

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Humangenetik
Direktor Univ.-Prof. Dr. J. Horst

**Variabilität der Kopienzahl des TSPY-Gens auf dem Y-Chromosom unter besonderer
Berücksichtigung von Hodengewebe und Hodentumoren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Klamroth, Verena
aus Würzburg
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Heribert Jürgens

1.Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Horst

2.Berichterstatter: Frau Univ.-Prof. Dr. M. Simoni

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Humangenetik
Direktor Univ.-Prof. Dr. J. Horst
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Horst
Koreferent:

ZUSAMMENFASSUNG

Variabilität der Kopienzahl des *TSPY*-Gens auf dem Y-Chromosom unter besonderer Berücksichtigung von Hodengewebe und Hodentumoren

Klamroth Verena

TSPY- das „Testis-spezifische Protein des Y-Chromosoms“ – ist ein Protein, das auf dem Y-Chromosom kodiert wird und bisher nur in Hoden nachgewiesen werden konnte. In Hodentumoren und auch in Prostata-Carcinomen ist die Expression im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht. Das *TSPY*-Gen liegt in mehreren Kopien auf dem Y-Chromosom vor. Durch Southern Transfer-Untersuchungen konnten zwischen 30 und 60 *TSPY*-Genkopien nachgewiesen werden. Eine Y-Chromosom-Sequenzanalyse erfolgte bisher nur an einem einzelnen Individuum und zeigte 35 *TSPY*-Genkopien. Eine genaue Bestimmung der individuellen Variation der *TSPY*-Genkopienzahl wurde bisher nicht durchgeführt.

In dieser Arbeit erfolgt die präzise Quantifizierung der *TSPY*-Genkopienzahl durch Echtzeit-Polymerasekettenreaktion. Zunächst wurde die *TSPY*-Genkopienzahl an Blut gesunder Männer bestimmt. Es ergaben sich bei 51 Individuen Werte zwischen 26 und 180 Kopien, der Mittelwert lag bei 54 Kopien. Hinsichtlich der Fragestellung einer möglichen Rolle der *TSPY*-Genkopienzahl bei der erblichen Prädisposition für Hodentumoren erfolgte weiterhin eine Untersuchung an Blut von Seminompatien. Bei 13 Patienten konnten zwischen 29 und 60 *TSPY*-Genkopien mit einem Mittelwert von 46 Kopien nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bei diesen beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Da Tumoren vom gesunden Gewebe abweichende somatische Genamplifikationen mit Variationen der Kopienzahl aufweisen können, wurde zudem eine *TSPY*-Genkopienzahlbestimmung in gesunden Hodengewebe und in Hodentumoren durchgeführt. Die *TSPY*-Genkopienzahlen unterschieden sich in normalen und malignen Geweben nicht signifikant, im Gegensatz zu Blut war allerdings die Kopienzahl im gonadalen Gewebe mit durchschnittlich 179 *TSPY*-Genkopien signifikant erhöht.

Die *TSPY*-Genkopienzahl korreliert offensichtlich nicht mit der Prädisposition für die Ausbildung eines testikulären Tumors. Allerdings ergaben sich Hinweise auf eine physiologische somatische Variation der *TSPY*-Genkopienzahl.

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2004

INDEX

1	EINLEITUNG	5
1.1	Hodentumoren	5
1.2	TSPY	6
	TSPY-Gen	6
	TSPY-Genkopienzahl	7
	Das TSPY-Protein	7
	TTSN-Familie	8
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Die Polymerasekettenreaktion	10
	Prinzip der PCR	10
	Quantitative Echtzeit-PCR	11
2.2	Material	16
	Blut- und Gewebeproben	16
	Sonden und Starter	16
	PCR-Amplifikation	17
	DNA-Kalibrierung	18
3	ERGEBNISSE	19
4	DISKUSSION	26
5	ANHANG	31
6	LITERATUR	33
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung	39

1 EINLEITUNG

1.1 Hodentumoren

Hodenkrebs gehört mit einer Inzidenz von ca. 5/100 000 zu den häufigsten malignen Tumoren bei jungen Männern im Alter von 15 bis 35 Jahren. Als Risikofaktoren der Entstehung gelten anatomische Veränderungen wie Kryptorchismus und Leistenhernien und gonosomale Störungen, wie u. a. das Klinefelter-Syndrom (47, XXY) und die Gonadendysgenese (z.B. testikuläre Feminisierung). Eine familiäre Häufung weist auf eine erbliche Prädisposition mit dominantem Erbgang bei verminderter Penetranz oder auch rezessivem Erbgang hin (53), für erstgradig Verwandte besteht ein sechs- bis zehnfach erhöhtes Risiko. Auslösende Gene konnten bisher nicht identifiziert werden.

Keimzellen (Gameten) sind pluripotente Zellen, aus denen in den Testes die Spermien gebildet werden. Die Spermatogenese wird in die drei Phasen Spermatozytogenese, Meiose und Spermio-genese unterteilt. Bis zur Pubertät teilen und differenzieren sich die Gameten mitotisch zu Spermatogonien, aus denen sich lebenslang die primären Spermatozyten entwickeln. In der ersten Reifeteilung der Meiose werden diese zu sekundären Spermatozyten, aus denen in der zweiten Reifeteilung die haploiden Spermatisden entstehen. Während der Spermio-genese differenzieren sich diese ohne weitere Teilung zu Spermatozoen.

Aus den Gameten entwickeln sich die Keimzelltumoren. Man unterscheidet beim Mann Seminome (47%) und Nichtseminome. Letztere sind in absteigender Malignität (Choriokarzinom, embryonales Karzinom, Dottersacktumor, Germinom, Teratom) unterteilt, jedoch enthalten 30% aller Keimzelltumoren mehr als eine dieser vorgenannten histologischen Entitäten.

Hinsichtlich der Pathogenese und Progression von Keimzelltumoren wurden verschiedene Modelle entwickelt. Danach gehen Keimzelltumoren vermutlich aus einer malignen Transformation von primordialen Keimzellen in der Fötalzeit hervor. Carcinomata in situ (Cis) und Seminome können als Übergangsstufen hin zur malignen Transformation in Nichtseminome angesehen werden (Abbildung 1 (15)).

Modell zur Onkogenese von Hodentumoren (nach Heidenreich et al.)

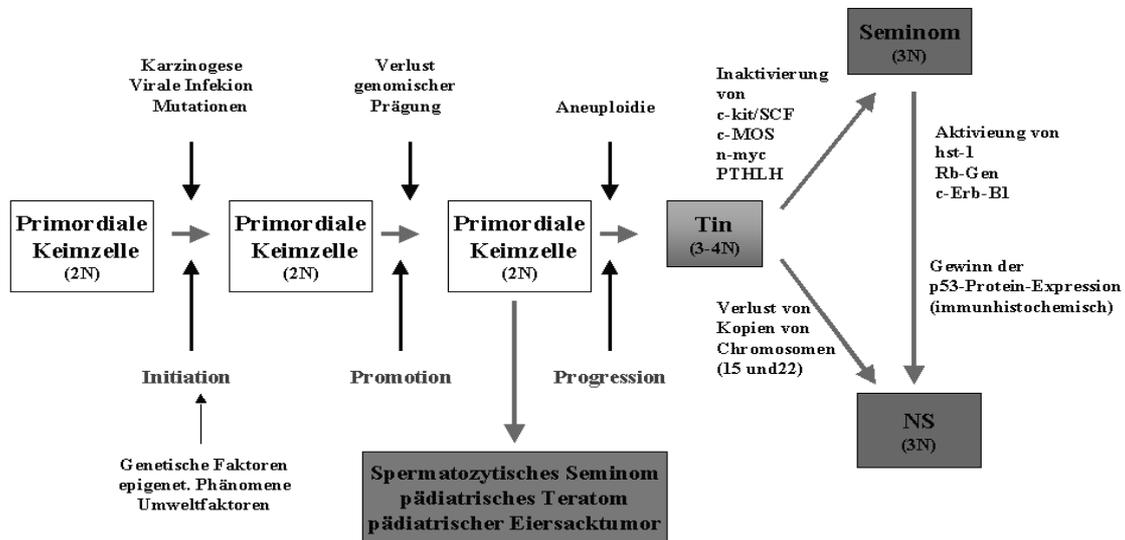


Abbildung 1 Modell zur Pathogenese von Hodentumoren; TIN = testikuläre intraepitheliale Neoplasie, NS = Nichtseminom

Auf die intrauterine Initiation folgen nach einem latenten Intervall von ca. 15 Jahren die Promotionsphase mit Verlust genomischer Prägung und die Progressionsphase mit Auftreten von Aneuploidien. Mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (u.a. *c-kit/SCF*, *c-MOS*, *n-myc*, *PTHLH*) bilden sich invasive Seminome. Am Ende dieser Kaskade stehen mit fortschreitender Aktivierung und Mutation von Onkogenen (u.a. p53) und Verlust von Chromosomenmaterial (u.a. 15, 22) die Nichtseminome (NSE).

Die meisten Studien über die Bedeutung des Y-Chromosoms bei der Tumorentwicklung basieren auf zytogenetischen Methoden, es gibt nur wenige molekulargenetische Analysen über Onkogene oder Tumorsuppressorgene auf dem Y-Chromosom, die möglicherweise in der frühen Phase der Tumorgenese eine Rolle spielen. (31).

1.2 TSPY

TSPY-Gen

Ein Gen, das möglicherweise in der Tumorgenese beteiligt ist, ist das Gen für das Testis-spezifische Protein auf dem Y-Chromosom (*TSPY*).

TSPY findet sich beim Menschen als heterogene Genfamilie auf dem Y-Chromosom.

Beim Menschen sind bisher mindestens neun *TSPY*-Gene (ca. 3% Divergenz) und fünf Pseudogene (ca. 1% Divergenz) (28, 61) identifiziert worden, die sich vor allem durch Variationen im Promotorbereich, eine 18bp-Duplikation und einzelne Nukleotidsubstitutionen unterscheiden. (28) Die beschriebenen *TSPY*-Gene enthalten sechs Exons, fünf Introns und eine Promotorregion unbekannter Länge. Das einzelne Gen ist 2,8 kb lang und in je ein 20kb-Element der DYZ5-Tandem-Wiederholungseinheiten eingebettet.(35)

***TSPY*-Genkopienzahl**

Die Zahl der *TSPY*-Genkopien ist sowohl individuell als auch bei verschiedenen Spezies variabel, sie wird z.B. bei der Ratte auf zwei, beim Rind auf 50 bis 200 (19), beim Menschen auf etwa 30 bis 60 geschätzt (35, 59). Die Sequenzierung der maskulinspezifischen Region (MRY) des Y-Chromosoms bei einem Individuum ergab 35 *TSPY*-Kopien im proximalen Bereich des kurzen Y-Arms (51).

Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Metaphase- und Interphasechromosomen und Hybridisierung mit cDNA-Sonden wiesen mehrere Genansammlungen nach: Eine auf dem proximalen kurzen Arm des Y-Chromosom im Intervall 3C von Yp11.2 (*TSPY* A), zudem mindestens drei weitere Loci auf dem kurzen und zwei auf dem langen Arm (*TSPY* B-F). (9)

Das *TSPY*-Protein

In Hodengewebe und Prostatakarzinomen konnten zwei Proteinprodukte *TSPY*-S und *TSPY*-L (nicht zu verwechseln mit *TSPYL*, dem Gen auf Chromosom 6) nachgewiesen werden. Das prädominierende Transkript ist *TSPY*-L (Synonym *TSPY*^{major}). *TSPY*-S wird durch die Nutzung einer alternativen Splice-Stelle generiert. Beide Peptide unterscheiden sich aufgrund einer Verschiebung im Leseraster in der Länge (294/308 Aminosäuren) und der C-terminalen Sequenz. (28)

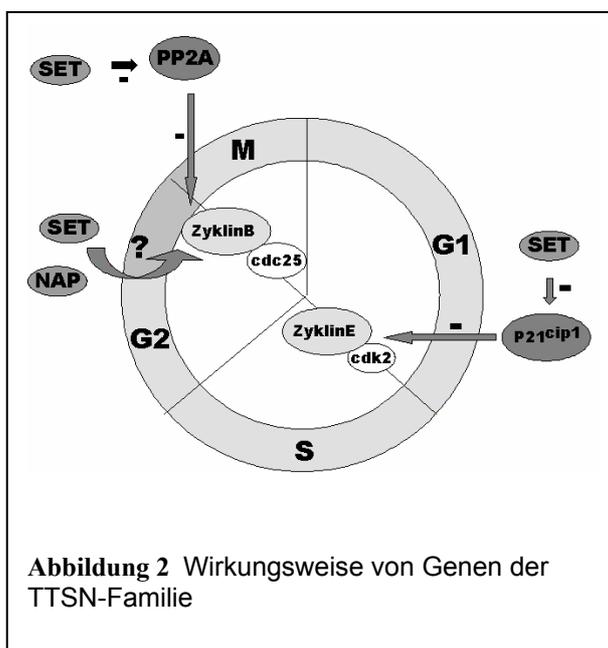
Die Funktion des *TSPY*-Proteins ist nicht bekannt. Schnieders (47) zeigte mit immunhistochemischen Methoden eine Anreicherung von *TSPY* in Spermatogonien und -zu einem kleineren Teil- in den primären Spermatozyten. Eine Bedeutung in der frühen Spermatogenese, beim Übergang von mitotischer Proliferation zu meiotischer Differenzierung, wird diskutiert.

