränderungen der somatischen Zelltypen des Hodens wider, die mit Spermatogenesestörungen assoziiert werden, unter anderem die testikuläre Fibrose und die Aktivierung bzw. Infiltration von Immunzellen einschließlich Mastzellen. Eine Überexpression dieser Gene wurde in allen pathologischen Proben beobachtet. Ihre gezielte Inhibition offenbart somit neue Möglichkeiten bei der Therapie von männlicher Infertilität.

## 5 Summary

Male infertility is a major health problem, affecting 12-15 % of reproductive aged couples worldwide. Still, in a majority of cases no cause of the infertility can be found and causal treatment can only be offered to a small minority of patients. As yet, few studies have used microarray technology to compare global gene expression patterns of the „normal“ and the “diseased” human testis. In order to describe distinct human testicular pathologies in molecular terms, 63 testicular biopsies were categorized by their ‘expression phenotypes’ employing two different microarray platforms. It could be shown by different clustering procedures that the molecular signature of the different pathologies correlated with the histological preclassification of the testicular biopsies based on a morphological score count system.

The progressive loss of specific germ cell stages in the distinct pathologies was further exploited to reveal stage-specific gene expression profiles of the human testis. By using analysis of variance (ANOVA) and permutation analysis, differentially expressed genes between the pathological subgroups were filtered that exhibit high statistical significance. The vast majority of these genes were testis- or germ cell-specific and decreased with progressive impairment of spermatogenesis, largely reflecting loss of the corresponding mRNA-expression cells. It could be shown that these genes play an important role throughout human spermatogenesis. By using different cluster analysis groups of genes with distinct transcriptional profiles could be built that were characteristic of the pre-/meiotic and post-meiotic phases of spermatogenesis. It was even possible to distinguish between genes which are specifically expressed in early and late stages of spermatid differentiation.

A smaller subset of genes showed increased transcript levels in testicular pathologies as compared to normal spermatogenesis. These over-expressed genes reflected on the molecular level histological changes of the somatic cells which are associated with impaired spermatogenesis, i.e. testicular fibrosis and infiltration of immune cells, including mast cells. Over-expression of these genes was a common signature of all pathological samples, possibly offering new opportunities for the management of male infertility.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alastalo TP, Lonnstrom M, Leppa S, Kaarniranta K, Pelto-Huikko M, Sistonen L and Parvinen M (1998) Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Exp Cell Res* 240, 16-27.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Almstrup K, Nielsen JE, Hansen MA, Tanaka M, Skakkebaek NE and Leffers H (2004) Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 70, 1751-1761.
- Alwine JC, Kemp DJ and Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354.
- Andersson AM, Jorgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De Meyts E and Skakkebaek NE (2004) Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3161-3167.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Benjamini Y and Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57, 289-300.
- Benoist C and Mathis D (2002) Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 420, 875-878.
- Biggiogera M, Fakan S, Leser G, Martin TE and Gordon J (1990) Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Mol Reprod Dev* 26, 150-158.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M and Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-193.
- Bonferroni CE (1936) Teoria statistica classi e calcolo delle probabilità. *Pubbl R Int Super Sci Econ Comm Firenze* 8: 1-62.
- Brazma A and Vilo J (2000) Gene expression data analysis. *FEBS Lett* 480, 17-24.
- Breckwoldt M, Neumann F and Bräuer H (1991) Die Hormone der Zona reticularis. *Exempla endocrinologica. Bildatlas zur Physiologie und Morphologie des endokrinen Systems. Medical Services, München, Band 1.*
- Brown PO and Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21, 33-37.
- Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy EM and O'Brien DA (1998) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 58, 834-841.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- Campbell NA, Reece JB and Mitchell LG (1999) *Biology*, 5th ed: Pearson Benjamin Cummings San Francisco.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H and Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3, 958-965.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 112, 35-51.
- Cleveland WS and Devlin SJ (1988) Locally-weighted regression: An approach to regression analysis by local fitting. *J Am Statist Assoc* 83 596 - 610.
- Dadoune JP, Siffroi JP and Alfonsi MF (2004) Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.
- Davis JT and Ong DE (1992) Synthesis and secretion of retinol-binding protein by cultured rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 47, 528-533.

