

**Expression und Funktion des humanen TSPY
während der Keimzellentwicklung und gonadalen
Tumorgenese — Untersuchungen an einem
transgenen Mausmodell**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Anja Schöner

geboren am 18. Mai 1981 in Hannover

2009

Referent: Prof. Dr. J. Schmidtke

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 21.12.2009

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der Funktion des humanen TSPY während der Keimzellentwicklung im postnatalen und adulten Testis und der Embryonalentwicklung anhand eines *TSPY*-transgenen Mausmodells.

Zu diesem Zweck wurden spermatogenesedefiziente *TSPY*-transgene Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen und als Kontrollen nicht transgene NMRI- Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen generiert. Bei der histologischen Analyse der Hoden und Nebenhoden von 58 adulten *TSPY-Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}- und 38 NMRI-*Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Männchen wiesen *TSPY*-transgene und nicht transgene Kit-defiziente NMRI-Männchen einen partiellen Spermatogeneserescue des Kit-defizienten testikulären Phänotyps auf. In den Testes von *TSPY-Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Mäusen waren im Vergleich zu NMRI-*Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Kontrollen in signifikant mehr *Tubuli seminiferi* pachytäne Spermatozyten präsent und hochsignifikant mehr *Tubuli seminiferi* von *TSPY*-transgenen Männchen im Vergleich zu den Kontrollen mit runden bzw. elongierten Spermatischen ausgestattet. Nach einer Verpaarungszeit von mindestens drei Monaten generierten 14,28% aller verpaarten *TSPY*-transgenen Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen (n = 28) Würfe, während keines der verpaarten Kontrollmännchen (n = 18) fertil war. Nachdem ein fertiles *TSPY-Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Männchen zum Aufbau einer *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Mauslinie eingesetzt wurde (*L2-TSPY-Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}) zeigte sich, dass der beobachtete partielle Spermatogenese- und Fertilitätsrescue mit reduzierter Penetranz auf die männlichen *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Nachkommen übertragen wird. Um zu untersuchen, ob der partielle Spermatogeneserescue der *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Männchen durch einen frühen postnatalen proliferativen und/oder Apoptose-protectiven Effekt des Transgens auf die frühen Keimzellen bedingt war, wurden verschiedene postnatale Altersstadien spermatogenesedefizienter *TSPY*-transgener Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen und nicht transgener NMRI- Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Kontrollen generiert (4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp) und die Testes mittels TUNEL-Assays und aktivierter Caspase 3- bzw. Ki67-Immunhistochemie untersucht. In keinem der analysierten postnatalen Stadien waren die Unterschiede in der testikulären Keimzellapoptose- und -proliferationsraten bei *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen signifikant. Präpubertäre 30,5 Tage alte *TSPY-Kit*^{W-v}/*Kit*^{W-v}-Männchen zeigten allerdings eine höhere Anzahl meiotischer Keimzellen als die nicht transgenen Kontrollen.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Spermatogenese- und Fertilitätsrescue bei *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Männchen durch einen Einfluss des humanen *TSPY* auf die frühe testikulären embryonalen Keimzellen bedingt war, wurden 14,5 und 17,5 dpc *TSPY*-transgene Embryonen der Linie *Tg(TSPY)9Jshn* und des Auszuchtstammes NMRI als Wildtypkontrollen auf eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung von *TSPY* während der embryonalen Keimzellentwicklung hin untersucht. *TSPY* wurde vorab spezifisch in Gonozyten und Präespermatogonien in Testes der *TSPY*-transgenen Embryonen beider Altersstadien immunhistochemisch nachgewiesen. Die Analyse der Keimzellapoptose- und -proliferationsraten in den embryonalen Testes mittels TUNEL-Assays und Caspase 3- bzw. Ki67-Immunhistochemie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonen.

Schlagwörter: *TSPY*, transgenes Mausmodell, Spermatogenesedefizienz

Abstract

The purpose of this thesis was to investigate the function of human TSPY during germ cell development in both postnatal and adult testes and also during embryonic development by using a *TSPY* transgenic mouse model.

In an attempt to pursue the desired purpose, spermatogenesis-deficient *TSPY* transgenic *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* mice and non-transgenic NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* mice were generated as controls. A partial spermatogenic rescue of the Kit-deficient testicular phenotype was observed in *TSPY* transgenic and non-transgenic Kit-deficient NMRI mice when the testes and epididymides of 58 adult *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* and 38 NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* males were analyzed histologically. There were significantly more *tubuli seminiferi* with pachytene spermatocytes in testes of *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* mice in comparison to NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* controls. Also, a higher number of these *tubuli seminiferi* contained round and elongated spermatids in *TSPY* transgenic males compared to that of the controls (difference highly significant). After a mating period of at least three months 14.28 % of all mated *TSPY* transgenic *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* males (n = 28) generated offspring, whereas none of the mated control males (n = 18) was fertile. One fertile *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* male was used for the generation of a *TSPY* transgenic Kit-deficient mouse line (L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*) and it was observed that the partial rescue of spermatogenesis and fertility was transmitted with reduced penetrance to the male *TSPY* transgenic Kit-deficient offspring. To investigate if the partial spermatogenic rescue in *TSPY* transgenic Kit-deficient males is due to an early postnatal proliferative and/or apoptosis-protective effect of the transgene on early germ cells, several postnatal stages of spermatogenesis-deficient *TSPY* transgenic *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* males and non-transgenic NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* controls were generated (4.5 dpp, 15.5 dpp und 30.5 dpp). Testes were analyzed by TUNEL assay and activated Caspase 3 and Ki67 immunohistochemistry, respectively. None of the analyzed postnatal stages showed any significant differences in testicular germ cell apoptotic and proliferation rates between *TSPY* transgenic and non-transgenic *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* males. However, 30.5-day-old pre-pubertal *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* males showed a higher number of meiotic germ cells than the non-transgenic controls.

In an effort to investigate if the observed rescue of spermatogenesis and fertility in *TSPY* transgenic Kit-deficient males is due to an influence of the human transgene on the early testicular embryonic germ cells, 14.5 and 17.5 dpc embryos of the *TSPY* transgenic line

Tg(TSPY)9Jshn and of the NMRI outbred strain as wildtype controls were examined with respect to a proliferative or anti-apoptotic effect of TSPY during embryonic germ cell development. TSPY was specifically detected immunohistochemically in gonocytes and prespermatogonia in testes of *TSPY* transgenic embryos of both stages. The analysis of the germ cell apoptotic and proliferation rates in embryonic testes by TUNEL assay and Caspase 3 and Ki67 immunohistochemistry, respectively, showed negligible differences between *TSPY* transgenic and non-transgenic embryos.

Key words: TSPY, transgenic mouse model, spermatogenesis deficiency

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
Abkürzungen	12
1 Einleitung	15
1.1 Das humane Y-Chromosom	15
1.2 Das Y-Chromosom der Labormaus	18
1.3 Das testis-specific protein, Y-encoded (TSPY)	21
1.3.1 Das humane TSPY (hTSPY)	22
1.3.2 Das muride Tspy (mTspy)	25
1.3.3 Die TTSN-Superfamilie	26
1.3.4 Onkogenes Potenzial des TSPY und Keimzelltumore	27
1.4 Spermatogenese der Maus	29
1.5 Kit-Defizienz	31
1.6 Die TSPY-transgene Mauslinie Tg(TSPY)9Jsh^m	35
1.7 Ziel dieser Arbeit	38
2 Material	39
2.1 Chemikalien	39
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	39
2.1.2 Biologische Substanzen und Enzyme	40
2.1.3 Kits	41
2.2 Materialien und Geräte	41
2.2.1 Geräte.....	41
2.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	42
2.3 Standardpuffer, -lösungen und -medien	43
2.4 Tiermaterial	44

2.5	<i>Computerprogramme</i>	45
2.6	<i>Referenzsequenzen (GenBank Accession-Nummern)</i>	45
3	Methoden	46
3.1	<i>Zuchtlinien der Labormaus</i>	46
3.1.1	NMRI.....	46
3.1.2	Tg(TSPY)9Jshm	46
3.1.3	C57BL/6J und C57BL/6J-Kit ^{W-v} /J	46
3.1.4	Etablierung der TSPY-C57BL/6J-Kit ^{W-v} /J Zuchtlinie.....	47
3.1.5	Fertilitätsanalyse der TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} und NMRI-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Männchen	47
3.2	<i>Extraktion genomischer DNA aus Gewebe</i>	47
3.3	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	48
3.4	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</i>	49
3.4.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	49
3.5	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR) aus DNA</i>	50
3.5.1	Allgemeine PCR-Bedingungen	51
3.5.2	Sequenzen der verwendeten Primer	52
3.6	<i>Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit NsiI</i>	52
3.7	<i>Fixierung und Einbettung von Organen und Gewebe</i>	53
3.7.1	Paraffineinbettung von Hoden.....	53
3.7.2	Paraffineinbettung von Embryonen.....	54
3.7.3	Technoviteinbettung von Hoden	55
3.8	<i>Herstellung von Paraffin- und Technovitschnitten</i>	55
3.9	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)</i>	55
3.9.1	HE-Färbung von Paraffinschnitten.....	56
3.9.2	HE-Färbung von Technovit 7100 Schnitten.....	56
3.10	<i>Histologische Analysen von Hoden und Nebenhoden</i>	57
3.11	<i>Immunhistochemie</i>	57
3.11.1	Peroxidase-Antiperoxidase-ABC-Färbung.....	58
3.11.2	TSPY-Antiseren 837/3, Klon #2 und Klon #7	59

3.11.3	Aktiviertes Caspase 3-Antiserum, Ki67-Antiserum und EEF1A1-Antiserum .	61
3.11.4	Apoptosedetektion mittels TUNEL-Assays	63
3.12	Statistische Analysen	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Untersuchungen zur Funktion von TSPY in spermatogenesedefizienten TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Mäusen.....	66
4.1.1	Generierung von TSPY-C57BL/6J-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} - und NMRI-C57BL/6J-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Mäusen.....	67
4.1.2	Genotypisierungen der verschiedenen Zuchtlinien	67
4.1.2.1	Nachweis des TSPY-Transgens	68
4.1.2.2	Nachweis der Kit ^{W-v} -Mutation	69
4.1.3	Histologische Untersuchungen der Hoden und Nebenhoden männlicher TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} und NMRI-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} Mäuse	71
4.1.4	Fertilitätsanalysen bei TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} und NMRI-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Männchen	74
4.1.5	Histologische Analyse der Hoden und Nebenhoden und Fertilitätsanalyse homozygoter Nachkommen des TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Männchens Nr.45	76
4.1.6	Nachweis der adulten TSPY-Expression in TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Männchen .	77
4.1.7	Untersuchungen zu Apoptose und Proliferation bei TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} - und NMRI-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Mäusen verschiedener postnataler Altersstadien.....	80
4.1.8	Expressionsnachweis des eukaryontischen Elongationsfaktors eEF1A in Testes von TSPY-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} und NMRI-Kit ^{W-v} /Kit ^{W-v} -Männchen	88
4.2	Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose in TSPY-transgenen Embryonalstadien.....	90
4.2.1	Genotypisierung der 14,5 und 17,5 dpc alten TSPY-transgenen und nicht transgenen Embryonalstadien.....	90
4.2.2	Nachweis der TSPY-Expression im embryonalen Testis.....	91
4.2.3	TUNEL, Caspase 3 und Ki-67-Immunfärbungen in TSPY-transgenen Embryonen der Altersstadien 14,5 und 17,5 dpc	94
5	Diskussion.....	101
5.1	Untersuchungen zur Spermatogenese in der TSPY-transgenen Kit-defizienten Mauslinie TSPY-C57BL/6J-Kit^{W-v}/J.....	102

5.2 <i>Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose im TSPY-transgenen embryonalen Testis</i>	109
5.3 <i>Ausblick auf mögliche weiterführende Untersuchungen bei TSPY-transgenen Mäusen der Linien Tg(TSPY)9Jsh^m und TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J</i>	113
6 Literaturverzeichnis	118
Lebenslauf	141
Publikationsliste	142
Danksagung	144
Erklärung	146

Anm.: Widmung (S. 3), Lebenslauf (S. 141) und Danksagung (S. 144) sind nicht enthalten.

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aq. bidest.	bidestilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
hTSPY	humanes TSPY
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt

l	Liter
LB	Luria-Bertani
LW	Leerwert
M	Molar
m	milli-
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
min	Minute
Mio.	Million
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTspy	murines Tspy
μ	mikro-
n	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriummhydroxid
Nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p	pico-
PAR	Pseudoautosomale Region
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
rTspy	Ratten-Tspy
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
sec	Sekunde(n)
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tg	transgen
Tris	Trishydroxyethylamin
u	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
W	Watt
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Die embryonale Gonadenanlage der Säugetiere ist zunächst indifferent. Ebenso sind die primordialen Keimzellen bis zur gonadalen Expression des Y-chromosomalen geschlechtsdeterminierenden *SRY*-Gens von bipotentem Charakter. Durch die *SRY*-Expression in den Sertoli-Vorläuferzellen der Urogenitalleiste (beim Menschen ab der sechsten Embryonalwoche, bei der Maus ab Tag 10,5 der Embryonalentwicklung) wird die Differenzierung der indifferenten Gonadenanlage zum Testis induziert, in deren Verlauf neben der Differenzierung der somatischen Vorläuferzelllinien zu Sertoli- und Leydigzellen auch die Differenzierung der einwandernden Urkeimzellen zu männlichen Präspmatogonien stattfindet (Koopman *et al.*, 1990; Wehner und Gehring, 1995; Hanley *et al.*, 2000; Albrecht und Eicher, 2001). Bei der weiteren Entwicklung dieser Keimzellen zu befruchtungsfähigen Spermien im Laufe der Spermatogenese und Spermio-genese ist ebenfalls eine Reihe von Y-chromosomalen Genen von Bedeutung (siehe z.B. Review von Burgoyne, 1998).

Unter den bisher identifizierten 45 funktionellen Genen auf dem kleinen, akrozentrischen Y-Chromosom des Menschen befindet sich auch das *Testis-spezifische Protein, Y-kodiert* (*TSPY*). Diese Y-chromosomale Genfamilie ist bei Säugetieren konserviert und im Testis und der Prostata exprimiert.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression und Funktion des humanen *TSPY* anhand eines transgenen Mausmodells.

1.1 Das humane Y-Chromosom

Die Gonosomen des Menschen sind außerordentlich heteromorph. Während das submetazentrische, euchromatin-reiche X-Chromosom 155 Mb DNA umfasst und 1098 Gene beherbergt (Ross *et al.*, 2005), trägt das kleine, akrozentrische Y-Chromosom (siehe Abbildung 1-1) mit 58 Mb nur 2-3% zum haploiden Säugergenom bei (Strachan und Read, 1996). Zudem weist es in großen Teile genetisch inertes, mittel- bis hochrepetitives Heterochromatin auf (Strachan und Read, 1996; Graves, 2002, 2004), welches aus sich wiederholenden Einheiten verschiedener Längen besteht. Eingeteilt werden dieser Bereiche in vier Blöcke. Die Blöcke *DYZ1* und *DYZ2* befinden sich am distalen Ende des langen Chromosomenarms (Yq). Ihre Ausdehnungen sind individuell verschieden und

spielen für die männliche Entwicklung und Fertilität keine Rolle (Cooke und McKay 1978; Cooke *et al.* 1983). Der Block DYZ3 umspannt das Zentromer und enthält alphanucleäre Satelliten-DNA (Tyler-Smith *et al.*, 1988). Der vierte Block, DYZ4 (synonym auch als DYZ5 bezeichnet), befindet sich am proximalen Ende des kurzen Chromosomarms (Yp) und variiert in seiner Länge ebenfalls individuell. Die 20-40 sich tandemartig wiederholenden Sequenzeinheiten von jeweils 20,4 kb können sich über eine Länge von 540 bis 800 kb erstrecken (Tyler-Smith *et al.*, 1988, 2008).

Eine Rekombination zwischen dem X- und Y-Chromosom während der männlichen Meiose findet ausschließlich an den distalen Enden des kurzen (Yp) und langen (Yq) Arms des Y-Chromosoms, den sog. pseudoautosomalen Regionen (PARs) statt (Ciccocioppa *et al.*, 2000). Die humanen PARs der Gonosomen zeigen eine 20-fach höhere Rekombinationsrate im Vergleich mit dem Rest des Genoms. Die PAR1 an der Spitze des kurzen Chromosomenarms des humanen Y-Chromosoms besteht aus 2,6 Mb. Es wird angenommen, dass die X-Y-Paarung in dieser Region zumindest bei Mensch und Maus eine kritische Funktion für die Spermatogenese hat (Burgoyne *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992; Mohandas *et al.*, 1992). Mit einer Länge von nur 320 bp ist die humane PAR2 an der Spitze von Yq sehr viel kleiner als die PAR1. Die PAR2 zeigt eine sehr viel geringere Paarungs- und Rekombinationsfrequenz als die PAR1 und ist für die Fertilität nicht entscheidend (Kvaloy *et al.*, 1994; Li und Hamer, 1995; Kuhl *et al.*, 2001).

Bisher wurden in den Y-chromosomalen PAR1- und PAR2-Regionen 28 funktionelle Gene identifiziert, welche der dosiskompensierenden X-Inaktivierung entgehen, z.T. für Haushaltsproteine kodieren und ein annähernd sequenzhomologes Pendant auf dem X-Chromosom besitzen (Mang und Morris, 2007).

Der erheblich größere Teil des Y-Chromosoms ist von der meiotischen Rekombination ausgeschlossen und wird als *male-specific region of the Y chromosome* (MSY) bezeichnet. Die MSY umfasst ca. 95% des gesamten Y-Chromosoms. Innerhalb der MSY wurden 27 proteinkodierende Gene oder Genfamilien identifiziert, die durch die fehlende Rekombination eine Tendenz zur Degeneration aufweisen (Skaletsky *et al.*, 2003). Die Einteilung dieser Gene erfolgt in zwei Klassen (Lahn und Page, 1990). Die erste Klasse beinhaltet 21 X-Y-homologe Gene mit je einem nicht sequenzidentischen Homolog auf dem X-Chromosom (Skaletsky *et al.*, 2003, Delbridge *et al.*, 2004). Sie werden z.T. als Relikte des autosomalen Vorläuferchromosoms angesehen, aus welchem sich die Gonosomen der Säugetiere entwickelt haben (Ohno, 1967).

Die zweite Klasse der MSY-Gene umfasst sechs Genfamilien ohne entsprechendes X-

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des humanen Y-Chromosoms. Verändert nach Lahn und Page (1997) und Lau (1999). Dargestellt sind die Gene des humanen Y-Chromosoms auf dem kurzen (pter) und dem langen Arm (qter). Die Pseudoautosomalen Bereiche PAR1 und PAR2 (gelb dargestellt) beinhalten Gene mit annähernd sequenzhomologen Pendanten auf dem X-Chromosom (hellblau, rechts). Die Einteilung der *male-specific region of Y chromosome* (MSY) erfolgt in 43 Deletionsintervalle (1A1A bis 7). Den verschiedenen Deletionsintervallen zugeordnet sind einerseits X-Y-homologe Gene mit nicht sequenzidentischem Homolog auf dem X-Chromosom (grün, links) und testisspezifisch exprimierte Gene ohne X-Homolog (rot, Mitte). Der *TSPY*-Hauptcluster im Deletionsintervall 3C ist mit einem weißen Kästchen hervorgehoben. Die Deletionsintervalle 4B und 7 (grau dargestellt) enthalten Heterochromatin.

1.2 Das Y-Chromosom der Labormaus

Bei der Mehrzahl der klassischen Inzucht- und Auszuchtstämme der Labormaus handelt es sich um Hybride mit unterschiedlichen Genomanteilen von *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* und *Mus musculus castaneus* (Morwaki, 1994; Wade *et al.*, 2002). Das Y-Chromosom lässt sich bei 75% aller Inzuchtstämme vom *Mus musculus musculus*-Typ ableiten, die restlichen 25% weisen ein Y-Chromosom vom *Mus musculus domesticus*-Typ auf (Bishop *et al.*, 1985; Moriwaki, 1994).

Die murinen und humanen Y-chromosomalen pseudoautosomalen Regionen sind sehr divergent. Alle bisher für den Menschen beschriebenen Y-chromosomalen Gene der PARs sind bei der Labormaus, soweit vorhanden, auf Autosomen lokalisiert (Palmer *et al.*, 1997). In der murinen PAR1-Region befindet sich ein funktionelles *Sts*-Gen, das für eine Steroidsulfatase kodiert und ein orthologes Pseudogen auf dem kurzen Arm des menschlichen Y-Chromosoms aufweist (Graves *et al.*, 1998).

Das Y-Chromosom der Labormaus wird in zwei große Bereiche eingeteilt: *Spy* (auf Yp) beinhaltet putative Gene für die Spermatogenese, während die Region *Smy* (auf Yq und in der perizentrischen Region) vier im multi-copy Status vorliegende putative Gene für die Spermio-genese enthält (Burgoyne *et al.*, 1992; Sutcliffe *et al.*, 1989; Bishop und Mitchell, 1999, Reynard *et al.*, 2009).

Das *Spy*-Deletionsintervall *Sxr^b* umfasst 900 kb und sieben funktionelle X/Y-homologe Gene, *Zfy2-Dffry-Dby-Uty-Eif2 γ -Smcy-Ube1y-Zfy1*, sowie zwei Pseudogene, *Tspy* und *Arhay-ps2* (Mazeyrat *et al.*, 1998). Proximal von *Zfy2* gelegen befindet sich *Sry*, der Testis-determinierende Faktor (Koopman *et al.*, 1990), welcher in Interaktion mit putativen *tda*-Genen (*testis-determining autosomal*) die regelrechte Testesausbildung initiiert

(Albrecht *et al.*, 2003), jedoch bei der Maus nicht streng testis-spezifisch exprimiert wird. Transkripte von *Sry* konnten mittels RT-PCR während der Embryonalentwicklung (11-19 Tage *post-coitum*) im embryonalen sowie im adulten Gehirn (im Diencephalon, Mesencephalon und Cortex) nachgewiesen werden (Mayer *et al.*, 2000). Proximal von *Sry* auf Yp sind mindestens 25-50 Kopien von *Rbmy* lokalisiert (Mahadevaiah *et al.*, 1998). Die Expression von *Ube1y*, *Zfy1*, *Zfy2*, *Rbmy*, *Dffry* und *Y353/B* ist ausschließlich testikulär, während die übrigen Gene ubiquitär exprimiert werden (Ehrmann *et al.*, 1998; Mazeyrat *et al.*, 1998).

Bis auf *Eif2s3y* und *Ube1y* wurden für alle murinen Y-chromosomalen Gene des kurzen Arms orthologe Gene auf dem humanen Y-Chromosom nachgewiesen (Bishop und Mitchell, 1999). Während *EIF2 γ* und *UBE1Y* im Laufe der Evolution der *Eutheria* bei den Primaten verloren gingen, persistieren die X-Homologen auch heute noch (Ehrmann *et al.*, 1998; Mazeyrat *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den humanen orthologen Genen, die sich über einen 30 Mb-Bereich auf Yp und Yq des humanen Y-Chromosoms verteilen, sind die entsprechenden murinen Homologe auf die perizentrische Region des murinen Y-Chromosoms konzentriert. Ein Beispiel syntenischer Homologie zwischen Y-Chromosomen verschiedener Ordnungen der Säugetiere repräsentieren die Gene *DFFRY-DBY-UTY* des humanen Deletionsintervalls 5C einerseits und die entsprechenden Gene *Dffry-Dby-Uty* des murinen Deletionsintervalls *Sxr^b* andererseits (Mazeyrat *et al.*, 1998).

Kürzlich identifizierten Ferguson *et al.* (2009) zwei weitere Gene (*H2al2Y* und *AK006152*) auf dem kurzen Arm des murinen Y-Chromosoms außerhalb des *Sxr^b*-Deletionsintervalls. Beide Gene werden testisspezifisch, bevorzugt in Spermatozyten exprimiert und zeigen eine verstärkte testikuläre Transkription in Mäusen mit MSYq-Deletionen. Es sind mindestens zwei Kopien *AK006152* auf dem murinen Yp präsent, die mindestens drei Exons und zwei Introns beinhalten. Bisher wurde kein X-chromosomales oder autosomales *AK006152* Homolog im Mausgenom identifiziert. Im Gegensatz zu *AK006152* ist *H2al2Y* (*Histone 2A-like y-linked*) intronlos und in mindestens zwei Kopien organisiert. *H2al2y* codiert für ein neues Histon der H2A-Superfamilie und besitzt multiple verwandte Gene auf dem murinen X-Chromosom (*H2al1*), sowie ein einzelnes verwandtes autosomales Gen auf dem murinen Chromosom 2 (*H2al2*). Auch die X-chromosomalen und das autosomale Gen dieser Familie zeigen eine spezifische Expression in Spermatozyten. Dies deutet auf eine Rolle der kodierten Proteine bei der Reorganisation und Neuverpackung des Genoms in reifenden Keimzellen hin. (Ferguson *et al.*, 2009).

Die MSYq-Region (langer Arm des Y-Chromosoms ohne die pseudoautosomale Region)

der Maus ist vornehmlich aus hochrepetitiven DNA-Sequenzen zusammengesetzt und in den meisten Zelltypen transkriptionell inaktiv (Eicher *et al.*, 1989; Fennelly *et al.*, 1996; Navin *et al.*, 1996; Nishioka *et al.*, 1986, 1992, 1993 a, b; Simpson 1997). Deletionen in dieser Region beeinträchtigen die Spermienentwicklung (Spermiogenese) und Spermienfunktion, u.a. durch abnormale Entwicklung des Spermienkopfes, wobei das Ausmaß der Störungen je nach Größe der Deletion variiert von Teratozoospermie und reduzierter Fertilität bis hin zu kompletter Infertilität (Conway *et al.*, 1994; Moriwaki *et al.*, 1988; Styrna *et al.*, 1991a, b, 2002; Suh *et al.*, 1989; Touré *et al.*, 2004; Xian *et al.*, 1992).

Bisher wurden vier Gene auf dem langen Arm des murinen Y-Chromosoms identifiziert. Die in multiplen Kopien vorliegende *Ssty*-Genfamilie (*Y-linked spermatogenesis specific transcript*, synonym als *Y353/B* bezeichnet) wird testis-spezifisch in runden Spermatischen exprimiert und hat wichtige Funktionen für die Spermiendifferenzierung und -funktion. Neben der *Ssty*-Genfamilie wurden kürzlich noch zwei weitere im *multi-copy* Status vorliegende Gene auf dem langen Arm des Maus-Y-Chromosoms identifiziert, *Sly* und *Asty* (Touré *et al.*, 2005). Die *Sly*-Genfamilie (*Sycp3-like Y-linked*) kodiert für ein Protein mit Homologie zu den Chromatin-assoziierten Proteinen *Xlr* und *Xmr*, welche von den X-chromosomalen *Xlr/Xlm* Genfamilie kodiert werden. *Sly*-Transkripte werden von multiplen Loci auf MSYq kodiert und werden abundant im Testis in Spermatischen exprimiert (Touré *et al.*, 2005).

Das *Asty*-Gen besitzt ein annähernd sequenzidentisches Homolog auf dem X-Chromosom (Touré *et al.*, 2005). *Asty* wird u.a. in Spermatischen transkribiert, es ist aber derzeit noch unklar, ob die prozessierte *Asty*-mRNA auch translatiert wird (Touré *et al.*, 2005).

Das *Orly*-Gen (*Oppositely-transcribed, rearranged locus on the Y*) auf Yq setzt sich aus partiellen Kopien der bekannten Yq-Gene *Ssty1* (Exon 1, Exon 2 und ein Teil von Exon 3), *Asty* (Exon 2 bis Exon 4) und *Sly* (Exon 1 und Exon 2 und Teile von Intron 2) zusammen, wobei das *Ssty1*-Genfragment in *Antisense*-Orientierung vorliegt (Ellis *et al.*, 2007). Die Promotorregionen von *Ssty* und *Sly* sind dabei erhalten geblieben, liegen in *antisense*-Orientierung zueinander vor und ermöglichen eine bidirektionale Transkription des *Orly*-Gens. Die chimäre Struktur des *Orly*-Genlocus ist beispiellos und ermöglicht die Transkription des *Sense*-Transkripts *Orly* und des *Antisense*-Transkripts *Orlyos*, die innerhalb des murinen Testis spermatidenspezifisch exprimiert werden (Ellis *et al.*, 2007).

1.3 Das *testis-specific protein, Y-encoded (TSPY)*

TSPY (*testis-specific protein, Y-encoded*) ist eine heterogene, Y-chromosomale Genfamilie, die eine Konservierung bei den plazentalen Säugern (*Eutheria*) aufweist. Seit der Entdeckung des humanen *TSPY*-Gens im Jahre 1987 (Arnemann *et al.*, 1987; Dechend *et al.*, 2000, Krick *et al.*, 2003) wurden orthologe Genfamilien in vielen plazentalen Linien charakterisiert: in weiteren Primaten wie Menschenaffen, Lemuren (Zhang *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1996) und Makaken (Jakubiczka *et al.*, 1993), in *Artiodactylen* (Paarhufer) wie Rind, Schaf, Ziege und Schwein (Jakubiczka *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1997a und 1997b; Vogel und Schmidtke 1998, Verkaar *et al.*, 2004), in *Perissodactylen* (Unpaarhufer) wie dem Pferd (Manz *et al.* 1998) und in *Rodentia* (Nagetiere) bei der Familie *Muridae* (Langschwanzmäuse) (Vogel *et al.*, 1998a; Mazeyrat und Mitchell, 1998, Dechend *et al.*, 1998, Karwacki *et al.*, 2006). Bei Säugern wie *Prototheria* (Kloakentiere) und *Metatheria* (Beuteltiere) ist die *TSPY*-Konservierung bislang noch ungeklärt. Im Southern-Blot wurde eine Kreuzhybridisierung einer humanen *TSPY*-cDNA-Sonde mit weiblicher genomischer Beuteltier-DNA als autosomale Lokalisation gewertet (Delbridge *et al.*, 1997).

Die genomische Organisation von *TSPY* variiert. Bei Mensch und Rind liegt *TSPY* als repetitive Genfamilie vor. Besonderheiten weisen hingegen die Nagetiere auf. Während *Mus plathyrix* ebenfalls eine *multi-copy* Organisation zeigt, besitzen andere Spezies des Subgenus *Mus* wie die Labormaus lediglich unikale *Tspsy*-Gene, welche zu Pseudogenen degeneriert sind (Schubert *et al.*, 2000a, b). In der Ratte wiederum ist das *rTspsy* immer noch funktionell und liegt in zwei Kopien vor (Dechend *et al.*, 1998; Mazeyrat und Mitchell, 1998).

Tspsy-orthologe Gene konnten überdies im Genom von Hamstern (Genus *Mesocricetus*) und Sandmäusen (Genus *Meriones*) identifiziert werden (Karwacki *et al.*, 2006). Das *gTspsy* (Gerbil-Tspsy) liegt auch bei der mongolischen Rennmaus (*Meriones unguiculatus*) als degeneriertes Pseudogen im *single-copy* Status vor. Karwacki *et al.* (2006) identifizierten sechs Mutationen, welche die Kodierung und das Spleißen des *gTspsy* beeinträchtigen und jede für sich für einen Funktionsverlust des *gTspsy* ausreichend gewesen wären. Diese Mutationen unterscheiden sich vollkommen von den Nonsense- und Spleißmutationen, welche zum Funktionsverlust des murinen *Tspsy*-Gens geführt haben (Schubert *et al.*, 2000a, b). So ist der *Tspsy*-Genlocus während der Nagerevolution mindestens zweimal unabhängig voneinander degeneriert. Die Organisation und Expression des *hTspsy* (Hamster-Tspsy) ähnelt sehr denen der funktionellen orthologen Gene

im Primaten- und Rindergenom. Das Hamster-*Tspy* ist in multiplen Kopien mit funktionellen Mitgliedern und Pseudogenen organisiert, die testisspezifisch exprimiert werden (Karwacki *et al.*, 2006).