TSPY-RNA-Transkripte sind sowohl in normalem Hodengewebe als auch in gonadalen Tumoren quantifiziert worden. Eine im Vergleich zu normalem Gewebe erhöhte Menge des Proteins wurde in reifen testikulären Seminomen, Carcinomata in situ der Testes und in Prostatakarzinomen nachgewiesen (29,47) *TSPY* wird auch in Gonadoblastomen, benignen Tumoren, die vor allem bei Patienten mit dysgenetischen Gonaden auftreten, überexprimiert.

TSPY liegt in der Y-chromosomalen Kandidatenregion von GBY, dem Gonadoblastom-induzierenden Faktor (55, 61)

TTSN-Familie

TSPY ist ein Mitglied der „TTSN-Familie“. Zu dieser Gruppe gehören u.a. *TSPYL* („*TSPY*-like“, ein *TSPY*-Homolog auf Chromosom 6), SET, NAP-1 (nucleosome assembly protein1) und CDA1 (cell division nuclear antigen1) (4, 18, 60, 61, 62).



Den Mitgliedern der TTSN-Familie scheint eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus in eukaryontischen Zellen zuzukommen. Der Zellzyklus wird am Übergang der vier Phasen M, G1, S und G2 durch Protein-Kinase-Komplexe kontrolliert, die aus zwei Teilen, der aktivierenden Untereinheit Zyklin und der katalytischen Untereinheit Cdk (Zyklin-abhängige-Kinase), bestehen. Zykline aktivieren CDK's, welche daraufhin spezifisch Substrate phosphorylieren, dies ist ein notwendiger Mechanismus zur Progression des Zyklus. Sowohl die Zykline als auch die Cdk's unterliegen hierbei einer Modulation durch

aktivierende und hemmende Proteine (12). Hier scheint ein Wirkungsort der TTSN's zu liegen. SET wirkt am Übergang der Phasen G1 –S und G2- M aktivierend; in vitro konnte die Bindung von SET und NAP an Zyklin B selbst nachgewiesen werden (11, 12, 32). Die Funktion von CDA 1 liegt - im Gegensatz zu SET und NAP - möglicherweise in einer Hemmung der Passage des Zellzyklus. (4, 11, 12, 23, 32, 50).

Ob und in welcher Weise *TSPY* selbst in den Zellzyklus eingreift, ist nicht bekannt. Es zeigt Homologie mit funktionellen Regionen von SET und wirkt möglicherweise ebenfalls in der Regulation des Zellzyklus ein. (61)

Als Zielsetzung dieser Arbeit sollte unter anderem die *TSPY*-Genkopienzahl im männlichen Genom und ihre interindividuelle Schwankung ermittelt werden. Des Weiteren sollte untersucht

werden, ob die Prädisposition für die Ausbildung eines Hodentumors mit der *TSPY*-Genkopienzahl korreliert ist. Immunhistochemische Untersuchungen an tumorösem Hodengewebe wie Carcinoma insitu, Seminomen und Gonadoblastomen haben gezeigt, dass *TSPY* in diesen nativen und malignen Geweben stark exprimiert wird. Es ist denkbar, dass dieses Phänomen auf einem *TSPY*-Gendosiseffekt beruht und damit auf eine genomische Amplifikation des *TSPY*-Gens bei Hodentumorpatienten zurückzuführen ist.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde die *TSPY*-Genkopienzahl in normalem Hodengewebe und in Blut von gesunden Männern mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion ermittelt und mit der Kopienzahl in Blut und testikulärem Gewebe von Hodentumorpatienten verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Polymerasekettenreaktion

Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung spezifischer Nukleinsäuren (DNA). Die Zielsequenz des Matrizenstrangs wird während der PCR exponentiell vervielfältigt.

Seit ihrer Entwicklung durch Mullis et al. 1986 hat die PCR vielfältige Modifizierungen und Verbesserungen erfahren, die jedoch alle dem gleichen Prinzip folgen: der Wiederholung eines dreistufigen Reaktionsaufbaus, dessen Einzelschritte sich alleine durch die Temperatur unterscheiden:

- 1.) Denaturierung der DNA-Doppelhelix mit Auftrennung in komplementäre Einzelstränge bei 95°C
- 2.) Hybridisierung der komplementären DNA-Sequenz mit Oligonukleotid-Startern, wobei die Hybridisierungstemperatur von Schmelzpunkt T_m des Oligonukleotids abhängig und somit für jedes Nukleotid unterschiedlich ist
- 3.) Polymerisationsreaktion mit Extension der hybridisierten Oligonukleotid-Starters in 5'-3'-Richtung durch die DNA-Polymerase

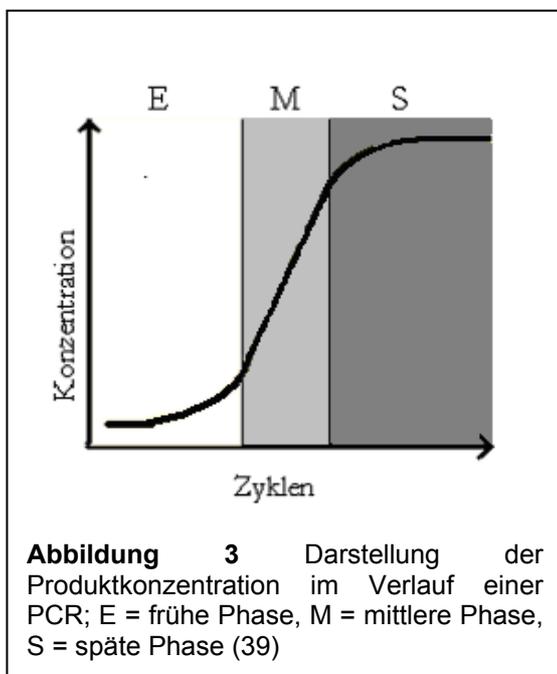
Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des Produktes. Bei 100%-iger Effizienz entstehen rechnerisch nach 20 Zyklen aus einem einzigen Fragment 10^6 Kopien.

In der Praxis zeigt die PCR nur eine Effizienz von ca. 70%, begründet v.a. durch die Konzentrationsunterschiede der einzelnen Komponenten während der Reaktion. (Tabelle 1(39))

Reagenzien	Konditionen zu Beginn der Reaktion				Konditionen nach 20 PCR-Zyklen				
	Menge in Gramm	Menge in Picomol	Konzentration	Verhältnis zu Fragment	Menge in Gramm	Menge in Picomol	Konz.	Verhältnis zu Schablone	Verhältnis zu Fragment
genomische DNA	1 μ g	5*10 ⁻⁷	5 fM	1	1 μ g	5*10 ⁻⁷	5 fM	1	10 ⁻⁶
Fragment (1kb)	0,3 pg	5*10 ⁻⁷	5 fM	1	0,3 pg	0,5	5 nM	10 ⁶	1
Jeder Starter	325 ng	50	0,5 μ M	10 ⁸	322 ng	49,5	0,495 μ M	10 ⁸	99
Jedes dNTP	2,88 μ g	5*10 ³	50 μ M	10 ¹⁰	2,78 μ g	4,8*10 ³	48 μ M	9,5*10 ⁹	9,5*10 ³
TaqDNA Polymerase	2 U	0,1	1 nM	2*10 ⁵	2 U	0,1	1 nM	2*10 ⁵	0,2

Tabelle 1: Konzentrationen der Reagenzien zu Beginn und nach 20 PCR-Zyklen (39)

Die Amplifikationskurve während der PCR zeigt einen sigmoiden Verlauf mit drei Phasen (Abbildung 3). In den ersten Zyklen (E) binden Starter aufgrund der Konzentrationsunterschiede vermehrt an zur Zielsequenz alternative Bindungsstellen und initiieren deren Amplifikation, was die Effizienz der PCR nur in den ersten Zyklen beeinflusst, da diese unspezifischen Produkte



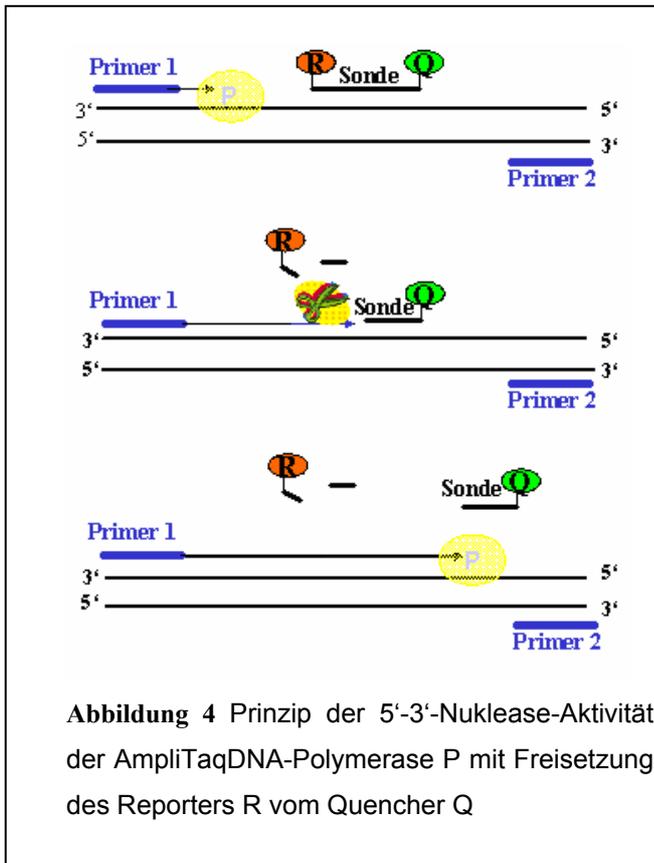
meist an ihrem Ende keine Bindungsstelle für den zweiten Starter besitzen und ihre Konzentration im weiteren Verlauf zu vernachlässigen ist.

In der mittleren Phase der PCR (M) sind die optimalen Bedingungen mit harmonischen Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner erfüllt und die Amplifikationskurve zeigt einen exponentiellen Anstieg mit einer Verdopplung der Zielsequenz in jedem Zyklus. Da in der späten Phase der PCR (L) die relativen Konzentrationen der Polymerase und weiterer Komponenten sinken und zudem

Bindungen zwischen komplementären Produkten entstehen, die nicht als Matrizen verfügbar sind, endet die Kurve in einem Plateau ohne signifikante weitere Amplifikation. Theoretisch besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge eines Fragmentes zu Beginn der Reaktion und der Kopienzahl nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen. Hierauf baut die quantitative Echtzeit-PCR (real-time PCR) zur Quantifizierung eines Gens auf, die Messung erfolgt in der exponentiellen Phase M der Reaktion bei jener Zykluszahl, nach der erstmals eine Akkumulation des Produkts erfasst wird (Abbildung 3).

Quantitative Echtzeit-PCR

Die angewandte Methode basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase. Zusätzlich zu den Reagenzien einer PCR (u.a. Primer, DNA-Polymerase) wird eine spezifisch zwischen die Starter an den Matrizenstrang bindende Sonde eingefügt, die am 5'-Ende durch den fluoreszenten Reporterfarbstoff VIC (Emission 550nm) markiert ist. Am 3'-Ende trägt sie den Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin, Emission 585 nm). Weiterhin ist im PCR-Puffer ein interner Referenz-Farbstoff ROX enthalten. Wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, so absorbiert der Quencher die Energie des Reporterfarbstoffs (Förster Resonanz Energie Transfer, FRET). Während der PCR führt die 5'-Exonukleaseaktivität der TaqMan-Polymerase zur Hydrolyse der Sonde, Trennung



der beiden interferierenden Farbstoffe und zu einem Anstieg der Reporteremission (Abbildung 4). Da für jedes amplifizierte Produkt genau ein Fluorophor freigesetzt wird, ist die Zunahme der messbaren Strahlung direkt proportional zur Menge der amplifizierten Sequenzen.

Die Auswertung erfolgte mit der im ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionssystem integrierten Software. Der Fluoreszenzanstieg wird mit Hilfe des ABI 7700 Sequence Detektors (Applied Biosystems) Zyklus für Zyklus erfasst. Das System besteht aus einem 96-Felder-Thermocycler, einem Argonlaser und einer CCD-Kamera (CCD: charge coupled device).

