

Testikuläre Gewebeshomogenität aus der Perspektive einer globalen Expressionsanalyse

Einleitung

Es steht immer noch zur Debatte, ob eine Biopsie des Hodens aus einem Areal repräsentativ ist für den Rest des Hodens (Refs).

Wir haben zur Beantwortung dieser Frage statt der klassischen Histopathologie die Microarray-Analyse benutzt. Dieser Ansatz ersetzt die optische Beurteilung der Histologie durch einen multiparametrischen Ansatz, in dem das Genexpressionsprofil von ~ 54000 Genen dazu dient, die Ähnlichkeit zweier Biopsien in Bezug auf ihr transkriptionelles Profil zu bestimmen. Da dieses Profil maßgeblich durch seinen zellulären Anteil bestimmt wird (Ref), besitzt man so ein sehr sensitives Instrument, um Abweichung im Anteil der Keimzellen in einer Biopsie zu bestimmen.

Material & Methoden

Humane Hoden-Biopsien von Männern mit verschieden starker Ausprägung der spermatogenen Störung wurden einem modifizierten *Johnsen*-Scoring unterworfen, um ein Kriterium für den spermatogenetischen Arrest zu erhalten (Ref).

8 Biopsien von Männern mit meiotischem Arrest wurden für eine anschließende RNA-Extraktion während der Operation konserviert. Total-RNA wurde aus den Biopsien mit der klassischen Phenol/Chloroform-Methode und anschließender Säulen-Aufreinigung isoliert. Der mRNA-Anteil wurde mittels T7-Polymerase und gleichzeitigem Einbau von Biotin-16-UTP amplifiziert, um so genug Transkripte für eine anschließende Hybridisierung auf U133V2 Affymetrix-Microarrays zu erhalten (Abb. 1).

Zu Klassifizierung der Proben wurde eine umfangreiche statistische Analyse der Daten mittels der Open-Source-Software R durchgeführt.

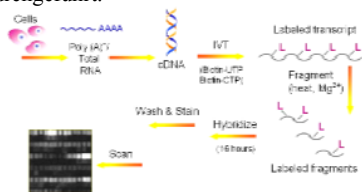


Abb. 1: Lineare Amplifikation der mRNA, Hybridisierung und Scannen.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 8 Hoden-Biopsien mittels der Microarray-Analyse untersucht. Hiefür wurden folgende Proben verwendet:

- 1) 3 Biopsien von Patient A aus dem linken Hoden (GELB).
- 2) 1 Biopsie von Patient B aus dem rechten Hoden (ROT).
- 3) 4 Biopsien von Patienten B, C, D, E (BLAU).

In einem ersten Ansatz wurden die Genexpressionsprofile der 8 Biopsien von Männern mit meiotischen Arrest (Johnsen Score 5) mittels hierarchischem Clustering nach ihrer Ähnlichkeit gruppiert (Abb. 2). Zu erwähnen ist hier, dass keine Gene gefiltert wurden, sondern das gesamte Profil aller 54000 Gene dafür benutzt wurde, eine molekulare Klassifizierung der Biopsien durchzuführen.

Es ist ersichtlich, dass die 3 Biopsien von Patient A am ähnlichsten sind (gelb), dann die Biopsie des kontralateralen Hodens desselben Patienten (rot), während die anderen 4 Patienten weiter entfernt clustern, welches eine verringerte Ähnlichkeit der Profile bedeutet.