- De Cesare D, Fimia GM and Sassone-Corsi P (2000) CREM, a master-switch of the transcriptional cascade in male germ cells. *J Endocrinol Invest* 23, 592-596.
- de Kretser DM (2004) Editorial: Is spermatogenic damage associated with Leydig cell dysfunction? *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3158-3160.
- de Kretser DM (1997) Male infertility. *Lancet* 349, 787-790.
- de Kretser DM and Baker HW (1996) in *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*, eds. Adashi EY, Rock J A and Rosenwaks Z (Lippincott-Raven, Philadelphia), 2031-2062.
- de Kretser DM and Baker HW (1999) Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3443-3450.
- de Kretser DM and Holstein AF (1976) Testicular biopsy and abnormal germ cell. Hafez, ESE (ed) *Human Semen and Fertility Regulation in Men* Mosby, St Louis, 332-343.
- de Kretser DM, Huidobro C, Southwick GJ and Temple-Smith PD (1998) The role of the epididymis in human infertility. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 271-275.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P and Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21, 10-14.
- Dysvik B and Jonassen I (2001) J-Express: exploring gene expression data using Java. *Bioinformatics* 17, 369-370.
- Eddy EM (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57, 103-128.
- Edgington ES (1995) *Randomization tests*. New York: Marcel-Dekker 3rd ed.
- Eichler W, Ruschpler P, Wobus M and Drossler K (2001) Differentially induced expression of C-type lectins in activated lymphocytes. *J Cell Biochem* 81, 201-208.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- el-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttill A, Elton R, James K and Chisholm GD (1987) Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril* 48, 470-479.
- Engel W, Keime S, Kremling H, Hameister H and Schluter G (1992) The genes for protamine 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenet Cell Genet* 61, 158-159.
- Evans EA, Zhang H and Martin-DeLeon PA (2003) SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 54.
- Fawcett DW and Phillips DM (1969) Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J Reprod Fertil (Suppl)* 6, 405-418.
- Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W and Spiess AN (2007) A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 13, 33-43.
- Fimia GM, De Cesare D and Sassone-Corsi P (1999) CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398, 165-169.
- Fimia GM, Morlon A, Macho B, De Cesare D and Sassone-Corsi P (2001) Transcriptional cascades during spermatogenesis: pivotal role of CREM and ACT. *Mol Cell Endocrinol* 179, 17-23.
- Fitzgerald J, Hutchison WM and Dahl HH (1992) Isolation and characterisation of the mouse pyruvate dehydrogenase E1 alpha genes. *Biochim Biophys Acta* 1131, 83-90.
- Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP and Adams CL (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364, 555-556.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT and Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-773.
- Foresta C, Moro E and Ferlin A (2001) Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22, 226-239.
- Fox MS, Ares VX, Turek PJ, Haqq C and Reijo Pera RA (2003) Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Mol Reprod Dev* 66, 403-421.
- Freeman WM, Robertson DJ and Vrana KE (2000) Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29, 1042-1046, 1048-1055.
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM and Mayerhofer A (2002) Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15072-15077.