Emissionen zwischen 500 und 600 nm werden über lichtleitende Glasfaserkabel aufgefangen und durch

einen teildurchlässigen Spiegel auf einen Spektrographen fokussiert. Die Überlagerungsspektren der drei Farbstoffe werden von der CCD-Kamera nach Wellenlänge in ihre Farbanteile aufgetrennt und die Daten durch die integrierte Software analysiert. Die Emission wird im Abstand von wenigen Sekunden gemessen und der Anteil jedes Farbstoffs am erfassten Spektrum ermittelt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch fluktuierende, PCR-unabhängige Fluoreszenzen zu vermeiden, wird die Emission des Reporterfarbstoffs durch die Referenzfarbstoffemission dividiert.

$$\Delta R_n = \frac{\text{Reporterfarbstoffemission}}{\text{Referenzfarbstoffemission}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die Software des ABI 7700 Sequenz-Detektors verarbeitet die gewonnenen Daten. ΔR_n wird in jedem Zyklus berechnet und gegen die Zykluszahl aufgetragen. Der PCR-Zyklus, bei dem ΔR_n einen vorgewählten Schwellenwert erreicht und die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, wird als C_T bezeichnet. (Abbildung 5)

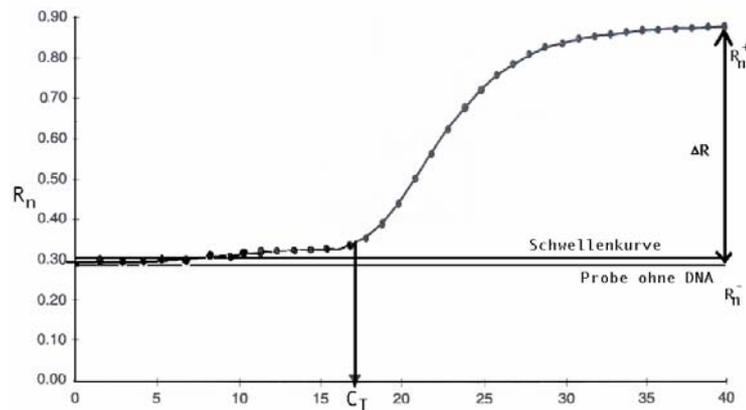


Abbildung 5 PCR-Amplifikationsschema zur Darstellung der Zyklusanzahl C_T , bei der die Reporterfluoreszenz R_n^+ die Hintergrundfluoreszenz R_n^- übersteigt

R_n wird logarithmisch aufgetragen und der Schwellenwert im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve, in dem keine Reaktionskomponente limitierend wirkt, gewählt (Abbildung 6)

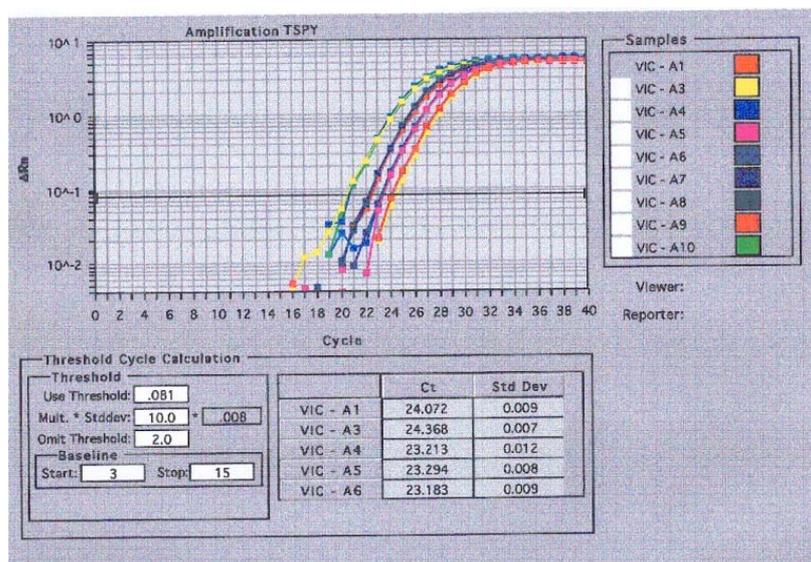


Abbildung 6 Graphische Darstellung des ABI Prism 7700 Sequenz-Detektions-Systems zur Schwellenwertberechnung; logarithmische Darstellung von ΔR_n gegen die Zykluszahl

In einer Standardkurve werden die C_T -Werte der Referenzprobe in steigender Konzentration aufgetragen. Ist die absolute Kopienzahl des untersuchten Gens in der Referenzprobe bekannt,

lässt sich zum CT-Wert der DNA-Probe die Ausgangsmenge in der Standardkurve ablesen (Abbildung 7)

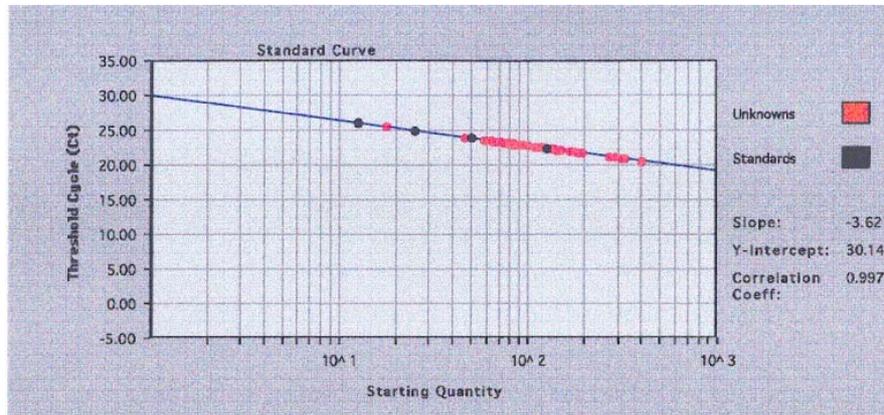


Abbildung 7 Standardkurve zur Berechnung der relativen DNA-Konzentration; schwarz dargestellt die Werte der Kontroll-DNA in von links nach rechts steigender Konzentration; rot die Werte der DNA-Proben

Mithilfe der ermittelten Standardkurve wird die relative Kopienzahl der Test-DNA bestimmt (Ratio Genkopienzahl Test-DNA / Standard-DNA). Bei bekannter Genkopienzahl in der Referenzprobe lässt sich die absolute Menge errechnen.

Zur Bestimmung der Genkopienzahl (hier TSPY) in der Referenzprobe, auf die sich die Standardkurve und damit die Berechnungen der DNA-Proben beziehen, erfolgt zunächst eine Analyse der Referenzprobe mit der Genkopienzahl X am Sequenz-Detektor. In einem zweiten Durchgang wird der Referenzprobe ein Testgenfragment bekannter Menge C zugegeben und die Messung wiederholt. Die Emissionsdifferenz der beiden Versuche ($\gamma_2 - \gamma_1$) ist direkt proportional zur zugegebenen Genkopienzahl C. Aus ihr lässt sich die Kopienzahl X in der Referenzprobe errechnen (s. Anhang).

$$X \quad \Rightarrow \quad \gamma_1$$

$$X + C \quad \Rightarrow \quad \gamma_2$$

$$\frac{\gamma_2 - \gamma_1}{C} = A$$

$$X = A \times \gamma_1$$

wobei X die Referenzprobe unbekannter Genkopienzahl, C das Testgenfragment bekannter Testgenfragmentmenge, γ_1 und γ_2 Anzahl der Emissionssignale, A die Genmenge pro Emissionssignal.

Zur Korrektur möglicher Schwankungen der eingesetzten DNA-Menge wird ein Gen bekannter und in jedem Individuum gleicher Kopienzahl als Referenz sowohl in der Referenzprobe als auch in der DNA-Probe amplifiziert. So wurde bei diesem Versuch das *SRY*-Gen, das sich wie *TSPY* auf dem Y-Chromosom (Yp11.3) befindet und beim Mann (Karyotyp 46, XY) in nur einer Kopie pro diploidem Genom vorliegt, als Referenz verwendet und die in der Referenzprobe gemessene Emission „gleich 1“ gesetzt. Die *SRY*-Messungen in der Referenzprobe und der DNA-Probe sollten den gleichen Wert ergeben, eine Abweichung ist Ausdruck einer unterschiedlichen Menge an DNA. Wird z.B. die doppelte DNA-Menge der DNA-Probe eingesetzt, so ist auch der gemessene Wert für *SRY* in der DNA-Probe doppelt so groß wie in der Referenzprobe.

Neben *SRY* wurden in diesem Versuch auch das Faktor VIII-Gen auf dem X-Chromosom und das *TSPYL*-Gen auf dem Chromosom 6 untersucht. Sie dienen zur Evaluierung des Referenzgens, da sie wie *SRY* eine konstante Kopienzahl im Genom haben. Ihre Emissionen sollten den Werten des *SRY*-Gens entsprechen und konstant sein. Abweichungen beim Vergleich dieser Referenzloci können Hinweise auf einen Messfehler, aber auch auf Aneuploidien geben, wie sie sich in Tumorgewebe nachweisen lassen.

Durch das Verhältnis der gemessenen Größen ist eine zuverlässige absolute Quantifizierung eines Gens möglich. Die beschriebene Methode findet Anwendung in der Routinediagnostik, z.B. zum Nachweis von Duplikationen im *PMP22*-Gen bei der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung oder Deletionen im gleichen Gen bei der HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies) (63).

2.2. Material

Blut- und Gewebeproben

Die DNA stammt aus Blut und Hodengewebe nicht verwandter Männer. Die DNA-Probe eines gesunden männlichen Erwachsenen diente bei allen PCR-Amplifikationen als Referenzprobe. Die „Normalblutproben“ stammen von 55 nicht verwandten Gesunden. Als „Tumorblutproben“ dienten Blutproben 15 Betroffener eines histologisch gesicherten Seminoms.

Die Gewebeproben der Kontrollgruppe stammten von 33 gesunden Männern, bei denen im Rahmen einer Revaskularisierung nach elektiver Sterilisationsbehandlung eine Gewebeprobe aus Hoden entnommen worden war.

Weiterhin wurde Tumorgewebe von 24 Patienten mit Seminomen im Rahmen des operativen Eingriffs isoliert und in Flüssigstickstoff bis zur DNA-Extraktion gelagert.

Es wurden somit 70 Blutproben und 57 Gewebeproben analysiert.

Die Gewebeproben wurden mit Proteinase K behandelt. Die DNA aller Proben wurde entsprechend Standardmethoden per Phenolextraktion isoliert und in TE-Puffer (10mM Tris HCL, 1mM EDTA, pH 8 mit purifiziertem HPLC Wasser) in einer Konzentration von 12,5 ng/µl (nach optischer Dichte bei 260 nm) bei 4°C gelagert.

Sonden und Starter

Sonden und Starter („Primer“) wurden mit der Primer Express™ Software (Applied Biosystems) entworfen und von der Firma Interactiva bezogen. Identische Schmelztemperatur wurde bei der Erstellung der Vorwärts- und Rückwärts-Starter berücksichtigt.

Die folgenden Oligonukleotidsequenzen als Starter wurden benutzt:

TSPY Exon- 4-Fragment (89bp):

TSPYex4F: 5'-ACT CCA ATT GAG TGG TAT CCG G-3'

TSPYex4R: 5'-GAG AAC CAG TTG AAG TTA AGG CT-3'

Faktor VIII Exon-3-Fragment (87bp):

F8ex3F: 5'-CTA CCA TCC AGG CTG AGG TTT ATG -3'

F8ex3R: 5'-CAC CAA CAG CAT GAA GAC TGA CA -3'

SRY-1-Fragment (73bp):

SRY1F: 5'-TGC ACA GAG AGA AAT ACC CGA ATT A -3'

SRY1R: 5'-CTG CAA TTC TTC GGC AGC AT -3'

TSPYL-1-Fragment (79bp).

TSPYL1F: 5'-AGT CCT TCA TTC GCA GAA ACC A -3'

TSPYL1R: 5'-TCG GAC TCT GGA AGG CTG TG -3'

Alle Sonden (bezogen von Applied Biosystems) enthielten am 5'-Ende einen VIC-Reporter, am 3'-Ende einen über einen LAN (linker arm nucleotide) verbundenen Quencher-Farbstoff TAMRA. Die Sonden wurden so gewählt, dass in der Sondensequenz mehr C als G vorlagen, ein G am 5'-Ende wurde nicht akzeptiert.