Die genaue Funktion, Regulation und Evolution der *TSPY*-Genfamilie ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend ungeklärt. Die evolutionäre Konservierung des Testis-spezifischen Proteins, Y-kodiert bei den rezenten *Plazentalia* und die abundante Expression von *TSPY* im Testis deuten jedoch auf eine wichtige Funktion während der Spermatogenese hin. Der derzeitige Stand der Forschung lässt eine Rolle in der Proliferation und/oder meiotischen Differenzierung der Spermatogonien vermuten.

In den folgenden Abschnitten wird eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten orthologen Gene des Menschen und der Maus gegeben.

1.3.1 Das humane *TSPY* (*hTSPY*)

TSPY wurde erstmals 1987 von Arnemann *et al.* beschrieben. Arnemann *et al.* (1987) isolierten den genomischen Subklon pJA36B2 aus dem Cosmidklon cos36 und wiesen die transkriptionelle Aktivität des isolierten Gens in testikulärem Gewebe nach. pJA36B2 stellte sich als Derivat eines Pseudogens heraus. Ein zweiter *TSPY*-Lokus wurde drei Jahre später durch die Isolierung des testikulären *TSPY*-cDNA-Klons pJA923 identifiziert (Arnemann *et al.*, 1991). Dieser Klon wies eine 92%ige Sequenzhomologie zu pJA36B2 auf.

1992 isolierten Zhang *et al.* den genomischen Klon cY-231. Dieser detektierte im Northern-Blot mit humaner testikulärer RNA spezifisch ein 1,3 kb Signal und zeigte überdies im Southern-Blot ein Y-spezifisches Hybridisierungsmuster. Durch ein Screening einer humanen testikulären cDNA-Bank mit dem genomischen Klon cY-231 wurde der *TSPY*-cDNA-Klon Y-231 isoliert. Dieser besitzt eine 97%ige Homologie zu pJA923 und detektiert im Northern-Blot spezifisch eine Bande von 1,3 kb. Über Sequenzvergleiche zwischen cY-231, Y-231 und pJA923 konnte die Struktur einer *TSPY*-Transkriptionseinheit aufgedeckt werden. Eine solche Einheit umfasst 2791 bp und setzt sich aus 6 Exons (531, 78, 112, 146, 82 und 210 bp) und 5 Introns (606, 128, 100, 106, und 692 bp) zusammen (Zhang *et al.*, 1992; Schnieders *et al.*, 1996). Allerdings entspricht die Transkriptvariante Y-231 nicht der Mehrheit der *TSPY*-Transkripte, da sie über die Nutzung einer alternativen Spleißakzeptorsequenz generiert wird, welche sich 11 bp strangabwärts in Exon 5 befindet (Schnieders *et al.*, 1996). Das prädominierende

Transkript, als *TSPY^{major}* bezeichnet, wurde 1996 von Schnieders *et al.* identifiziert. Dieses umfasst 1159 bp und kodiert für ein Polypeptid von 308 Aminosäuren.

Die Organisation der heterogenen *TSPY*-Genfamilie ist im humanen Genom einzigartig: sie ist die bisher größte bekannte, sich tandemartig wiederholende proteinkodierende Genfamilie (Skaletsky *et al.*, 2003; Tyler-Smith, 2008). Sie ist innerhalb der MSY (*male-specific region of the Y chromosome*) auf dem Y-Chromosom lokalisiert, wobei der Hauptteil der *TSPY*-Kopien auf Yp im Deletionsintervall 3C liegt (*TSPYA*). Je ein *TSPY*-Mitglied ist im Deletionsintervall 3C als konstitutiver Bestandteil von *DYZ5* in tandemartig repetitiven Sequenzabschnitten von 20,4 kb eingebettet (Manz *et al.*, 1993; Skaletsky *et al.*, 2003). Pro Genom existieren 20-40 *DYZ5*-Einheiten, die jeweils eine *TSPY*-Kopie beherbergen (Tyler-Smith *et al.*, 1988; Tyler-Smith, 2008). Neben diesem Hauptcluster bestehen noch mindestens zwei weitere Loci auf Yp, welche als *TSPYB* und *TSPYD* bezeichnet werden, sowie drei Loci auf Yq (*TSPYC*, *TSPYE* und *TSPYF*) (Dechend *et al.*, 2000; Ratti *et al.*, 2000). Die *TSPY*-Kopienzahl variiert beim gesunden Menschen interindividuell zwischen 23 bis 64 Kopien (Repping *et al.*, 2006). In infertilen Männern wurde allerdings von Vodicka *et al.* (2007) eine signifikant höhere Anzahl an *TSPY*-Kopien detektiert. Zwischen den einzelnen funktionellen *TSPY*-Genfamilienmitgliedern existieren Sequenzunterschiede von 1% auf kodierender Ebene und innerhalb der Promotorregion; unter Einbeziehung von Pseudogenen (z.B. pJA36B2), die auch präsent sind, beträgt die Nukleotiddivergenz bis zu 10% (Vogel und Schmidtke, 1998). Die genomische Variabilität spiegelt sich auch auf der Ebene der bislang aus Testis und Prostata isolierten *TSPY*-Transkripte wider (Dechend *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2003). Es ist bisher nicht bekannt, ob alle funktionellen *TSPY*-Kopien exprimiert werden. Bislang wurden 18 verschiedene *TSPY*-Transkriptvarianten identifiziert, die sich im Spleißmuster und/oder ihrer Sequenz unterscheiden (Zhang *et al.*, 1992, Schnieders *et al.* 1996; Dechend, 2000; Lau *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2008). Sechs dieser Varianten wurden kürzlich von Schubert *et al.* (2008) in Hoden von androgeninsensitiven transgenen *TSPY-Ar^{Tjm}* Männchen der Maus beschrieben. Ihre biologische Bedeutung und ein mögliches Vorkommen beim Menschen sind noch unklar. Der Prototyp *TSPY^{major}* kodiert für ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 35 kDa, welches posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert wird und sich im Western-Blot überwiegend als 38,5 kDa-Phosphoprotein darstellt (Schnieders *et al.*, 1996, Lau *et al.*, 2003).

TSPY wird abundant im Testis und zu einem geringeren Anteil in Epithelzellen der Prostata exprimiert (Schnieders *et al.*, 1996, Lau *et al.*, 2003). Bereits in 14-40 Wochen alten humanen fetalen Testes konnte *TSPY* in Prä spermatogonien und Gonozyten über Immunhistochemie nachgewiesen werden (Honecker *et al.*, 2004a). Im adulten Testis stellt sich *TSPY* immunhistochemisch keimzellspezifisch im Zytoplasma von Spermatogonien, primären Spermatozyten und runden Spermatischen dar (Schnieders *et al.*, 1996; Kido und Lau, 2005). Einige Spermatogonien zeigen ebenfalls im Nukleoplasma eine *TSPY*-Immunfärbung (Schnieders *et al.*, 1996). Das von Schnieders *et al.* (1996) eingesetzte Antiserum 837/3 erkennt 149 Aminosäuren des N-terminalen Proteinbereichs. Die von Kido und Lau (2005) generierten monoklonalen Antikörper richten sich einerseits gegen die N-terminalen Aminosäuren 1-150 (Klon #2) und andererseits gegen die in allen *TSPY*-Isoformen vorhandenen C-terminalen Aminosäuren 151-308 (Klon #7) des *TSPY*-Proteins. Während Klon #2 ähnlich dem Antiserum 837/3 vor allem Spermatogonien und in geringerem Maße auch primäre Spermatozyten detektiert, ergibt sich beim Einsatz von Klon #7 neben einer spermatogonialen und spermatozytären Färbung auch eine Markierung runder Spermatischen (Kido und Lau, 2005), was auf das Vorhandensein spezifischer Transkripte in den Spermatischen hindeutet.

Die Expression von *TSPY* lässt sich *in vitro* über Androgene stimulieren (Lau und Zhang, 2000). Bei der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte nach Androgenapplikation eine Hochregulierung der *TSPY*-Expression beobachtet werden. Eine Hochregulierung der *TSPY*-Expression zeigten auch Singh *et al.* (2008) in der androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP-C81, die ein *In-vitro*-Modell für das späte Stadium der Prostatakarzinomentwicklung mit assoziierter Hormonunabhängigkeit darstellt. Dasari *et al.* (2002) demonstrierten *in vitro* eine Regulierung der *TSPY*-Transkription über DNA-Methylierung in LNCaP- und ND1-Zelllinien. Auch Gallagher *et al.* (2005) zeigten für die parentale humane Melanomzelllinie WM793, dass die *TSPY*-Transkription *in vitro* durch Methylierung reprimiert werden kann.

Über einen *Screen* einer murinen fetalen gonadalen cDNA-*Library* mittels der *Yeast-Two-Hybrid*-Methode identifizierten Kido und Lau (2008) den eukaryontischen Translationselongationsfaktor eEF1A als möglichen Bindungspartner von *TSPY*. eEF1A ist essentiell für die Elongationsphase während der Proteintranslation. Kido und Lau (2008) wiesen eine Co-Lokalisation und Interaktion von *TSPY* und eEF1A in co-transfizierten COS7-Zellen nach, sowie eine Co-Expression von *TSPY* und eEF1A in testikulären Keimzelltumoren. Überdies zeigten sie, dass *TSPY* und eEF1A synergetisch

die Expression von einem Luciferase Reporter gen in vorübergehend co-transfizierten HEK293-Zellen verstärken. Die Autoren schlossen daraus, dass TSPY wachstumsfördernde Funktionen ausübt, indem es synergetisch mit eEF1A die Proteinsynthese stimuliert.

1.3.2 Das muride *Tspy* (*mTspy*)

Ein *TSPY*-orthologes Gen bei der Labormaus *Mus musculus* wurde 1998 von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (Vogel *et al.*, 1998a; Mazeirat und Mitchell, 1998). Über Sequenzvergleiche verschiedener genomischer Klone und testikulärer cDNA-Klone des Maus-*Tspy*-Gens (*mtspy*), einer Metaphasen-FISH-Analyse sowie quantitative Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei *mTspy* um ein *single-copy* Pseudogen auf dem kurzen Arm des murinen Y-Chromosoms handelt (Vogel *et al.*, 1998a; Mazeirat und Mitchell, 1998). Durch *Nonsense*-Mutationen in den Exons 1, 2 und 5, welche Stopcodons in allen drei Leserahmen zur Folge haben, kann das *mTspy* kein funktionelles Transkript generieren. Ebenso ist das Spleißmuster des *mTspy* abweichend von denen der humanen und bovinen funktionellen Orthologen. Durch eine Mutation in der Spleißakzeptorsequenz von Intron 3 (GT → GA) sowie einer 24 bp-Deletion am Übergang Intron 1/Exon 2 ergibt sich ein aberrantes Spleißverhalten, bei dem die Exons 1, 2, 5 und 6 in den *mtspy*-Transkripten erhalten bleiben, die Exons 3 und 4 allerdings herausgespleißt werden. Aus diesen Transkripten kann kein *TSPY*-homologes Protein erzeugt werden (der längste durchgängige offene Leserahmen umfasst 47 Aminosäuren), weshalb *Tspy* bei Spezies des Subgenus *Mus* als Pseudogen klassifiziert wird (Schubert *et al.*, 2000).

Schubert *et al.* (2000) zeigten, dass die Evolution des murinen *Tspy* eine Momentaufnahme des allmählichen Verfalls einer Y-chromosomalen Genfamilie innerhalb der MSY-Region widerspiegelt. Die Degeneration zum Pseudogen im Subgenus *Mus* erfolgte während der *Murinae*-Evolution nach der Abspaltung der *Mus-plathyrix*-Linie vor 4 Mio. Jahren (Schubert *et al.*, 2000a, b) vom gleichnamigen Genus. Bei allen untersuchten Arten des Subgenus *Mus* (*M. booduga*, *M. cervicolor*, *M. spretus* und *M. macedonicus*) liegt *Tspy* als unikales Pseudogen vor. Funktionelle Homologe konnten hingegen bei der Gattung *Apodemus* (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*) und in *Mus plathyrix* (Subgenus *Pyromys*) identifiziert werden. *Mus plathyrix* besitzt ebenso wie Mensch und Rind eine Y-chromosomale, heterogene, repetitive *Tspy*-Genfamilie mit funktionellen als auch nichtfunktionellen Mitgliedern. Das *Apodemus-Tspy* hingegen stellt ein funktionelles

aTspy-Gen im *single-copy*-Status dar, welches testisspezifisch exprimiert wird (Schubert *et al.*, 2000a, b).

Unabhängig von dem oben beschriebenen Degenerationsereignis vor ca. vier Mio. Jahren hat vor ca. 22 Mio. Jahren nach der Abspaltung der *Gerbillinae* (Rennmäuse) von den *Muridae* ein weiteres Mal ein natürlicher Funktionsverlust des *Tspy*-Gens während der *Rodentia*-Evolution stattgefunden (Karwacki *et al.*, 2006). Ähnlich wie bei *Mus plathyrix* ist *Tspy* beim Goldhamster als repetitive, sequenzheterogene Genfamilie mit funktionellen und nicht funktionellen Mitgliedern organisiert und testisspezifisch exprimiert.

Das *Tspy* der Labormaus *Rattus norvegicus*, das *rTspy*, wurde 1998 von zwei Arbeitsgruppen charakterisiert (Dechend *et al.*, 1998; Mazeyrat und Mitchell, 1998). Bei der Ratte liegt *Tspy* als funktionell konserviertes Gen in zwei Kopien auf dem Ratten Y Chromosom vor.

1.3.3 Die TTSN-Superfamilie

Alle TSPY-Isoformen haben zumindest einen Teil einer konservierten, Cyclin-B-bindenden und/oder Histon-bindenden, ungefähr 160 Aminosäuren umfassenden Domäne, der SET/NAP-Domäne, gemeinsam (Li und Lau, 2008). Diese wurde benannt nach ihrer ursprünglichen Identifizierung im humanen SET-Onkoprotein (*suppressor of variegation, enhancer of zeste and Trithorax*) und im NAP-1 (*nucleosome assembly protein*) (Tsuchiya *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1998). Die SET/NAP-Proteine sind strukturell verwandt und haben eine große Bandbreite biologischer Funktionen, wie Zellzyklusregulation, Chromatinorganisation, Transkriptionsmodulation, Steroidrezeptor-Coregulation und Histone-Chaperone (Adachi *et al.*, 1994; Kellogg *et al.*, 1995; Estanyol *et al.*, 1999; Compagnone *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2001; Canela *et al.*, 2003; Ozbun *et al.*, 2003; Gamble *et al.*, 2005; Kandilci and Grosveld, 2005; Vera *et al.*, 2005; Kido and Lau, 2006). Durch ihre Homologie zueinander werden die SET/NAP-Proteine TSPY (synonym auch als TSPY1 bezeichnet), das X-Homolog TSPX (synonym als TSPY-like 2, DENTT oder CDA1 bezeichnet; Delbridge *et al.*, 2004), die TSPY-like Proteine (synonym auch als TSPYL1 und TSPYL3-6 klassifiziert) (Vogel *et al.*, 1998b), das humane Onkoprotein SET (von Lindern *et al.*, 1992, Adachi *et al.*, 1994, Nagata *et al.*, 1995, Shin *et al.*, 1999) sowie NAP1 (Ishimi und Kikuchi, 1991) zur TSPY/TSPY-like/SET/NAP 1(TTSN)-Protein-Superfamilie zusammengefasst (Vogel und Schmidtke, 1998).

Das humane *TSPX* und das murine *Tspx* sind strukturell und in ihrer Lokalisation nahe dem *SMCX*-Gen evolutionär hoch konserviert. Sie zeigen eine ubiquitäre Expression und unterliegen der X-Inaktivierung. Die Konservierung eines X-Homologs von *TSPY* bei Mensch und Maus und die chromosomale Nähe des *TSPX* Gens in beiden Spezies zum *SMCX*-Gen werden als Indizien dafür gewertet, dass das *TSPY/TSPX*-Genpaar ein Relikt des ursprünglichen autosomalen Vorläuferpaares ist, aus dem sich die Gonosomen der *Mammalia* entwickelt haben (Delbridge *et al.*, 2004). Während das Y-chromosomale Homolog im Laufe der Evolution eine männlichspezifische Funktion bei der Spermatogenese akquirierte, behielt das X-chromosomale Homolog seine „Haushaltsgenfunktion“ bei und wurde Gegenstand des X-Inaktivierungssystems (Delbridge *et al.*, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *TSPX* oder *SET* zu einer Verzögerung bzw. einem Stillstand des Zellzyklus in der G₂/M-Phase führt (Chai *et al.*, 2001; Canela *et al.*, 2003; Kellogg *et al.*, 1995). Dagegen beschleunigt eine *TSPY*-Überexpression die Proliferation vorübergehend transfizierter HeLa-Zellen durch einen schnelleren G₂/M-Übergang (Oram *et al.*, 2006). Es wird postuliert, dass diese zellzyklusregulierenden Eigenschaften der Mitglieder der TTSN-Proteinfamilie durch eine direkte Interaktion mit den mitotisch aktiven Typ B Cyclinen vermittelt werden. Li und Lau (2008) zeigten, dass *TSPY* und *TSPX* *in vitro* Cyclin B1 binden, welches entscheidend auf die G₂/M-Transition des Zellzyklus einwirkt. *TSPY* vermag *in vitro* und *in vivo* die Kinaseaktivität des Cyclin B1-CDK1(*cyclin-dependent kinase 1*)-Komplexes zu stimulieren, wohingegen *TSPX* einen reprimierenden Einfluss auf die Cyclin B1-CDK1-Funktion ausübt. Die Inhibition der Kinaseaktivität des Cyclin B1-CDK1-Komplexes wird durch den sauren Carboxylschwanz von *TSPX* und *SET* vermittelt, welcher *TSPY* fehlt (Li und Lau, 2008).

1.3.4 Onkogenes Potenzial des *TSPY* und Keimzelltumore

TSPY wird eine mögliche Rolle bei der Entstehung von Tumoren zugesprochen. Eines der Indizien dafür ist eine nachweisbar starke Expression in malignen testikulärer Keimzelltumore und ihren Vorläuferstadien. So wird *TSPY* im testikulären Carcinoma-*in-situ*-Stadium (CIS; Schnieders *et al.*, 2005) exprimiert, dem Vorläuferstadium invasiver Seminome und Nonseminome, sowie im Gonadoblastom (Hildenbrand *et al.*, 1999; Kersemaekers *et al.*, 2005 Lau *et al.*, 2000), dem benignen Vorläuferstadium der

dysgenetischen Gonade, das sich vornehmlich zu einem malignen Dysgerminom entwickeln kann (Kersemaekers *et al.*, 2005). Eine *TSPY*-Expression lässt sich außerdem in testikulären Seminomen (Lau *et al.*, 2000) und intrakraniellen testikulären Keimzelltumoren und in einigen Dysgerminomen nachweisen (Hoei-Hansen *et al.*, 2006; Kersemaekers *et al.*, 2005). In Non-Seminomen hingegen wird *TSPY* nur minimal oder gar nicht exprimiert (Li *et al.*, 2007). Überdies wird *TSPY* auch in anderen malignen Geweben exprimiert, wie dem hepatozellulären Karzinom und dem Nierenzellkarzinom bei Männern (Yin *et al.*, 2005), im Prostatakarzinom (Hildenbrand *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2003; Schnieders *et al.*, 1996) und im humanen Melanom (Gallagher *et al.*, 2005). *TSPY* wurde durch Deletionsmapping in die Gonadoblastom-induzierende Region auf dem humanen Y-Chromosom gemappt und gilt als der wahrscheinlichste Kandidat für den *GBY*-Locus, dem *gonadoblastoma locus on the Y chromosome* (Tsuchiya *et al.*, 1995.) Diese Annahme wird auch durch einen starken Expressionsnachweis von *TSPY* in den dysgenetischen Keimzellen unterstützt (Cools *et al.*, 2006). Ein Gonadoblastom ist ein maligner Tumor der dysgenetischen Gonade von Frauen mit 46,XY-Karyotyp oder Y-chromosomalen Mosaiken, der mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 30\%$ entsteht (Verp und Simpson, 1987). *TSPY* wird auch stark in dysgenetischen Gonaden von Patienten mit testikulärer Feminisierung (TFM, Karyotyp 46,XY, durch Androgenresistenz weiblicher Phänotyp; siehe auch 1.5.3) exprimiert, die ein erhöhtes Risiko einer Carcinoma *in situ*-Entwicklung von 15-35% zeigen (Looijenga *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Indizien wird *TSPY* als Kandidatengene für *GBY* gehandelt.

Neben der *TSPY*-Expression in benignen und malignen Tumoren und der Lage innerhalb der *GBY*-Region sprechen noch weitere Indizien für eine putative onkogene Rolle von *TSPY*. Dazu gehört zum einen die relativ hohe Homologie von *TSPY* zu dem Protoonkogen *SET* (Schnieders *et al.*, 1996). Oram *et al.* (2006) erzielten in athymischen Nacktmäusen, denen sie subkutan *TSPY* überexprimierende transfizierte HeLa- und NIH3T3-Zellen impften, ein im Vergleich zu den Kontrollen beschleunigtes Tumorwachstum. Zudem führte eine ektopische *TSPY*-Expression in transfizierten HeLa-Zellen zu einer Hochregulierung von Onkogenen und zellwachstumsfördernden Genen und zu einer Hemmung von apoptotischen Genen und Zellzyklusinhibitoren (Oram *et al.*, 2006).

1.4 Spermatogenese der Maus

Während bei der Oogenese weiblicher Säugetiere die Gesamtzahl der weiblichen Keimzellen schon während der Embryonalentwicklung festgelegt wird, läuft die männliche Spermatogenese kontinuierlich während des gesamten adulten Lebens ab.

Bei den Säugetieren sind die Gonaden und deren Ausführungsgänge während der Embryonalentwicklung bipotent angelegt. Erst durch die Expression des geschlechtsdeterminierenden Gens *SRY* findet die geschlechtsspezifische Differenzierung der indifferenten Gonadenanlage (Urogenitalleiste) zum Testis statt (Wehner und Gehring, 1995). Diese Entwicklung setzt bei der Maus ab Tag 10,5 *post-coitum* (dpc) ein, während der Expression des murinen *Sry*-Gens (Berta *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990; Koopmann *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990).

Primordiale Keimzellen (PGCs) sind in der Maus bereits am Embryonaltag E6,5 vorhanden und immunhistochemisch anhand der Expression von Plazentaler Alkalischer Phosphatase (PLAP) und OCT3/4 nachweisbar (Surani, 2001). Ihre Entstehung aus proximalen Epiblastzellen erfolgt durch Signale des benachbarten extraembryonalen Ektoderms (Lawson *et al.*, 1999; McLaren, 2003). An Tag E8,5 befinden sich im entodermalen Dottersackepithel ca. 100 PGCs. Diese wandern von Tag 9,5 dpc bis 12,5 dpc unter fortschreitender Proliferation in die Urogenitalleiste direkt neben der Nierenanlage ein (Green, 1966; Eddy *et al.*, 1981). Gleichzeitig zu dieser Besiedlung der Genitalleiste mit Urkeimzellen findet eine Eliminierung extragonadaler PGCs über BAX-abhängige Apoptose statt (Stallock *et al.*, 2003). Sobald die in der Medulla verbleibenden PGCs von sich bildenden Sertolizellen umgeben sind, werden sie als Gonozyten bezeichnet (Donovan *et al.*, 1986), bei Kontakt mit der Basalmembran des primitiven Tubulus (Hodenkanal) hingegen als Präspmatogonien (Honecker *et al.*, 2004). Bei Abschluss der Testisdifferenzierung befinden sich etwa 5000 Präspmatogonien zusammen mit Sertoli-Vorläuferzellen in den Hodenkanälchen. Das Interstitium wird von einer großen Anzahl fetaler Leydigzellen besiedelt. Nach einer Proliferationsphase von einigen Tagen nimmt die mitotische Aktivität der Präspmatogonien ab, und sie arretieren schließlich ab Tag E16 bis zur Geburt in der prämeiotischen G₀/G₁-Phase des Zellzyklus (Vergouwen *et al.*, 1991). Degenerierende Keimzellen werden von den umgebenden Sertolizellen phagozytiert (de Kretser, 1993).

Ab dem dritten postnatalen Tag differenzieren die Präspmatogonien, welche in Kontakt mit der Basalmembran stehen, zu undifferenzierten Typ A *single* (As) Spermatogonien

(früher auch als *A isolated* bezeichnet, Huckins, 1971). Sie fungieren als spermatogoniale Stammzellen (Brinster, 2002; Zhao und Garbers, 2002). Im Tubuluslumen verbliebene Gonozyten gehen dagegen in die Apoptose über (McLean *et al.*, 2003).

Mit Beginn der Geschlechtsreife vollzieht sich in den *Tubuli seminiferi* (den Hodenkanälchen) der Testes die zyklisch ablaufende Spermatogenese, welche bei der Maus in 12 Stadien eingeteilt wird (Russel *et al.*, 1990). Funktionell wird dieser unidirektionale Prozess in drei Phasen unterteilt:

- 1) die mitotische Proliferationsphase, in der die Spermatogonien eine hohe Teilungsrate haben,
- 2) die Meiosephase mit der ersten und zweiten Reifeteilung, in der das genetische Material der primären Spermatozyten halbiert und rekombiniert wird,
- 3) die Spermiogenese, in der sich die haploiden Spermatiden zu reifen, befruchtungsfähigen Spermatozoen entwickeln.

Ab dem sechsten Tag der postnatalen Entwicklung beginnen die Typ A Spermatogonien sich asymmetrisch zu teilen (Mc Lean *et al.*, 2003). Aus dieser Teilung geht einerseits wieder eine *As*-Spermatogonie und andererseits eine Typ A *paired* (A pr) Spermatogonie hervor. Letztere teilt sich dichoton in zwei Typ A *aligned* (A al) Spermatogonien (De Rooij und Grootegoed, 1998; De Rooji *et al.*, 1999). Über interzelluläre Brücken bleiben die *A paired* und die *A aligned* Spermatogonien in Verbindung. Aus den *A aligned* Spermatogonien entstehen durch Weiterdifferenzierung Typ A1 Spermatogonien, die sich wiederum zu Typ A2 bis Typ A4 Spermatogonien differenzieren. Aus der Teilung der Typ A4 Spermatogonien entstehen eine intermediäre und wieder eine Typ A1 Spermatogonie. Die intermediäre Spermatogonie teilt sich in zwei Typ B Spermatogonien, welche sich anschließend in je zwei präleptotäne Spermatozyten teilen. Diese gehen am Tag 11 der postnatalen Entwicklung in die Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung (Meiose I) über. Darin durchlaufen die primären Spermatozyten in einem zeitintensiven Prozess nacheinander das leptotäne, zygotäne, pachytäne und diplotäne Stadium, woran sich in rascher Folge die Metaphase, Anaphase und Telophase anschließen. Daraus gehen zwei sekundäre Spermatozyten hervor, die allerdings nur kurzlebig sind und schnell in die zweite meiotische Reifeteilung (Meiose II) übergehen. Die daraus resultierenden haploiden runden Spermatiden bleiben durch Plasmabrücken miteinander verbunden (Russel, 1990). Die Dauer der meiotischen Phase beträgt bei der Maus 8-10 Tage. Für die sich daran anschließende Spermiogenese, in der sich die runden in befruchtungsfähige elongierte

Spermatiden umgestalten, werden nochmals 14 Tage benötigt. In dieser Differenzierung ist das Spermatidenchromosom einer sehr starken Kondensation unterworfen. Zahlreiche Organellen und Zytoplasma werden in Residualkörpern abgeschnürt und ein Flagellum und Akrosom ausgebildet. Während dieser Spermiogenese schützen und ernähren Sertolizellen die sich differenzierenden Spermatiden. Außerdem phagozytieren die Sertolizellen einen Großteil des von den Spermatiden abgestoßenen Zytoplasmas. Die hochdifferenzierten Spermien werden vom Tubuluslumen durch peristaltische Kontraktionen der Tubuluswände zum *Rete testis* und anschließend für die weitere Reifung in die Nebenhoden transportiert (Russel, 1990).

1.5 Kit-Defizienz

Der transmembrane Tyrosinkinaserzeptor Kit und sein Ligand SCF (*stem cell factor*) spielen eine fundamentale Rolle in der Hämatopoese, Melanogenese und Gametogenese. In der Spermatogenese spielen Signale des Kit/SCF-Systems eine wichtige Rolle bei der Proliferation, dem Überleben und der Migration der PGCs sowie bei der Proliferation und dem Überleben der differenzierten Typ A Spermatogonien. Bei der Maus ist während der Embryonalentwicklung die *c-kit*-Expression (von 7,5 bis 13,5 dpc) z. T. mit der Proliferations- und Migrationsphase der PGCs überlappend (Manova *et al.*, 1991). Mutationen im *W*- (*white spotting*) oder *Sl*-Locus (*Steel*, kodierend für SCF) inhibieren die Proliferation und Migration der primordialen Keimzellen und führen zu einer drastischen Reduktion der Anzahl der PGCs in der Gonadenanlage (Russell, 1979; Chabot *et al.*, 1988; Geissler *et al.*, 1988; Dolci *et al.*, 1991; s. Abbildung 1-2).

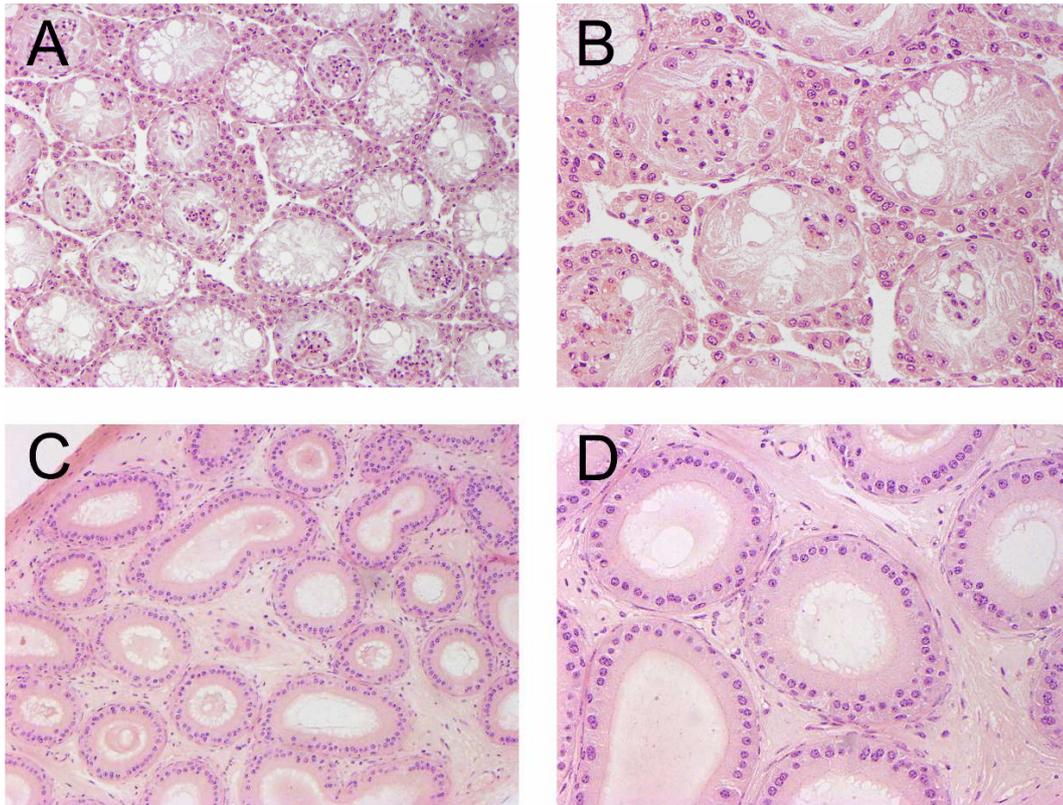


Abbildung 1-2: Histologie von Testis und Epididymis eines adulten Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchens. HE-gefärbte Technovitschnitte eines Testis (A, 100x und B, 200x) und eines Nebenhodens (C, 100x und D, 200x) eines 5 Monate alten Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchens. Die Hoden zeigen keine Keimzellen über die Stufe der Spermatogonien hinaus, und die Nebenhoden enthalten keine Spermien.