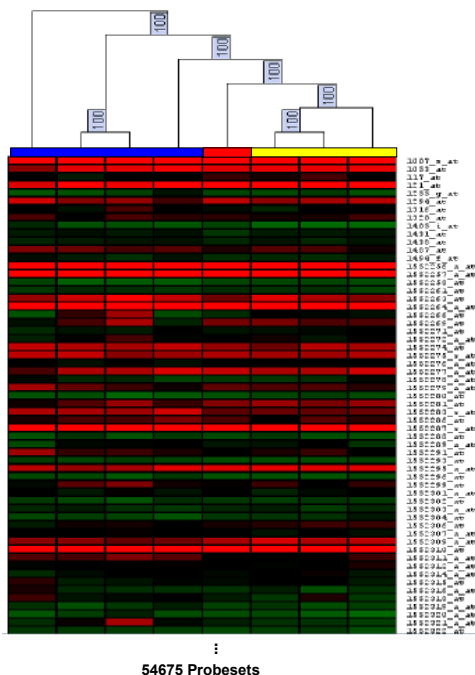


Abb. 2: Hierarchisches Clustering aller Gene

Dieses Bild zeigt sich auch bei der Darstellung mittels einer anderen Methode, der *Principle Component Analysis*, bei der große Datensätze auf ihre wesentliche Varianz reduziert werden (Abb.3)

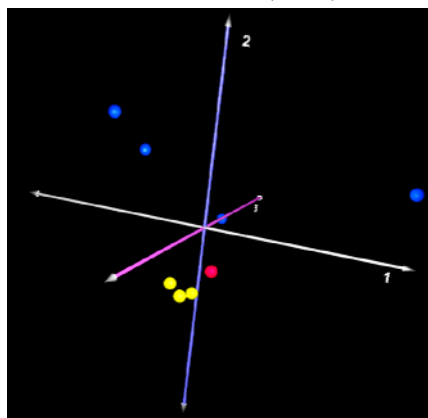


Abb. 3: PCA aller Gene, Darstellung der Proben

Zur Untersuchung derjenigen Gene, welche sich in den 8 Biopsien maximal unterscheiden und somit die Unterschiedlichkeit der Proben ausmachen, wurden 200 Gene mit der höchsten Varianz durch alle Proben ausgesucht (Abb. 4).

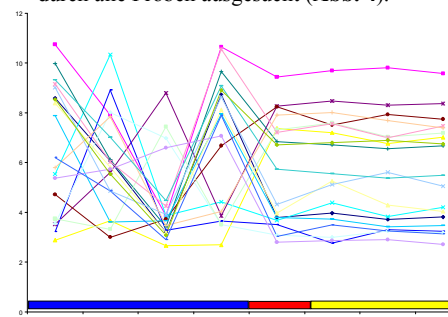


Abb. 4: 20 Hoch-variable Gene

Diese hoch-variablen Gene wurden einer sog. Gene Ontology-Analyse unterzogen, bei der überrepräsentierte Funktionen von Genen innerhalb einer Gruppe aufgedeckt werden. Hier zeigten sich Unterschiede in der Häufigkeit von Transkripten der Spermatogenese und inflammatorischen Antwort (z. B. Komplementkaskade, Abb. 5+6).

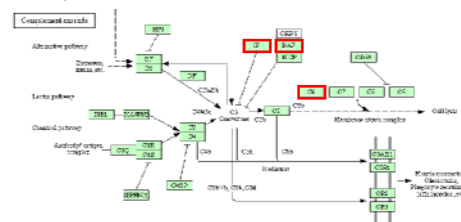


Abb. 5: Drei gefilterte Gene, die variabel zwischen den Biopsien sind und eine Rolle innerhalb der Komplementkaskade spielen

Hoch-variable Gene innerhalb des meiotischen Arrests

Spermatogenese (1.3E-3), Fusion Sperm/Ei (3.4E-2), Spermien-Motilität (6.1E-2)

Antigen-Prozessierung und -Präsentation (6E-5, 1E-3), Komplement-Aktivierung (1.9E-2), Inflammatorische Antwort (3.3E-2)

Tubuli seminiferi

Interstitialium

Abb. 6: Zusammenfassung der über-repräsentierten Funktionen der hoch-variablen Gene mit p-Werten

Schlußfolgerung

Die Genexpressionsprofile von Hoden-Biopsien mit meiotischem Arrest zeigen starke Ähnlichkeit, wenn sie aus demselben und dem kontralateralen Hoden kommen. Andere Patienten zeigen ein aberranteres Profil, welches hauptsächlich durch Gene der Spermatogenese und der inflammatorischen Antwort gekennzeichnet ist.