TSPYex4:

VIC 5'- AGG CCT ATC GCC GCA GCA GAC ACC ACA -3'

F8ex3:

VIC 5'-ACA GTG GTC ATT ACA CTT AAG AAC ATG GCT TCC C -3'

SRY1:

VIC 5'- TTC GCC TTC CGA CGA GGT CGA TAC TT

TSPYL1:

VIC 5'- CTC ATC TGC AGC TTC TTC ACT TGG TTT TCA GAC -3'

Sonden und Starter wurden in Aliquots entsprechend der für eine Messung nötigen Menge in einer Konzentration von 10pmol/µl in TE-Puffer bei -20°C gelagert.

PCR-Amplifikation

Die PCR wurde mit dem ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionssystem, dem TaqMan™ core reagent kit, 96-Felder MicroAmp optical plates™ und MicroAmp optical caps™ (PE Biosystems) in Reaktionsvolumina von 24µl durchgeführt. Das Amplifikationsgemisch („Master Mix“) für alle Proben einer Reaktion wurde direkt vor der PCR hergestellt und enthielt 1 x TaqMan Gold Puffer, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, und 400 µM dUTP, 4,5mM MgCl, 0,0025 U /µl AmpliTaqGold, 0,005 U /µl AmpErase Uracil N-Glykosylase (UNG), je 300 nM des Vorwärts- bzw. Rückwärts-Starters, 200nM TaqMan™Sonde und HPLC purifiziertes Wasser. In jedem Versuch erfolgte die Amplifikation (*TSPY*, *Faktor VIII*, *SRY* bzw. *TSPYL*) parallel in der Referenzprobe und der Test-DNA. In jeder Einzelreaktion wurden 50ng Test-DNA bzw. für die Standardkurve in je drei Feldern 12,5 ng, 25 ng, 50 ng und 125 ng DNA der Referenzprobe eingesetzt. Zur Aktivierung von AmpErase Uracyl-N-Glycolsylse (Kontaminationsvermeidung) wurde die PCR 2' bei 50°C eingeleitet. Es folgten 10' bei 95°C, und 40 x (15" bei 95°C, 1' bei 60°C). Jeder Versuch erfolgte in vier Durchläufen.

DNA-Kalibrierung

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Firma Roboscreen GmbH in Leipzig eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) von *TSPY* Exon 4-Fragmenten und *Faktor VIII* Exon 3-Fragmenten. Das *TSPY*-Exon 4-Fragment hat eine Länge von 89bp, ein Molekulargewicht MG von 54692,6 g/mol. Es wurde durch PCR amplifiziert und auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch gereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit). Nach optischer Dichtemessung bei 260 nm OD (Konzentration 25,2 ng/μl) erfolgte eine Verdünnung auf 10ng/μl (79,4μl *TSPY*-Fragment + 120,6μl H₂O). Genauso wurde mit dem *Faktor VIII* Exon 3-Fragment verfahren (Länge 87bp; Molekulargewicht 53475,8g/mol; optische Dichte 30,9ng/μl; Verdünnung: 64,7μl *FVIII*-Fragment + 135,3 μl H₂O).

3 ERGEBNISSE

Zur Quantifizierung der *TSPY*-Genkopienzahl wurden 55 Blutproben und 33 testikuläre Gewebeproben von nichtverwandten gesunden Männern und 15 Blutproben und 24 Gewebeproben von Hodentumorpatienten mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion durch das ABI 7700 Sequence-Detector-System von Applied Biosystems untersucht. Die *TSPY*-Genkopienzahl im Blut und Hodengewebe wurde relativ quantifiziert, indem eine DNA-Referenzprobe mit bekannter *TSPY*-Kopienzahl eingesetzt wurde.

Die Messung der Konzentration des *TSPY*-Exon4-Fragments durch HPLC ergab eine Konzentration von $7,26371E+10$ Molekülen / μ l, des *Faktor VIII* Exon 3-Fragments von $1,24917E+11$ Molekülen / μ l.

Die Fragmente wurden verdünnt (s. Anhang) und 280.000 Kopien des *TSPY*-Fragments bzw. 15.000 Kopien des *Faktor VIII*-Fragments wurden 50ng der Referenzprobe beigegeben und durch Echtzeit-PCR mit dem ABI Prism 7700 Sequenz-Detektionssystem amplifiziert. Laut Berechnung auf Grundlage der Avogadro-Konstante und des durchschnittlichen Molekulargewichtes eines Nukleotids waren in 50ng genomischer DNA 7462 *Faktor VIII*-Kopien zu erwarten (s. Anhang Formel 1). Die Berechnung bezieht sich auf die Größe des diploiden Genoms, das laut International Human Genome Sequencing Consortium $6,4 \times 10^9$ bp groß ist (17). Die Analyse und anschließende Berechnung aufgrund der durch HPLC ermittelten Werte ergab eine Kopienzahl von 8480 Kopien, also ein um den Faktor 1,136 höheres Ergebnis als nach Berechnung erwartet (s. Anhang)

Für *TSPY* errechnete sich alleine auf Grundlage der *TSPY*-Fragmentkonzentrationsbestimmung durch HPLC ein Wert von 50,58 *TSPY*-Kopien pro Genom. Die absolute Quantifizierung mit Korrektur durch das *Faktor VIII*-Ergebnis ergab eine *TSPY*-Genkopienzahl von 57,47 in der DNA-Kontroll-Probe (s. Anhang)

Es wurden für alle Proben je vier Messungen von *TSPY* und den drei Testloci *SRY*, *Faktor VIII* und *TSPYL* durchgeführt. Da *SRY* wie das Testgen *TSPY* auf dem Y-Chromosom liegt, diente es für alle Proben als Referenzgen.

Die Messdaten der Testloci aller 70 Blutproben und 57 Gewebeproben wurden gegeneinander gemessen (*Faktor VIII* /*SRY*, *Faktor VIII* /*TSPYL*, *TSPYL* /*SRY*). Der Erwartungswert beträgt 1. Waren für eine Probe sowohl *Faktor VIII* /*SRY* als auch *TSPYL* /*SRY* entweder kleiner als 0,6667 oder größer als 1,500 und lag *Faktor VIII* /*TSPYL* innerhalb dieser Grenzen, so wurde *SRY* als Fehlmessung bewertet und die Messung aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

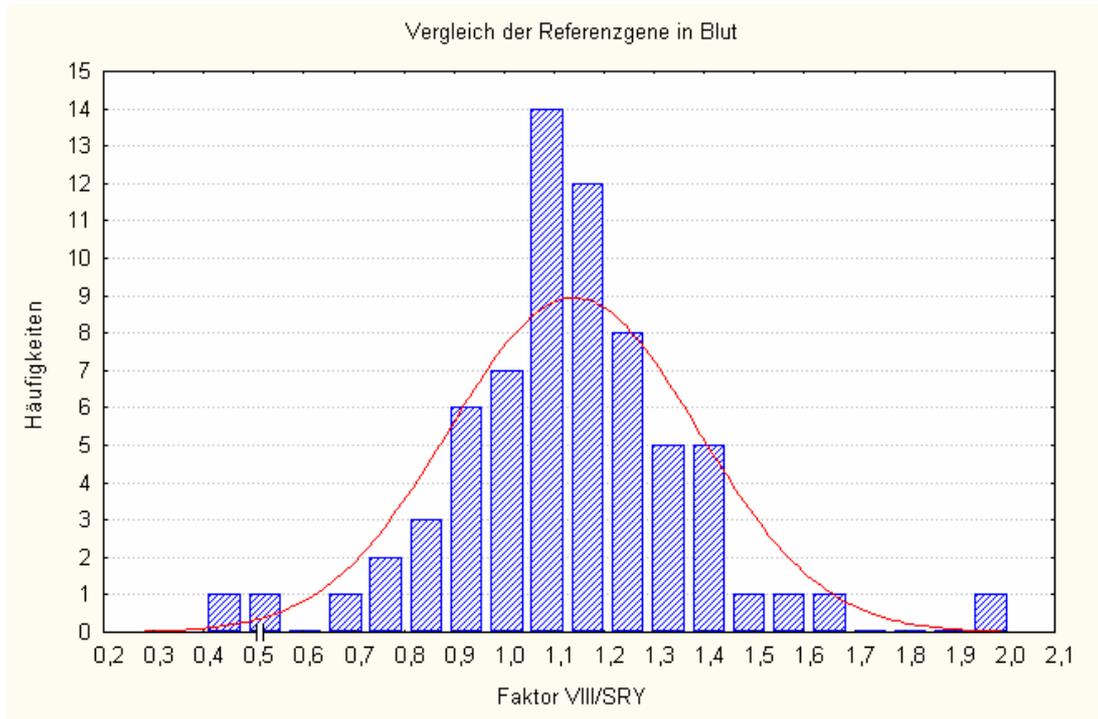


Abbildung 8 Ergebnisse des Quotienten Faktor VIII/SRY in Blutproben

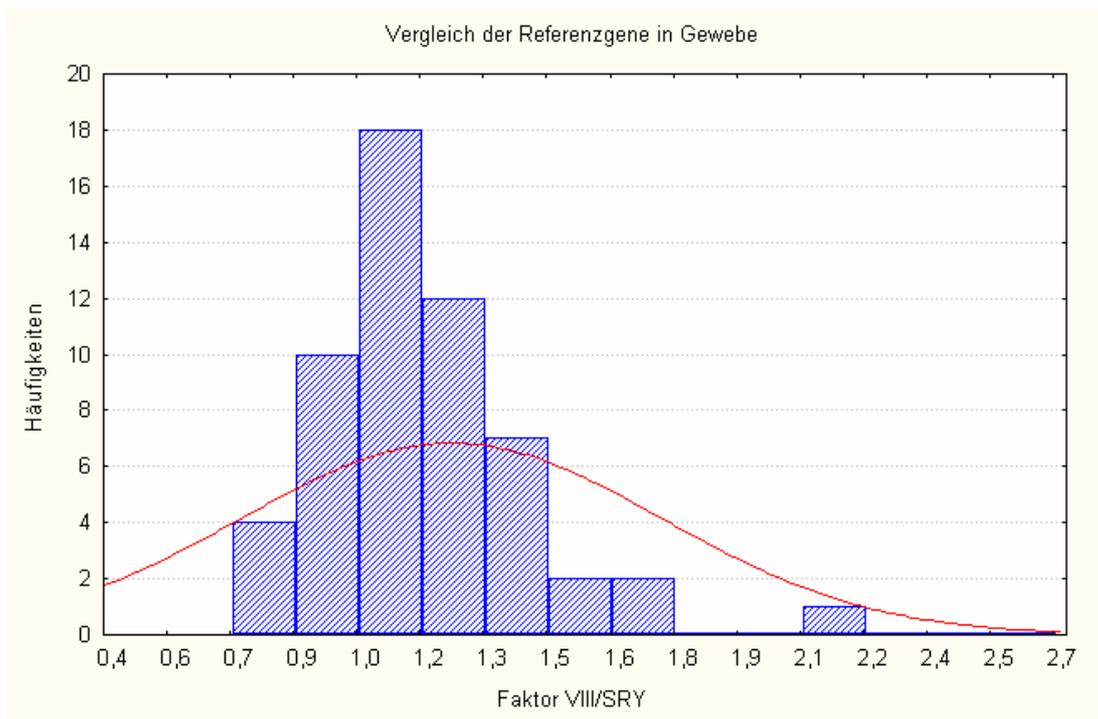


Abbildung 9 Ergebnisse des Quotienten Faktor VIII / SRY in Gewebeproben

In die weitere Bewertung gingen ein:

- 51 von 55 Blutproben Gesunder (92,7%)
 - 13 von 15 Blutproben Betroffener eines Seminoms (80%)
 - alle 24 Gewebeproben Gesunder (100%)
 - 28 von 33 Gewebeproben aus Seminomen (84,8%)
- = 64 von 70 Blutproben (91,4%) und 52 von 57 Gewebeproben (94,5%)
 = 115 von 127 Proben gesamt (90,6%)

Die absolute Kopienzahl in den DNA-Proben konnte durch Vergleich mit der Referenzprobe bekannter *TSPY*-Kopienzahl (57,47) bestimmt werden. Schwankungen der DNA-Konzentrationen wurden durch den Messwert von *SRY* korrigiert. Die Formel zur Berechnung lautet demnach:

$$\frac{TSPY}{SRY} \times a \quad \text{(Gleichung 2)}$$

wobei a = 57,47 (*TSPY*-Genkopienzahl der Kontrolle)

Zur Bestimmung der individuellen Variation der *TSPY*-Genkopienzahl auf dem Y-Chromosom wurden 51 Blutproben und 24 native testikuläre Gewebeproben von nichtverwandten gesunden Männern mittels Echtzeit-PCR untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

	Gült. N	Mittelwert	Minimum	Maximum	Stdabw.	V coef.
Blut Gesunder	51	54	26	180	28,78	52,87
Natives Hodengewebe	24	182	72	313	78,07	43

Tabelle 2 *TSPY*-Kopienzahl in Blut und Gewebe Gesunder

Bei der Analyse der Blutproben betrug die mittlere Kopienzahl bei gesunden Männern 54 Kopien mit einem Minimum von 26 und einem Maximum von 180 (Variationskoeffizient 52,87 Kopien). Wird von den oberen abweichenden Werten von 170 und 180 (s. Abbildung 10) abgesehen, so ergaben sich Werte zwischen 26 und 100 Kopien. In den 24 nativen Hodengewebeproben betrug die mittlere *TSPY*-Kopienzahl 182 (Minimum 72, Maximum 313, Variationskoeffizient 43 Kopien).