Der Kit-Ligand SCF wird entlang des Migrationspfades der PGCs von Mesenchymzellen und in Sertoli-Vorläuferzellen in den embryonalen Genitaleisten exprimiert (Matsui *et al.*, 1990). Pesce *et al.* (1997) zeigten, dass die Kit/SCF-Interaktion in Zellkultur zur Adhäsion der PGCs an somatische Zellen beiträgt. Co-Kulturen von PGCs und Sertolizellen bestätigten, dass PGCs *in vitro* nur in Anwesenheit der SCF-exprimierenden Sertolizellen überleben und proliferieren können. In Abwesenheit dieser SCF-exprimierenden Sertolizellen gehen PGCs in die Apoptose über (Dolci *et al.*, 1991; Godin *et al.*, 1991; Matsui *et al.*, 1991).

Die *c-kit*-Expression setzt nach der Geburt wieder am Tag 5 *post partum* (dpp) ein. Im juvenilen Maustestis wird *c-kit* abundant in Typ A Spermatogonien, in interstitialen Leydigzellen und zu einem geringeren Ausmaß in Typ B Spermatogonien exprimiert (Manova *et al.*, 1990; Sorrentino *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1991; Ohta *et al.*, 2000). Der von Sertolizellen gebildete SCF ist notwendig für das Überleben und die Differenzierung der Spermatogonien und wird in den ersten zehn Tagen nach der Geburt

verstärkt exprimiert (Manova *et al.*, 1990, 1991, 1993; Rossi *et al.*, 1992). SCF existiert entweder in löslicher Form oder an Sertolizellen membrangebunden. Ein zellprotektiver Effekt von SCF setzt sich innerhalb des Testis bis zu den pachytänen Spermatozyten fort, die ebenfalls noch den Kit-Rezeptor exprimieren (Vincent *et al.*, 1998; Prabhu *et al.*, 2006). Yan *et al.* (2000) zeigten, dass SCF durch eine Hemmung der Apoptose auch in diesen Zellen das Überleben fördert.

Der Mechanismus, über welchen das Kit/SCF-System die Proliferation der Spermatogonien beeinflusst, wurde von Feng *et al.* (2000) aufgeklärt. Dabei ist vor allem die PI3-K(Phosphatidylinositol 3'-Kinase)-Signalgebung für die spermatogoniale Proliferation und Spermatogenese von besonderer Bedeutung. Nach Stimulation des Kit-Rezeptors durch SCF wird der rapamycin-sensitive PI3-K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalweg rekrutiert, um die Expression von Cyclin D3 und die Phosphorylierung von Retinoblastom-Protein (Rb) zu induzieren, was zur Proliferation der Spermatogonien führt. Die Bindung von SCF induziert die Phosphorylierung von Kit und die Bindung der p85-Untereinheit der PI3-K an Kit, die wiederum über reversible Phosphorylierung aktiviert wird. Über den wortmannin- und rapamycin-sensitiven Signalweg erfolgt die Phosphorylierung der p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase 1*) durch SCF/Kit. An diesem Vorgang ist AKT beteiligt, eine *downstream* Kinase der PI3-K Signalgebung, die durch aktiviertes PI3-K phosphoryliert und damit aktiviert wird. Aktivierte AKT phosphoryliert und aktiviert p70S6K indirekt über einen wortmannin-sensitiven Signalweg *via* FRAP-Kinase (*FKBP-12-rapamycin associated protein*; auch bekannt als mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) oder RAFT-1 (*rapamycin and FKBP12 target 1*)) und stellt damit den Hauptvermittler zwischen SCF/Kit/PI3-K und p70S6K dar. P70S6K vermittelt schließlich die Expression von Cyclin D3 und die Phosphorylierung von Rb (Retinoblastoma Protein), welche beide wichtig für den Fortschritt des Zellzyklus sind. *Cyclin D3* wird als Gen der frühen Antwort (*early response gene*) und als mögliches Hauptziel von SCF angesehen, welches den Fortschritt der G₁/S-Phase von spermatogonialen Zellen antreibt (Feng *et al.*, 2000).

Eine verkürzte (*truncated*) Form des *c-kit*, das *tr-kit*, wird in Mausspermatozoen exprimiert und löst die Eizellaktivierung während der Fertilisation aus (Sette *et al.* 1997, 1998).

Mutationen im murinen *c-Kit*-Gen sowie im *Sl*-Lokus (*steel*, kodierend für SCF) führen neben Anämie und einem farblosen Fell zu Infertilität. Bei der spontanen Punktmutation *Kit*^{W^v} handelt es sich um eine C-nach-T-Mutation im Nukleotid 2007. Diese führt zu einer Threonin-nach-Methionin-Substitution an Aminosäureposition 660 innerhalb der

zytoplasmatischen Region dieses Tyrosinkinase-Rezeptors und damit zu einer beeinträchtigten Rezeptoraktivität. Während heterozygote C57BL/6J-*Kit^{W^v}*/J-Tiere eine leichte makrozytische Anämie und variable weiße Punkte im ansonsten schwarzen Fell aufweisen (was dem Genlocus seinen Namen *Dominant white spotting* verlieh), sind homozygote männliche und weibliche Tiere weiß, ebenfalls anämisch und infertil. Die Mutation *W-v* wurde nach dem Genlocus (*white spotting*) und nach den variablen Anteilen (*variable*) weißer Punkte im Fell heterozygoter Tiere benannt.

Die Keimzellen homozygoter *Kit^{W-v/W-v}*-Tiere entwickeln sich nicht und degenerieren. Diese Degeneration wird begleitet von Apoptose, und es wird vermutet, dass Fas und p53 zusammenwirkend am Keimzelltod beteiligt sind (Ohta *et al.*, 2003; Sakata *et al.*, 2003). Auch während der normalen Gonadenentwicklung und dem ersten postnatalen Spermatogenesezyklus wird ein großer Teil der primordialen Keimzellen und testikulären Keimzellen durch Apoptose eliminiert (Rodriguez *et al.* 1997; Wang *et al.* 1998). Im adulten Maustestis beschränkt sich die apoptotische Keimzelldegeneration überwiegend auf die Spermatogonien (Blanco-Rodriguez *et al.*, 1996). Sertolizellen könnten das Fas-System zur Regulation des Keimzellschicksals einsetzen. Es wurde gezeigt, dass der Fas-Ligand auf Sertolizellen exprimiert wird, während die benachbarten Spermatogonien *Fas* exprimieren (Lee *et al.*, 1997). Sakata *et al.* (2003) folgerten aus Experimenten mit *Kit^{W-v/W-v}·Fas^{-/-}*-Doppelmutanten, dass Kit-Signale die Fas-vermittelte Apoptose durch Herunterregulierung der *Fas*-Expression in den Gonaden negativ regulieren. Sie zeigten überdies, dass die *Fas*-Expression in Kit-defizienten *Kit^{W-v}*-Spermatogonien heraufreguliert ist. Sakata *et al.* (2003) postulierten, dass die Herunterregulierung der *Fas*-Expression in den Gonaden durch die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges infolge der Stimulation des Kit-Rezeptors geschieht. Vermutlich werden inhibitorische Mechanismen der Fas-vermittelten Apoptose durch multiple Signalmoleküle einschließlich Akt und ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) reguliert, welche nicht nur den Expressionslevel von Fas beeinflussen, sondern auch intrazelluläre Signalwege *via* Fas. Somit könnten Kit-vermittelte Signale die Fas-vermittelte Apoptose nicht nur durch eine Unterdrückung der Fas-Expression, sondern auch durch eine Blockierung intrazellulärer Signalwege *via* Fas inhibieren (Sakata *et al.*, 2003). Ohta *et al.* (2003) vermuteten, dass zwei Zielkomponenten des PI3-K/Akt-Signalweges, Bad und Caspase 9, an der Keimzellapoptose in Kit/SCF-Mutanten beteiligt sein könnten. Diese Transkriptionsfaktoren gehören der forkhead-Familie an, welche vermutlich das Todessignal, den Fas-Ligand und IKK reguliert, eine

Kinase, die wiederum den KF-kB Transkriptionsfaktor reguliert. Diese Komponenten unterscheiden sich von den Komponenten des p53-Signalweges (Ohta *et al.*, 2003).

Es wird vermutet, dass die p53- und Fas-Signalwege interaktiv, jedoch nicht abhängig voneinander sind (Sakata *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2002). Yin *et al.* (2002) postulierten, dass p53 separate *downstream* Komponenten, u.a. auch Fas, zum Ziel haben könnte, der Fas-Signalweg jedoch auch durch nicht-p53-Signale ausgelöst werden könnte. Solch ein System könnte einen synergistischen Regulationsmechanismus der Apoptose liefern.

1.6 Die *TSPY*-transgene Mauslinie *Tg(TSPY)9Jshm*

Der pseudogene Status des *mTspy* ermöglichte die Generierung einer *hTSPY*-transgenen Mauslinie. Das erste *TSPY*-transgene Mausmodell entstand 2003 durch Schubert *et al.* mittels Pronukleusinjektion eines 8,2 kb großen humanen *TSPY*-Konstrukts in befruchtete Eizellen des NMRI-Auszuchtstammes. Das verwendete Konstrukt umfasste 2,95 kb des humanen *TSPY*-Promotors, das gesamte *hTSPY*-Strukturgen, sowie 2,45 kb des 3'-Bereiches. Nach Retransfer der injizierten Zygoten in scheinträchtige Ammen konnten unter den Nachkommen drei *Founder* identifiziert werden. Während die zwei weiblichen *Founder* lediglich eine autosomale Transgenintegration ohne Transmission an Nachkommen aufwiesen, zeigte der einzige männliche *Founder* (M9) eine keimbahnständige Integration. Nach ihm ist die *TSPY*-transgene Mauslinie als *Tg(TSPY)9Jshm* benannt. Die genomische Organisation des humanen Transgens in dieser Linie entspricht mit 40-50 Kopien auf dem distalen Teil des murinen Yq weitestgehend der humanen Situation. Innerhalb des transgenen Testis werden die *hTSPY*-Transkripte zudem überwiegend nach dem Spleißmuster des humanen *TSPY^{major}* gespleißt. Das gewebespezifische Expressionsmuster des Transgens, das zellspezifische Expressionsmuster im transgenen Testis und die Topologie der testikulären Expression des Transgens entsprechen bei dieser Linie nahezu dem menschlichen Muster. *TSPY* wird in transgenen Mäusen abundant im Testis und zu einem geringeren Maße im Gehirn exprimiert. Innerhalb des Testis beschränkt sich die Expression vor allem auf Spermatogonien und in geringerem Maße auf primäre Spermatozyten und runde Spermatisden (Schubert *et al.*, 2003, Kido persönliche Mitteilung). Das transgene *hTSPY*-Protein liegt im Testis, ebenso wie beim Menschen, in der phosphorylierten Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 38,5 kDa vor. Diese Beobachtungen sprechen für

eine Konservierung wichtiger Faktoren der *TSPY*-Genregulation zwischen Mensch und Maus.

Mit der Generierung dieser transgenen Mauslinie wurde erstmals ein evolutionär degeneriertes Pseudogen durch ein funktionelles Ortholog ersetzt. *TSPY*-transgene Mäuse zeigen unter normalen physiologischen Bedingungen keinen sichtbaren transgenen Phänotyp. Im Vergleich mit Wildtypmäusen waren die Spermatogenese und Spermio-genese adulter *TSPY*-transgener Mäuse nicht positiv oder negativ durch das Transgen beeinflusst. Schubert *et al.* (2003) folgerten, dass unter normalen Bedingungen das humane Transgen mit einem bisher unbekanntem murinen orthologen oder homologen Protein um die gleichen Interaktionspartner konkurrieren könnte und es denkbar wäre, dass sich der transgene Phänotyp erst offenbart, wenn die Spermatogenese unter suboptimalen Bedingungen abläuft.

In einem Versuchsansatz wurden daher *TSPY*-transgene *Insl3*-defiziente Mäuse generiert. Homozygote *Insl3*^{-/-} Knock-out-Mäuse (Zimmermann *et al.*, 1999) entwickeln durch die gestörte Gubernakulumentwicklung einen bilateralen Kryptorchismus und sind infertil. *Insulin-like 3* ist ein Mitglied der *Insulin-like* Hormonsuperfamilie (Adam *et al.*, 1993). Bei der Maus wird *Insl3* gonadenspezifisch in ovariellen Thekazellen und testikulären Leydigzellen exprimiert (Zimmermann *et al.*, 1999). Über die Stimulation der Entwicklung des *Gubernaculum testis* beeinflusst *Insl3* während der Embryonalentwicklung den *Descensus testis* während der transabdominalen Phase (Zimmermann *et al.*, 1999; Emmen *et al.*, 2000). Aufgrund der erhöhten Temperatur im abdominal lokalisierten Testis (bei der Maus bedeutet das einen Temperaturunterschied von 2,5°C, Salman *et al.*, 1988) entsteht eine Testisatrophie. Die Spermatogenese stagniert im kryptorchiden Testis in einem frühen Stadium der Differenzierung und hat einen Spermatogenese-arrest auf Stufe der pachytänen Spermatozyten und damit Infertilität zur Folge (Nguyen *et al.*, 2002; Zimmermann, 1997). Mittels der TUNEL-Methode ist eine 3- bis 5-fach erhöhte Apoptoserate detektierbar (Zimmermann, 1997). Einen direkten Einfluss des *Insl3* auf die Keimzellentwicklung gibt es nicht (Zimmermann *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2002). In *TSPY*-transgenen *Insl3*-defizienten Mäusen wird *TSPY* abundant in Spermatozyten und zu einem geringeren Anteil in primären Spermatozyten exprimiert (Schubert, 2001). Bei der Untersuchung verschiedener postnataler Altersstadien war bei 15 und 20 Tage alten *TSPY*-transgenen kryptorchiden Männchen die testikuläre Keimzellanzahl im Vergleich zur nicht transgenen *Insl3*-defizienten Tieren signifikant erhöht. Weiterhin war bei 30, 45 und 52 Tage alten *TSPY*-transgenen *Insl3*-defizienten Mäusen die testikuläre keimzellspezifische

Apoptoserate im Vergleich zu den nicht transgenen krytorchiden Kontrolltieren signifikant erniedrigt (Hussein, 2005, Schubert persönliche Mitteilung). Diese Untersuchungen weisen auf einen Einfluss des *TSPY*-Transgens auf die spermatogoniale Proliferation und/oder meiotische Differenzierung hin und zeigen einen möglichen Apoptose-protectiven Effekt des Transgens auf die Spermatogonien und primären Spermatozyten im krytorchiden Testis (Schubert, 2001; Hussein 2005).

Schubert *et al.* (2008) generierten *TSPY*-transgene Ar^{Tfm} -Mäuse, die durch eine *frameshift*-Mutation im X-chromosomalen Gen des Androgenrezeptors (*AR*) eine Androgeninsensitivität bei hemizygoten Männchen aufweisen (Charest *et al.*, 1991). Beim Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS; früher als testikuläre Feminisierung bezeichnet; MIM #300068, #312300, Online Mendelian Inheritance in Man), findet embryonal zwar noch eine Differenzierung der Gonadenanlage zum Testis statt, jedoch wird die weitere Differenzierung zum männlichen Phänotyp durch die gestörte Testosteronwirkung verhindert. Die Testes verbleiben im Abdomen bzw. senken sich maximal bis zur Leiste, während es durch die Rückbildung der Müllergänge zur Ausbildung einer blind endenden Vagina kommt. Alle nicht-Androgen-abhängigen Sexualdifferenzierungen sind nicht betroffen. Aus der Androgenresistenz resultiert letztlich trotz 46,XY-Karyotyp und normalem Serumtestosteronspiegel ein weiblicher Phänotyp, da alle übrigen weiblichen Entwicklungsschritte ungestört sind. Die Spermatogenesedefizienz, die beim AIS beobachtet wird, ist höchstwahrscheinlich ein unspezifischer Sekundäreffekt des Kryptorchismus (Lyon *et al.*, 1970). Die Spermatogenese ist beim AIS auf der Stufe der pachytänen Spermatozyten arretiert. Schubert *et al.* (2008) wiesen in den Testes der *TSPY*- Ar^{Tfm} -Mäuse ein aberrantes Spleißverhalten des humanen *TSPY* nach. Zudem zeigte sich eine 2-fach hochregulierte *TSPY*-Expression in einigen Tieren. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen Effekt der Androgeninsensitivität, sondern der Heterogenität der genetischen Hintergründe der *TSPY*- Ar^{Tfm} - und *TSPY*-transgenen Mäuse handeln könnte. Die Testisgewichte waren in den transgenen Männchen signifikant erhöht, und ein transgenes Männchen zeigte eine Spermatogeneseentwicklung bis über die meiotische Prophase hinaus. Beim Menschen besitzen Patienten mit dysgenetischen Gonaden ein erhöhtes Risiko von 30% für die Entwicklung von Keimzelltumoren (Gonadoblastoma, CIS und/oder invasive Keimzelltumoren). Bei Patienten mit Androgeninsensitivität liegt das Risiko einer Keimzelltumorentwicklung bei 5-10% (Cools *et al.*, 2006). Schubert *et al.* (2008) konnten in *TSPY*- Ar^{Tfm} -Mäuse keine Entwicklung von Keimzelltumoren beobachten. Allerdings ist beschrieben worden, dass es

bei Mäusen nicht zu einer Ausbildung von Seminoma oder Non-Seminoma kommt (Lam *et al.*, 2004; Oosterhuis und Looijenga, 2005). Die beobachtete Entwicklung von Leydigzelltumoren führten die Autoren auf den Hintergrundeffekt des genetischen NMRI-Hintergrundes zurück.

Mit der transgenen Mauslinie *Tg(TSPY)9Jshn* scheint nun ein geeignetes artifizielles Tiermodell verfügbar zu sein, um die Regulation, Expression und Funktion des humanen *TSPY* näher zu untersuchen.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion des humanen *TSPY* während der Keimzellentwicklung im postnatalen und adulten Testis und der Embryonalentwicklung anhand eines *TSPY*-transgenen Mausmodells zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollte das von Schubert *et al.* (2003) generierte *TSPY*-transgene Mausmodell eingesetzt werden, um die keimzellspezifische Funktion von *TSPY* im Kit-defizienten Testis zu analysieren.

Parallel sollte bei der transgenen Linie *Tg(TSPY)9Jshn* das Expressionsmuster des humanen *TSPY* Transgens immunhistochemisch während der murinen Embryonalentwicklung analysiert und die mögliche *TSPY*-Funktion bei der Proliferation und Apoptose früher Keimzellen untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching
EDTA	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure, 96%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol, 96.4%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma Chemie, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma Chemie, Deisenhofen
Glycerin, 87%	Sigma Chemie, Deisenhofen
Hämatoxylin nach <i>Gill</i>	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
IVF-Medium	MediCult, Kopenhagen, Dänemark
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
M2-Medium	Sigma Chemie, Deisenhofen
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NuSieve-Agarose	Difco Laboratories, Detroit, USA
Orange G	Sigma Chemie, Deisenhofen
Paraformaldehyd	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pikrinsäure	Sigma Chemie, Deisenhofen
Rotiplast	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
SeaKem-Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Shandon Xylene Substitute	Thermo Shandon, Dreieich
Shandon Xylene Substitute Mountant	Thermo Shandon, Dreieich
Technovit 7100	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
Technovit 3040	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
Tris	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Serva, Feinbiochemika, Heidelberg
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

2.1.2 Biologische Substanzen und Enzyme

dNTPs	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Marker:	
1 kb-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
PeqGOLD 50 bp Leiter	PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Antikörper:	
Cleaved Caspase 3-Antikörper (Asp 175)	New England Biolabs, Schwalbach
Cleaved Caspase 3 (Asp 175) Blockingpeptid	New England Biolabs, Schwalbach
Anti-Ki67-Antikörper	NeoMarkers, über Thermo Fisher, Dreieich
Anti-EEF1A1-Antikörper	ProteinTech Group, Manchester, UK
Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (Kaninchen-PAP)	DAKO, Hamburg
TSPY-Antiserum 837/3	Insitut für Humangenetik, Med. Hochschule Hannover (Schnieders <i>et al.</i> , 1996)

TSPY-Antikörper Klon #2 und Klon #7 Yun-Fai Chris Lau, San Francisco, USA (Kido and Lau, 2005)

Enzyme:

<i>ExoSAP-IT</i> (Exonuclease I, Alkalische Phosphatase aus Garnelen)	USB, Staufen
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deisenhofen
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym <i>Nsi</i> I	New England Biolabs, Frankfurt/Main

2.1.3 Kits

<i>ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit</i>	Chemicon (Millipore), Schwalbach/Taunus
<i>Peroxidase Substrate KIT DAB</i>	Vector Laboratories, über Camon, Wiesbaden
<i>Vectastain Elite ABC Kit</i>	Vector Laboratories, über Camon, Wiesbaden
<i>R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit</i>	Vector Laboratories, über Camon, Wiesbaden

2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Geräte

Ausgießstation AP 280-3	Microm, Heidelberg
Autoklav	Jürgens, Hannover
Brutschränke	Heraeus Instruments, Harnau
Cleanbench	Heraeus Sepatech, Osterode
Einbettautomat Hypercenter XP	Shandon, ThermoScientific, Dreieich
Elektrophoresegeräte:	
Horizon 58/11.14/20.25	Gibco-BRL, Eggestein
Miniprotean II	Biorad, München
Geldokumentation:	
Kamera CU5	Polaroid, Enschede
Bioprofil-Videosystem	Vilber Lourmat, über Fröbel, Lindau

Heizblöcke:

Thermomixer5436	Eppendorf, Hamburg
TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Intelligent Heating Block	Biometra, Göttingen
Mikropipetten (einstellbar)	Gilson, über Abimed, Langenfeld
Mikroskop	Zeiss, Jena

Mikrotome:

HM 335E	Microm, Heidelberg
Polycat E	Reichert-Jung, Nusslach
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
pH-Meter	Jürgens, Hannover
Photometer Lambda 2	Perkin Elmer, Vaterstetten
Photomikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Jürgens, Hannover
Sterilbank	Heraeus Sepatech, Osterode

Thermocycler:

T3 Kombi, T3000, T Personal	Biometra , Göttingen
UV-Transilluminator	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortex Genie-Mixer	Janke & Kunkel, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Zentrifugen:

Eppendorfzentrifuge 5415C	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Beckman L5-65 (Rotoren SW28, SW50.1),	
Beckman J2.21 (Rotoren JA14, JA20)	Beckman, München
Biofuge A, Christ UJ1,	
Variofuge RF (Rotor 2190)	Heraeus Sepatech, Osterode
Mikroliter-Zentrifuge	Hettich, Tübingen

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark-Corporation, Rosswell, USA
Einmalpipetten	Greiner Bio One, Frickenhausen

Eppendorfspitzen	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen Sarstedt, Nürnbergrecht
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren
Hamburger Mappen	Jürgens, Hannover
Histoform S	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten (Polystyrol)	Brand, Wertheim
Petrischalen	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen; Sarstedt, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürnbergrecht
Skalpelle, Präparierbesteck	Jürgens, Hannover
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

2.3 Standardpuffer, -lösungen und -medien

10x PBS:	0.8% (w/v)	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,02% (w/v)	KCl
		pH 7,4 einstellen
50x TAE:	2 M	Tris-HCl
	57,1%	Essigsäure
	0,05 M	EDTA
10x TBE:	0,9 M	Tris-HCl
	0,9 M	Borsäure
	0,02 M	EDTA

10x TE:	100 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
		pH 8,0 einstellen
Lysis-Puffer:	50 mM	Tris-HCl
	100 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS
		pH 8,0 einstellen
Probenladepuffer für Gelelektrophorese:	30% (w/v) nach belieben	Glycerol Orange G ad Aqua dest.
Proteinase K-Puffer:	9,2 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	0,92 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS
		pH 7,5 einstellen

2.4 Tiermaterial

Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte entsprechend dem Deutschen Tierschutzgesetz und den International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Alle Prozeduren wurden bei der zuständigen Behörde beantragt und genehmigt. Mäuse des Stammes C57BL/6J-*Kit^{W^v}*/J wurden bezogen von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA; Stammmnummer 000049). Die Haltung der C57BL/6J-*Kit^{W^v}*/J-Mäuse, NMRI-Wildtyp-Mäuse und *TSPY*-transgenen Mäuse der Linie *Tg(TSPY)9Jsh^m* erfolgte im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover und in den Tierställen des Instituts für Humangenetik der Universität Göttingen in Gruppen von je drei bis vier Tieren pro Käfig in einem Raum mit kontrolliertem, zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, 21±1°C Raumtemperatur und freiem Zugang zu Wasser und pelletierter Zuchtdiät (Herilan, Eggersmann, Rinteln). Für die DNA-Extraktion zur Genotypisierung der Tiere wurde etwas Ohrgewebe entnommen. Zur Organentnahme wurden die Tiere durch das Inhalationsnarkotikum Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) getötet.

2.5 Computerprogramme

SPSS 17 (SPSS, München)

2.6 Referenzsequenzen (*GenBank Accession-Nummern*)

hTSPY (Humanes TSPY): M98524,

hTSPY, mRNA: HSU58096,

hTSPY, 5' flankierende Sequenz: AF042176,

TSPY^{major}: U56096,

cY-231: M98524,

mtspy (Maus-*tspy*), genomisch: AF022800, AJ001379,

mtspy, aberrant gespleißtes Transkript: AJ001378

Maus-*Kit*, mRNA: Y00864, AY536430

Weitere *Accession-Nummern* werden explizit im Text genannt oder können den jeweiligen Literaturangaben entnommen werden.

3 Methoden

3.1 Zuchtlinien der Labormaus

3.1.1 NMRI

Bei der Zuchtlinie NMRI (Nomenklatur Crl:NMRI(Han)) der Labormaus *Mus musculus* handelt es sich um einen Albino Auszuchtstamm mit hoher Reproduktionsrate. Er ist benannt nach dessen Herkunft aus dem Naval Medical Research Institute (NMRI). Poiley vom National Institute of Health (NIH) erhielt diese Swiss-Maus 1937 von Clara Lynch und übergab sie später an das Naval Medical Research Institute. 1979 wurde diese Linie vom Zentralinstitut für Labortierzucht in Hannover bei Charles River Laboratories eingeführt.

3.1.2 *Tg(TSPY)9Jshm*

Die *TSPY*-transgene NMRI-Linie *Tg(TSPY)9Jshm* wurde 2001 von Schubert (Schubert 2001, Schubert *et al.* 2003) mittels Pronukleusinjektion eines 8,2 kb großen humanen *TSPY*-Konstrukts in befruchtete NMRI-Eizellen generiert. Das Konstrukt enthielt 2,95 kb der humanen *TSPY*-Promotorregion, das gesamte *TSPY*-Strukturgen, sowie 2,45 kb des 3'-Bereiches. Benannt wurde die Linie nach dem männlichen *Founder* #9, welcher als einziger der generierten *Founder* eine Keimbahntransmission aufwies.

3.1.3 C57BL/6J und C57BL/6J-*Kit*^{W^v}/J

Die C57BL/6-Maus wurde 1921 von C.C. Little entwickelt und 1948 bzw. 1981 bei The Jackson Laboratory bzw. Charles River Laboratories eingeführt. Die mutante Inzucht-Linie C57BL/6J-*Kit*^{W^v}/J (Jackson Laboratories, Stammnummer 000049) trägt eine Spontanmutation im *Kit*-Gen. Hierbei handelt es sich um eine C-nach-T-Mutation im Nukleotid 2007, welche zu einer Threonin-nach-Methionin-Substitution an Aminosäureposition 660 innerhalb der zytoplasmatischen Region dieses Tyrosinkinase-Rezeptors führt. Heterozygote Tiere weisen variable weiße Punkte innerhalb des normalerweise schwarzen Fells auf. Überdies zeigen diese Tiere eine leichte

makrozytische Anämie. Homozygote Tiere hingegen sind weiß, haben eine makrozytische Anämie und sind infertil.

3.1.4 Etablierung der *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W-v}/J* Zuchtlinie

C57BL/6J-Kit^{W-v}/J-Mäuse wurden von Charles River erworben. In diese Linie wurde die *TSPY*-transgene Linie *Tg(TSPY)9Jshn* eingekreuzt, um homozygote *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen zu generieren. Da die Linie *Tg(TSPY)9Jshn* auf einem NMRI-Hintergrund erzeugt wurde, wurden als Kontrolltiere auch *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen generiert.

3.1.5 Fertilitätsanalyse der *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen

Zur Überprüfung der Fertilität wurden adulte *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen 1:1 mit geschlechtsreifen heterozygoten *Kit^{W-v}*- und Wildtyp-Weibchen für mindestens drei Monate verpaart. Nach Ende der Verpaarungen wurden die Weibchen getötet und die Uteri, Ovidukte und Ovarien präpariert, um sie auf Zeichen von Trächtigkeit hin zu untersuchen.

Weiterhin wurden adulte *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen jeweils mit einem geschlechtsreifen CD1-Weibchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden der Ovidukt und die Uteri der Weibchen, welche einen Vaginalpfropf aufwiesen (VP-positiv), auf das Vorhandensein von Spermien hin untersucht. Uteri und Ovidukt besamter Weibchen wurden mit M2-Medium gespült und die Anzahl der Spermien in der unverdünnten Probe mittels einer Neubauerkammer gezählt.

Jeweils beide Nebenhodenschwänze von sieben adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen wurden in IVF-Medium (MediCult, Kopenhagen, Dänemark) überführt, mit einer feinen Schere zerschnitten und anschließend für 120 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Spermien wurden anschließend unverdünnt oder in IVF-Medium verdünnt (1:40) mittels Neubauerkammer unter dem Mikroskop quantifiziert.

3.2 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe

Die Extraktion genomischer DNA zur Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte nach der Methode von Hogan *et al.* (1994). Dabei wurden 0,1-0,3 g Gewebe (Teil des Ohrs) mit 500 µl Lysispuffer und 35 µl Proteinase K (10µg/µl) versetzt und über Nacht bei 55°C auf

einer Wippe inkubiert. Am Folgetag wurde ein Volumenanteil äquilibriertes Phenol (pH 8,0) hinzugegeben, das Gemisch ca. 2 min geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Überführung der DNA-enthaltenden wässrigen Phase wurde ein Volumenanteil Chloroform hinzugefügt, die Probe anschließend geschüttelt und abermals bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde anschließend ohne Berührung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde mit 1/15 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,0) sowie einem Volumenanteil reinsten Ethanol bei RT ausgefällt und erneut zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde anschließend entfernt und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach Trocknung bei 37°C in 40 µl HPLC-Wasser resuspendiert.

3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm gegen einen Vergleichswert bestimmt werden.

Empirisch bestimmt hat DNA der Konzentration 50 µg/ml einen 260-nm-Extinktionswert von ca. 1,0. Gleiches gilt für RNA der Konzentration 40 µg/ml. Daraus ergibt sich folgende Bestimmungsformel für DNA(RNA)-Lösungen mit dem Verdünnungsfaktor f, gemessen in Küvetten der Schichtdicke 1 cm:

$$\Delta E_{260-320} \times 50(40) \times f = \mu\text{g DNA(RNA)/ml}$$

Das verwendete Photometer erlaubte gleichzeitig eine Einschätzung der Qualität der vorliegenden Nukleinsäuren, indem vier wichtige Kennwellenlängen des Spektrums bestimmt wurden:

230 nm (Absorption von Salzen und Kohlenhydraten)

260 nm (Absorptionsmaximum der Basen von Nukleinsäuren)

280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen)

320 nm (Basislinie des Absorptionsspektrums von Nukleinsäuren).

Richtwerte für eine Nukleinsäurepräparation guter Qualität sind ein 230-nm-Wert <50% und ein 280-nm-Wert <60% des 260-nm-Wertes. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm sollte daher einen Wert von 1,8 haben.

3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die größenabhängige Separation von Makromolekülen durch Gelelektrophorese basiert auf dem elektrokinetischen Phänomen, dass ein geladenes Partikel durch elektrostatische Kräfte in Bewegung gesetzt wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Weitere Parameter für das Wanderungsverhalten sind die Ladungsdichte und Konformation des Makromoleküls, die Größe des elektrischen Feldes, die Dichte der Gelmatrix und die gewählten Pufferbedingungen. Je nach Fragestellung stehen zwei unterschiedliche Polymere zur Verfügung:

- Polyacrylamidgele für eine Längenunterscheidung bis zu einer Base
- Agarosegele für die Trennung größerer Fragmente (Polyacrylamidgele weisen hierfür eine zu geringe Porengröße auf).