- Gautier L, Cope L, Bolstad BM and Irizarry RA (2004) affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307-315.
- Gershon D (2002) Microarray technology: an array of opportunities. *Nature* 416, 885-891.
- Giorgini F, Davies HG and Braun RE (2002) Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development* 129, 3669-3679.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R and Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.
- Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S and Izuhara K (2006) Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol* 18, 233-240.
- Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H et al. (2006) Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 5, 157-171.
- Gruber BL (2003) Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 5, 147-153.
- Gu CC, Rao DC, Stormo G, Hicks C and Province MA (2002) Role of gene expression microarray analysis in finding complex disease genes. *Genet Epidemiol* 23, 37-56.
- Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT et al. (1998) Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod* 59, 1266-1274.
- Gupta AS, Kothari LK and Bapna RB (1975) Surgical sterilization by vasectomy and its effects on the structure and function of the testis in man. *Br J Surg* 62, 59-63.
- Hansel NN and Diette GB (2007) Gene expression profiling in human asthma. *Proc Am Thorac Soc* 4, 32-36.
- Hargreave TB (2000) Genetics and male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 12, 207-219.
- Hauser R, Botchan A, Amit A, Ben Yosef D, Gamzu R, Paz G, Lessing JB et al. (1998) Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia--is it necessary? *Hum Reprod* 13, 3081-3085.
- Hauser R, Botchan A, Yogev L, Gamzu R, Ben Yosef D, Lessing JB, Amit A et al. (2002) Probability of sperm detection in nonobstructive azoospermic men undergoing testicular sperm extraction procedures unrelated to clinical parameters. *Arch Androl* 48, 301-305.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P et al. (2001) Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539-548.
- Hedger MP (2002) Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol* 57, 19-34.
- Hedger MP (1997) Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 2, 38-47.
- Heller CG and Clermont Y (1963) Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 140, 184-186.
- Heller CH and Clermont Y (1964) Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. *Recent Prog Horm Res* 20, 545-575.
- Herschlein HJ and Lechner W (1974) The diagnosis and treatment of pelvic adhesions causing recurrent pelvic pain in cases with normal findings on pelvic palpation (author's transl). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 34, 303-306.
- Hess H, Heid H and Franke WW (1993) Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol* 122, 1043-1052.
- Hild M, Beckmann B, Haas SA, Koch B, Solovyev V, Busold C, Fellenberg K et al. (2003) An integrated gene annotation and transcriptional profiling approach towards the full gene content of the Drosophila genome. *Genome Biol* 5, R3.
- Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T et al. (2002) Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res* 62, 233-240.
- Holdcraft RW and Braun RE (2004) Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27, 335-342.
- Holm M, Rajpert-De Meyts E, Andersson AM and Skakkebaek NE (2003) Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. *J Pathol* 199, 378-386.
- Holstein AF and Rossen-Runge EC (1981) Atlas of Human Spermatogenesis. Grosse Verlag, Berlin.

- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM et al. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19, 342-347.
- Ihaka R and Gentleman R (1996) R: A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Statist* 5: 299-314.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O et al. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33, e56.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U and Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Jarow JP, Budin RE, Dym M, Zirkin BR, Noren S and Marshall FF (1985) Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy. A controlled study. *N Engl J Med* 313, 1252-1256.
- Jezek D, Banek L, Hittmair A, Pezerovic-Panijan R, Goluzza T and Schulze W (1999) Mast cells in testicular biopsies of infertile men with 'mixed atrophy' of seminiferous tubules. *Andrologia* 31, 203-210.
- Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1, 2-25.
- Jongeneel CV, Delorenzi M, Iseli C, Zhou D, Haudenschild CD, Khrebtkova I, Kuznetsov D et al. (2005) An atlas of human gene expression from massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res* 15, 1007-1014.
- Kainz P (2000) The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 1494, 23-27.
- Kanaar R, Troelstra C, Swagemakers SM, Essers J, Smit B, Franssen JH, Pastink A et al. (1996) Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr Biol* 6, 828-838.
- Kaufman L and Rousseeuw P (1990) Finding groups in data, an introduction to cluster analysis. Brussels, Belgium: John Wiley & Sons.
- Kennedy RD and D'Andrea AD (2005) The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 19, 2925-2940.
- Kerr MK, Martin M and Churchill GA (2000) Analysis of variance for gene expression microarray data. *J Comput Biol* 7, 819-837.
- Ketola I, Rahman N, Toppari J, Bielinska M, Porter-Tinge SB, Tapanainen JS, Huhtaniemi IT et al. (1999) Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 140, 1470-1480.
- Kierszenbaum AL and Tres LL (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol* 65, 258-270.
- Kitamura K, Miyagawa Y, Iguchi N, Nishimura H, Tanaka H and Nishimune Y (2003) Molecular cloning and characterization of the human orthologue of the oppo 1 gene encoding a sperm tail protein. *Mol Hum Reprod* 9, 237-243.
- Kleene KC (2003) Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res* 103, 217-224.
- Kleene KC, Distel RJ and Hecht NB (1984) Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Dev Biol* 105, 71-79.
- Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P and Schleuning WD (1996) The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* 236, 827-836.
- Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L and Kohane IS (2002) Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18, 405-412.
- Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ and Laviolette M (2004) Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* 5, 21.
- Li SS (1990) Human and mouse lactate dehydrogenase genes A (muscle), B (heart), and C (testis): protein structure, genomic organization, regulation of expression, and molecular evolution. *Prog Clin Biol Res* 344, 75-99.