Des Weiteren wurde die *TSPY*-Genkopienzahl in Blut von 13 Hodentumorpatienten und in 28 Hodentumorgewebeproben analysiert. Die 13 Blutproben stammten alle von Patienten, von denen auch Hodentumorgewebe untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

	Gült. N	Mittelwert	Minimum	Maximum	Stdabw.	V coef.
Blut Hodentumorpt.	13	46	29	60	9,63	20,76
Tumoröses Hodentumorgewebe	28	176	59	260	51,08	29,03

Tabelle 3 *TSPY*-Kopienzahl in Blut und Gewebe von Hodentumorpatienten

Zusammengenommen ergab sich im Blut von Gesunden und Betroffenen ein Mittelwert von 53 *TSPY*-Kopien (Variationskoeffizient 49,59). Die Häufigkeitsverteilung ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

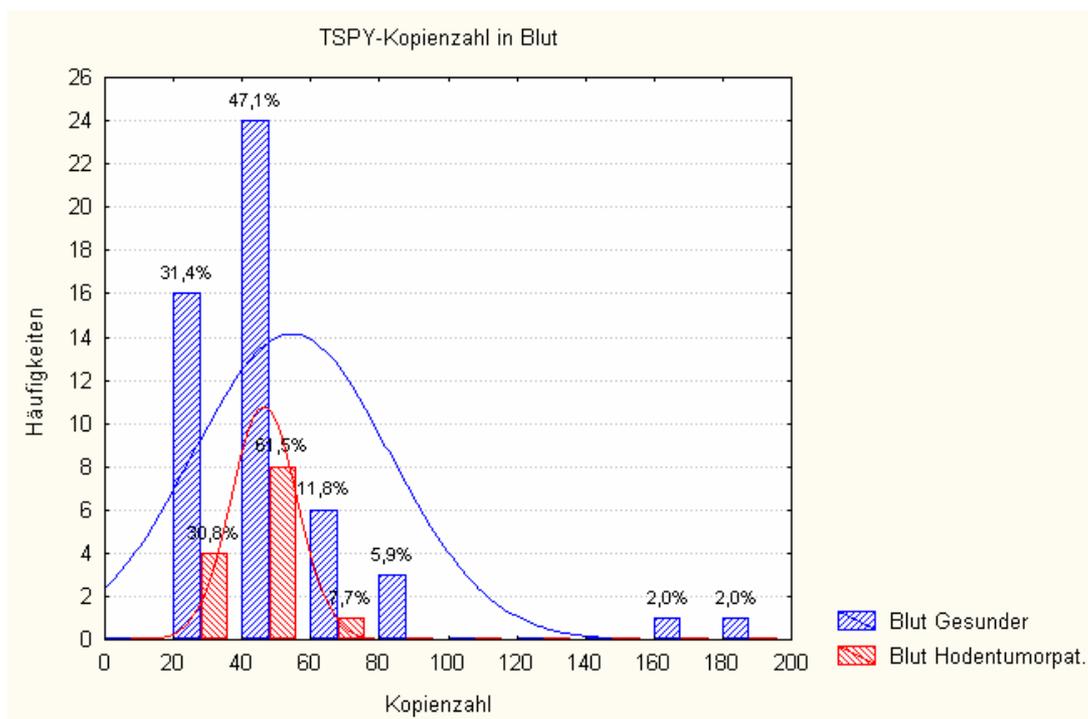


Abbildung 10 Vergleich der Häufigkeiten der *TSPY*-Genkopienzahl in Blut von Gesunden

In den untersuchten nativen und malignen testikulären Geweben betrug die mittlere *TSPY*-Kopienzahl 179. Interindividuell differierte die Anzahl der *TSPY*-Gene von 59 bis 313 Kopien. Es ergab sich, wie in Abbildung 11 dargestellt, in den Geweben zusammengenommen eine mittlere Kopienzahl von 179 mit einem Minimum von 52 und einem Maximum von 313.

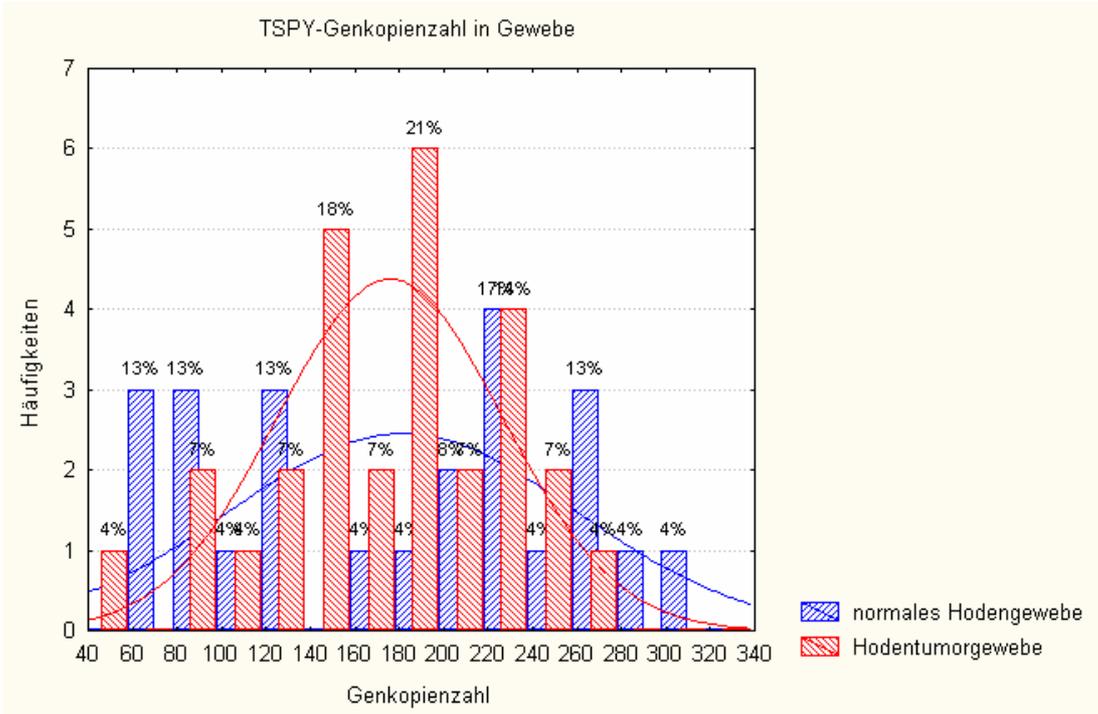


Abbildung 11 Vergleich der Häufigkeiten der TSPY-Genkopien in testikulärem Gewebe

In den Geweben wurde eine im Vergleich zum Blut ca. 3,5-fach erhöhte TSPY-Genkopienzahl gemessen, unabhängig davon, ob es sich um Proben von Gesunden oder Seminompatienten handelt (Abbildung 12).

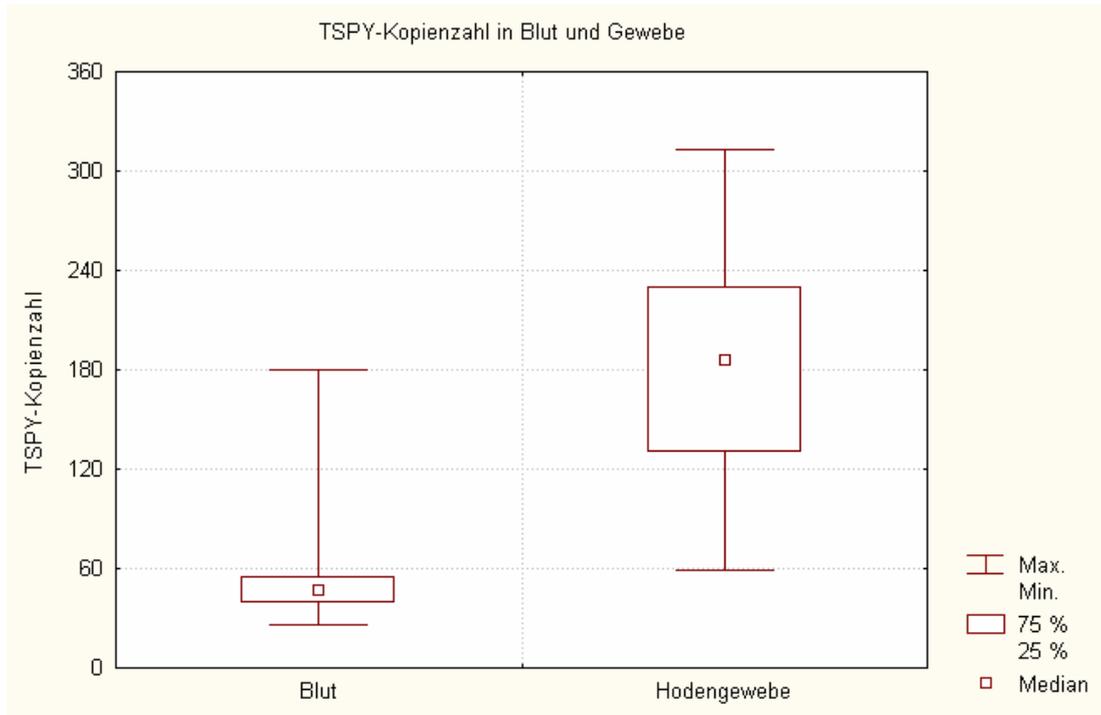


Abbildung 12 Vergleich der TSPY-Genkopienzahl in Blut und Hodengewebe

Ein Vergleich der *TSPY*-Messergebnisse in Blut und Gewebe einzelner Patienten zeigte keine Korrelation der erhobenen Werte. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, lässt sich aus der *TSPY*-Genkopienzahl eines Patienten im Blut kein Rückschluss auf die Anzahl der *TSPY*-Genkopien im testikulärem Gewebe ziehen.

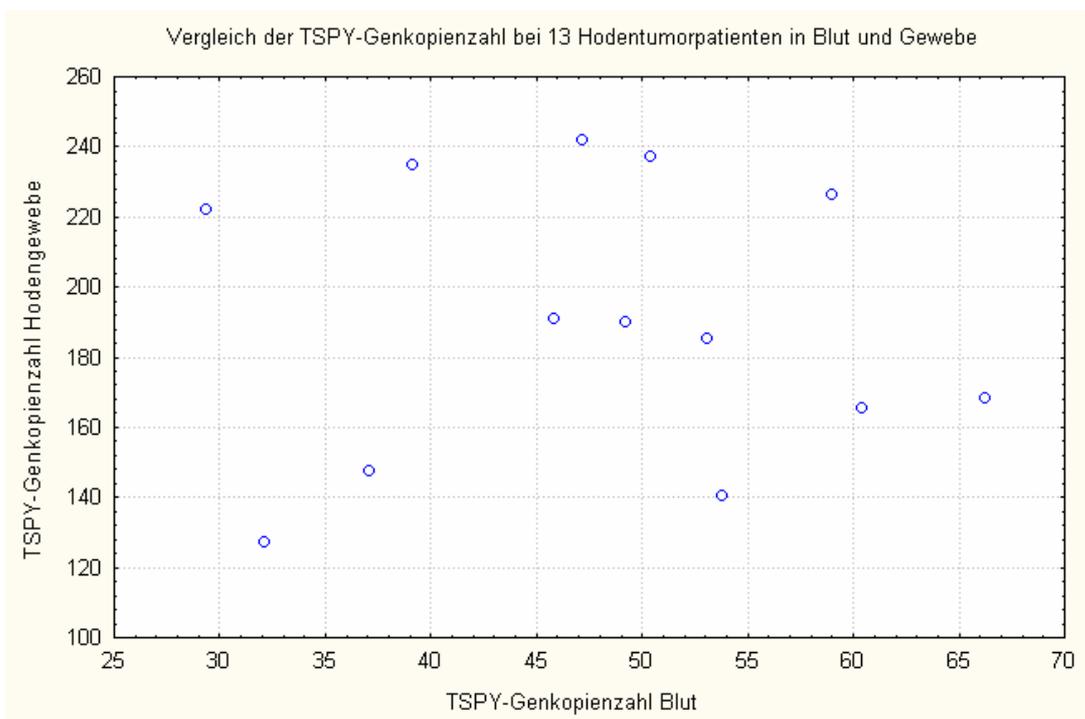


Abbildung 13 Vergleich der *TSPY*-Genkopienzahl in Blut und Gewebe von dreizehn Seminompatienten