Durch Variation der Polymerkonzentration kann die Porengröße der polymeren Gelmatrix verändert werden. Die Lage der unterschiedlichen Gelbanden lässt sich durch Interkalation des fluoreszierenden polyzyklischen Farbstoffs Ethidiumbromid (EtBr) zwischen den gestapelten Basenpaaren detektieren, wobei die Banden durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.4.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Agarosegelmatrix besteht aus linearen Polymeren, die alternierend aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose aufgebaut sind. Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich mit einer Geschwindigkeit durch die Agarosematrix, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist (Knippers, 1990).

Durch Variation der Porengröße der polymeren Gelmatrix kann der Trennbereich für unterschiedliche Fragmentlängen optimiert werden:

Gelkonzentration [%]	Trennbereich für lineare DNA [kb]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

Tabelle 3-1: Auflistung der Trennbereiche verschiedener Agarosegelkonzentrationen

Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1× TBE- bzw. 1× TAE-Puffer gelöst und nach Zugabe von 20-60 µl EtBr (0,1 µg/ml), je nach Gelvolumen, nach Abkühlung auf ca. 50°C in die Gießvorrichtung der Gelkammer eingefüllt. Nach Verfestigung der Agarose wurden 8 µl des PCR-Ansatzes mit 3 µl Ladepuffer gemischt und luftblasenfrei in die Geltaschen pipettiert. Zur Identifizierung der Bandengrößen wurde ein Längenstandard (1 kb-Leiter oder 50 bp-Leiter) ebenfalls mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) aus DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.* (1986) ermöglicht *in vitro* die exponentielle Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz mittels Primer-abhängiger, hitze-stabiler DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*. Bei dieser Kettenreaktion wird die exponentielle Vervielfältigung durch ein zyklisches Temperaturprofil aus Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Elongation (Primerverlängerung) durch die Polymerase erreicht. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als Matrize für die weitere DNA-Synthese. Als Starthilfe werden zwei einzelsträngige DNA-Moleküle benötigt, die spezifisch an komplementäre Sequenzen der gesuchten DNA-Region binden. Diese sogenannten Oligonukleotidprimer sind in der Regel zwischen 20 und 30 Nukleotide lang und bedingen eine recht hohe Hybridisierungstemperatur. Der 5'-ständige Primer wird im Folgenden als *forward*-Primer, der am 3'-Ende des Produktes liegende als *reverse*-Primer bezeichnet.

3.5.1 Allgemeine PCR-Bedingungen

Allgemein wurde bei der PCR-Amplifikation das folgende Reaktionsschema eingehalten:

Temperaturprofile:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	(s. Tab. 3-4, 3-5)	1 min	30-35 Zyklen
Elongation	72°C	1-3 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Tabelle 3-2: Allgemeines Temperaturprofil für Standard-PCRs

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	49°C	30 sec	39 Zyklen
Elongation	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Tabelle 3-3: Angepasstes Temperaturprofil der Kit-PCR

Standard-PCR-Ansatz:

Pro Probe wurde ein 30 µl Ansatz in Form eines Mastermixes hergestellt:

3 µl	10-fach Enzympuffer (enthält 15 mM MgCl ₂)
1 µl	<i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)
3 µl	dNTP-Mix (80 mM, d. h. 20 mM für jedes der 4 dNTPs)
0,2 µl	<i>Taq</i> Polymerase (1U)
<u>20,8 µl</u>	<u>steriles H₂O</u>
29 µl	Reaktionsansatz

Pro Ansatz wurde 1 µl Template (100 ng genomische DNA bzw. 1 µl Plasmidverdünnung 1:500 nach Plasmidpräparation) hinzugefügt. Die Kontrolle der amplifizierten Produkte erfolgte über gelelektrophoretische Auftrennung von 8 µl des PCR-Ansatzes in EtBr-gefärbten Gelen von 1%, 1,5%, 2% bzw. 4% (3:1 NuSieve:SeaKem) Agarose in TBE bzw. TAE-Puffer (s. Abschnitt 3.4.1).

3.5.2 Sequenzen der verwendeten Primer

In den Tabellen 3-4 und 3-5 sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer mit ihren Richtungen und Annealingtemperaturen (T_{PCR}), die für Standard-PCR-Reaktionen angewendet wurden, aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Richtung	T_{PCR}
Ex3Fwd	CAAGGAATATCTGGTGAACATCACAG	Ex 3/forward	59°C
4690E4Rev	GAGAACCAGTTGAAGAAGTTAAGGCT	Ex 4/reverse	59°C
P5	ATGAAGTGGAGGCCTATCGC	Ex 4/forward	55°C
TV03	CCTTGAGAATGTTTATTTTTCATT	Ex 6/reverse	55°C
TV12	CAGCGGCCGCAAGATATGGCTCTGGC	Pro/forward	61°C
TV13	CCCTAAGGGACTGCGCGCGA	Pro/reverse	61°C

Tabelle 3-4: Humane *TSPY*-Primer (Ex = Exon, Pro = Promotor)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Richtung	T_{PCR}
mtspy2	AAGATGAAGACTTACTGAACTAC	Forward	55°C
mtspy7	CCAGTATTTATCTCAGTCAATTCC	Reverse	55°C
Tfml	TCGCGACTACTACAACCTTCC	Forward	55°C
Tfmr1	TAAGGTCCGGAGTAGTTCTCC	Reverse	55°C
Kit-F	AAAGAGAGGCCCTAATGTCG	Forward	49°C
Kit-R	ACACGGCTTTACCTCCCACC	reverse	49°C

Tabelle 3-5 : Murine *Tspy*-, *Tfm*- und *Kit*-Primer

3.6 Restriktionsverdau von PCR-Produkten mit *Nsi*I

Typ-II-Restriktionsendonukleasen schneiden DNA-Moleküle innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer spezifischen Erkennungssequenzen. Bei der Genotypisierung von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen diente der Restriktionsverdau des *Kit*-PCR-Produktes erstens dem Nachweis der Mutation, durch welche eine Restriktionsstelle für die Restriktionsendonuklease *Nsi*I entsteht, und zweitens der Identifizierung von *Kit^{W-v}* hetero- und homozygoten Mäusen.

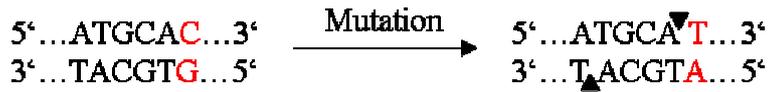


Abbildung 3-1: Generierung der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NsiI* durch die W^v-Mutation im *c-Kit*-Gen

Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl *NsiI* (20000U/ml) und 3 µl NEBuffer 3 versetzt, gemischt und mindestens 3 h (alternativ über Nacht) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau für 20 min bei 80°C inaktiviert und auf einem 4%igen Agarosegel (3:1 NuSieve:SeaKem) aufgetrennt. Neben 15 µl der Probe wurden zur Abschätzung der Bandengrößen 5 µl 50 bp-DNA-Leiter (1:2 verdünnt) aufgetragen.

3.7 Fixierung und Einbettung von Organen und Gewebe

Frisch präpariertes Material wurde direkt in das entsprechende Fixativ gegeben und, je nach Größe des Präparates, ein bis zwei Tage bei RT fixiert. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96% EtOH) wurde das Gewebe entwässert.

Fixative:

Bouin'sche Lösung

- 15 Teile gesättigte Pikrinsäure
- 5 Teile 37%ige Formaldehydlösung
- 1 Teil Eisessig

Fixativ mit 4% Paraformaldehyde

- 4 g PFA
- 100 ml PBS
- einige Tropfen NaOH (10N)

Die Lösung auf 55°C erhitzen, bis das PFA sich gelöst hat, anschließend auf Eis stellen. Den pH-Wert auf 6-7 mit HCl einstellen. Lagerung bei -20°C.

3.7.1 Paraffineinbettung von Hoden

Für die Paraffineinbettung wurde ein *Hypercenter XP*-Einbettautomat (Shandon) verwendet. Das Präparat wurde in beschrifteten Einbettkassetten (Medite) über Nacht unter

folgenden Bedingungen inkubiert: 120 min in 10%igem Formalin, 60 min in 70%igem Ethanol, 60 min in 90%igem Ethanol, 45 min in 100%igem Ethanol und viermal jeweils 60 min in 100%igem Ethanol. Anschließend wurde das Gewebe zweimal für jeweils 60 min in Xylol und dann 90 min und 120 min in Paraffin überführt. Das Präparat wurde daraufhin in einer AP 280-3-Ausgießstation (Micron) über Nacht in 60°C temperiertem Paraffin belassen. Zur Einbettung wurde eine Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe aus der Kassette entnommen und mit der zum Anschnitt vorgesehenen Seite nach unten in die Form überführt. Mit Hilfe einer Gießvorrichtung wurde die Form mit Paraffin aufgefüllt und dann mit der entsprechenden Kassettenschale abgedeckt. Die eingelassene Kassettenschale diente dem späteren Einspannen in das Rotationsmikrotom (Micron). Die Aushärtung erfolgte auf der Kühlplatte der Ausgießstation bei -20°C. Der Paraffinblock wurde nach Entnahme aus der Form bei 4°C gelagert.

3.7.2 Paraffineinbettung von Embryonen

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden Mausembryonen der Stadien 10,5 dpc bis 12,5 dpc sowie 13,5 dpc bis 17,5 dpc präpariert. Am gewünschten Tag der Embryonalentwicklung wurde das Muttertier mit Isofluran getötet. Nach Eröffnung wurde der Uterus entnommen und in eiskaltem PBS gewaschen. Der Uterus, die Embryonalhüllen und die Plazenta wurden mittels Uhrmacherpinzette und Schere eröffnet. Zur DNA-Extraktion für spätere Genotypisierung und Geschlechtsbestimmung wurde bei 10,5 bis 12,5 Tage alten Embryonen die Embryonalhülle verwendet, bei älteren Embryonen eine Extremität entfernt. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 4% PFA bei 4°C unter ständiger Bewegung (Wippe, MiniRocker MR-1, PeQLab Biotechnologie GmbH). Nach mehrstündigem Waschen in PBS wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100% in 1x PBS) bei 4°C unter ständiger Bewegung über mehrere Tage dehydriert. Zur weiteren Dehydrierung wurden die Embryonen für jeweils 30 min in reinstem Isopropanol und anschließend mit einem Gemisch von 25% Xylol/75% Isopropanol, 50% Xylol/50% Isopropanol und 75% Xylol/25% Isopropanol versetzt. Nach einer zwei- bis dreistündigen Inkubation in 100% Xylol erfolgte eine Präinfiltration der Präparate über Nacht in 60°C warmem, flüssigem Paraffin. Das Paraffin wurde anschließend so häufig gewechselt, bis das Xylol vollständig

aus dem Gewebe entfernt worden war. Abschließend wurden die Präparate in Paraffinblöcken eingegossen und die Blöcke bei 4°C gelagert.

3.7.3 Technoviteinbettung von Hoden

Die Technoviteinbettung von präparierten Testes wurde mit Hilfe von *Technovit 7100*, *Technovit 3040* und *Histoform S* der Firma Heraeus Kulzer durchgeführt. Dabei wurde sich strikt an die Vorschrift des Herstellers gehalten, die dem *Technovit 7100* entnommen werden kann. Die Technovitblöcke wurden nach der Aushärtung bei RT gelagert.

3.8 Herstellung von Paraffin- und Technovitschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke nach Abkühlung auf -20°C mit der Kassettenschale in ein Rotationsmikrotom eingespannt. Die Schnittdicke betrug 3 µm. Mit einem feinen Pinsel wurden die Schnitte zum Strecken in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf *SuperFrost-Plus* Objektträger (Menzel-Gläser) gezogen. Nach Trocknung bei RT wurden die Schnitte in Hamburger Mappen (Jürgens) gelagert.

Die Technovitblöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte der Dicke 3 µm angefertigt. Mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette (Jürgens) wurden die Schnitte in ein Wasserbad von 37°C überführt und von dort luftblasenfrei auf Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei 60°C auf einer Heizplatte für 2 h getrocknet und bei RT in Hamburger Mappen (Jürgens) gelagert.

3.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Darstellung nukleärer Strukturen und zytoplasmatischer Bereiche wurden Schnitte der in Paraffin und *Technovit 7100* eingebetteten Proben einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Hierbei färben sich die Zellkerne mittels des Hämatoxylins blau, alle anderen Zellstrukturen werden durch das Eosin rötlich gefärbt.

3.9.1 HE-Färbung von Paraffinschnitten

Lösungen:

Eosin: 180 ml dH₂O

20 ml Eosin 2% (20 g Eosin auf 1000ml dH₂O)

20 ml 96% EtOH

2 Tropfen Essigsäure reinst

Mayers Hämaunlösung: 1:10 verdünnt mit dH₂O und filtriert

Vorgang:

1. Entparaffinieren der Schnitte
2. Schrittweises Hydrieren der Präparate in absteigender Alkoholreihe
3. Anfärben der Zellkerne
4. Bläuen
5. Gegenfärbung
6. Schrittweises Dehydrieren der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe
7. vollständiges Dehydrieren
8. Eindecken

Bedingungen:

- 3 x 5 min in Xylol bei RT
- je 5 min in 100%, 90%, 80%, 70% EtOH, dH₂O bei RT
- 3 min Mayers Hämaunlösung
- 10 min mit Leitungswasser fließend wässern
- 3 min Eosin
- kurz eintauchen in dH₂O, 70%, 80%, 90% EtOH
- 2 x 3 min 100% EtOH,
3 x 2 min HistoClear
- mit Histomount

3.9.2 HE-Färbung von *Technovit 7100* Schnitten

Lösungen:

Eosin: 1g Eosin in 8 ml dH₂O lösen

ad 200 ml 100% EtOH

2 Tropfen 100% Essigsäure

Hämatoxylin nach Gill: Gebrauchsfertig, nur filtrieren

EtOH-HCl-Lösung: 2 ml konzentrierte HCl in 200 ml 70% EtOH

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Anfärben der Zellkerne	25 min Hämatoxylin nach <i>Gill</i>
2. Waschung	5 sec in EtOH-HCl
3. Bläuen	10 min in fließendem Leitungswasser
4. Gegenfärbung	3 min Eosin
5. Differenzierung	20 sec in 96% EtOH
6. Dehydrieren der Schnitte	2 x 2 min in 100% EtOH, 3 x 2 min HistoClear
7. Eindecken	mit Histomount

3.10 Histologische Analysen von Hoden und Nebenhoden

Hoden und Nebenhoden von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen verschiedener Altersstadien (5 Wochen bis 8 Monate), fixiert in 4% Paraformaldehydlösung oder Bouin's Fixativ und eingebettet in Paraffin oder Technovit, wurden 3 µm dick geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Pro Tier wurden sechs verschiedene Schnittebenen pro Hoden und Nebenhoden angefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. In jeder Schnittebene wurden alle *Tubuli seminiferi* gezählt. Außerdem wurde die Anzahl der *Tubuli* ermittelt, welche pachytäne Spermatozyten und/oder runde bzw. elongierte Spermatiden enthielten und diese Anzahl zu der *Tubuli*-Gesamtzahl in Beziehung gesetzt. Die Nebenhoden wurden in Hinsicht auf das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Spermien bewertet.

Bei jeweils vier 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen wurde je ein HE-gefärbter Gewebeschnitt (3 µm) beider Hoden histologisch auf das Vorhandensein pachytäner Spermatozyten und/oder runder bzw. elongierter Spermatiden hin untersucht. Ermittelt wurden dazu pro Tier die *Tubuli*-Gesamtzahlen, die Anzahl der *Tubuli seminiferi*, welche pachytäne Spermatozyten und/oder runde bzw. elongierte Spermatiden enthielten, sowie die Gesamtzahl dieser Keimzellen.

3.11 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Analysen verschiedener Antigene wurden Paraffinschnitte Formalin-, Paraformaldehyd- und Bouin-fixierter Gewebe verwendet, die mit der Peroxidase-Antiperoxidase-ABC-Färbung mittels spezifischer Antikörper gefärbt wurden.

3.11.1 Peroxidase-Antiperoxidase-ABC-Färbung

Für die Immunfärbung wurde eine Kombination aus ABC-verstärkter Peroxidasefärbung und Peroxidase-Antiperoxidase-Färbemethode durchgeführt.

Bei der von Hsu *et al.* (1981 a und b) entwickelten ABC-Methode werden ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein präformierter Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase verwendet. Das Glykoprotein Avidin besitzt vier Bindestellen für das Vitamin Biotin und hat zu diesem eine extrem hohe Affinität, was zu einer im Wesentlichen irreversiblen Bindung führt. Weiterhin können die meisten Proteine, Enzyme eingeschlossen, mit mehreren Biotin-Molekülen konjugieren. Dies erlaubt eine Bildung von Makromolekülkomplexen zwischen Avidin und biotinylierter Peroxidase, was zu einer Verstärkung der Peroxidasewirkung und damit des Signals führt.

Die Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Komplex-Methode wurde von Sternberger (1979) entwickelt. Dabei wird ein Peroxidase-gekoppelter Antiperoxidaseantikörper (PAP) verwendet, welcher in derselben Spezies hergestellt wurde wie der eingesetzte Primärantikörper. Die Komplexe aus Enzym und Antikörper bilden sich mit einem Molverhältnis von zwei Molekülen IgG zu drei Molekülen Peroxidase. Diese PAP-Komplexe binden in der immunhistochemischen Färbung an die eingesetzten Sekundärantikörper und führen mittels ihrer Peroxidaseaktivität wiederum zu einer Signalverstärkung.

Als chromogenes Substrat für die Peroxidase wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in H₂O₂ eingesetzt, wodurch es zu einer stabilen braunen Farbreaktion kommt. Diese kann durch vorherige Zugabe des Schwermetallsalzes NiCl₂ noch verstärkt und zu einer grauschwarzen Färbung verändert werden.

Allgemeines zur Färbeprozedur:

Für immunhistochemische Färbungen wurden Paraffinschnitte (3 µm) Formalin-, Paraformaldehyd- und Bouin-fixierter Gewebe verwendet. Entparaffinierung, Hydrierung, Waschungen und Gegenfärbung der Objektträger wurden auf Glasgondeln in Glasküvetten durchgeführt. Die Inkubationen der Antikörperverdünnungen wurden je nach Präparatgröße in 25-100 µl der angegebenen Lösungen pro Präparat direkt auf den Objektträgern durchgeführt und die Lösungen anschließend durch kapillares Abziehen mit Zellstofftuch vom Präparat entfernt. Das Normalserum, der biotinylierte sekundäre Antikörper und die Komponenten des ABC-Gemisches stammten aus dem *Vectastain Elite ABC Kit* bzw. (im Falle der TSPY-Antiseren Klon #2 und Klon #7) aus dem

R.T.U. Vectastain Universal Quick Kit (Camon, Wiesbaden). Für die PAP-Verdünnung wurde das Peroxidase-gekoppelte Antiperoxidase-Kaninchen-IgG (Kaninchen-PAP, Sigma) verwendet. Zur Herstellung des DAB-Substrates fand das *Vectastain DAB Substrate Kit* (Camon, Wiesbaden) Anwendung.

3.11.2 TSPY-Antiseren 837/3, Klon #2 und Klon #7

Für die zelluläre Analyse der *TSPY*-Expression wurden das *TSPY*-Antiserum 837/3 (Schnieders *et al.*, 1996) in einer 1:300-Verdünnung, sowie die *TSPY*-Antiseren Klon #2 (Verdünnung 1:250) und Klon #7 (Verdünnung 1:1000) der Arbeitsgruppe von Yun-Fai Chris Lau (Kido and Lau, 2005) angewendet. Als Negativkontrollen wurden die Primärantikörper eine Stunde vor dem Auftragen auf den Schnitt mit humanem GST-*TSPY*-Fusionspeptid (Skawran, 2002) geblockt.

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Entparaffinieren des Schnittes	3 x 10 min in Xylol bei RT
2. Wechsel in alkoholisches Milieu	2 x 5 min abs. Isopropanol bei RT
3. Schrittweises Hydrieren des Präparates in absteigender Alkoholreihe	je 5min in 100%, 90%, 80 %, 70% EtOH, dH ₂ O bei RT
4. Antigendemaskierung für Antiseren Klon #2 und Klon #7	20-30 min bei 95°C in 50 mM Tris-HCl (pH 10), 20 min bei RT abkühlen lassen
5. Inhibition endogener Peroxidasen	5 min (837/3) bzw. 15 min (Klone #2 und #7) in 3% H ₂ O ₂ (v/v) in dH ₂ O, RT
6. Waschung	je 5 min dH ₂ O und PBS bei RT
7. Blockierung mit Normalserum	60 min in 6% (v/v) Normalserum der Ziege in PBS/1% BSA (837/3) bzw. Normalserum des Pferdes (Klon #2 und #7) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
8a. Blockierung des Primärantikörpers mit dem Antigen	60 min vor Anwendung 1:300 (v/v) Antiserum 837/3 bzw. 1:250 Klon #2 bzw. 1:1000 Klon #7 mit 1:10 (v/v) humanem GST- <i>TSPY</i> -Fusionspeptid ansetzen in 6% (v/v) Normalserum der Ziege/PBS/1% BSA (837/3)

-
- bzw. in 1,5% (v/v) Normalserum des Pferdes in PBS (Klon #2 und #7); Inkubation über Nacht bei 4°C in lichtundurchlässiger Feuchtkammer
- 8b. Primärantikörper über Nacht 1:300 (v/v) Antiserum 837/3 in 6% (v/v) Normalserum der Ziege/PBS/1% BSA bzw. 1:250 Klon #2 bzw. 1:1000 Klon #7 in 1,5% (v/v) Normalserum des Pferdes in PBS, in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei 4°C
9. Waschung 3 x 5 min in PBS bei RT
10. Sekundärer, biotinylierter IgG-Antikörper (837/3) in PBS/1% BSA bzw. biotinylierter Maus-IgG-Antikörper (Klon #2 und #7) in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
11. Waschung 3 x 5 min in PBS bei RT
12. Kaninchen-PAP für Antikörper 837/3 30 min 1:200 Kaninchen-PAP in PBS/0,1% BSA in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
13. Waschung 3 x 5 min PBS bei RT
14. ABC-Komplex 30 min 1:250 Mischung aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) in PBS bei RT (Reagenzienmischung 30 min vor Gebrauch angesetzt.)
15. Waschung 3 x 5 min PBS bei RT
16. Enzymatische Färbung 25-100 µl DAB Substrat-Lösung pro Präparat (*Vectastain Peroxidase Substrate Kit DAB*)
Die Entwicklungsreaktion wurde bei RT durchgeführt und durch kurze Betrachtung unter dem Mikroskop verfolgt, sodass bei entsprechender Intensität gestoppt werden konnte (Färbezeit: 2-3min).
17. Stoppen der Reaktion in dH₂O bei RT

- | | |
|------------------|--|
| 18. Gegenfärbung | 3 min Mayers Hämalaun 1:10 in dH ₂ O, anschließend 10 min fließend wässern |
| 19. Eindecken | nach Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (Schritt 3 in umgekehrter Reihenfolge) und anschließender Überführung in HistoClear (3 x 2min) mit Histomount |

3.11.3 Aktivierte Caspase 3-Antiserum, Ki67-Antiserum und EEF1A1-Antiserum

Das folgende Protokoll fasst die Färbeprotokolle für die Apoptosedetektion mittels Aktivierte Caspase 3-Antiserums (Verdünnung 1:80), die Detektion proliferativer Zellen über Ki67-Antiserum (Verdünnung 1:100) und die zelluläre Expressionsanalyse des eukaryontischen Elongationsfaktors 1 Alpha (eEF1A) mittels EEF1A1-Antiserums (Verdünnung 1:50) zusammen. Für die Negativkontrollen wurde im Falle des Ki67- und des EEF1A1-Antiserums statt des Primärantikörpers PBS/1% BSA aufgetragen. Als Negativkontrolle des Caspase 3-Antiserums wurde dieses eine Stunde vor dem Auftragen mit Aktivierte Caspase 3-Protein geblockt.

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Entparaffinieren des Schnittes	3 x 5 min in Xylol bei RT
2. Wechsel in alkoholisches Milieu	2 x 5 min abs. Isopropanol bei RT
3. Schrittweises Hydrieren des Präparates in absteigender Alkoholreihe	je 5min in 100%, 90%, 70% EtOH, dH ₂ O bei RT
4. Waschung	2 x 5 min in dH ₂ O bei RT, 5 min in PBS bei RT
5. Antigendemaskierung	Erhitzung in der Mikrowelle in 10 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 6) für 1 min auf höchster Stufe (900 Watt) und danach bei mittlerer Stufe (450 Watt), 20 min bei RT abkühlen lassen
6. Waschung	3 x 5 min dH ₂ O bei RT

7. Inhibition endogener Peroxidasen	10 min in 1% H ₂ O ₂ (v/v) in dH ₂ O bei RT
10. Waschung	3 x 5 min dH ₂ O bei RT 5 min PBS bei RT
11. Blockierung mit Normalserum der Ziege	60 min in 6% (v/v) Normalserum der Ziege in PBS/1% BSA in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
12a. Blockierung des Caspase 3-Primärantikörpers mit dem Antigen	60 min vor Anwendung 1:80 (v/v) Antiserum Asp175 mit 1:10 (v/v) aktivierte Caspase 3-Protein ansetzen in 6% Normalserum der Ziege PBS/1% BSA; Inkubation über Nacht bei 4°C in lichtundurchlässiger Feuchtkammer
12b. Primäreantikörper	über Nacht 1:80 (v/v) Antiserum Asp175 bzw. 1:100 Ki67-Antiserum bzw. 1:50 EEF1A1-Antiserum in 6% (v/v) Normalserum der Ziege/PBS/1% BSA, in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei 4°C
13. Waschung	3 x 5 min in PBS bei RT
14. Sekundärer, biotinylierter	30 min 1:250 (v/v) biotinylierter Kaninchen-IgG-Antikörper in PBS in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
15. Waschung	3 x 5 min in PBS bei RT
16. Kaninchen-PAP	30 min 1:200 Kaninchen-PAP in PBS/0,1% BSA in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
17. Waschung	3 x 5 min PBS bei RT
18. ABC-Komplex	30 min 1:250 Mischung aus Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte Peroxidase) in PBS bei RT (Reagenzienmischung 30 min vor Gebrauch angesetzt)
19. Waschung	3 x 5 min PBS bei RT
20. Enzymatische Färbung	25-100 µl DAB Substrat-Lösung pro Präparat (<i>Vectastain Peroxidase Substrate Kit DAB</i>)

	Die Farbentwicklung erfolgte bei RT und wurde durch kurze Betrachtung unter dem Mikroskop kontrolliert, um die Reaktion (maximale Inkubation 3 min) bei entsprechender Intensität zu stoppen.
21. Stoppen der Reaktion	in dH ₂ O bei RT
22. Gegenfärbung	3 min Mayers Hämalaun 1:10 in dH ₂ O, anschließend 10 min fließend wässern
23. Eindecken	mit Histomount nach Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (Schritt 3 in umgekehrter Reihenfolge) und anschließender Überführung in HistoClear (3 x 2 min)

3.11.4 Apoptosedetektion mittels TUNEL-Assays

Zur Apoptosedetektion wurde die TUNEL-Methode (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated deoxyuridinetriphosphate (dUTP) nick end labeling*) angewendet, welche auf der Markierung von einzel- oder doppelsträngigen DNA-Strangbrüchen, die als eines der Endprodukte der Apoptosekaskade entstehen, basiert. Dabei werden, katalysiert durch die Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT), die freien 3'-OH-DNA-Enden von Digoxigenin-gekoppelten Nukleotidtriphosphaten gebunden. Die Digoxigenin-Nukleotide werden in einem weiteren Schritt von einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper gebunden. Dessen Peroxidase setzt schließlich enzymatisch das zugefügte DAB-Substrat zu einer permanenten Färbung apoptotischer Zellen um.

Für den TUNEL-Assay wurden Paraffinschnitte Formalin-, Paraformaldehyd- und Bouin-fixierter Gewebe verwendet, die mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Digoxigenin-Methode mittels des *ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kits* (Serologicals) gefärbt wurden. Die Negativkontrolle wurde ohne TdT-Reagenz durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten die im Kit mitgelieferten Schnitte von Rattenbrustdrüsengewebe.

<u>Vorgang:</u>	<u>Bedingungen:</u>
1. Entparaffinieren des Schnittes	3 x 5 min in Xylol bei RT
2. Schrittweises Hydrieren des Präparates in absteigender Alkoholreihe	2 x 5 min 100% EtOH bei RT je 3 min in 95%, 70% EtOH bei RT 5 min PBS bei RT
3. Proteinase K-Proteinverdau	15 min Proteinase K in PBS (20 µg/ml) bei RT
4. Waschung	2 x 2 min in dH ₂ O bei RT
5. Inhibition der endogenen Peroxidase	5 min 3% H ₂ O ₂ in PBS bei RT
6. Waschung	2 x 5 min PBS bei RT
7. Äquilibrieren	75 µl <i>Equilibration Buffer</i> pro Präparat für mindestens 10 sec bei RT
8. TdT-Enzym	60 min 55 µl/5 cm ² <i>Working Strength TdT Enzyme</i> 1:3 in <i>Reaction Buffer</i> in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT
9. Stoppen der Reaktion	in <i>Working Strength Stop/Wash Buffer</i> (1 ml <i>Stop/Wash Buffer</i> + 34 ml dH ₂ O vermischen) Schnitte für 15 sec bewegen, anschließend 10 min bei RT inkubieren
10. Waschung	3 x 1 min PBS bei RT
11. Peroxidase-konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper	65 µl <i>Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugat</i> /5cm ² Präparat auf OT in lichtundurchlässiger Feuchtkammer bei RT für 30 min
12. Waschung	4 x 2 min PBS bei RT
13. Enzymatische Färbung	75 µl/5 cm ² <i>Working Strength Peroxidase Substrat</i> 1:50 in <i>DAB Dilution Buffer</i>) auf Präparat für 3 bis 6 min bei RT Die Entwicklungsreaktion wurde auf den Objektträgern durchgeführt und durch kurze Betrachtung unter dem Mikroskop verfolgt, so dass bei entsprechender Intensität gestoppt werden konnte.
14. Stoppen der Reaktion	in dH ₂ O bei RT

15. Waschung	3 x 1 min in dH ₂ O bei RT
16. Gegenfärben	3 min Mayers Hämalaun 1:10 in dH ₂ O, anschließend 10 min fließend wässern
17. Eindecken	mit Histomount nach Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (Schritt 3 in umgekehrter Reihenfolge) und anschließender Überführung in Histo-clear (3 x 2 min)

3.12 Statistische Analysen

Statistische Analysen der histologischen und immunhistochemischen Auswertungen der Präparate wurden mit dem Programm SPSS für Windows (*Statistical Package for the Social Sciences*) durchgeführt. Als statistische Tests wurden der t-Test, der Chi-Quadrat-Test nach Pearson, der Exakte Test nach Fisher und der Mann-Whitney-Test angewendet. Unterschiede der Daten wurden als signifikant beurteilt, wenn der ermittelte P-Wert kleiner als 0,05 war. Als hochsignifikant wurden Unterschiede bewertet, deren P-Wert kleiner als 0,01 war. Zur Übereinstimmungsprüfung der verwendeten Apoptosedetektionsmethoden Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assay wurde neben der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (zweiseitig, Signifianz bei $P \leq 0,025$) auch der Bland-Altman-Plot angewendet (Bland und Altman, 1986, 2003).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Funktion von TSPY in spermatogenesedefizienten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen

Die von Schubert (2001) generierte *TSPY*-transgene Mauslinie *Tg(TSPY)9Jsh* ist das einzige derzeit verfügbare *in-vivo*-Tiermodell, um die Regulation, Expression und Funktion der humanen *TSPY*-Genfamilie während der Ontogenese und postnatalen Entwicklung und den möglichen Einfluss von *TSPY* bei der Entstehung männlichspezifischer Tumore näher zu untersuchen. Vorarbeiten an dieser transgenen Linie zeigten, dass der menschliche *TSPY*-Promotor in dieser Linie aktiv ist und das menschliche Transgen nach dem humanen Muster exprimiert wird. *TSPY*-transgene Mäuse sind gesund und fertil, und es scheint, dass das Transgen unter normalen physiologischen Bedingungen die Spermatogenese und Spermiogenese im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht signifikant beeinflusst. Werden allerdings *TSPY*-hemizygoten Mäuse in die kryptorchide *Insl3*-„knock-out“-Mauslinie eingekreuzt (Zimmermann *et al.*, 1999), zeigen 15 und 20 Tage alte *TSPY*-transgene kryptorchide Männchen eine signifikant erhöhte testikuläre Keimzellanzahl im Vergleich zum nicht transgenen *Insl3*-defizienten Wildtyp. Auch scheint in einem postnatalen Zeitfenster von 30 bis 52 Tagen die testikuläre keimzellspezifische Apoptoserate bei *TSPY*-transgenen kryptorchiden *Insl3*-defizienten Männchen signifikant erniedrigt zu sein (Hussein, 2005; S. Schubert, persönliche Mitteilung). Dieser partielle *rescue* des *Insl3*-Phänotyps bei *TSPY*-transgenen Mäusen weist auf einen proliferativen und/oder anti-apoptotischen Effekt des Transgens während der Spermatogenese hin. Um zu untersuchen, ob *TSPY* einen proliferativen und/oder anti-apoptotischen Effekt auf die Spermatogonien ausübt, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit spermatogenesedefiziente *TSPY*-transgene *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und als Kontrollen nicht transgene *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen generiert und die Testes verschiedener postnataler Altersstadien histologisch und immunhistochemisch auf einen proliferativen oder anti-apoptotischen Effekt des humanen Transgens hin untersucht.