- Liu PY and Handelsman DJ (2003) The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update* 9, 9-23.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675-1680.
- Martin-du-Pan RC and Bischof P (1995) Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod* 10, 1940-1945.
- McCarrey JR, Kumari M, Aivaliotis MJ, Wang Z, Zhang P, Marshall F and Vandenberg JL (1996) Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGK-2 gene. *Dev Genet* 19, 321-332.
- McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Høeivang Hansen CE, de Kretser DM and Skakkebaek NE (2007) Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 22, 2-16.
- McVicar CM, O'Neill DA, McClure N, Clements B, McCullough S and Lewis SE (2005) Effects of vasectomy on spermatogenesis and fertility outcome after testicular sperm extraction combined with ICSI. *Hum Reprod* 20, 2795-2800.
- Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H and Mayerhofer A (2000) Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 74, 239-244.
- Meinhardt A and Schippe HC (2003) Immunologie des Hodens. Balance zwischen Immunprivileg und Entzündung *Reproduktionsmedizin Online*.
- Meng MV, Cha I, Ljung BM and Turek PJ (2000) Relationship between classic histological pattern and sperm findings on fine needle aspiration map in infertile men. *Hum Reprod* 15, 1973-1977.
- Miller D and Ostermeier GC (2006) Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol Obstet Fertil* 34, 840-846.
- Miyagawa Y, Tanaka H, Iguchi N, Kitamura K, Nakamura Y, Takahashi T, Matsumiya K et al. (2002) Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein alpha3 (cpalpha3). *Mol Hum Reprod* 8, 531-539.
- Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-958, 960, 962.
- Mueller O, Lightfoot S and Schroeder A (2004) RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control. *Agilent Technologies*.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Naef F, Hacker CR, Patil N and Magnasco M (2002) Characterization of the expression ratio noise structure in high-density oligonucleotide arrays. *Genome Biol* 3, PREPRINT0001.
- Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J et al. (2006) Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 86, 654-663.
- Neuvians TP, Gashaw I, Sauer CG, von Ostau C, Kliesch S, Bergmann M, Hacker A et al. (2005) Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *J Biotechnol* 117, 163-171.
- Nieschlag E and Behre HM (2000) *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.
- Nieschlag E, Buchter D, Von Eckardstein S, Abshagen K, Simoni M and Behre HM (1999) Repeated intramuscular injections of testosterone undecanoate for substitution therapy in hypogonadal men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51, 757-763.
- Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee SA and Tiraihi T (2004) CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod* 19, 124-128.
- Nissom PM, Sanny A, Kok YJ, Hiang YT, Chuah SH, Shing TK, Lee YY et al. (2006) Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. *Mol Biotechnol* 34, 125-140.