Insgesamt lag die relative Streuung für *TSPY* nach Korrektur der DNA-Konzentration (*TSPY/SRY*) in Blut (Variationskoeffizient 50%) höher als in Hodengewebe (Variationskoeffizient 36%), für Faktor 8 (Faktor 8 /*SRY*) in Blut bei 18%, in Hodengewebe bei 15% (Tabelle 3)

BLUT	F8/SRY	TSPY/SRY
Mittelwert	1,13	0,92
Standardabw	0,17	0,46
Variationskoeffizient	15%	50%
GEWEBE		
Mittelwert	1,15	3,11
Standardabw	0,20	1,12
Variationskoeffizient	18%	36%

Tabelle 4 Berechnung der Variationskoeffizienten für *TSPY* und *Faktor VIII* in Blut und Hodengewebe

Da die Quantität der eingesetzten DNA über eine *SRY*-, *Faktor VIII*- und *TSPYL*-Amplifikation evaluiert worden war, wurde die relative *TSPY*-Genkopienzahl für jede einzelne Probe ermittelt ($TSPY/SRY$). Der Vergleich der relativen Kopienzahlen zeigte eine somatische *TSPY*-Amplifikation in testikulärem Gewebe um den Faktor 3. Insgesamt fiel die relative Streuung im Blut höher aus als in den analysierten Geweben. Die Unterschiede der Genkopienzahl in Blut und Gewebe konnten nicht für das y-chromosomale Referenzgen *SRY* und das autosomale Testgen *TSPYL* auf dem Chromosom 6 und den x-chromosomalen *Faktor VIII* gefunden werden (Abbildung 14)

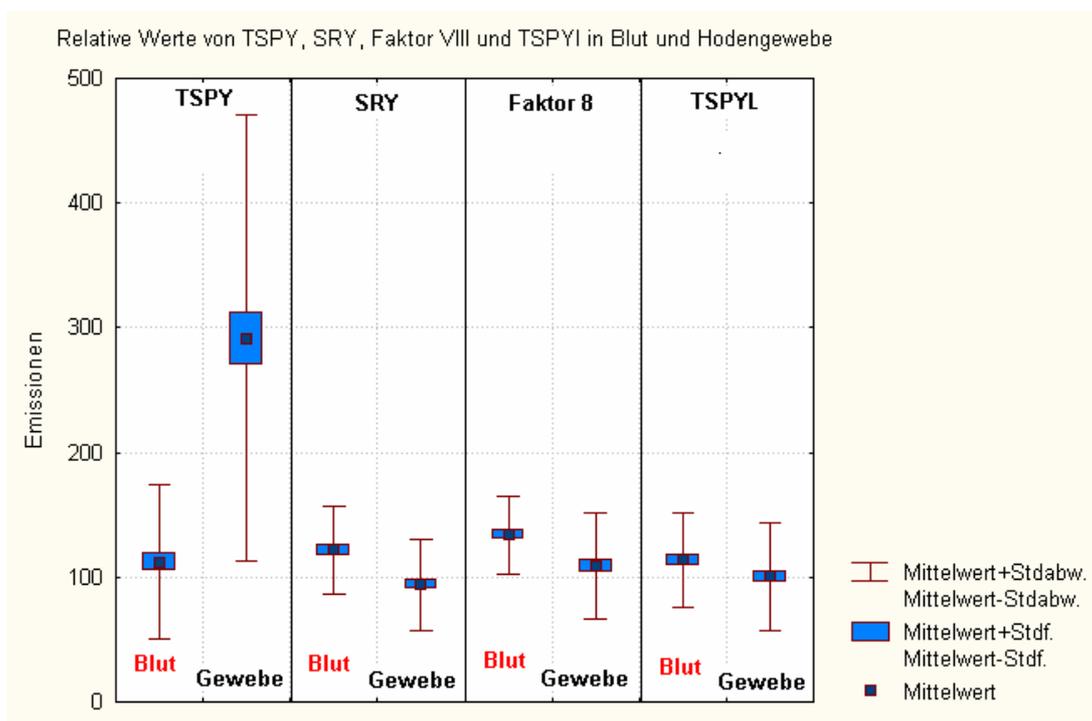


Abbildung 14 Emissionswerte für die untersuchten Gene *TSPY*, *SRY*, *Faktor VIII* und *TSPYL* in Blut (jeweils links) und Gewebe (jeweils rechts).

4 DISKUSSION

Manz et al (35) zeigten, dass die *TSPY*-Genkopienzahl beim Menschen interindividuell unterschiedlich zwischen 30 und 60 Kopien schwanken kann. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen die interindividuelle Variation der *TSPY*-Genkopienzahl. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Manz et al konnten jedoch in Blut von Männern Werte von 26 bis 180 Kopien ermittelt werden. Durch die hier eingesetzte Echtzeit-PCR ließ sich also eine größere individuelle Variation erfassen, die zwar die vorher veröffentlichten Ergebnisse einschließt, jedoch im Mittel bei 54 *TSPY*-Genkopien, also im oberen Bereich der Erwartungswerte, lag. Die Methode der Echtzeit-PCR wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal zur quantitativen Erfassung der Kopienzahl einer Y-chromosomalen Genfamilie eingesetzt.

Bei der Sequenzanalyse der „Male Specific Region“ auf dem Y-Chromosom durch Skaletzky et al (50) wurden 35 *TSPY*-Kopien dedektiert, die auf zwei *TSPY*-Genorten auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert sind: ein *TSPY*-Locus (34 Kopien) im Deletionsintervall 4A und eine einzelne *TSPY*-Kopie distal von 4A. Die Daten wurden aus BAC-Klonen gewonnen, die zu 60% überlappend, zu 40% nur einmal vorlagen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Sequenzierung durch Skaletzky et al Genkopien nicht erfasst wurden. Hierfür spricht die Dedektierung von nur zwei *TSPY*-Loci, Dechend et al (9) dagegen hatten bei der Analyse von YAC-Klonen fünf über das gesamte Y-Chromosom verteilte *TSPY*-Genloci nachgewiesen, ein weiterer wurde durch Ratti et al (43) beschrieben. Insgesamt existieren 4 *TSPY*-Loci auf Yp (*TSPYA* bis *TSPYD*) und zwei weitere Loci (*TSPYE*, *TSPYF*) auf Yq (9, 43)

Neben Messungen in Blut gesunder Männer wurde auch die *TSPY*-Genkopienzahl in Blut von 13 Patienten mit Hodentumoren (Seminomen) mittels Echtzeit-PCR untersucht. Bei den Hodentumorpatienten wurde ein arithmetischer Mittelwert von 46 *TSPY*-Genkopien ermittelt. In den Blutproben Gesunder und Betroffener zusammengefasst wurden im Mittel 53 *TSPY*-Genkopien detektiert. Die Hypothese, dass eine Prädisposition für Seminome auf Unterschiede der genomischen *TSPY*-Genkopienzahl zurückzuführen ist, konnte folglich nicht bestätigt werden.

Die Funktion der in Blut nachgewiesenen multiplen *TSPY*-Genkopien ist nicht bekannt. Entstanden sind sie vermutlich durch wiederholte Duplikationen während der Evolution des Y-Chromosoms. Da kein entsprechendes Homolog auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, kann keine Rekombination durch Crossingover mit einem Nichtschwesterchromatid eines homologen Chromosoms während der Meiose stattfinden. Ein Austausch von genetischem Material ist nur durch einen ungleichen Schwesterchromatidaustausch während Meiose und Mitose möglich. Tandemwiederholungseinheiten, wie sie auch für *TSPY* existieren, begünstigen

eine nichtreziproke Rekombination zwischen Schwesterchromatiden. Hierdurch können möglicherweise die negativen Effekte von Mutationen in der nichtrekombinanten Region auf dem Y-Chromosom ausgeglichen werden. Dominant negative Mutationen können diluiert, Effekte von Nullallelen kompensiert werden.

Es wäre von Interesse, Verwandte zu untersuchen, um festzustellen, ob zwischen den Generationen eine Veränderung der *TSPY*-Genkopienzahl erfolgt.

In den hier untersuchten Proben aus Hodengewebe ergaben sich weitaus höhere *TSPY*-Genkopienzahlen als in Blut. Die *TSPY*-Genkopienzahl lag in nativem Gewebe um einen Mittelwert von 182 Kopien und damit ca. dreimal höher als in Blut Gesunder. In den 28 untersuchten Hodentumorgewebeproben wurde ein arithmetischer Mittelwert von 176 Kopien ermittelt. Abhängig von der Herkunft der Zellen - Blut oder Gewebe - zeigte sich auch innerhalb der untersuchten Individuen (13 Tumorpatienten) eine Variation mit 2,6 bis 7,6-fach erhöhten Messwerten. Aus der *TSPY*-Genkopienzahl im Blut eines Individuums konnte kein Rückschluss auf die Kopienzahl im testikulären Gewebe gezogen werden. (s. Abbildung 13).

Die Zunahme der Genkopienzahl in Gewebe war für das Y-chromosomale *TSPY*-Gen spezifisch, zeigte sich jedoch nicht für das autosomale *TSPYL* auf dem Chromosom 6, *Faktor VIII* auf dem X-Chromosom und das *SRY*-Gen auf dem Y-Chromosom. Bisher veröffentlichte Daten zur *TSPY*-Genkopienzahl hatten sich auf Blutproben bezogen. Eine Analyse an Hodengewebe wurde bisher zur Quantifizierung von *TSPY*-RNA durchgeführt und ergab hohe Werte des *TSPY*-Transkripts in Spermatozytenvorstufen und Carcinomata in situ, jedoch wurden keine Untersuchungsergebnisse auf genomischer Ebene veröffentlicht.

Das Hodengewebe ist reich an Spermien und Spermiovorstufen, in denen jeweils der haploide Chromosomensatz mit männlichem oder weiblichen Chromosomensatz vorliegt. Eine Verzerrung der Resultate aufgrund eines übermäßigen Anteils an Spermien mit männlichem Chromosomensatz wurde durch die Korrektur mit *SRY*, das ebenfalls auf dem Y-Chromosom liegt, vermieden.

Die Ergebnisse weisen auf eine somatische Variation der *TSPY*-Genkopienzahl hin. Dies bedeutet, dass in den Keimzellen beziehungsweise ihren Tochterzellen eine Amplifikation des *TSPY*-Gens erfolgte. Eine solche Genamplifikation ist eine bekannte Eigenschaft prokaryontischer Zellen. Mit diesem Mechanismus passen sich bakterielle Populationen an Umgebungsveränderungen an und modulieren die Expression von während der Entwicklung notwendigen Genen.

Auch bei Tieren sind physiologische DNA-Amplifikationen beschrieben worden. Ahlroth et al. (1) konnten beim Huhn mittels Fiber-FISH-Analyse eine Kopienzahlfuktuation im Avidin-Gen nachweisen. Dieses Gen befindet sich auf dem Z-Chromosom, das beim Huhn in einer Kopie (ZW), beim Hahn in zwei Kopien (ZZ) vorliegt. In den einzelnen Zellen eines Huhns konnten unterschiedliche Kopienzahlen des Avidin-Gens nachgewiesen werden. Als

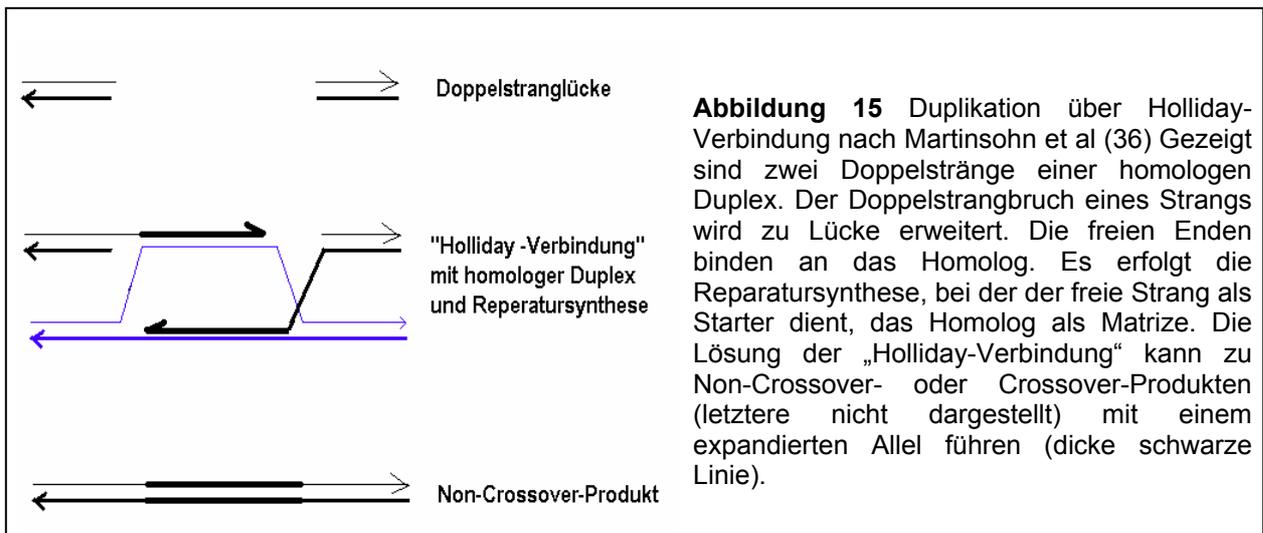
Entstehungsmechanismus wurde ein sog. ungleicher Schwester-Chromatiden-Austausch angenommen. Hierbei erfolgt ein Crossing-over zwischen nichtallelischen Sequenzen zweier Schwesterchromatiden. Die Fehlpaarung wird durch Homologien der Sequenzen stabilisiert, v.a. in Bereichen repetitiver Tandemsequenzen. Der reziproke Austausch führt auf dem einen DNA-Strang zu einer Insertion, auf dem anderen zu einer Deletion. Dies bedeutet, dass bei einem reziproken Austausch die Summe der Kopien die gleiche bleibt.