4.1.1 Generierung von *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-C57BL/6J-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen

Kit-defiziente Mäuse der Linie *C57BL/6J-Kit^{W-v}/J* zeigen aufgrund einer Mutation im Kit-Rezeptorgen einen Spermatogenese-arrest auf Stufe der Spermatogonien. Heterozygote *C57BL/6J-Kit^{W-v}/J*-Weibchen von Charles River wurden mit *TSPY*-transgenen Männchen verpaart. Die heterozygoten *TSPY-Kit^{W-v}*-Männchen und *NMRI-Kit^{W-v}*-Weibchen der F1-Generation wurden mit Eintritt der Geschlechtsreife verpaart, um in der F2-Generation homozygote transgene *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen zu generieren. Weil die *TSPY*-transgene Linie *Tg(TSPY)9Jshm* auf einem *NMRI*-Hintergrund begründet ist (Schubert *et al.*, 2003), wurden als Kontrollen *NMRI*-Männchen mit heterozygoten *C57BL/6J-Kit^{W-v}/J*-Weibchen verpaart und die heterozygoten männlichen und weiblichen *NMRI-Kit^{W-v}*-Nachkommen für die Zucht von *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen eingesetzt. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden an homozygoten Kit-defizienten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen der F2- und folgender Generation durchgeführt.

4.1.2 Genotypisierungen der verschiedenen Zuchtlinien

Zur Analyse der Genotypen der Mäuse der verschiedenen Zuchtlinien (siehe Abschnitt 4.1.1) wurden *TSPY*-spezifische PCRs eingesetzt (siehe Abschnitt 4.1.2.1) sowie ein Teilbereich des *c-kit*-Gens mittels PCR und Restriktionsverdau analysiert (siehe Abschnitt 4.1.2.2). Um die eingesetzte DNA-Menge quantitativ und qualitativ zu kontrollieren, wurde zusätzlich eine PCR mit dem Primerpaar *Tfmr1/Tfmr1* durchgeführt (siehe Abbildung 4-1), durch welches bei männlichen und weiblichen Tieren ein spezifisches Produkt von 480 bp der N-terminalen Domäne des murinen Androgenrezeptors amplifiziert wird (Moharreh-Khiabani, 2002).



Abbildung 4-1: Genomische PCR mit dem Primerpaar *Tfmr1/Tfmr1* aus 100 ng DNA von fünf weiblichen *NMRI-Kit^{W-v}* Weibchen (1-5). Aufgetragen wurden ein 1kb-Längenmarker (M), die PCR-Produkte von fünf Tieren (1-5) und der Leerwert (L). Alle fünf Proben sind amplifizierbar und weisen damit eine ausreichende DNA-Konzentration auf.

4.1.2.1 Nachweis des *TSPY*-Transgens

Der Nachweis des humanen Transgens in männlichen Nachkommen der Zuchtlinien *Tg(TSPY)9Jshn* und *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W-v}/J* erfolgte mittels PCR aus genomischer DNA mit drei verschiedenen Primerpaaren. Über das Primerpaar P5/TV03 wurden die Exons 4 bis 6 des *hTSPY* amplifiziert und ein Produkt von 1191 bp generiert (Schubert, 2001; siehe Abbildung 4-2 A). Das Primerpaar TV12/TV13 amplifiziert ein 1259 bp großes Produkt des *TSPY*-Promotorbereiches (Schubert, 2001; siehe Abbildung 4-2 B). Das dritte Primerpaar Ex3fwd/4690E4Rev diente dem Nachweis eines 235 bp großen Produktes der *TSPY*-Exons 3 und 4 (siehe Abbildung 4-2 C). Als Positivkontrolle diente der Plasmidklon pHerbi (Schubert, 2001; siehe Abbildungen 4-2 A und B). Alle drei Primerpaare amplifizierten spezifisch das humane *TSPY*-Transgen (Schubert 2001 und persönliche Mitteilung; siehe Abbildung 4-2 A-C).

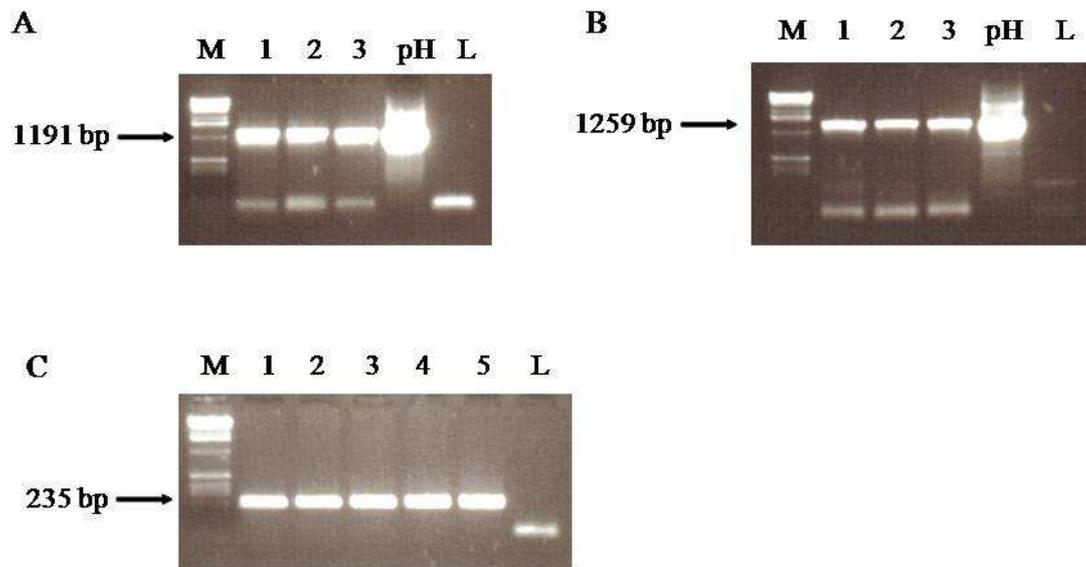


Abbildung 4-2: *TSPY*-spezifische PCRs mit den Primerpaaren P5/TV03 (A), TV12/TV13 (B) und Ex3fwd/4690E4Rev (C) aus genomischer DNA von transgenen Männchen. Aufgetragen wurden ein 1kb-Längenmarker (M), die PCR-Produkte von drei (1-3 in A und B) bzw. fünf (1-5 in C) transgenen Männchen, die Positivkontrolle mit dem rekombinanten Plasmid pHerbi (pH) und der Leerwert (L). Alle getesteten Männchen sind *TSPY*-positiv und damit transgen.

4.1.2.2 Nachweis der *Kit*^{W^v}-Mutation

Der Nachweis der *Kit*^{W^v}-Mutation bei Männchen und Weibchen der Linien *TSPY*-C57BL/6J-*Kit*^{W^v}/J und NMRI-C57BL/6J-*Kit*^{W^v}/J erfolgte mittels *Kit*-spezifischer PCR und anschließenden Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *Nsi*I.

Aus genomischer DNA wurde zunächst mit Hilfe des Primerpaares Kit-F/Kit-R ein spezifisches Produkt von 105 bp des murinen *c-kit*-Gens amplifiziert, welches die Mutationsstelle umfasst (siehe Abbildung 4-3).

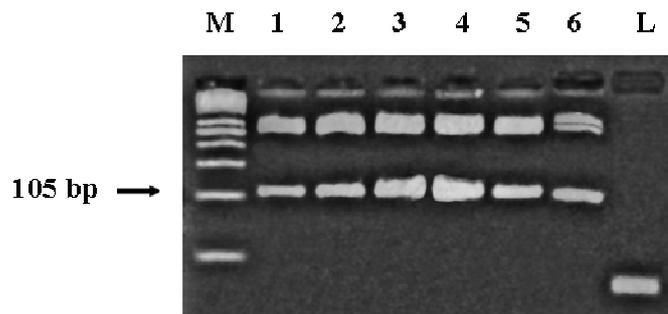


Abbildung 4-3: Kit-spezifische PCR mit dem Primerpaar Kit-F/Kit-R aus genomischer DNA von sechs Mäusen der Linie *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J* (1-6). Aufgetragen wurden ein 50bp-Längenmarker (M), die PCR-Produkte von sechs *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J*-Männchen (1-6) und der Leerwert (L).

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *NsiI* verdaut. Durch die *Kit^{W^v}*-Mutation wird eine *NsiI*-Schnittstelle generiert, die nach Restriktionsverdau das 105 bp große PCR-Produkt in zwei Banden von 85 bp und 20 bp aufspaltet. Bei Heterozygotie wird nach 4%-iger Gelelektrophorese (3% Nusieve Agarose, 1% Seakem Agarose) neben der 105 bp-Bande auch eine 85 bp große Bande sichtbar. Liegt die Mutation hingegen homozygot vor, ist nach 4%iger Gelelektrophorese lediglich die 85 bp Bande präsent (siehe Abbildung 4-4).

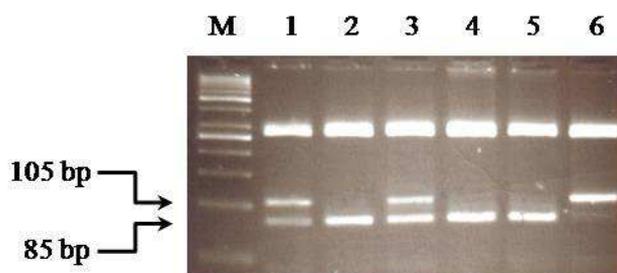


Abbildung 4-4: Agarosegelelektrophorese nach *NsiI*-Restriktionsverdau von Kit-PCR-Produkten. Aufgetragen wurden ein 50bp-Längenmarker (M) und die verdauten PCR-Produkte von sechs *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J*-Männchen (1-6). Die Männchen 1 und 3 sind heterozygot für die *Kit^{W^v}*-Mutation, die Mäuse 2, 4 und 5 sind homozygot, während Tier 6 den Wildtyp repräsentiert.

4.1.3 Histologische Untersuchungen der Hoden und Nebenhoden männlicher *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Mäuse

Um einen möglichen Einfluss des Transgens auf die Spermatogenese in *Kit*-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden 58 adulte *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und 38 adulte nicht transgene *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Kontrollen im Alter von fünf Wochen bis acht Monaten generiert und die Histologie der Hoden und Nebenhoden mikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 4-5). Die Testes adulter homozygoter *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Tiere mit C57BL/6-Hintergrund beinhalten fast keine Keimzellen und zeigen einen Spermatogenese-arrest auf Stufe der undifferenzierten Typ A Spermatogonien, und die Nebenhoden enthalten keine postmeiotischen Keimzellen (Little und Cloudman, 1937; Fekete *et al.*, 1941).

Von allen Tieren wurden beide Testes histologisch untersucht und mindestens sechs unterschiedliche Ebenen der Testes analysiert (siehe Abschnitt 3.10). Bei 42 von 58 analysierten adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen waren in den Testes pachytäne Spermatozyten präsent und bei 35 von 58 *TSPY*-transgenen *Kit*-defizienten Männchen ein *rescue* der *Kit*-Defizienz in Form von runden und/oder elongierten Spermatiden ausgebildet (siehe Abbildung 4-5). Interessanterweise war auch bei einigen analysierten Kontrollen (*NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*, siehe Abbildung 4-5) ein partieller *rescue* des *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Phänotyps aufgetreten. Insgesamt war dieser aber bei prozentual weniger Tieren manifestiert. In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der histologischen testikulären Analysen der *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und nicht transgenen *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäuse dargestellt. Wie aus Tabelle 4-1 ersichtlich, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und gleichaltrigen *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Kontrollen bezüglich der Anzahl der Tiere mit pachytäne Spermatozyten enthaltenden Hoden ($P = 0,176$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson; siehe Tabelle 4-1) und der Zahl der Mäuse mit runden und/oder elongierten Spermatiden präsentierenden Testes ($P = 0,211$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson; siehe Tabelle 4-1) nachgewiesen werden. In den meisten Fällen wies jedoch nur einer der beiden Hoden von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen eine meiotische Keimzellentwicklung auf, der andere zeigte das typische Bild eines *Kit*-defizienten Hodens mit einem Spermatogenese-arrest auf spermatogonialer Stufe.

Von allen 58 *TSPY*-transgenen und 38 nicht transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Männchen wurden auch beide Nebenhoden histologisch auf die Präsenz von Spermien untersucht. Diese Untersuchung ergab, dass hochsignifikant mehr *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- als *NMRI-*

Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen Spermien in ihren Nebenhoden aufwiesen ($P = 0,001$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson; s. Tabelle 4-1). Es wurden allerdings nicht alle Bereiche (Kopf, Körper Schwanz), sondern nur Teilbereiche des Nebenhodens histologisch analysiert. Als Spermien-negativ klassifizierte Tiere könnten daher durchaus einige wenige Spermien in den nicht analysierten Nebenhodenbereichen aufweisen.

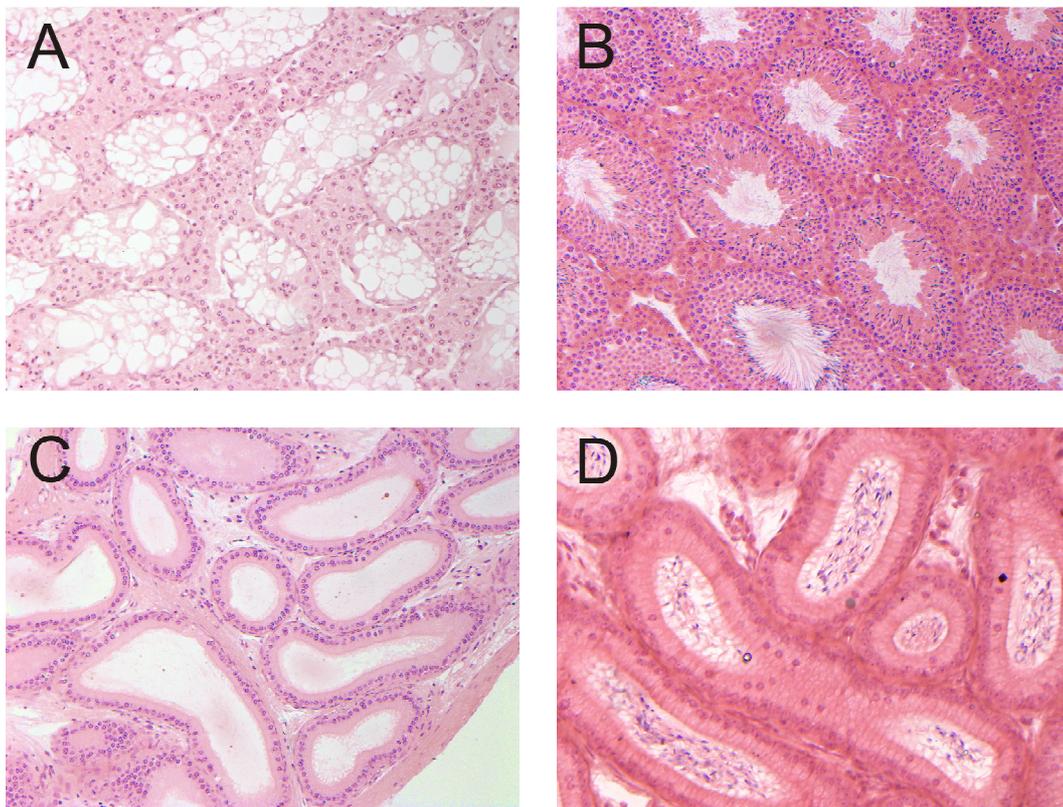


Abbildung 4-5: Histologie der Testes und Epididymides adulter *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Der HE-gefärbte Testis-Akrylatschnitt eines 4,5 Monate alten NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (A, 100x) zeigt keine Keimzellen über die Stufe der Spermatogonien hinaus. Ein HE-gefärbter Testis-Akrylatschnitt eines 10,5 Monate alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (B, 100x) weist einen *rescue* der Spermatogenese mit zahlreich entwickelten Spermatozyten sowie runden und elongierten Spermatisden auf. Während der untersuchte Nebenhodenbereich des NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (C, 100x) keine Spermien beinhaltet, sind im betrachteten Nebenhodenbereich des *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (D, 200x) viele entwickelte Spermien sichtbar.

	Tiere mit pachytänen Spermatozyten	Tiere mit runden und/oder elongierten Spermatiden	Tiere mit Spermien in den Nebenhoden**
TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}	42/58 (72,41%)	35/58 (60,34%)	23/58 (39,66%)
NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}	23/38 (60,53%)	18/38 (47,37%)	3/38 (7,89%)

Tabelle 4-1: Keimzellanalysen adulter TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}- und NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen.

Angegeben sind die relative Anzahl der Mäuse, welche Keimzellen in ihren Hoden bzw. Nebenhoden zeigten und in Klammern die entsprechenden Angaben in Prozent. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen und NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Kontrollen in der relativen Anzahl der Tiere mit Testes mit pachytänen Spermatozyten bzw. runde und/oder elongierte Spermatiden detektiert ($P > 0,05$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Die Anzahl der Tiere mit Spermien-enthaltenden Nebenhoden unterschied sich hingegen hochsignifikant zwischen TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen und den gleichaltrigen NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Kontrollen (** hochsignifikant, $P = 0,001$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

Bei TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen und NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Kontrollen, die pachytäne Spermatozyten bzw. Spermatiden innerhalb der Testes zeigten, wurden pro Tier die prozentualen Anteile der *Tubuli seminiferi* mit pachytänen Spermatozyten bzw. mit runden und/oder elongierten Spermatiden an der Gesamttubulizahl ermittelt und von allen Tieren der Gesamtanteil aller *Tubuli* mit meiotischen Keimzellen in Form von pachytänen Spermatozyten und Spermatiden errechnet (siehe Tabelle 4-2). Beim Vergleich der Testes von TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Mäusen und NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen waren signifikant mehr *Tubuli* mit primären Spermatozyten in TSPY-transgenen Mäusen präsent ($P = 0,007$, t-Test; siehe Tabelle 4-2) und hochsignifikant mehr *Tubuli seminiferi* von TSPY-transgenen Männchen mit runden bzw. elongierten Spermatiden ausgestattet ($P = 0,001$, t-Test; siehe Tabelle 4-2).

	<i>Tubuli seminiferi mit primären Spermatozyten</i> *	<i>Tubuli seminiferi mit runden und/oder elongierten Spermatisden</i> **
<i>TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	21,88% (n = 42)	20,68% (n = 35)
<i>NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	11,02% (n = 23)	6,38% (n = 18)

Tabelle 4-2: Prozentuale Anteile der *Tubuli seminiferi* mit primären Spermatozyten bzw. runden und/oder elongierten Spermatisden in den Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Angegeben sind die prozentualen Anteile der Keimzellenthaltenden *Tubuli* an den **Gesamt tubulizahlen**. *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Tiere zeigten sowohl bezüglich der primären Spermatozyten als auch hinsichtlich der Spermatisden signifikant mehr *Tubuli* mit meiotischen Keimzellen als die gleichaltrigen *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Kontrollen. *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen unterschieden sich signifikant im Prozentsatz der Hodenkanälchen, welche primäre Spermatozyten enthielten (* P < 0,05, t-Test). Der prozentuale Anteil von *Tubuli seminiferi* mit runden und/oder elongierten Spermatisden ergab zwischen transgenen und Kontrolltieren einen hochsignifikanten Unterschied (** P < 0,01, t-Test). Für beide Analysen wurden Präparate ohne Spermatozyten bzw. ohne Spermatisden ausgeschlossen.

4.1.4 Fertilitätsanalysen bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen

Fünf geschlechtsreife *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen wurden mit jeweils einem geschlechtsreifen CD1-Weibchen verpaart und die Ovidukte und Uteri der Vaginalpropf-positiven Weibchen am nächsten Morgen auf Spermien hin untersucht. Von vier Verpaarungen konnte je ein Vaginalpropf-positives Weibchen untersucht werden. Bei keinem der vier untersuchten Weibchen konnten in dem zum Spülen der Ovidukte und des Uterus verwendeten unverdünnten M2-Mediums bei der mikroskopischen Analyse in einer Neubauer Kammer Spermien detektiert werden. Histologische Untersuchungen der präparierten und fixierten Hoden und Nebenhoden der verpaarten fünf Männchen (sechs verschiedene Ebenen beider Testes wurden histologisch untersucht) zeigten bei drei Männchen Spermien in Hoden und Nebenhoden. Bei den übrigen zwei adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Männchen konnten keine Spermien in Hoden und Nebenhoden mittels histologischer Analyse nachgewiesen werden. Ihre Testes enthielten auch keine meiotischen Keimzellen in Form von primären oder sekundären Spermatozyten.

Weiterhin wurden jeweils beide Nebenhodenschwänze von sieben adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen mit IVF-Medium gespült und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Spermien hin untersucht. Bei fünf der sieben Tiere konnten bewegliche Spermien beobachtet werden, die übrigen zwei Tiere wiesen keine Spermien auf. Die Ergebnisse der Auszählungen mittels Neubauer-Kammer sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tiernr.	Alter	Spermien/ml IVF-Medium
2A	5 Monate	0
43	5,5 Monate	4×10^3
60	5,5 Monate	5×10^3
74	5,5 Monate	$1,7 \times 10^5$
92	5 Monate	1×10^3
93	5 Monate	0
94	5 Monate	$2,2 \times 10^5$

Tabelle 4-3: Zählungen isolierter Spermien aus den Nebenhodenschwänzen von sieben adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Die Ergebnisse sind in Spermienzahl pro ml angegeben. Fünf der sieben Männchen wiesen bewegliche Spermien auf.

Es wurden 28 adulte *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und 18 adulte *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Alter von sechs Wochen bis acht Monaten mindestens drei Monate mit fertilen heterozygoten *Kit^{W-v}*- oder Wildtypweibchen verpaart. Die Testes und Nebenhoden der verpaarten Männchen wurden anschließend histologisch analysiert und die verpaarten Weibchen nach dem Lösen der Verpaarung auf das Vorhandensein einer Schwangerschaft anatomisch untersucht. Kein verpaartes Weibchen zeigte zum Zeitpunkt des Verpaarungsendes ein bei der Sektion sichtbares Zeichen einer Schwangerschaft. Während der Verpaarungszeit jedoch konnte Fertilität bei einigen, jedoch nicht allen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen beobachtet werden. Während keines der 18 Kontrollmännchen Würfe produzierte, hatten vier der 28 verpaarten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen Nachkommen generiert. Dieser Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant ($P = 0,144$, Exakter Test nach Fisher). Die Ergebnisse der histologischen Analyse der Hoden und Nebenhoden der verpaarten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen nach Verpaarungsende (vgl. Abschnitt 3.10 und 4.1.3) sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst und wurden in die Ergebnisse von Abschnitt 4.1.3 mit einbezogen. Die

histologischen Analysen der Testes und Epididymides der verpaarten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Männchen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Mäuse mit pachytänen Spermatozyten ($P = 0,337$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson) bzw. runden und/oder elongierten Spermatiden ($P = 0,148$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson) und der Anzahl der Männchen mit Spermien-enthaltenden Nebenhoden (siehe Tabelle 4-4, $P = 0,064$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

	Tiere mit pachytänen Spermatozyten	Tiere mit runden und/oder elongierten Spermatiden	Tiere mit Spermien in den Nebenhoden
<i>TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	18/28 (64,29%)	17/28 (60,71%)	12/28 (42,86%)
<i>NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	9/18 (50%)	7/18 (38,89%)	3/18 (16,67%)

Tabelle 4-4: Histologische Keimzellanalysen der verpaarten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen ($n = 28$) und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen ($n = 18$). Angegeben sind die relative Anzahl der Mäuse, welche Keimzellen in ihren Hoden bzw. Nebenhoden zeigten mit den entsprechenden Prozentangaben in Klammern. Bei keinem der drei Untersuchungskriterien lag ein signifikanter Unterschied zwischen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen vor ($P > 0,05$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

4.1.5 Histologische Analyse der Hoden und Nebenhoden und Fertilitätsanalyse homozygoter Nachkommen des *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens Nr.45

Ein fertiles *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen (Nr.45) wurde zum Aufbau einer neuen *TSPY*-transgenen *Kit*-defizienten Linie (*L2-TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*) eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich der Fertilitätsrescue auf die homozygoten männlichen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Nachkommen dieses Männchens übertragen ließ. Dieses Männchen hatte während einer Verpaarungszeit von fünf Monaten zwei Würfe von jeweils einem (unbekanntes Geschlecht) und zehn Nachkommen (vier Männchen und sechs Weibchen) generiert. Es wurden die Hoden und Nebenhoden von 17 homozygoten männlichen Nachkommen des Männchens *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Nr.45 histologisch untersucht (siehe Abschnitt 4.1.3). Bei 14 der 17 (82,35%) homozygoten Männchen der Linie *L2-TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* wurden in den *Tubuli seminiferi* pachytäne Spermatozyten detektiert während elf der 17 analysierten männlichen *L2*-Nachkommen (64,71%) runde und/oder elongierte Spermatiden

ausgebildet hatten. Acht der 17 L2-Männchen (47,06%) wiesen Spermien in ihren Nebenhoden auf. Dreizehn adulte homozygote Männchen der Linie L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* wurden für mindestens drei Monate mit fertilen heterozygoten *Kit^{W-v}*- oder Wildtypweibchen verpaart. Von diesen 13 Männchen generierte ein Männchen (7,69%) einen Wurf von sechs Nachkommen (ein Männchen, fünf Weibchen). Der Fertilitäts- und Spermatogeneserescue des *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen Nr.45 ließ sich damit auf einige *Kit*-defiziente Nachkommen der Linie L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* übertragen. Die Ergebnisse der histologischen Analysen und Fertilitätsuntersuchungen bei Tieren der Linie L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* wurden in die Ergebnisse der Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4 mit einbezogen.

4.1.6 Nachweis der adulten *TSPY*-Expression in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen

Mittels Immunhistochemie wurden die *TSPY*-exprimierenden Zellen in adulten transgenen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes analysiert. Es wurden ausschließlich Serienschnitte von Präparaten verwendet, bei denen in der vorab durchgeführten histologischen Begutachtung bereits pachytäne Spermatozyten und runde bzw. elongierte Spermatiden nachgewiesen werden konnten. Neben dem Antiserum 837/3 (Schnieders *et al.*, 1996; siehe Abbildung 4-6) wurden ebenfalls die *TSPY*-spezifischen monoklonalen Antikörper Klon #2 und Klon #7 der Arbeitsgruppe von Chris Lau (Kido und Lau, 2005) verwendet (siehe Abbildungen 4-7 und 4-8), um mögliche *TSPY*-Isoformen zu detektieren (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.1). Während das eingesetzte *TSPY*-Antiserum 837/3 und der Klon #2 den N-terminalen Bereich des *TSPY*-Peptids als Epitop erkennen, detektiert Klon #7 spezifisch den C-terminalen Bereich des humanen Transgens. *TSPY* konnte mit allen drei Antisera in den Keimzellen der *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes spezifisch detektiert werden (siehe Abbildungen 4-6 A, 4-7 A und B, 4-8 A und B), während im NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testis keine spezifische *TSPY*-Immunfärbung auftrat (siehe Abbildungen 4-6 B, 4-7 C, 4-8 C). Eine unspezifische Färbung von Leydigzellen und elongierten Spermatiden mit dem Antiserum 837/3, wie sie in Abbildung 4-6 sichtbar ist, wurde bereits früher beschrieben (Schnieders *et al.*, 1996, Schubert *et al.*, 2003). In den Testes der analysierten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen wurde *TSPY* nur in vereinzelt *Tubuli* immunhistochemisch nachgewiesen, in denen *TSPY* vor allem in Spermatogonien und primären Spermatozyten exprimiert wird. In diesen Zellen wurde *TSPY* mittels des 837/3-Antisera und Klon #2 vornehmlich im Zytoplasma und zu einem geringeren Maße im Nukleus detektiert,

während Klon #7 fast ausschließlich eine nukleäre Lokalisation von TSPY zeigte. Mit dem monoklonalen Antikörper Klon #2 wurde zusätzlich eine schwache TSPY-Immunfärbung in runden Spermatiden detektiert (siehe Abbildung 4-7). Wider Erwarten konnte TSPY mit Klon #7 nicht in runden Spermatiden dargestellt werden (siehe Abbildung 4-8; vgl. Abschnitt 1.3.1 und Kido und Lau, 2005). Die mit dem Peptid geblockten Negativkontrollen zeigten keine spezifischen Keimzellfärbungen (siehe Abbildungen 4-6 C, 4-7 D, 4-8 D). Die Topologie der *TSPY*-Transgen-Expression in Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen entspricht dem testikulären Expressionsmuster der Linie *Tg(TSPY)9Jshm* (Schubert *et al.*, 2003).

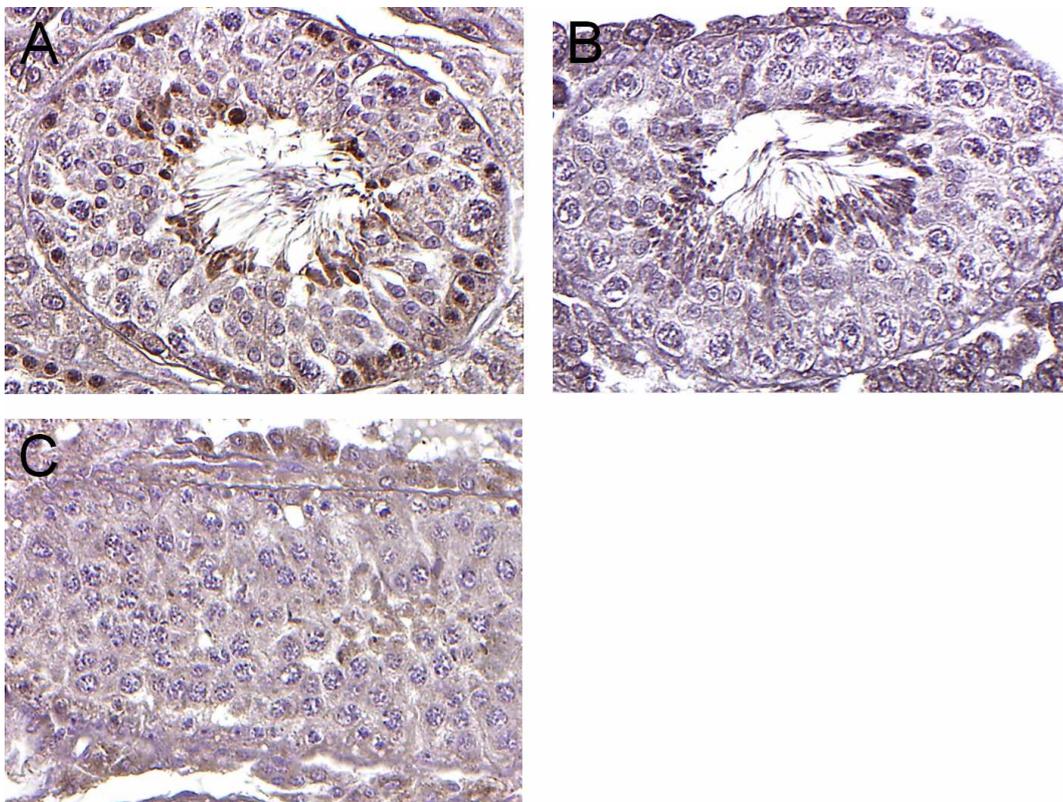


Abbildung 4-6: Immunhistochemischer Nachweis der *TSPY*-Expression im Testis einer adulter *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Maus mittels 837/3-Antiserums (Schnieders *et al.*, 1996). Immungefärbter Testis eines zwei Monate alten L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (A) und eines 5,5 Monate alten NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (B). In der Negativkontrolle (C) wurde das Antiserum mit dem GST-*TSPY*-Fusionspeptid (Skawran, 2002) blockiert. Die Gegenfärbung aller Schnitte erfolgte mittels Mayers Hämalaun. Aufnahme aller Schnitte in 400-facher Vergrößerung.