- Nistal M, Gonzalez-Peramato P and Paniagua R (2003) Diagnostic value of differential quantification of spermatids in obstructive azoospermia. *J Androl* 24, 721-726.
- Nistal M, Santamaria L and Paniagua R (1984) Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat (Basel)* 119, 155-160.
- Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W and Kirchhoff C (2005) Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol Hum Reprod* 11, 53-64.
- Okamoto O and Fujiwara S (2006) Dermato-pontin, a novel player in the biology of the extracellular matrix. *Connect Tissue Res* 47, 177-189.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P and Krawetz SA (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360, 772-777.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP and Krawetz SA (2004) Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429, 154.
- Passing H and Bablok (1983) A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 709-720.
- Pelletier RM and Byers SW (1992) The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20, 3-33.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Petersen C, Fuzesi L and Hoyer-Fender S (1999) Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of approximately 70 kDa. *Mol Hum Reprod* 5, 627-635.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Psarros M, Heber S, Sick M, Thoppae G, Harshman K and Sick B (2005) RACE: Remote Analysis Computation for gene Expression data. *Nucleic Acids Res* 33, W638-643.
- Quackenbush J (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2, 418-427.
- Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32 Suppl, 496-501.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE and Garbers DL (2001) A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12527-12531.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE and Garbers DL (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14869-14874.
- Raleigh D, O'Donnell L, Southwick GJ, de Kretser DM and McLachlan RI (2004) Stereological analysis of the human testis after vasectomy indicates impairment of spermatogenic efficiency with increasing obstructive interval. *Fertil Steril* 81, 1595-1603.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339, 62-66.
- Religio A, Schwager C, Richter A, Ansorge W and Valcarcel J (2002) Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 30, e51.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL et al. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.
- Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-160.
- Rockett JC, Patrizio P, Schmid JE, Hecht NB and Dix DJ (2004) Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res* 549, 225-240.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB and Mahmoud AMA (2000) *Who Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male*. Cambridge University Press.
- Rozen S and Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.

- Russell L (1977) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 148, 313-328.
- Russell LD (1978) The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anat Rec* 190, 99-111.
- Russell LD (1984) Spermiation – the sperm release process: Ultrastructural observations and unresolved problems. *Electron Microscopy in Biology and Medicine, Ultrastructure of Reproduction* (J Van Blerkom and PM Motta, eds), Chapter 5, Plenum Press New York, 46-65.
- Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF and Schulze W (1996) A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum Reprod* 11, 752-755.
- Sassone-Corsi P (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.
- Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO and Davis RW (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10614-10619.
- Schlatt S and Weinbauer GF (1994) Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* 17, 214-222.
- Schlecht U, Demougin P, Koch R, Hermida L, Wiederkehr C, Descombes P, Pineau C et al. (2004) Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility. *Mol Biol Cell* 15, 1031-1043.
- Schluter G, Kremling H and Engel W (1992) The gene for human transition protein 2: nucleotide sequence, assignment to the protamine gene cluster, and evidence for its low expression. *Genomics* 14, 377-383.
- Schuler GD (1997) Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 75, 694-698.
- Schultz N, Hamra FK and Garbers DL (2003) A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12201-12206.
- Schulze W, Knuth UA, Jezek D, Benson DM, Fischer R, Naether OG, Baukloh V et al. (1997) Intratesticular sperm extraction. Basis for successful treatment of infertility in men with ejaculatory azoospermia. *Adv Exp Med Biol* 424, 81-88.
- Schulze W, Thoms F and Knuth UA (1999) Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* 14 Suppl 1, 82-96.
- Seo JT and Ko WJ (2001) Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 24, 306-310.
- Shalon D, Smith SJ and Brown PO (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6, 639-645.
- Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C and Millar M (1994) Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101, 193-198.
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ et al. (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24, 1151-1161.
- Shi L, Tong W, Fang H, Scherf U, Han J, Puri RK, Frueh FW et al. (2005) Cross-platform comparability of microarray technology: intra-platform consistency and appropriate data analysis procedures are essential. *BMC Bioinformatics* 6 Suppl 2, S12.
- Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR and Griswold MD (2004) The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71, 319-330.
- Shippy R, Sendera TJ, Lockner R, Palaniappan C, Kaysser-Kranich T, Watts G and Alsobrook J (2004) Performance evaluation of commercial short-oligonucleotide microarrays and the impact of noise in making cross-platform correlations. *BMC Genomics* 5, 61.