Bei unseren Messungen wurden nicht wie bei Alroth et al. einzelne Zellen, sondern DNA aus Gewebeproben untersucht. Es fand sich eine absolute Zunahme der Kopien, Befunde an Einzelzellen wurden nicht gewonnen. Wenn, wie von Ahlroth et al postuliert, innerhalb des Individuums ein Mosaik aus Genduplikationen und Gendeletionen von Schwesterchromatiden vorliegen würde, müsste in der Summe die Kopienzahl im Gewebe und Blut eines Individuums identisch sein.

Die somatische Genamplifikation von *TSPY* könnte dann durch den von Alroth et al beschriebenen Mechanismus erklärt werden, wenn Zellen mit einer Geninsertion einen Selektionsvorteil gegenüber denen mit entsprechender Deletion aufwiesen und eine erhöhte Mitose-/Meioserate in weiteren Zyklen entwickelten. Eine Zunahme der Kopienzahl in folgenden Generationen dieser Gewebe wäre zu erwarten. Beim Mann erfolgt während der meiotischen Teilungen die Degeneration von ca. 30 - 40% der Gameten. Eine Aussage, ob und wann möglicherweise eine solche Selektion stattgefunden hat, ist in unserem Versuch aufgrund von Messungen an testikulärem Gewebe, das alle Stufen der Spermatogenese einschließt, nicht möglich.

Ein Mechanismus, bei dem es zu einem Gewinn an Kopien ohne Verlust auf dem Homolog kommt, findet sich bei kurzen repetitiven Tandemsequenzen (Mikrosatelliten). Hier können Fehlpaarungen zwischen den komplementären DNA-Strängen einer DNA-Doppelhelix zu Insertionen oder Duplikationen führen. DNA-Stränge der Helix verschieben sich während der Replikation gegeneinander und lassen ungepaarte Bereiche mit Expansionen entstehen. Im Gegensatz zu Mikrosatelliten, die nur aus kurzen repetitiven Sequenzen mit ca. 4 Nukleotiden bestehen, beinhaltet ein *TSPY*-Gen jedoch mehr als tausend Nukleotide.

Genexpansionen können auch über Genkonversion entstehen (Übersicht s. 36). Genkonversion bezeichnet den Vorgang des Austauschs von genetischer Information zwischen zwei Genen oder Genbereichen auf DNA-Ebene ohne Informationsverlust des Donors. Dieser Mechanismus ist bei höheren Eukaryonten z.B. im Zusammenhang mit Medikamentenresistenzen beschrieben worden. Neben der Homogenisierung oder Diversifikation von Allelen können Allele mittels Genkonversion auch expandieren. Das sogenannte Doppelstrang-Reparatur-Modell beschreibt diesen Vorgang. Es ist in Abbildung 15 veranschaulicht.



Eingeleitet wird die DNA-Expansion durch einen Doppelstrangbruch eines Chromatids. Die entstehenden freien 5'-Enden werden exonukleolytisch abgebaut, was zu einer Doppelstranglücke führt. Die freien Stränge (3'- und 5'-Ende) binden an die Schwesterchromatide, es bildet sich eine Holliday-Verbindung, eine kovalente Bindung von DNA-Helices. Der offene Strang dient als Starter. DNA wird entlang des als Matrize dienenden Homologs synthetisiert. Schließlich verbindet sich der verlängerte Strang mit dem vorher gespaltenen 3'-Ende, die kovalente Bindung am Homolog wird gelöst. Entstanden ist eine DNA-Helix mit expandiertem Genbereich.

Dieses Modell (36) bietet eine Erklärung, wie die Kopienzahl von ganzen Genen oder Genbereichen auf dem in der männlichen Zelle in nur einer Kopie vorkommenden Y-Chromosom zunehmen kann.

Ein weiterer möglicher Mechanismus eines Genkopiengewinns ist eine Amplifikation über RNA-Stufen ähnlich der Replikation retroviraler DNA. Die entstehenden DNA-Bereiche sind intronlos, da sie über RNA-Intermediäre entstehen. Ob die gemessenen Amplifikationsprodukte solche intronlosen *TSPY*-Gene oder aber *TSPY*-Gene mit Exons und Introns widerspiegeln, kann in dem jetzigen Versuch nicht festgestellt werden, da die verwendeten Starter der PCR an Exonbereiche des *TSPY*-Gens binden und damit nur kleine Exonbereiche des *TSPY*-Gens amplifiziert wurden.

Daß die Erhöhung der *TSPY*-Genkopienzahl in Gewebe auf pathologische chromosomale Duplikationen, wie man sie häufig bei Tumoren findet, zurückzuführen ist, scheint unwahrscheinlich, da sich nicht nur in tumorösem sondern auch in gesundem Hodengewebe hohe *TSPY*-Genkopienzahlen bis zu 313 nachweisen ließen. Auch blieb das Verhältnis von *Faktor VIII* auf dem X-Chromosom und *SRY* auf dem Y-Chromosom in den Proben konstant.

Das *SRY*-Gen befindet sich im Bereich Yp11.3, also auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms, wo auch vier der bisher beschriebenen sechs Genkomplexe des *TSPY*-Gens liegen. Die Kopienzahlbestimmung von *SRY* ergab keine Diskrepanz zwischen Gewebe und Blut.

Eine mögliche Ursache der hohen ermittelten *TSPY*-Genkopienzahl in testikulärem Gewebe sind Messungenauigkeiten. Ein Vergleich der Variationskoeffizienten zeigt, dass die relative Streuung der *TSPY*-Genkopienzahl in testikulärem Gewebe (Variationskoeffizient 36%) weniger schwankte als in Blut (Variationskoeffizient 50%). Für das *Faktor VIII*-Gen, das in einer Kopie pro Genom in der Zelle vorliegt, ist die Schwankung in Blut und Gewebe geringer ausgefallen (in Blut 15%, in Hodengewebe 18%, siehe Tabelle 3). Die relativ hohe Streuung trat in beiden Proben nur beim *TSPY*-Gen, nicht jedoch beim *Faktor VIII*-Gen als Referenzprobe auf.

Der erhobene Befund der höheren *TSPY*-Genkopienzahl in testikulärem Gewebe im Vergleich zu Blut steht im Gegensatz zu der Auffassung, dass fast alle Zellen eines Individuums (mit Ausnahme von Lymphozyten) ein identisches Erbgut besitzen und eine somatische Veränderung als pathologisch gewertet werden muss. Der physiologische Nutzen einer auf das Hodengewebe beschränkten Amplifikation ließe sich mit der vermuteten proliferationsregulierenden Funktion des *TSPY*-Gens erklären. Der hohe Grad an Homologie von *TSPY* zu *SET* und *NAP*, die biochemische Modifikation von *TSPY* über eine Phosphorylierung und die zum Teil nukleäre Lokalisation von *TSPY* in Testes sowie die testesspezifische Expression in Spermatogonien und Spermatozyten führte zu der Hypothese, dass *TSPY* eine Funktion bei der Zellzyklusregulation in Spermatogonien zukommt. Im Ejakulat finden sich etwa 60 Mio. Spermien/ml, die während der ca. 72 Tagen dauernden Spermatogenese aus den Spermatogonien in den Hodenkanälchen gebildet werden. Möglicherweise wirkt *TSPY* spezifisch im massiven Zellumsatz der Spermatogenese.

Bei der beschriebenen quantitativen Echtzeit-PCR handelt es sich um eine sensible Methode, die zur Quantifizierung von Genen geeignet ist und in der Diagnostik eingesetzt wird. Durch die Anwendung einer Hybridisierungssonde kombiniert die Echtzeit-PCR die Sensitivität der herkömmlichen PCR mit der Spezifität der Southern Transfer-Analyse. Zur Bestätigung der in dieser Arbeit beschriebenen Messergebnisse sind jedoch Untersuchungen mit einer weiteren Methode indiziert. Die Southern Transfer-Analyse bietet den Vorteil, dass die Genkopienzahl ohne vorherige Genamplifikation bestimmt werden kann. Sollte sich der Befund der im Vergleich zu Blut höheren Genkopienzahl in Hodengewebe durch eine Southern Transfer Analyse bestätigen, könnte die FISH-Analyse in Hodengewebe Aufschluss über die Verteilung und Größe der *TSPY*-Loci auf dem Y-Chromosom geben.

5 ANHANG

Formel 1:

Menschliches Genom: $6,4 \times 10^9$ bp (17)

Durchschnittl. Molekulargewicht eines Nukleotids = 615,8

$$6,4 \times 10^9 \text{ bp} \times 615,8 = 3,94 \times 10^{12} \text{ g/mol}$$

$$3,94 \times 10^{12} \text{ g/mol} = 6,02214 \times 10^{23} \text{ Moleküle (Avogadro-Konstante)}$$

1g DNA entspricht $1,52 \times 10^{11}$ Molekülen

50ng DNA entspricht $7,462 \times 10^3$ Molekülen

→1g genomische DNA hat rechnerisch $1,52 \times 10^{11}$ Genomäquivalente

50ng DNA haben rechnerisch $7,462 \times 10^3$ Genomäquivalente

Verdünnung der Fragmente

TSPY Exon 4: Ausgangskonzentration $7,26371 \times 10^{10}$

10µl + 90µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 93,7µl H₂O
= 70000/ µl

FVIII Exon 3 Ausgangskonzentration $1,24917 \times 10^{11}$

10µl + 90µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 323µl H₂O
10µl + 90µl H₂O
10µl + 990µl H₂O
=3750/ µl

PCR zur absoluten Quantifizierung:

F VIII-Mittelwert pro 50ng DNA: 50,11 (45,17; 54,64; 50,53)
+ex3-Fragment: 138,75 (134,11;144,11; 138,05)
Differenz=88,64

88,64: 15.000 Kopien im Fragment
→ 50,11: 8.479,8 absolute Kopienzahl in 50ng DNA
x $7,462 \times 10^3$ (Formel 1)