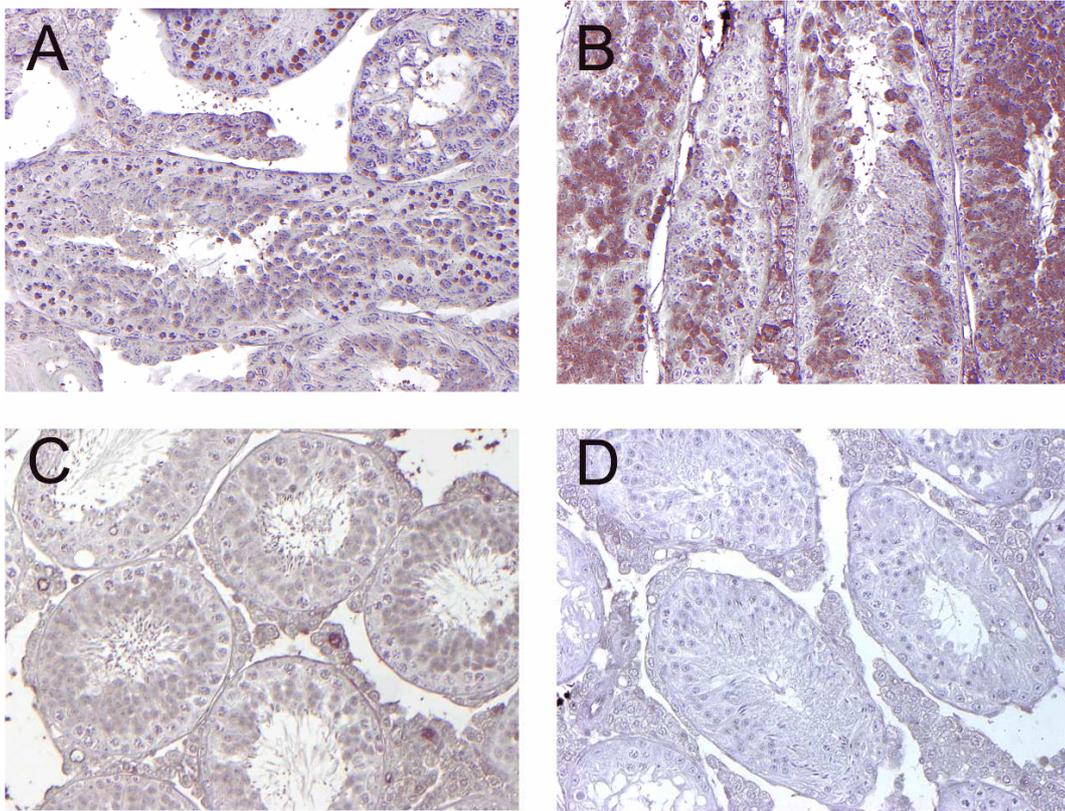


Abbildung 4-7: Immunhistochemischer Nachweis der *TSPY*-Expression im Testis eines adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens mit dem monoklonalen Antikörper Klon #2 (Kido und Lau, 2005). Dargestellt sind immungefärbte Testes eines 6,5 Monate alten *L2-TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (A, B) und eines 5,5 Monate alten *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (C). Für die Negativkontrolle (D) wurde der Antikörper mit dem GST-TSPY-Fusionspeptid (Skawran, 2002) blockiert. Alle Schnitte wurden mit Mayers Hämalaun gefärbt und in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

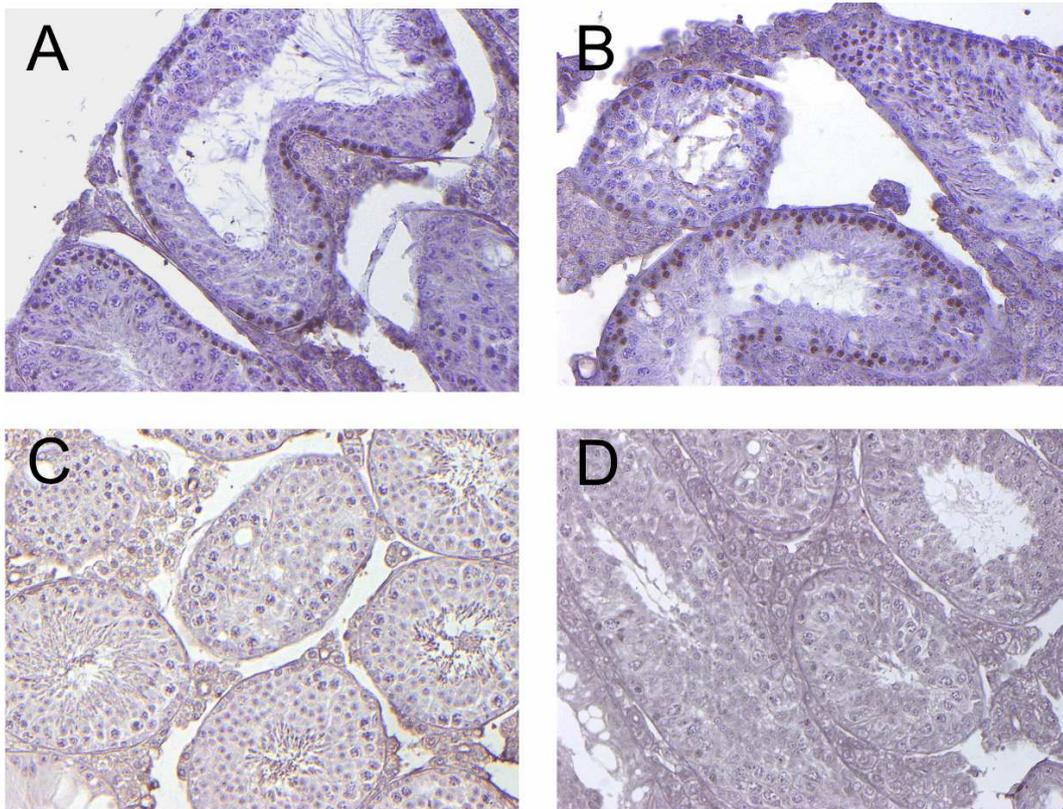


Abbildung 4-8: Immunhistochemischer *TSPY*-Expressionsnachweis im Testis einer adulten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Maus mit dem Antikörper Klon #7 (Kido und Lau, 2005). Die Abbildung zeigt den immungefärbten Testis einer zwei Monate alten *L2-TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Maus (A und B) und eines 5,5 Monate alten *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Kontrollmännchens (C). Die Blockierung des Antikörpers Klon #7 in der Negativkontrolle (D) erfolgte mit einem GST-*TSPY*-Fusionspeptid (Skawran, 2002). Gegenfärbung aller Schnitte mit Mayers Hämalaun. Darstellung in 200-facher Vergrößerung.

4.1.7 Untersuchungen zu Apoptose und Proliferation bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen verschiedener postnataler Altersstadien

Um zu prüfen, ob der partielle *rescue* der Spermatogenese bei *TSPY*-transgenen *Kit*-defizienten Männchen und die Fertilität einiger *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen auf einen anti-apoptotischen und/oder proliferativen Effekt des humanen Transgens auf die frühen Keimzellen zurückzuführen ist, wurden beide Testes von je fünf *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen der postnatalen Stadien 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp immunhistochemisch mittels TUNEL-Assays und Caspase 3- und Ki67-Antikörperimmundetektion analysiert. Die postnatalen Stadien 15,5 und 30,5 dpp wurden bewusst gewählt, weil bei diesen Altersstadien bei *TSPY*-transgenen kryptorchiden *Ins13-*

defizienten Männchen eine höhere Keimzellzahl (Stadium 15,5 dpp) bzw. ein Apoptose-
protektiver Effekt des humanen Transgens auf die frühen Keimzellen (Stadium 30,5 dpp)
gezeigt werden konnte (Hussein, 2005; Schubert persönliche Mitteilung). Das Stadium
4,5 dpp wurde gewählt, weil ab dem Tag 5 der postnatalen Mausentwicklung Kit-positive
differenzierte Typ A Spermatogonien präsent sind und derzeit postuliert wird, dass das
Kit/SCF System für das Überleben und die Proliferation der differenzierten Typ A
Spermatogonien entscheidend ist (Ohta *et al.*, 2000). Insgesamt wurden pro Testis zwei
Schnitte aus verschiedenen Ebenen mittels TUNEL-Assays und Caspase 3- und Ki67-
Antikörpers immungefärbt. Für die Auswertung wurde die Anzahl der *Tubuli seminiferi*
ermittelt, die mindestens eine immungefärbte Keimzelle aufwies und zur
Gesamttubulizahl des Testis in Relation gesetzt (modifiziert nach Lee *et al.*, 1997). Die
Ergebnisse aller drei Auswertmethoden sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Die Detektion proliferativer Zellen erfolgte mittels Immunfärbung mit einem Ki67-
Antikörper (Abbildung 4-9). Bei 4,5, 15,5 und 30,5 Tage alten Tieren wurde über Ki67-
Immunfärbung kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Hodenkanälchen mit Ki-
67-immungefärbten Keimzellen bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-
Männchen detektiert (4,5 dpp: P = 0,602, 15,5 dpp: P = 0,602, 30,5 dpp: P = 0,175, Mann-
Whitney-Test; siehe Tabelle 4-5).

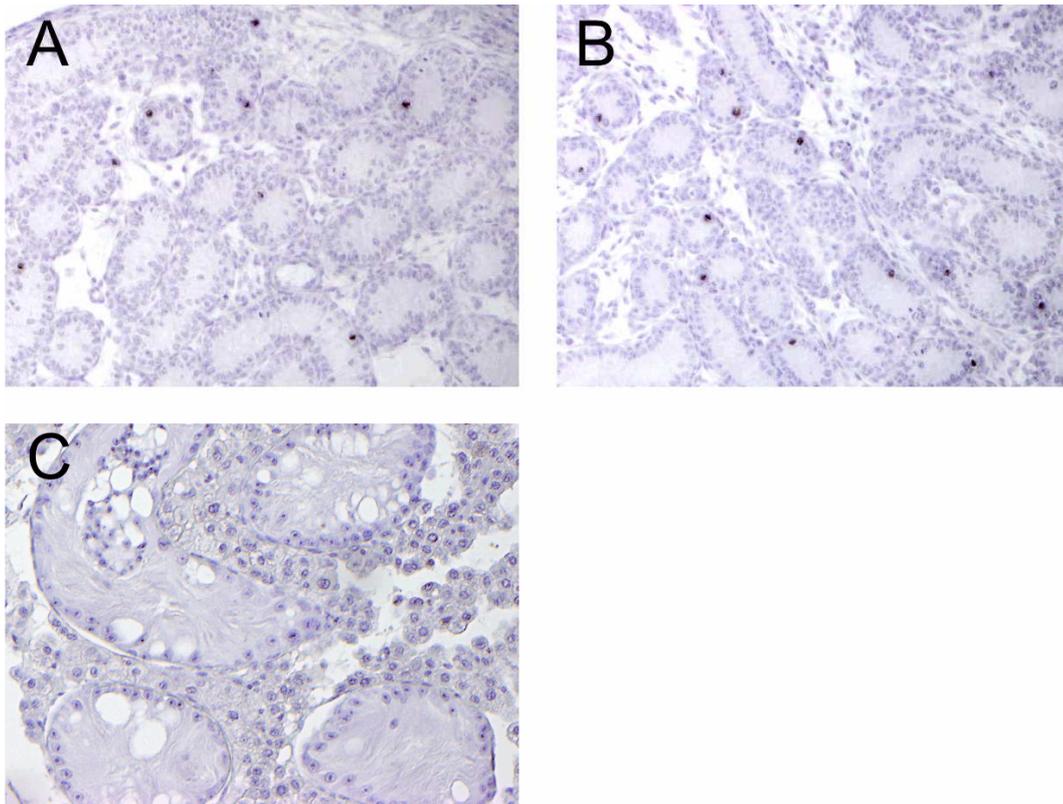


Abbildung 4-9: Exemplarische Darstellung des immunhistochemischen Nachweises proliferierender Zellen in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes des postnatalen Stadiums 4,5 dpp mittels ABC-Peroxidase-Immunfärbung mit Anti-Ki67-Antikörper und Mayers-Hämalaun-Gegenfärbung. Dargestellt sind ein *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testis (A) und ein *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testis (B), beide im Alter von 4,5 dpp. Die Negativkontrolle (C) erfolgte ohne Primärantikörper. Alle Aufnahme 200-fach vergrößert.

Zur Analyse der testikulären Apoptose wurde einerseits ein Caspase 3-Antikörper (Abbildung 4-10) eingesetzt und andererseits die TUNEL-Methode (Abbildung 4-11) angewendet. In keinem der drei untersuchten postnatalen Stadien konnte über aktivierte Caspase 3-Immundetektion (4,5 dpp: $P = 0,347$, 15,5 dpp: $P = 0,917$, 30,5 dpp: $P = 0,347$, Mann-Whitney-Test; siehe Tabelle 4-5) und mittels TUNEL-Assays (4,5 dpp: $P = 0,347$, 15,5 dpp: $P = 0,917$, 30,5 dpp: $P = 0,917$, Mann-Whitney-Test; siehe Tabelle 4-5) ein signifikanter Unterschied in der keimzellspezifischen Apoptoserate bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen gezeigt werden.

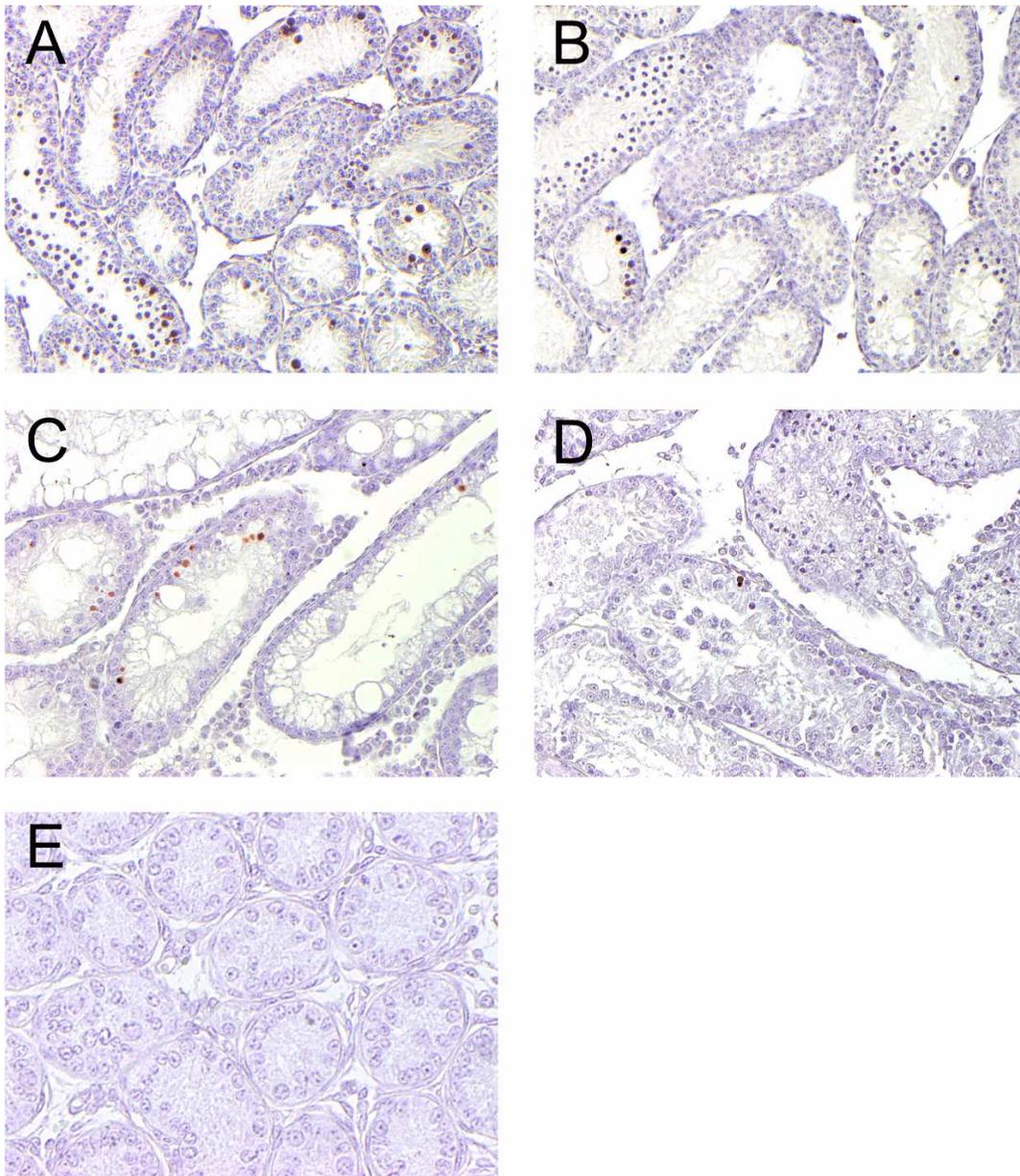


Abbildung 4-10: Exemplarische Darstellung des immunhistochemischen Nachweises apoptotischer Zellen in präpubertären und pubertären *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Hoden der postnatalen Stadien 15,5 dpp und 30,5 dpp mittels ABC-Peroxidase-Methode mit aktivierter Caspase 3-Antikörper Asp175 immungefärbt. *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes der Stadien 15,5 dpp (A) und 30,5 dpp (C) und Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Alter von 15,5 dpp (B) und 30,5 dpp (D). Für die Negativkontrolle (E) wurde der Primärantikörper mit dem dazugehörigen Asp175-aktivierte Caspase 3-Protein geblockt. Alle Schnitte wurden mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und in 200-facher Vergrößerung aufgenommen

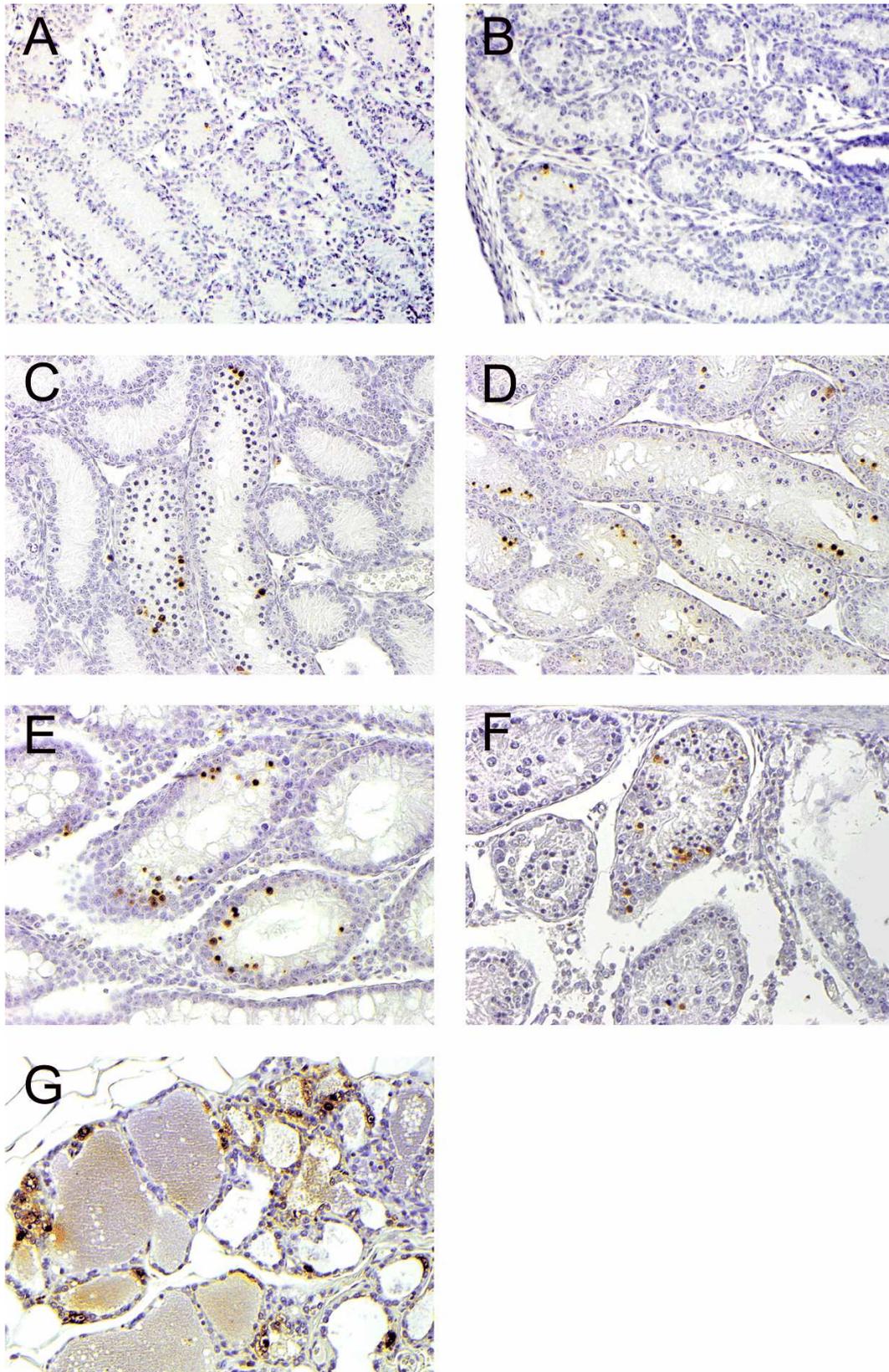


Abbildung 4-11: TUNEL-Färbung von paraffineingebetteten Hodengewebsschnitten von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen der postnatalen Stadien 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp. *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes der Stadien 4,5 dpp (A), 15,5 dpp (C) und 30,5 dpp (E) und Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Alter von 4,5 dpp (B), 15,5 dpp (D) und 30,5 dpp (F). Für die Positivkontrolle (G) wurde das im Kit mitgelieferte

Rattenbrustdrüsenngewebe angefärbt. Alle Testisgewebsschnitte wurden mit Mayers Hämalaun gegengefärbt. Für alle Aufnahmen wurde eine 200-fache Vergrößerung gewählt.

		Prozentsätze der <i>Tubuli seminiferi</i> mit mindestens einer gefärbten Zelle		
		4,5 dpp	15,5 dpp	30,5 dpp
Ki67	<i>TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	20,09% ± 5,97 (n = 5)	0,27% ± 0,28 (n = 5)	0,29% ± 0,16 (n = 5)
	<i>NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	22,24% ± 11,70 (n = 5)	1,28% ± 1,65 (n = 5)	1,24% ± 1,36 (n = 5)
TUNEL	<i>TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	4,47% ± 2,63 (n = 5)	13,08% ± 10,47 (n = 5)	7,52% ± 10,05 (n = 5)
	<i>NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	3,30% ± 3,01 (n = 5)	13,87% ± 11,84 (n = 5)	5,26% ± 3,93 (n = 5)
Caspase 3	<i>TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	2,25% ± 1,59 (n = 5)	5,66% ± 4,69 (n = 5)	1,47% ± 1,46 (n = 5)
	<i>NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i>	1,21% ± 1,02 (n = 5)	7,14% ± 5,91 (n = 5)	2,21% ± 2,08 (n = 5)

Tabelle 4-5: Proliferations- und Apoptoseanalysen in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes der postnatalen Stadien 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp über Ki67-Immunhistochemie, TUNEL-Assay und Caspase 3-Immunfärbung. Angegeben ist der relative Anteil der Hodenkanälchen in % bezogen auf die Gesamttubulizahl. Es sind die Ergebnisse der TUNEL, Caspase3- und Ki67-Antikörperdetektion in den Testes von jeweils fünf *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Alter von 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp dargestellt. Angegeben sind arithmetischer Mittelwert (X) ± Standardabweichung (s) aus (n) untersuchten Mäusen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den testikulären Proliferations- und Apoptoseraten von *TSPY*-transgenen und Kontrollmännchen ($P > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

Zur Übereinstimmungsprüfung der beiden Apoptosedetektionsmethoden Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assay wurden die Rangkorrelation nach Spearman (zweiseitig) und die Methode von Bland und Altman (1986, 2003) zum Vergleich zweier Messmethoden angewendet. Für *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäuse ergibt die zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman eine gute Korrelation der beiden eingesetzten Apoptosedetektionsmethoden ($r = 0,83$ bei $P < 0,025$), während die mittels TUNEL-

Assays und Caspase 3-Immundetektion ermittelten Ergebnisse für *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen nach Spermien nicht signifikant korrelieren ($r = 0,58$ bei $P > 0,025$). Die kritische Analyse nach Bland-Altman zeigt, dass die TUNEL-Methode und die aktivierte Caspase 3-Immundetektion verschieden große Werte messen. Für die beiden Genotypen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* sind die separaten Plots in den Abbildungen 4-12 A und B dargestellt. Die tatsächlichen Mittelwerte der Messwertdifferenzen (*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*: -5,22; *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*: -3,96) sind jeweils aufgrund der durchgängig größeren TUNEL-Messwerte nach unten verschoben (systematischer Fehler). Die Diagramme verdeutlichen außerdem, dass die Messunterschiede bei steigenden Messwerten zunehmen.

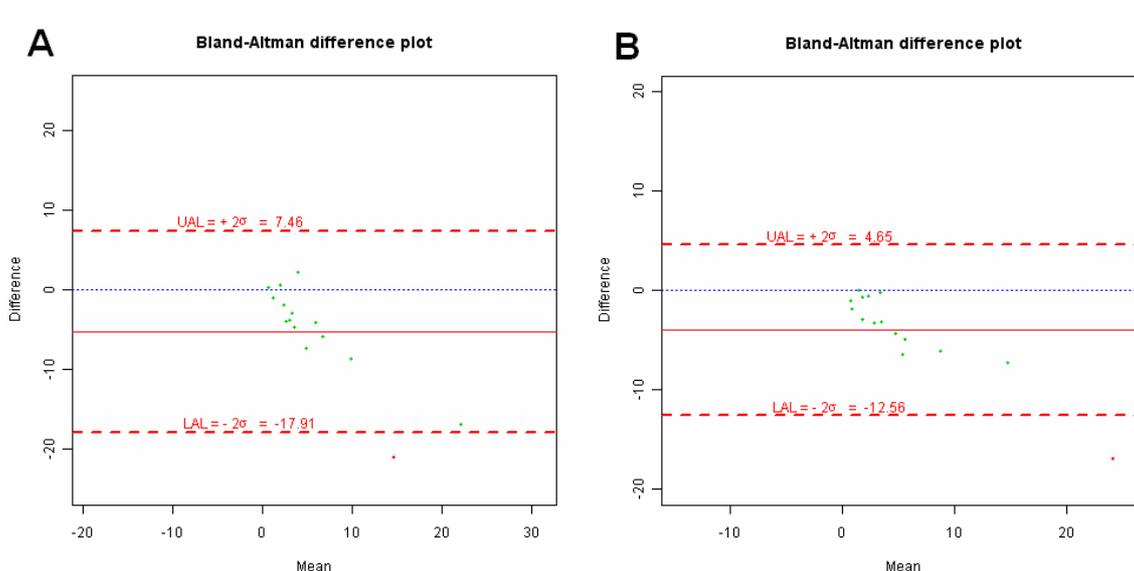


Abbildung 4-12: Bland-Altman-Punktdiagramme zum Vergleich der TUNEL- und Caspase-3-Messwerte bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- (A) und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen (B) der postnatalen Stadien 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp. Aufgetragen wurden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen die Mittelwerte der beiden Methoden. Die rot-gestrichelten Linien markieren die 95%-Übereinstimmungsgrenzen (mittlere Differenz $\pm 2 \times$ Standardabweichung), innerhalb derer 95% aller Messwerte liegen sollten. Idealerweise sollten die Punkte des Diagramms auf der blau-gestrichelten Linie (Differenz = 0) liegen. Die durchgezogene rote Linie markiert den tatsächlichen Mittelwert der Differenzen (*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*: -5,22; *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*: -3,96).

Des Weiteren wurden beide Testes von jeweils vier 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen histologisch untersucht und pro Tier die relative Anzahl der *Tubuli seminiferi* mit pachytäne Spermatozyten und/oder runden bzw. elongierten Spermatiden ermittelt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse aller

untersuchten Tiere ist in Tabelle 4-6 dargestellt. Pro untersuchtem Testis wurde jeweils eine Schnittebene analysiert. Die relative Zahl der *Tubuli* mit meiotischen Keimzellen ist bei *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Tabelle 4-6). Während bei 30,5 Tage alten *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen durchschnittlich 3,12% aller *Tubuli seminiferi* meiotische Keimzellen in Form von pachytänen Spermatozyten und/oder Spermatischen zeigten, war bei 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen im Durchschnitt in 12,03% der *Tubuli* meiotische Keimzellen präsent. Für die Quantifizierung der Keimzellen wurde von jedem Tier ein repräsentativer HE-gefärbter Testisschnitt eines jeden Testis ausgewählt und die Anzahl der pachytänen Spermatozyten und/oder Spermatischen ermittelt. Die durchschnittliche Keimzellzahl jeweils beider Hoden aller 30,5 Tage alten *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen ist in Tabelle 4-6 dargestellt. Während bei 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen durchschnittlich 660 Spermatozyten/Spermatischen in den Hoden präsent waren, war die durchschnittliche Keimzellzahl der gleichaltrigen *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäuse mit 123,25 Keimzellen deutlich reduziert. Der geringe Stichprobenumfang der analysierten Tiere und die Tatsache, dass von einem 30,5 Tage alten *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen nur ein Hoden für die Untersuchung zur Verfügung stand, ließen eine statistische Signifikanzprüfung der dargestellten Ergebnisse (Tabelle 4-6) nicht zu.

	Gesamtzahl aller <i>Tubuli seminiferi</i>	Anzahl der <i>Tubuli</i> mit Keimzellen	Prozentsatz der <i>Tubuli</i> mit Keimzellen	Anzahl aller vorhandenen Keimzellen
<i>TSPY- Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i> (n = 4)	317,5 ± 52,74	33,5 ± 45,1	12,03% ± 17,24	660 ± 874,76
<i>NMRI- Kit^{W-v}/Kit^{W-v}</i> (n = 4)	264,25 ± 56,93	8,25 ± 2,87	3,12% ± 0,91	123,25 ± 70,32

Tabelle 4-6: Histologische Keimzellanalyse der Hoden von jeweils vier 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Zusammenfassung der Einzelergebnisse aller untersuchten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Ausgewertet wurde jeweils eine Schnittebene beider Hoden. Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte aller Tiere und die entsprechenden Standardabweichungen ($X \pm s$). Dargestellt sind die Gesamtzahlen aller *Tubuli seminiferi* (jeweils beider Hoden pro Tier), die Anzahl der *Tubuli*, welche pachytäne Spermatozyten bzw. runde/elongierte Spermatischen aufwiesen, ihr relativer Anteil in Prozent zur Gesamttubulizahl und die Anzahl der gezählten Keimzellen in beiden Testes.