- Shiraishi K, Takihara H and Naito K (2003) Quantitative analysis of testicular interstitial fibrosis after vasectomy in humans. *Aktuelle Urol* 34, 262-264.
- Sigg C and Hedinger C (1981) Quantitative and ultrastructural study of germinal epithelium in testicular biopsies with "mixed atrophy". *Andrologia* 13, 412-424.
- Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H and Van Steirteghem AC (1997) Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 12, 2422-2428.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E and Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16, 972-978.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spieß AN, Mueller N and Ivell R (2003) Amplified RNA degradation in T7-amplification methods results in biased microarray hybridizations. *BMC Genomics* 4, 44.
- Steger K, Failing K, Klonisch T, Behre HM, Manning M, Weidner W, Hertle L et al. (2001) Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum Reprod* 16, 709-716.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, Doenecke D et al. (1999) Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl* 20, 747-754.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D and Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 4, 939-945.
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE and Bergmann M (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 6, 219-225.
- Sturn A, Quackenbush J and Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18, 207-208.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J et al. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6062-6067.
- Syntin P and Cornwall GA (1999) Immunolocalization of CRES (Cystatin-related epididymal spermatogenic) protein in the acrosomes of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 60, 1542-1552.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES et al. (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2907-2912.
- Tan PK, Downey TJ, Spitznagel EL, Jr., Xu P, Fu D, Dimitrov DS, Lempicki RA et al. (2003) Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res* 31, 5676-5684.
- Tanaka H and Baba T (2005) Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62, 344-354.
- Tash JA, McCallum S, Hardy MP, Knudsen B and Schlegel PN (2002) Men with nonobstructive azoospermia have Leydig cell hypertrophy but not hyperplasia. *J Urol* 168, 1068-1070.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T et al. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.
- Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, Mori R and Mizuno K (2001) Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem* 276, 31449-31458.
- Turek PJ, Ljung BM, Cha I and Conaghan J (2000) Diagnostic findings from testis fine needle aspiration mapping in obstructed and nonobstructed azoospermic men. *J Urol* 163, 1709-1716.
- Turner RM, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL and Moss SB (1998) An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J Biol Chem* 273, 32135-32141.

- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1999-2009.
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD and Eberwine JH (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1663-1667.
- Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE and Carr DW (1999) Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol Endocrinol* 13, 705-717.
- von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG and Nieschlag E (1999) Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2496-2501.
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM et al. (2006) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 34, D173-180.
- Wrobel G and Primig M (2005) Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction* 129, 1-7.
- Wu DM, Jiang M, Zhang M, Liu XS, Korolkova YV and Tseng GN (2006) KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm* 3, 1469-1480.
- Yaman O, Ozdiler E, Seckiner I and Gogus O (1999) Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nephrol* 31, 519-523.
- Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S and Kamidono S (2000) Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod* 15, 1543-1547.
- Yang B, Wang H, Gao XK, Chen BQ, Zhang YQ, Liu HL, Wang Y et al. (2004) Expression and significance of Rap1A in testes of azoospermic subjects. *Asian J Androl* 6, 35-40.
- Yang J, Medvedev S, Reddi PP, Schultz RM and Hecht NB (2005) The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1513-1518.
- Yang J, Morales CR, Medvedev S, Schultz RM and Hecht NB (2007) In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod* 76, 48-54.
- Yeung KY and Ruzzo WL (2001) Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics* 17, 763-774.
- Zhang D, Chen J, Saraf A, Cassar S, Han P, Rogers JC, Brioni JD et al. (2006) Association of *Catsper1* or *-2* with *Ca(v)3.3* leads to suppression of T-type calcium channel activity. *J Biol Chem* 281, 22332-22341.

## 7 Anhang

### 7.1 Gefahrstoffinformation

Name	R- und S-Sätze	Gefahrensymbol
Chloroform	R22-38-40-48/20/22 S(2)-36/37	Xn
Essigsäure	R10-35 S23-26-36/37/39-45	C
Ethanol	R11 S(2)-7-16	F
Ethidiumbromid	R22-26-36/37/38-68 S26-28-36/37-45	T+
Ethylendiamintetraessigsäure	R36-52/53 S61	Xi
Formaldehyd	R23/24/25-34-40-43 S26-36/37/39-45	T
Formamid	R61 S53-45	T
Guanidinisothiocyanat	R20/21/22-32 S13-26-36-46	Xn
Guanidinhydrochlorid	R22-36/38 S13-26-36-46	Xn, Xi
Isopropanol	R11-36-67 S(2)-7-16-24/25-26	F, Xi
2-Mercaptoethanol	R20/22-24-34-51/53 S26-36/37/39-45-61	T, N
MES Hydrat	S22-24/25	-
MES Natriumsalz	S22-24/25	-
Natriumcitrat	S25	-
RNAPure (enthält Phenol)	R23/24/25-32-34-48/20/21/22-52/53-68 S26-36/37/39-45-61	T
Salzsäure	R34-37 S26-36/37/39-45	C



## 7.2 Veröffentlichungen

### Tagungen und Kongresse

Posterpräsentation auf dem Stoffwechselfreffen, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf am 18.08.2005:

Feig C, Kirchhoff C, Schulze W, Spiess AN. Molecular scoring of human testicular biopsies: Classification of infertility and identification of spermatogenesis-related genes.