= 1,136 errechnete Zahl der F8-Kopien pro Genom

TSPY-Mittelwert pro 50 ng DNA: 56,5 (51,63; 61,30; 56,70)
+ ex4-Fragment: 98,46 (89,21; 109,67; 96,51)
Differenz = 41,93
41,93: 280.000 Kopien im Fragment
→ 56,5: 377.495 absolute TSPY-Kopienzahl in 50ng DNA
x $7,462 \times 10^3$ (Formel 1)
= 50,58 errechnete Zahl der TSPY-Kopien pro Genom

korrigiert durch FVIII: x 1,13

= **57,47** korrigierte TSPY-Kopienzahl

6 LITERATUR

1. Ahlroth MK, Ahlroth P, Kulomaa MS
Copy-number fluctuation by unequal crossing-over in the chicken avidin gene family
Biochem Biophys Res Commun 2001 Oct 26;288(2):400-6
2. Arnemann J, Jakubiczka S, Thuring S, Schmidtke J.
Cloning and sequence analysis of a human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY.
Genomics. 1991 Sep;11(1):108-14.
3. Boettger-Tong HL, Agulnik AI, Ty TI, Bishop CE.
Transposition of RhoA to the murine Y chromosome.
Genomics. 1998 Apr 15;49(2):180-7.
4. Chai Z, Sarcevic B, Mawson A, Toh H
SET-Related CDA1 (Cell Division Autoantigen-1) Arrests Cell Growth. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):33665-74
5. Chandley AC, Cooke HJ.
Human male fertility--Y-linked genes and spermatogenesis.
Hum Mol Genet. 1994;3 Spec No:1449-52. Review.
6. Conrad C, Hierl T, Glaser B, Taylor K, Zeitler S, Chandley AC, Schempp W.
High-resolution fluorescence in situ hybridization of RBM- and TSPY-related cosmids on released Y chromatin in humans and pygmy chimpanzees.
Chromosome Res. 1996 Apr;4(3):201-6.
7. Dasari VK, Goharderakhshan RZ, Perinchery G, Li LC, Tanaka Y, Alonzo J, Dahiya R.
Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer.
J Urol. 2001 Apr;165(4):1335-41.
8. Dechend F, Schubert S, Nanda I, Vogel T, Schmid M, Schmidtke J.
Organization and expression of rat Tspy.
Cytogenet Cell Genet. 1998;83(3-4):270-4.
9. Dechend F, Williams G, Skawran B, Schubert S, Krawczak M, Tyler-Smith C, Schmidtke J.
TSPY variants in six loci on the human Y chromosome.
Cytogenet Cell Genet. 2000;91(1-4):67-71.
10. Delbridge ML, Harry JL, Toder R, O'Neill RJ, Ma K, Chandley AC, Graves JA.
A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome.
Nat Genet. 1997 Feb;15(2):131-6.
11. Estanyol JM, Jaumot M, Casanovas O, Rodriguez-Vilarrupla A, Agell N, Bachs O.
The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity.
J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):33161-5
12. Ford HL, Pardee AB.
Cancer and the cell cycle.
J Cell Biochem. 1999;Suppl 32-33:166-72
13. Glaser B, Grutzner F, Willmann U, Stanyon R, Arnold N, Taylor K, Rietschel W, Zeitler S, Toder R, Schempp W.
Simian Y chromosomes: species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY.
Mamm Genome. 1998 Mar;9(3):226-31.
14. Glaser B, Hierl T, Taylor K, Schiebel K, Zeitler S, Papadopoulos K, Rappold G, Schempp W.
High-resolution fluorescence in situ hybridization of human Y-linked genes on released chromatin.
Chromosome Res. 1997 Feb;5(1):23-30.
15. Heidenreich A, Srivastava S., Moul J.W., Hofmann R.
Molecular Genetic Parameters in Pathogenesis and Prognosis of Testicular Germ Cell Tumors
Eur Urol 2000;37:121-135

16. Hildenbrand R, Schroder W, Brude E, Schepler A, Konig R, Stutte HJ, Arnemann J. Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome. *J Pathol.* 1999 Dec;189(4):623-6.
17. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome *Nature* 409, 860 - 921 (2001);
18. Ishimi Y, Kikuchi A. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):7025-9
19. Jakubiczka S, Schnieders F, Schmidtke J. A bovine homologue of the human TSPY gene *Genomics.* 1993 Sep;17(3):732-5.
20. Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Helszer Z, Baumstark A, Vogel W, Mikiewicz-Syguła D, Kaulzewski B. Xp;Yp translocation inherited from the father in an SRY, RBM, and TSPY positive true hermaphrodite with oligozoospermia. *J Med Genet.* 2000 Oct;37(10):E28. No abstract available.
21. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling *Biochem J.* 2001 Feb 1;353(Pt 3):417-39
22. Kellogg DR, Kikuchi A, Fujii-Nakata T, Turck CW, Murray AW. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins *J Cell Biol.* 1995 Aug;130(3):661-73
23. Kim EG, Choi ME, Ballermann BJ. Spatially restricted expression of set mRNA in developing rat kidney. *Am J Physiol.* 1994 Jan;266(1 Pt 2):F155-61
24. Kim HS, Hirai H, Takenaka O. Molecular features of the TSPY gene of gibbons and Old World monkeys. *Chromosome Res.* 1996 Nov;4(7):500-6.
25. Kim HS, Kageyama T, Nakamura S, Takenaka O. Nucleotide sequence of cDNA and the gene expression of testis-specific protein Y in the Japanese monkey. *Zoolog Sci.* 1997 Aug;14(4):609-14.
26. Kim HS, Takenaka O. A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and humans: sequence, evolution, and phylogeny. *Am J Phys Anthropol.* 1996 Jul;100(3):301-9.
27. Kohler, K., Rost, A.-K. and Remke, H. Calibration and Storage of DNA Competitors Used for Contamination-Protected Competitive PCR *BioTechniques*, vol. 23:4, p. 722-726
28. Krick R, Jakubiczka S, Arnemann J. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes *Gene.* 2003 Jan 2;302(1-2):11-19
29. Lau Y, Chou P, Iezzoni J, Alonzo J, Komuves L. Expression of a candidate gene for the gonadoblastoma locus in gonadoblastoma and testicular seminoma *Cytogenet Cell Genet.* 2000;91(1-4):160-4.
30. Lau YF, Zhang J. Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2000 Apr;27(4):308-21.
31. Lau YF. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am J Hum Genet.* 1999 Apr;64(4):921-7.

32. Li M, Makkinje A, Damuni Z.
The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A
J Biol Chem. 1996 May 10;271(19):11059-62
33. Lin CT, Lyu YL, Xiao H, Lin WH, Whang-Peng J.
Suppression of gene amplification and chromosomal DNA integration by the DNA mismatch repair system
Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No. 16 3304-3310
34. Liou JD, Ma YY, Gibson LH, Su H, Charest N, Lau YF, Yang-Feng TL
Cytogenetic and molecular studies of a familial paracentric inversion of Y chromosome present in a patient with ambiguous genitalia.
Am J Med Genet. 1997 May 16;70(2):134-7.
35. Manz E, Schnieders F, Brechlin AM, Schmidtke J.
TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome.
Genomics. 1993 Sep;17(3):726-31.
36. Martinsohn JT, Sousa AB, Guethlein LA, Howard JC.
The gene conversion hypothesis of MHC evolution: a review
Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):168-200
37. Mazeyrat S, Mitchell MJ.
Rodent Y chromosome TSPY gene is functional in rat and non-functional in mouse.
Hum Mol Genet. 1998 Mar;7(3):557-62.
38. Mazeyrat S, Saut N, Sargent CA, Grimmond S, Longepied G, Ehrmann IE, Ellis PS, Greenfield A, Affara NA, Mitchell MJ.
The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation is gene dense with syntenic homology to the human AZFa region
Hum Mol Genet. 1998 Oct;7(11):1713-24.
39. McPherson MJ, Moller SG
PCR
BIOS Scientific Publishers Limited, Cromwell Press UK, 2000
40. Ozbun LL, You L, Kiang S, Angdisen J, Martinez A, Jakowlew SB.
Identification of differentially expressed nucleolar tgfbeta1 target (dentt) in human lung cancer cells that is a new member of the tspy/set/nap-1 superfamily
Genomics. 2001 Apr 15;73(2):179-93.
41. Patsalis PC, Hadjimarco MI, Velissariou V, Kitsiou-Tzeli S, Zera C, Syrrou M, Lyberatou E, Tsezou A, Galla A, Skordis N.
Supernumerary marker chromosomes (SMCs) in Turner syndrome are mostly derived from the Y chromosome.
Clin Genet. 1997 Mar;51(3):184-90
42. Patsalis PC, Sismani C, Hadjimarco MI, Kitsiou-Tzeli S, Tsezou A, Hadjiathanasiou CG, Velissariou V, Lymberatou E, Moschonas NK, Skordis N.
Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients.
Clin Genet. 1998 Apr;53(4):249-57.
43. Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA, Brenner C, Wangh LJ.
Real-time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres.
Mol Hum Reprod. 2000 Dec;6(12):1155-64.
44. Ratti A, Stuppia L, Gatta V, Fogh I, Calabrese G, Pizzuti A, Palka G.
Characterization of a new TSPY gene family member in Yq (TSPYq1).
Cytogenet Cell Genet. 2000;88(1-2):159-62
45. Rocchietti March M, Aversa A, Caprio M, Fabbri A, Isidori A.
[Azoospermia and genetic mutations: implications for the methods of in vitro fertilization].
Minerva Endocrinol. 1996 Dec;21(4):123-31. Review. Italian.

46. Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, Toder R, Wolfe J, Zeitler S, Chandley AC.
Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes.
Chromosome Res. 1995 Jun;3(4):227-34.
47. Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J
Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues.
Hum Mol Genet. 1996 Nov;5(11):1801-7.
48. Schubert S, Dechend F, Skawran B, Krawczak M, Schmidtke J.
Molecular evolution of the murine tspy genes.
Cytogenet Cell Genet. 2000;91(1-4):239-42.
49. Schubert S, Dechend F, Skawran B, Kunze B, Winking H, Weile C, Romer I, Hemberger M, Fundele R, Sharma T, Schmidtke J.
Silencing of the Y-chromosomal gene tspy during murine evolution.
Mamm Genome. 2000 Apr;11(4):288-91
50. Shin KS, Shin EY, Bae SC, Kim SR, Jeong GB, Kwak SJ, Ballermann BJ, Kim EG.
Expression of SET is modulated as a function of cell proliferation.
J Cell Biochem. 1999 Jul 1;74(1):119-26
51. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC.
The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes
Nature 2003 Jun 19;423(6942):825-37
52. Tascou S, Nayernia K, Samani A, Schmidtke J, Vogel T, Engel W, Burfeind P.
Immortalization of murine male germ cells at a discrete stage of differentiation by a novel directed promoter-based selection strategy.
Biol Reprod. 2000 Nov;63(5):1555-61.
53. Tollerud DJ, Blattner WA, Fraser MC, Brown LM, Pottern L, Shapiro E, Kirkemo A, Shawker TH, Javadpour N, O'Connell K, et al.
Familial testicular cancer and urogenital developmental anomalies
Cancer 1985 Apr 15;55(8):1849-54
54. Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ.
Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history.
Mol Phylogenet Evol. 2000 Nov;17(2):133-44.
55. Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Disteche CM.
Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome
Am J Hum Genet. 1995 Dec;57(6):1400-7.
56. Tyler-Smith C, Taylor L, Muller U.
Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome
J Mol Biol. 1988 Oct 20;203(4):837-48
57. Vogel T, Boettger-Tong H, Nanda I, Dechend F, Agulnik AI, Bishop CE, Schmid M, Schmidtke J.
A murine TSPY.
Chromosome Res. 1998 Jan;6(1):35-40.
58. Vogel T, Borgmann S, Dechend F, Hecht W, Schmidtke J.
Conserved Y-chromosomal location of TSPY in Bovidae.
Chromosome Res. 1997 May;5(3):182-5.
59. Vogel T, Dechend F, Manz E, Jung C, Jakubiczka S, Fehr S, Schmidtke J, Schnieders F.
Organization and expression of bovine TSPY.
Mamm Genome. 1997 Jul;8(7):491-6.
60. Vogel T, Dittrich O, Mehraein Y, Dechend F, Schnieders F, Schmidtke J.
Murine and human TSPYL genes: novel members of the TSPY-SET-NAP1L1 family.
Cytogenet Cell Genet. 1998;81(3-4):265-70.

61. Vogel T, Schmidtke J.
Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein"
Cytogenet Cell Genet. 1998;80(1-4):209-13.
62. von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeijer A, Grosveld G.
Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its
3' half to different genes: characterization of the set gene
Mol Cell Biol. 1992 Aug;12(8):3346-55
63. Wilke K, Duman B, Horst J
Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR.
Hum Mutat. 2000 Nov;16(5):431-6
64. Zhang JS, Yang-Feng TL, Muller U, Mohandas TK, de Jong PJ, Lau YF.
Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y
chromosome.
Hum Mol Genet. 1992 Dec;1(9):717-26.

Danksagung

Meinen wissenschaftlichen Betreuern Herrn Prof. Dr. J. Horst und PD Dr. K. Wilke möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Materialien und für ihren vielseitigen fachlichen Rat danken. Sie haben mich während der gesamten Arbeit sehr sachkundig und richtungsweisend begleitet. Ich verdanke ihnen Fürsprache und hilfreiche Unterstützung. Besonders Herr Dr. Wilke hat die Entstehung und Ausarbeitung kritischfördernd begleitet und viel Geduld bei der Korrekturlesung gezeigt.

Ich danke auch Frau Dr. P. Pennekamp, Frau Dr. N. Markov-Bogdanova und den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die Hilfestellungen bei der praktischen Ausführung.

Frau Dr. S. Schubert der Universität Hannover gab mir wertvolle Hinweise bei der Interpretation der Ergebnisse.

Dankbar anerkennen möchte ich die Überlassung der Blut- und Gewebeproben durch Frau PD Dr. S. Kliesch der Urologischen Abteilung, und die Bereitstellung des ABI 7700 Sequenz Detektors durch Herrn Prof. Dr. W. E. Berdel vom Knochenmarktransplantationszentrum des Universitätsklinikums Münster.