4.1.8 Expressionsnachweis des eukaryontischen Elongationsfaktors eEF1A in Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen

Kido und Lau (2008) wiesen eine funktionelle Interaktion des humanen TSPY mit dem eukaryontischen Translationselongationsfaktor eEF1A nach, durch welche in co-transfizierten HEK293-Zellen die Proteinsynthese eines Reportergens verstärkt wurde. Ein Nachweis des eEF1A1-Proteins in den Testes von je zwei 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen erfolgte in dieser Doktorarbeit mittels Immunhistochemie mit einem eEF1A1-Antikörper. Bei beiden Tieren wird eEF1A1 bevorzugt in Spermatogonien und primären Spermatozyten (wenn vorhanden) exprimiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kido und Lau wurden die peritubulären myoiden Zellen nicht mittels eEF1A1-Antikörpers immungefärbt. Das eEF1A1-Peptid ließ sich immunhistochemisch ausschließlich im Zytoplasma von Spermatogonien und Spermatozyten nachweisen. Allerdings zeigten pro Testisschnitt nur einige Gruppen von *Tubuli seminiferi* eEF1A1-positive Keimzellen. Ein Unterschied im Expressionsmuster zwischen *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Proben konnte rein visuell betrachtet nicht ermittelt werden (siehe Abbildung 4-13).

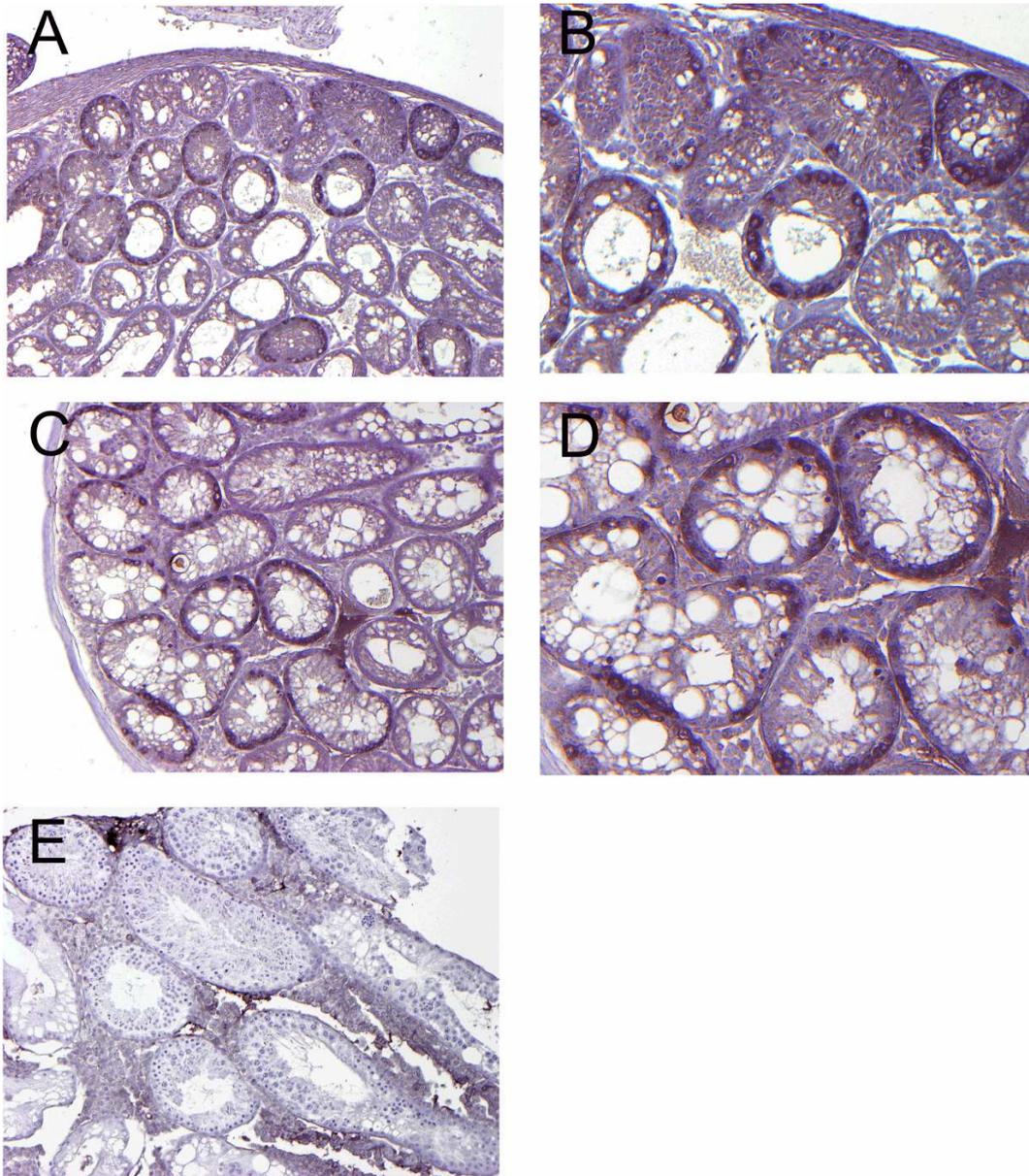


Abbildung 4-13: Immunhistochemischer Nachweis der eEF1A-Expression in Testes von 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen mittels Anti-EEF1A1-Antikörpers. Dargestellt sind Testes eines *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (A, 100x; B, 200x) und eines *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchens (C, 100x; D, 200x) jeweils im Alter von 30,5 dpp. Bei beiden Tieren ist eine zyttoplasmatische Färbung in den Spermatogonien und einigen primären Spermatozyten sichtbar. Die Negativkontrolle (E, 100x) wurde ohne Primärantikörper durchgeführt. Alle Schnitte sind mit Mayers Hämalaun gegengefärbt.

4.2 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose in *TSPY*-transgenen Embryonalstadien

Um zu untersuchen, ob der partielle *rescue* der Spermatogenese bei *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen durch einen proliferativen und/oder antiapoptotischen Effekt des humanen *TSPY* auf frühe testikuläre embryonale Keimzellen bedingt war, wurden verschiedene Embryonalstadien von Mäusen der *TSPY*-transgenen Linie *Tg(TSPY)9Jshm* und des Auszuchtstammes NMRI als Wildtypkontrolle generiert und 4% PFA fixierte Gesamtembryonen nach Paraffineinbettung immunhistochemisch mittels TUNEL-Assays und Caspase 3- und Ki67-Antikörper-Immundetektion untersucht. Die Embryonalstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc wurden bewusst gewählt, weil vorab Herr Prof. Dr. Leendert Looijenga, Department of Pathology, Erasmus MC-University Medical Center, Rotterdam, in testikulären embryonalen Keimzellen von 14,5 und 17,5 dpc alten *TSPY*-transgenen Embryonen eine starke Immundetektion des Proliferationsmarkers Ki67 gezeigt hat.

4.2.1 Genotypisierung der 14,5 und 17,5 dpc alten *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonalstadien

Die Genotypisierung der *TSPY*-transgenen Embryonen erfolgte mittels PCR mit *TSPY*-spezifischen Primern (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Zur Geschlechtsbestimmung der nicht transgenen Embryonen wurde eine PCR mit genomischer DNA und dem Primerpaar *mtspy2/mtspy7* durchgeführt (Vogel *et al.*, 1998). Dieses Primerpaar bindet spezifisch in Exon 2 und Exon 6 des murinen *Tsyp* und generiert bei männlichen Embryonen ein *Tsyp* spezifisches Produkt von 1421 bp (siehe Abbildung 4-14).

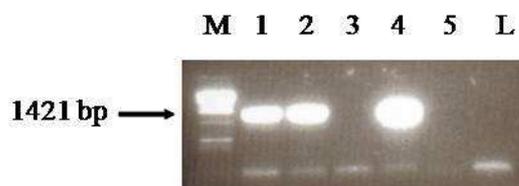


Abbildung 4-14: PCR-Analyse mit dem Primerpaar *mtspy2/mtspy7* aus DNA von fünf isolierten männlichen und weiblichen Embryonen (1-5). Die NMRI-Embryonen 1, 2 und 4 sind männlich und die Embryonen 3 und 5 weiblich. 1kb-Längenmarker (M), Leerwert (L).

4.2.2 Nachweis der *TSPY*-Expression im embryonalen Testis

Es wurden je fünf männliche *TSPY*-transgene und NMRI-Embryonen der Altersstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc mittels Proliferations- und Apoptosemarker untersucht. Die murinen Embryonalstadien wurden wie von Kotsiari (2005) beschrieben isoliert. Einige der untersuchten Präparate waren vorab von Alexandra Kotsiari (2005) im Rahmen einer biologischen Diplomarbeit isoliert und eingebettet worden. Als interne Kontrolle zur vorab durchgeführten Genotypisierung wurden immunhistochemische Färbungen an Maus-Gesamtembryonen mit dem humanen Antiserum 837/3 (Schnieder *et al.*, 1996) durchgeführt. Paraffinschnitte von je fünf *TSPY*-transgenen und NMRI-Wildtyp-Embryonen der Embryonalstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc wurden unter Anwendung einer Modifikation des ABC-Peroxidaseprotokolls von Davidoff und Schulze (1990) mit dem Antiserum 837/3 immungefärbt.

TSPY wurde spezifisch in Gonozyten und Präspmatogonien in Testes von *TSPY*-transgenen Embryonen der Embryonalstadien 14,5 (Abbildung 4-15 C und E) und 17,5 dpc (Abbildung 4-16 C und E) immunhistochemisch nachgewiesen, während die Testes der untersuchten gleichaltrigen NMRI Embryonen (siehe Abbildungen 4-15 D und 4-16 D) keine spezifische *TSPY*-Immunfärbung zeigten. Der Hauptanteil des transgenen Proteins war zytoplasmatisch in Gonozyten der Testisanlagen detektierbar. Die mit dem humanen *TSPY*-Peptid (Skawran, 2002) geblockten Kontrollschnitte zeigten keine spezifische Immunfärbung, was die Spezifität des *TSPY*-Antiserums in den transgenen Embryonen verdeutlicht (siehe Abbildungen 4-15 F und 4-16 F).

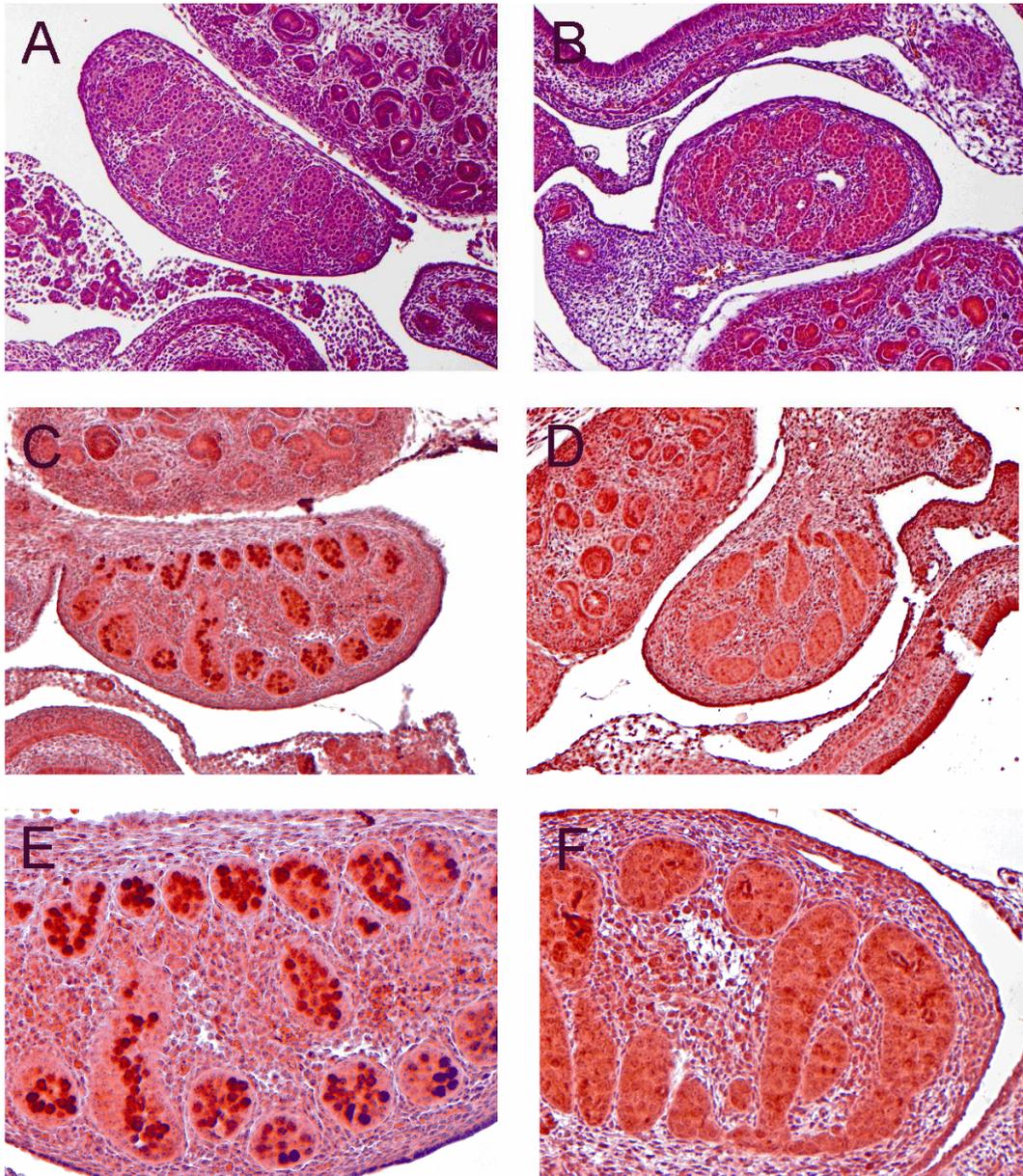


Abbildung 4-15: Immunhistochemischer Nachweis der *TSPY*-Expression im embryonalen Testis eines 14,5 Tage alten *TSPY*-transgenen und eines 14,5 Tage alten nicht transgenen Embryos. HE-Übersichtsfärbungen der Testes eines 14,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (A) und eines nicht transgenen (B) NMRI-Embryos, jeweils in 100-facher Vergrößerung dargestellt. Die mit dem 837/3-Antiserum gefärbten Schnitte der entsprechenden *TSPY*-transgenen (C) und nicht transgenen (D) Testisanlagen (in 100-facher Vergrößerung), sowie in (E) eine 200-fache Vergrößerung des *TSPY* immungefärbten transgenen Testis. (F) Hodengewebschnitt eines 14,5 dpc alten *TSPY*-transgenen Embryos, bei dem das Antiserum 837/3 mit einem GST-*TSPY*-Fusionspeptid (Skawran, 2002) geblockt wurde, in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Alle Schnitte wurden mit HE gegengefärbt.

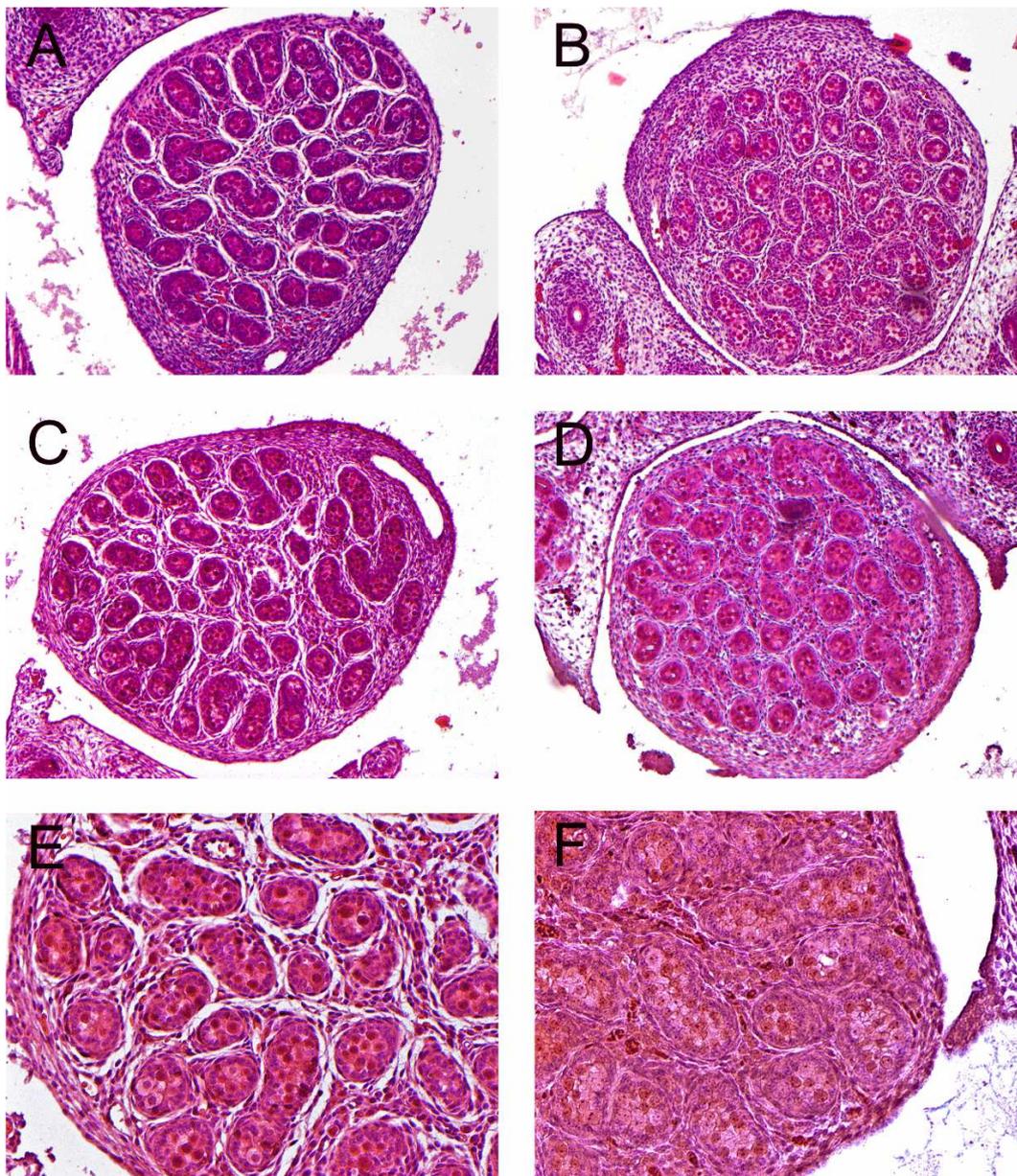


Abbildung 4-16: Immunhistochemischer Nachweis der *TSPY*-Expression in der Testisanlage eines 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen Embryos und eines 17, 5 Tage alten NMRI-Embryos. HE-Übersichtsfärbungen der Testes eines 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (A) und eines nicht transgenen (B) Embryos, in jeweils 100-facher Vergrößerung dargestellt. Die mit dem 837/3-Antiserum immungefärbten Schnitte der entsprechenden *TSPY*-transgenen (C) und nicht transgenen (D) Testisanlagen (jeweils 100-fache Vergrößerung), sowie in (E) eine 200-fache Vergrößerung des *TSPY*-immungefärbten *TSPY*-transgenen embryonalen Testis. Als Negativkontrolle (F) wurde das mit dem GST-*TSPY*-Fusionspeptid (Skawran, 2002) geblockte Antiserum auf dem transgenen Embryo eingesetzt (200-fache Vergrößerung). Die Gegenfärbungen in C-F erfolgten nach der HE-Methode.

4.2.3 TUNEL, Caspase 3 und Ki-67-Immunfärbungen in *TSPY*-transgenen Embryonen der Altersstadien 14,5 und 17,5 dpc

Paraffinschnitte von fünf männlichen NMRI-Embryonen und fünf männlichen Embryonen der Linie *Tg(TSPY)9Jshm* der Embryonalstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc wurden mittels TUNEL-Assays und Caspase 3-Immunhistochemie auf apoptotische Keimzellen in den embryonalen Testes untersucht und die keimzellspezifische Proliferation über Ki67-Immundetektion ermittelt. Pro Tier wurde immer nur ein embryonaler Testis analysiert und pro Testis und Genotyp eine Testisebene untersucht. Pro Embryo wurde anschließend das Verhältnis aller testikulärer Keimzellen zu apoptotischen bzw. Ki67 positiven Keimzellen ermittelt (Hussein, 2005; Tabellen 4-7 und 4-8)

In 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen und nicht transgenen embryonalen Testes wurden durchschnittlich mehr proliferierende Keimzellen beobachtet als bei 14,5 Tage alten embryonalen Hoden (Tabelle 4-7). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der relativen Anzahl Ki67 positiver Keimzellen bei *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonen der Embryonalstadien 14,5 und 17,5 dpc nachgewiesen (14,5 dpc: $P = 0,602$, 17,5 dpc: $P = 0,754$, Mann-Whitney-Test, siehe Abbildung 4-17 und Tabelle 4-7).

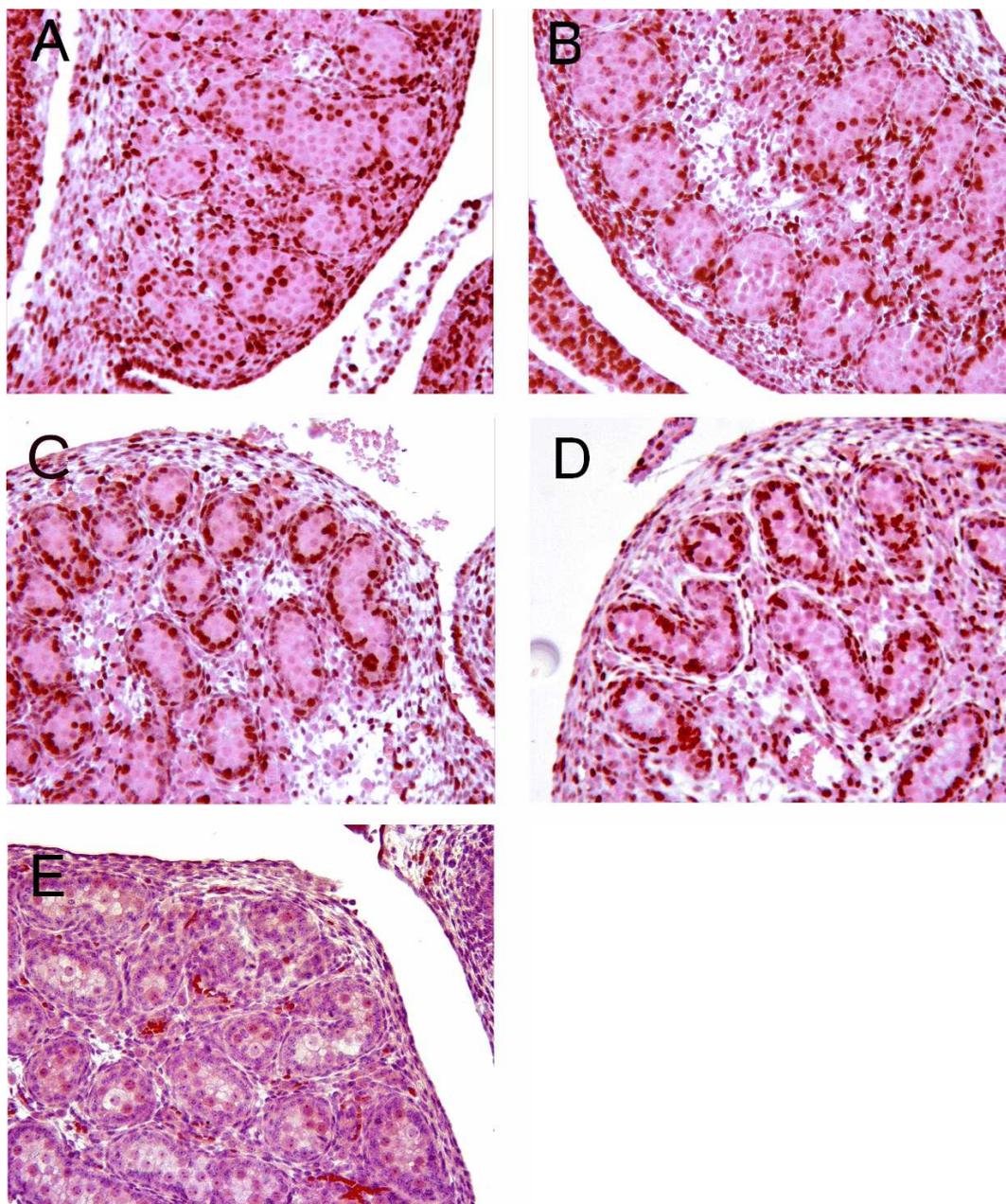


Abbildung 4-17: Immunhistochemischer Nachweis proliferierender Keimzellen in nicht transgenen und *TSPY*-transgenen Testes von 14,5 und 17,5 Tage alten Embryonen mittels Ki67-Immundetektion. Ki67-IHC eines 14,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (A) und eines gleichaltrigen nicht transgenen (B) embryonalen Testis, sowie eines 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (C) und eines gleichaltrigen nicht transgenen embryonalen Hodens (D). Als Negativkontrolle (E) diente ein ohne Primärantikörper gefärbter *TSPY*-transgener embryonaler Testis. Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Aufnahme aller Schnitte in 200-facher Vergrößerung.

	14,5 dpc	17,5 dpc
<i>TSPY</i>	24,60% ± 9,62 (n = 5)	39,08% ± 5,82 (n = 5)
NMRI	28,14% ± 5,28 (n = 5)	38,30% ± 9,90 (n = 5)

Tabelle 4-7: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Anteile proliferierender Keimzellen in Prozent in transgenen (*TSPY*) und nicht transgenen (NMRI) embryonalen Testes der Altersstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc. Es wurden je fünf Tiere untersucht. Es existieren keine signifikanten Unterschiede bei der relativen Anzahl Ki67-positiver Keimzellen zwischen *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonen der Embryonalstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc ($P > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

Im zeitlichen Verlauf betrachtet ist die testisspezifische Apoptoserate bei 14,5 Tage alten Embryonen unabhängig vom Genotyp im Vergleich zu 17,5 Tage alten Embryonen erhöht. Bei 14,5 und 17,5 Tage alten embryonalen Testes wurden mittels TUNEL-Assays (Tabelle 4-8, Abbildung 4-18) und Caspase 3-Antikörperdetektion (Tabelle 4-8 und Abbildung 4-19) keine signifikanten Unterschiede in der testikulären Apoptoserate bei *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonen detektiert.

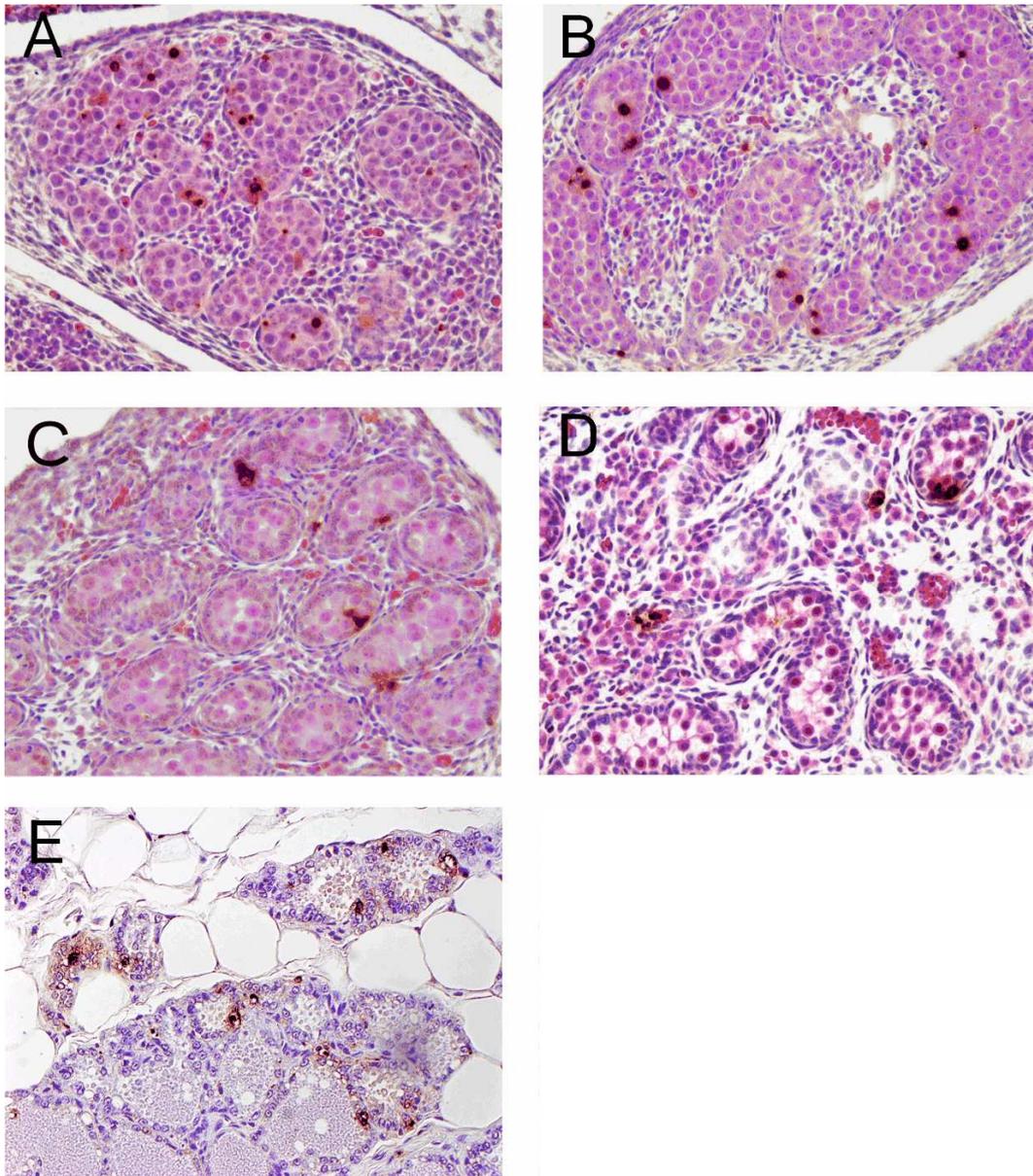


Abbildung 4-18: Immunhistochemische Detektion apoptotischer Keimzellen mittels TUNEL-Assays in transgenen und nicht transgenen Testes von 14,5 und 17,5 Tage alten Embryonen. Über die TUNEL-Methode angefärbte Schnitte eines 14,5 Tage alten transgenen (A) und eines gleichaltrigen nicht transgenen (B) Embryos, sowie eines 17,5 Tage alten transgenen (C) und eines gleichaltrigen nicht transgenen Embryos (D). Für die Positivkontrolle (E) wurde das im Kit mitgelieferte Rattenbrustdrüsengewebe angefärbt. Die Gegenfärbungen aller Präparate erfolgten nach der HE-Methode (alle 200-fache Vergrößerung).