Kurzvortrag auf dem *14th European Testis Workshop*, Bad Aibling, Deutschland vom 22 - 26.04.2006:

Feig C, Kirchhoff C, Schulze W, Ivell R und Spiess AN. Quantification of human spermatogenesis and testicular pathology by gene expression profiling.

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W und Spiess AN (2007). A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* 13, 33-43.

Wolski KM, Feig C, Kirchhoff C, Cameron DF (2007). Immortalized Sertoli cell lines sk11 and sk9 and binding of spermatids in vitro. *Asian J Androl.* 9(3):312-20.

Spiess AN\*, Feig C\*, Schulze W, Chalmel F, Capallo-Obermann H, Primig M und Kirchhoff C. Cross-Platform Gene Expression Signature of Human Spermatogenic Failure Reveals Inflammatory-like Response (eingereicht in *Human Reproduction*).

\* ANS and CF contributed equally

### 7.3 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Schulze aussprechen, der sich für das Fortbestehen unserer Arbeitsgruppe stets eingesetzt hat. Außerdem bedanke ich mich für seine fachlichen Diskussionen und die Bereitstellung zahlreicher Patientenproben, die die Durchführung dieses Projektes erst ermöglicht haben.

Bei Frau Prof. Dr. Kirchhoff möchte ich mich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, ihre gute Betreuung sowie für die ständige Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Außerdem danke ich ihr ganz herzlich für ihre eigene Begeisterung für die Forschung, die mich trotz der schwierigen Umstände stets motiviert hat.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Hahn für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Chemie.

Allen ehemaligen und noch anwesenden Mitgliedern der Andrologie danke ich für ihre Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit. Bei Herrn Dr. Andrej-Nikolai Spiess möchte ich mich vor allem für die Einarbeitung in die Mikroarray-Technologie und für seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Ganz besonders möchte ich Frau Martina Behnen und Frau Dr. Heike Cappallo-Obermann für ihre Ratschläge und steten Aufmunterungen danken. Frau Stefanie Reinhardt danke ich für ihre Hilfe bei der Aufarbeitung der Patientenproben.

Bei Herrn Prof. Dr. Primig möchte ich mich ganz herzlich für die tolle und reibungslose Kooperation bedanken, die es mir ermöglicht hat, in einer sehr kurzen Zeitspanne zahlreiche Mikroarray-Experimente durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich meinen Dank an Philippe Demougin und Frédéric Chalmel aussprechen, die mir bei der Durchführung der Experimente und der statistischen Auswertung stets zur Seite gestanden haben.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer liebevoll unterstützt und ermutigt haben.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Caroline Feig
Anschrift	Hudtwalckerstrasse 25b 22299 Hamburg
Geburtsdatum	15.12.1979
Geburtsort	Auchel (Frankreich)

### Schulbildung

1986-1990	Buttendick-Grundschule in Wesel
1990-1999	Andreas-Vesalius-Gymnasium in Wesel
1999	Abitur

### Hochschulstudium

10/1999-12/2003	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
06/2003-12/2003	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät der Ruhr-Universität Bochum
06/2004-05/2007	Promotion in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

### Tätigkeiten

01/2003-12/2003	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät der Ruhr- Universität Bochum Assistentin des Biochemischen Praktikums für Studenten der Medizin und der Biochemie
-----------------	---

## 7.5 Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Textstellen wurden als solche gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich anderweitig noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe und dass ich die Dissertation nur im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg eingereicht habe.

Hamburg, den .....

.....