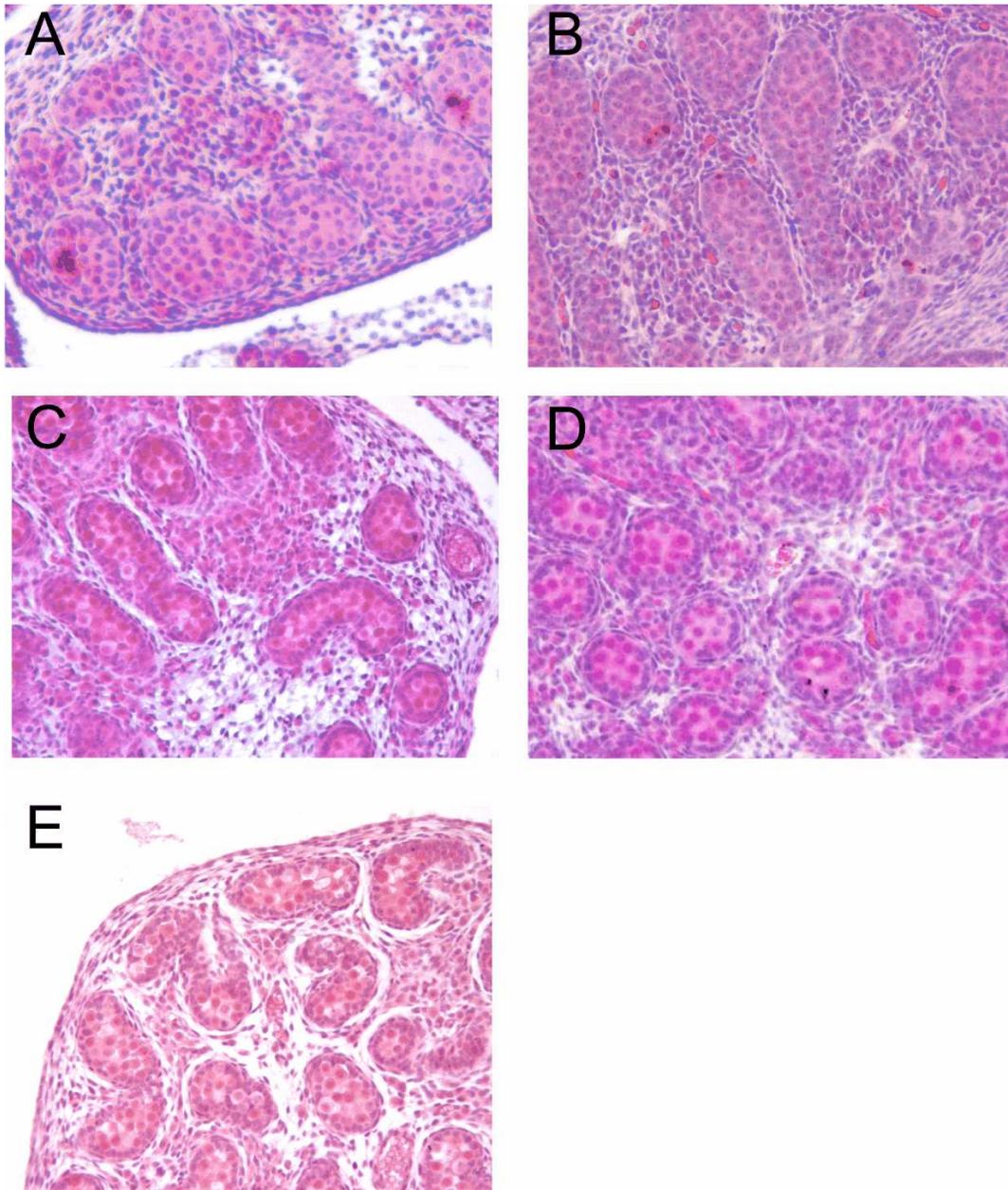


Abbildung 4-19: Immunhistochemischer Nachweis apoptotischer Keimzellen in nicht transgenen und *TSPY*-transgenen embryonalen Testes von 14,5 und 17,5 Tage alten Embryonen mittels Caspase 3-Antikörpers. Caspase 3 immungefärbte und mittels HE gegengefärbte embryonale Testesschnitte einer 14,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (A) und einer gleichaltrigen nicht transgenen (B) Maus , sowie eines 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen (C) und eines gleichaltrigen nicht transgenen embryonalen Hodens (D). Für die Negativkontrolle (E) wurde der Caspase 3-Primärantikörper mit dem aktivierte-Caspase 3-Protein geblockt. Alle Schnitte wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

	14,5 dpc		17,5 dpc	
	Caspase 3	TUNEL	Caspase 3	TUNEL
<i>TSPY</i>	1,35% ± 1,24 (n = 5)	3,09% ± 2,66 (n = 5)	0,09% ± 0,14 (n = 5)	0,78% ± 0,36 (n = 5)
<i>NMRI</i>	0,42% ± 0,45 (n = 5)	1,55% ± 0,93 (n = 5)	0,10% ± 0,06 (n = 5)	0,43% ± 0,26 (n = 5)

Tabelle 4-8: Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Anteile apoptotischer tubulärer Zellen in transgenen (*TSPY*) und nicht transgenen (*NMRI*) embryonalen Testes der Altersstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc detektiert mittels Caspase 3- und TUNEL-Methode. Untersucht wurden jeweils fünf Tiere. Die ermittelten Werte von transgenen und nicht transgenen Tieren unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander (14,5 dpc: $P = 0,602$, 17,5 dpc: $P = 0,076$ für TUNEL-Assay und 14,5 dpc: $P = 0,117$, 17,5 dpc: $P = 0,296$ für Caspase 3 Detektion, Mann-Whitney-Test).

Wie in Abschnitt 4.1.7 wurde auch hier eine Übereinstimmungsprüfung der beiden Apoptosedetektionsmethoden Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assay mittels Spearman'scher Rangkorrelation und Bland-Altman-Plots (Bland und Altman, 1986, 2003) durchgeführt. Die zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ergibt für *TSPY*-Embryonen eine gute Korrelation der beiden eingesetzten Apoptosedetektionsmethoden ($r = 0,72$ bei $P < 0,025$), während die mittels Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assays erzielten Ergebnisse für *NMRI*-Embryonen nach Spearman nicht signifikant korrelieren ($r = 0,27$ bei $P > 0,025$). Nach Bland-Altman-Analyse (Abbildungen 4-20 A und B) werden auch in 14,5 und 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen und *NMRI*-Embryonen über TUNEL-Methode und aktivierte Caspase 3-Immundefektion unterschiedlich große Apoptosewerte gemessen. Der Mittelwert der Messwertdifferenzen (*TSPY*-Embryonen: -1,216; *NMRI*-Embryonen: -0,728) ist auch hier durch die höheren TUNEL-Messwerte nach unten verschoben. Die Diagramme verdeutlichen auch hier, dass die Messunterschiede bei steigenden Messwerten zunehmen.

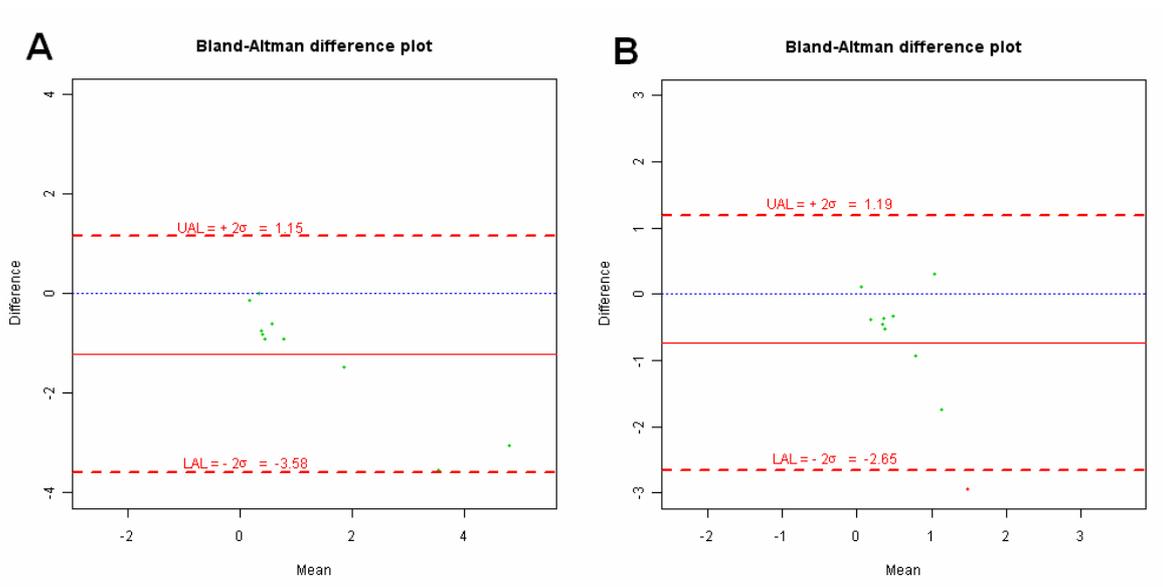


Abbildung 4-20: Bland-Altman-Punktdiagramme zum Vergleich der TUNEL- und Caspase-3-Messwerte der TSPY- (A) und NMRI-Embryonen (B) der Stadien 14,5 dpc und 17,5 dpc. Aufgetragen wurden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen die Mittelwerte der beiden Methoden. Die 95%-Übereinstimmungsgrenzen (mittlere Differenz $\pm 2 \times$ Standardabweichung) sind durch rot-gestrichelten Linien markiert. Die Differenz-Nulllinie ist blau-gestrichelt dargestellt. Die durchgezogene rote Linie markiert den tatsächlichen Mittelwert der Differenzen (TSPY-Embryonen: -1,216; NMRI-Embryonen: -0,728).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zur Funktion des humanen TSPY im embryonalen sowie im Kit-defizienten transgenen Maustestis durchgeführt. Während in den meisten der bisher veröffentlichten Arbeiten zur Aufklärung der Funktionen von TSPY verschiedene transient mit *TSPY* transfizierte Zellkultursysteme (HeLa, HEK293, COS7) eingesetzt wurden (Oram *et al.*, 2006; Kido und Lau, 2008; Li und Lau, 2008), wurde in dieser Arbeit ein *TSPY*-transgenes Mausmodell genutzt, um die Funktion von TSPY *in vivo* zu untersuchen.

Bisher stützen sich die Vermutungen über eine proliferative und/oder anti-apoptotische Funktion von TSPY auf eine Reihe von Beobachtungen. Zum einen entsprechen die Topologie und der zeitliche Verlauf der testikulären *TSPY*-Expression (Schnieders *et al.*, 1996) dem Muster der spermatogonialen Teilungsaktivität. Weiterhin deuten auch die starke *TSPY*-Expression im malignen testikulärem Seminom und seinem Vorläuferstadium, dem Carcinoma *in situ*, auf eine mögliche Funktion von TSPY als Proliferationsfaktor hin (siehe Abschnitt 1.3.4). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine ektopische *TSPY*-Expression in transient transfizierten HeLa-Zellen die Zellproliferation durch einen schnelleren G₂/M-Übergang beschleunigt und dabei indirekt Zellwachstum fördernde Gene hochreguliert werden, während Apoptose-fördernde Gene und Zellzyklusinhibitoren in ihrer Expression reprimiert werden (Oram *et al.*, 2006). Li und Lau (2008) wiesen kürzlich nach, dass TSPY *in vitro* Cyclin B1 bindet und die Kinaseaktivität des Cyclin B1/CDK1-Komplexes, welcher entscheidend auf die G₂/M-Transition des Zellzyklus einwirkt, zu stimulieren vermag. Kido und Lau (2008) haben ebenfalls über die *Yeast-Two-Hybrid*-Methode den Translationselongationsfaktor eEF1A als möglichen Bindungspartner von TSPY identifiziert und damit eine weitere Möglichkeit offenbart, wie TSPY eine proliferative oder anti-apoptotische Funktion ausüben könnte.

Mit der *TSPY*-transgenen Mauslinie *Tg(TSPY)9Jshm* haben Schubert *et al.* (2003) ein *in vivo*-Modell generiert, um die Funktion von TSPY näher zu untersuchen.

5.1 Untersuchungen zur Spermatogenese in der *TSPY*-transgenen *Kit*-defizienten Mauslinie *TSPY*-*C57BL/6J-Kit^{W-v}/J*

Die von Schubert (2001) generierte *TSPY*-transgene Mauslinie *Tg(TSPY)9Jsh* besitzt 40-50 Kopien des humanen Transgens auf dem distalen murinen Yq und entspricht damit in der genomischen Organisation weitestgehend der humanen Situation. Ebenso entsprechen das gewebespezifische und zellspezifische Expressionsmuster und die Topologie der testikulären Expression des Transgens nahezu dem humanen Muster. Das Spleißverhalten innerhalb des transgenen Testis folgt überwiegend dem Muster des humanen prädominierenden Transkripts *TSPY^{major}*, und das transgene Protein liegt im transgenen Testis wie beim Menschen als 38,5 kDa-Phosphoprotein vor (Schubert, 2001; Schubert *et al.*, 2003). Diese Übereinstimmungen deuten trotz der evolutionären Degeneration des murinen *Tspy* auf eine Konservierung wichtiger Faktoren der *TSPY*-Genregulierung zwischen Mensch und Maus hin. Vermutlich konkurriert das transgene Protein unter normalen physiologischen Bedingungen sogar mit dem bisher nicht identifizierten murinen Homolog, das im Laufe der murinen Evolution eine *TSPY*-analoge Funktion im Maustestis übernommen hat, um die gleichen Interaktionspartner, denn unter normalen physiologischen Bedingungen weist diese *TSPY*-transgene Mauslinie keinen sichtbaren transgenen Phänotyp auf (Schubert *et al.*, 2003). Schubert *et al.* (2003) postulierten, dass der transgene Phänotyp sich erst unter suboptimalen Spermatogenesebedingungen offenbaren könnte. Voruntersuchungen von Hussein (2005) an kryptorchiden *Insl3*-defizienten *TSPY*-transgenen Mäusen haben bereits gezeigt, dass *TSPY* im kryptorchiden Hoden in einem zeitlich sehr begrenzten Fenster eine proliferative und/oder anti-apoptotische Wirkung auf die frühen Keimzellen ausübt. Dieser erstmals beschriebene phänotypische Effekt des humanen *TSPY*-Transgens lässt vermuten, dass in der Linie *Tg(TSPY)9Jsh* das *hTSPY*-Transgen nach dem menschlichen Muster agiert, obwohl im Laufe der Evolution das murine Ortholog bei Spezies des Subgenus *Mus* degeneriert ist (Mazeyrat und Mitchell, 1998; Schubert *et al.*, 2000a, b; Vogel *et al.*, 1998a).

Um zu untersuchen, ob *TSPY* einen proliferativen und/oder anti-apoptotischen Effekt auf die Spermatogonien ausübt, wurden in der vorliegenden Arbeit spermatogenesedefiziente *TSPY*-transgene *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und als Kontrollen nicht transgene NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen generiert und die Testes verschiedener postnataler Altersstadien

histologisch und immunhistochemisch auf einen proliferativen oder anti-apoptotischen Effekt des humanen Transgens hin untersucht.

Durch eine Missense-Mutation (c.C2007T, p.Thr660Met) in der zytoplasmatischen Region des Tyrosinkinase-Rezeptors Kit und die dadurch beeinträchtigte Rezeptoraktivität werden die Proliferation und Migration der primordialen Keimzellen (PGCs) homozygoter Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Männchen inhibiert, was zu drastisch reduzierten Zahlen primordialer Keimzellen in den Genitalleisten und damit zu Infertilität führt (Russell, 1979; Chabot *et al.*, 1988; Geissler *et al.*, 1988; Dolci *et al.*, 1991). Zur Generierung der in dieser Arbeit untersuchten transgenen Kit-defizienten Mäuse wurden zwei Mausstämmen gekreuzt: Kit-defiziente C57BL/6J-Tiere und transgene NMRI-Mäuse. Um einem möglichen Einfluss des genetischen NMRI-Hintergrundes auf die Auswirkung des TSPY-Transgens in den $TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}$ -Männchen Rechnung zu tragen, wurden außerdem als Kontrollen NMRI- Kit^{W-v}/Kit^{W-v} -Mäuse generiert. Der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Phänotyp einer Mutation oder eines Transgens in Mausstämmen wurde bereits mehrfach beobachtet (Coleman und Hummel, 1973; Hummel *et al.*, 1972; Jinnah *et al.* 1999; Moser *et al.*, 1992; Rozmahel *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 2008; Takagi *et al.* 1992; Threadgill *et al.*, 1995; Upadhyya *et al.*, 1999). Genetische Modulatoren können die Expression des transgenen oder mutierten Gens über zahlreiche Mechanismen verändern, z.B. Expressionssuppression oder -verstärkung, Veränderung der DNA-Transkriptionsrate oder mRNA-Stabilität, epigenetische Effekte, welche Veränderungen in der DNA-Methylierung oder Chromatinstruktur bewirken (Erickson, 1996) und damit durchaus Einfluss auf den Phänotyp nehmen.

Der Nachweis des humanen TSPY in den Testes von $TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}$ -Männchen (siehe Abschnitt 4.1.6) erfolgte über Immunhistochemie mit den drei TSPY-Antisera 837/3 (Schnieders *et al.*, 1996), Klon #2 und Klon #7 (Kido und Lau, 2005). Während die Antisera 837/3 und Klon #2 die N-terminalen Aminosäuren 1-149 (Dechend, 2000) bzw. 1-150 erkennen (Kido und Lau, 2005), nutzt der Klon #7 die C-terminalen Aminosäuren 151-308 des TSPY-Proteins als Epitop. Kido und Lau (2005) konnten mit Klon #7 neben der für 837/3 und Klon #2 typischen spermatogonialen und spermatozytären Färbung auch eine starke Markierung runder Spermatozoen detektieren. Es ist denkbar, dass über den Klon #7 auch TSPY-Isoformen spezifisch in runden Spermatozoen nachgewiesen werden, die durch die alternativ gespleißten Transkripte Exon1A, Exon1B und Exon 1C generiert werden, denen große Teilbereiche des N-Terminus von TSPY fehlen (Kido und Lau, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte TSPY mit allen drei Antisera spezifisch in den

Keimzellen der *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes detektiert werden, während in *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testes keine spezifische TSPY-Immunfärbung auftrat und die mit einem GST-Fusionspeptid (Skawran, 2002) geblockten Negativkontrollen keine spezifischen Keimzellfärbungen zeigten (siehe Abschnitt 4.1.6). In den Testes der analysierten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen wurde TSPY abundant in Spermatogonien und primären Spermatozyten immunhistochemisch nachgewiesen und bei dem Einsatz von Klon #2 auch eine schwache TSPY-Immunfärbung in runden Spermatiden detektiert (siehe Abschnitt 4.1.6, Abbildung 4-7). Das mit dem Antiserum 837/3 und dem Klon #2 nachgewiesene transgene Expressionsmuster entspricht damit exakt dem menschlichen Muster (Schnieders *et al.*, 1996; Kido und Lau, 2008). Wider Erwarten konnte TSPY allerdings nicht mit Klon #7 in runden Spermatiden dargestellt werden (siehe Abbildung 4-8; vgl. Abschnitt 1.3.1 und Kido und Lau, 2005). Die zelluläre Topologie der TSPY-Expression im *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Testis entspricht damit nur in Teilbereichen dem menschlichen Expressionsmuster und dem testikulären Expressionsmuster der Linie *Tg(TSPY)9Jshn* (Schubert *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass in den Testes der *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen keine TSPY-Transkripte nach dem Muster von Exon1A, 1B und 1C gespleißt werden. Weitere Untersuchungen zum Spleißverhalten von TSPY in Testes von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen sind erforderlich, um das putative aberrante Spleißverhalten des humanen Transgens zu sichern. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Yun-Fai Chris Lau hatte vorab mittels immunhistochemischer Untersuchungen schon gezeigt, dass TSPY in Testes der Linie *Tg(TSPY)9Jshn* mittels Klon #7-Immundetektion u.a. auch in runden Spermatiden nachgewiesen wird (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Yun-Fai Chris Lau).

Bei der histologischen Analyse der Hoden verschiedener adulter *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* Männchen (siehe Abschnitt 4.1.3) waren bei *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Männchen signifikant mehr *Tubuli seminiferi* mit meiotischen Keimzellen präsent als bei *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Bei der histologischen Analyse der Nebenhoden war die Anzahl der *TSPY*-transgenen Mäuse mit Spermien in den Nebenhoden hochsignifikant erhöht im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrollen (siehe Tabelle 4.2). Weil bei der histologischen Untersuchung der Nebenhoden nur Teilbereiche (Kopf, Körper oder Schwanz) derselben von jedem Tier analysiert wurden, ist es nicht auszuschließen, dass als Spermien-negativ klassifizierte Tiere durchaus in nicht betrachteten Bereichen der Nebenhoden noch Spermien aufwiesen. Dieser Sachverhalt müsste durch detailliertere histologische Untersuchungen noch abgeklärt werden.

Fertilität nach einer Verpaarungszeit von mindesten drei Monaten war allerdings bei 14,28% aller verpaarten *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen und bei keinem verpaarten NMRI-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen aufgetreten (siehe Abschnitt 4.1.4). Insgesamt ist der partielle *rescue* des Kit-defizienten testikulären Phänotyps bei *TSPY*-transgenen Mäusen stark vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig. Allein der genetische Hintergrund des Auszuchtstammes NMRI reicht aus, um bei NMRI-C57BL/6J-*Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* hybriden Mäusen einen partiellen *rescue* der Spermatogenese zu induzieren. Ähnliche Erfahrungen wurden auch von Schubert *et al.* (2008) bei der Analyse von androgen-insensitiven *TSPY-Ar^{Tfm}*- und NMRI-*Ar^{Tfm}*-Mäusen gemacht. Schubert *et al.* (2008) verglichen die testikuläre Histologie von transgenen, androgeninsensitiven *TSPY-Ar^{Tfm}*-hybriden Männchen mit der von gleichaltrigen NMRI-*Ar^{Tfm}*- und *Ar^{Tfm}*-Männchen und detektierten testikuläre Leydigzelltumore in den Testes von *TSPY-Ar^{Tfm}*- (10,9%) und in NMRI-*Ar^{Tfm}*-Mäusen (9,7%), jedoch in keinem der untersuchten *Ar^{Tfm}*-Männchen. Da Leydigzelltumore in *Ar^{Tfm}*-Mäusen normalerweise mit einer Inzidenz von 1,8% auftreten (Chung, 1980), führten Schubert *et al.* (2008) die erhöhte Tumorzinzidenz bei *TSPY-Ar^{Tfm}* und NMRI-*Ar^{Tfm}*-Männchen auf einen starken Effekt des NMRI-Hintergrundes zurück. Um zu untersuchen, ob die Expression des humanen Transgens durch eine komplette Androgeninsensitivität beeinflusst wird, verglichen Schubert *et al.* (2008) die *TSPY*-Expression von transgenen Männchen der Linie *Tg(TSPY)9Jshn* mit der von *TSPY-Ar^{Tfm}*-Hybriden und detektierten eine zweifach erhöhte *TSPY*-Expression in drei von fünf analysierten androgen-insensitiven *TSPY-Ar^{Tfm}*-Männchen. Schubert *et al.* (2008) führten auch die variable Transgentranskription auf die genetische Heterogenität der untersuchten *TSPY-Ar^{Tfm}*-Mäuse zurück. Aufgrund dieser Befunde sollten für weiterführende Untersuchungen *TSPY*-transgene Mäuse auf einem C57BL/6J-Hintergrund generiert werden, um den Effekt des NMRI-Hintergrundes in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* auszuschließen. Untersuchungen an der Linie L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* haben gezeigt, dass der beobachtete partielle Spermatogenese- und Fertilitätsrescue bei Kit-defizienten *TSPY*-transgenen Mäusen mit reduzierter Penetranz auf die männlichen Kit-defizienten Nachkommen übertragen wird (siehe Abschnitt 4.1.5). Während z.B. 47,06% aller untersuchten L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Tiere (n = 17) Spermien in ihren Nebenhoden zeigten, konnten lediglich 7,69% aller verpaarten männlichen L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäuse einen Wurf generieren. Auch die Untersuchungen an der Linie L2-*TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}* verdeutlichen, dass die beobachteten Effekte stark vom genetischen Hintergrund der analysierten Mäuse abhängig sind.

Der Spermatogeneserescue bei *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen könnte einerseits durch eine verstärkte Proliferation oder andererseits durch eine reduzierte Apoptose differenzierter Typ A Spermatogonien zurückzuführen sein. Innerhalb des Maustestis ist das Kit/SCF-System für das Überleben und die Proliferation der differenzierten Typ A Spermatogonien von entscheidender Bedeutung (Ohta *et al.*, 2000). *TSPY* wird abundant in Spermatogonien exprimiert (Schnieders *et al.*, 1996), der genaue *TSPY*-exprimierende spermatogoniale Typ ist derzeit noch nicht bekannt. Dass *TSPY* die Proliferation von Zellen stimulieren kann, wurde bereits durch die *in-vitro*-Untersuchungen von Oram *et al.* (2006) an mit *TSPY* transfizierten HeLa-Zellen gezeigt. Zudem hatte auch Hussein (2005) in der transgenen kryptorchiden *TSPY-Ins13^{-/-}*-Mauslinie eine Apoptose-inhibierende Wirkung des humanen *TSPY* auf Spermatogonien und primäre Spermatozyten nachgewiesen und einen proliferativen Einfluss des Transgens auf die Spermatogonien postuliert.

Ein großer Teil der Spermatogonien homozygoter *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen entwickelt sich nicht und geht in die Apoptose über. Es wird angenommen, dass sowohl Fas als auch p53 synergistisch an der Auslösung des spermatogonialen Keimzelltodes bei Kit-defizienten Mäusen beteiligt sind (Ohta *et al.*, 2003; Sakata *et al.*, 2003). Unter physiologischen Bedingungen reprimiert das Kit/SCF-System die Fas-vermittelte Apoptose durch Herunterregulierung der Fas-Expression in den Gonaden. Es ist denkbar, dass der Spermatogeneserescue der *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäuse durch einen Apoptose-protectiven Effekt von *TSPY* auf die Spermatogonien im Testis bedingt ist. Es wird derzeit postuliert, dass das Kit/SCF-System die *Fas*-Expression über den Rapamycin-sensitive PI3-K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalweg reguliert (Sakata *et al.*, 2003) und es ist denkbar, dass *TSPY* genau über diesen Signalweg die *Fas*-Expression in differenzierten Typ A Spermatogonien reprimiert und damit die Apoptose der differenzierten Typ A Spermatogonien inhibiert. Der Rapamycin-sensitive PI3-K/AKT/mTOR/p70S6K-Signalweg wird von dem Kit/SCF-System auch genutzt, um die Proliferation der differenzierten Typ A Spermatogonien zu stimulieren (Feng *et al.*, 2000). Ob *TSPY* über einen Teil dieses Kit-Signalweges über einen Phosphorylierungsmechanismus auch auf die Proliferation von Spermatogonien Einfluss nimmt, bleibt zu evaluieren. Um zu untersuchen, ob der partielle *rescue* der Spermatogenese und Fertilität bei *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Männchen auf einen anti-apoptotischen und/oder proliferativen Effekt des humanen *TSPY*-Transgens auf die Spermatogonien zurückzuführen ist, wurden die Proliferations- und Apoptoseraten in Testes von 4,5 dpp, 15,5 dpp und 30,5 dpp alten

TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}-Männchen ermittelt (siehe Abschnitt 4.1.7). Das Stadium 4,5 dpp wurde gewählt, da bei der Maus ab dem 5. Tag der postnatalen Entwicklung *c-kit*-exprimierende differenzierte Typ A Spermatogonien im Testis vorliegen. Die Auswahl fiel weiterhin auf die Stadien 15,5 und 30,5 dpp, da bei diesen Altersstadien bei *TSPY*-transgenen kryptorchiden *Ins13*-defizienten Mäusen eine höhere testikuläre Keimzellzahl (Stadium 15,5 dpp) bzw. ein Apoptose-protektiver Effekt des humanen Transgens auf die Spermatogonien und primären Spermatozyten (Stadium 30,5 dpp) gezeigt werden konnte (Hussein, 2005; Schubert persönliche Mitteilung). Das Stadium 15,5 dpp wurde auch bewusst gewählt, weil während der postnatalen Mausentwicklung die Typ A Stammspermatogonien am Tag 6 zu proliferieren beginnen (Mc Lean *et al.*, 2003) und am Tag 15,5 der postnatalen Mausentwicklung bereits die erste meiotische Reifeteilung bis zu den pachytänen Spermatozyten abgeschlossen ist (Bellvé *et al.*, 1977) und *TSPY* zudem abundant in Spermatogonien und primären Spermatozyten exprimiert wird (Schnieders *et al.*, 1996). Haploide Spermatiden treten das erste Mal am Tag 20 der postnatalen Mausentwicklung in Erscheinung (Bellvé *et al.*, 1977). Weil *TSPY* in *TSPY*-transgenen Mäusen der Linie *Tg(TSPY)9Jshm* und beim Menschen auch in runden Spermatiden exprimiert wird (Kido und Lau, 2005; Lau, persönliche Mitteilung) und *in vitro* eine Bindung von *TSPY* an Histon 2B gezeigt wurde und derzeit eine mögliche Funktion von *TSPY* als Chaperon bei der Spermio-genese postuliert wird (Kido und Lau, 2006), wurde u.a. auch das postnatale Alterstadium 30,5 dpp in die Apoptoseanalyse mit einbezogen.

Bei der Maus treten pränatal und postnatal zwei keimzellspezifische Apoptosewellen auf (Wang *et al.*, 1998). Die erste Welle setzt, kurz nachdem die primordialen Keimzellen in die frühe Testisanalge migriert sind, am Tag 13 dpc ein und endet am 17. Tag der Embryonalentwicklung (Suzuki *et al.*, 2008). Die Apoptoserate der Keimzellen fällt von Tag 14 dpc bis 17 dpc stetig ab und ist zum Zeitpunkt der Geburt niedrig, um mit Beginn der Spermatogonienproliferation beim Einsetzen der ersten Spermatogenesewelle einen zweiten Apoptosepeak an Tag 10 dpp bis 13 dpp zu erreichen (Wang *et al.*, 1998). Die Proliferations- und Apoptoseraten der untersuchten 4,5, 15,5 und 30,5 Tage alten *TSPY*-transgenen *Kit*-defizienten Mäuse unterschieden sich nicht signifikant von denen der gleichaltrigen Kontrollen (siehe Abschnitt 4.1.7), obwohl bei der histologischen Analyse der Testes von 30,5 Tage alten Mäusen (siehe Tabelle 4-6) die Zahl der *Tubuli seminiferi* mit pachytänen Spermatozyten und Spermatiden und die testikuläre Keimzellzahl deutlich im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht waren. Es ist nun denkbar, dass *TSPY* im *Kit*-

defizienten Testis die Proliferation und/oder Apoptose der differenzierten Typ A Spermatogonien nicht nennenswert beeinflusst und dass der beobachtete Spermatogenese- und Fertilitätsrescue bei *TSPY*-transgenen Kit-defizienten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen (Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4) nicht durch einen deutlichen Effekt des Transgens in der präpubertären und pubertären Mausentwicklung zurückzuführen ist, sondern dass das humane *TSPY*-Transgen bereits früher in der Keimzellentwicklung einen proliferativen und/oder anti-apoptotischen Effekt auf die frühen Keimzellen ausübt. In der Maus ist das Kit/SCF-System auch für die Migration, das Überleben und Proliferation der primordialen Keimzellen in die indifferente Gonadenanlage von entscheidender Bedeutung (Ohta *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008; Runyan *et al.*, 2006), und es ist möglich, dass das humane *TSPY*-Transgen gerade in diesen frühen Keimzellen seine protektive und/oder proliferative Wirkung entfaltet und dadurch mehr primordiale Keimzellen in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Embryonen die Testisanlagen erreichen.

TSPY könnte die Spermatogenese in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen auch über eine Interaktion mit dem eukaryontischen Translationselongationsfaktor eEF1A beeinflussen (Kido und Lau, 2008). Kido und Lau (2008) hatten gezeigt, dass *TSPY* und eEF1A synergetisch die Expression eines Luciferase-Reportergens in transient co-transfizierten HEK293-Zellen verstärken. Die Autoren schlossen daraus, dass *TSPY* wachstumsfördernde Funktionen ausübt, indem es synergetisch mit eEF1A die Proteinsynthese stimuliert. Es ist daher durchaus möglich, dass *TSPY* auch in Kit-defizienten Mäusen die Expression von spermatogeneserelevanten Genen (proliferative und/oder Apoptose-protektive) auf der Translationsebene stimuliert. Das zellspezifische Expressionsmuster von *EEF1A* im Testis wurde bislang nur für den Menschen eingehender untersucht (Kido und Lau, 2008). Um zu untersuchen, ob der eukaryontische Translationselongationsfaktor *EEF1A* auch im Maustestis in spermatogonialen Keimzellen und primären Spermatozyten exprimiert wird und damit eine direkte Interaktion des humanen transgenen Proteins mit eEF1A möglich wäre, wurde die Expression von *EEF1A* im 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Maustestis immunhistochemisch untersucht (siehe Abschnitt 4.1.8). In *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen ist eEF1A abundant im Zytoplasma von Spermatogonien und primären Spermatozyten immunhistochemisch nachweisbar. Rein visuell betrachtet, existierten keine sichtbaren Unterschiede in der Anzahl der *EEF1A*-exprimierenden Keimzellen bei 30,5 Tage alten *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*- und *NMRI-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kido und Lau (2008) wurde keine eEF1A-

Immunfärbung in den peritubulären myoiden Zellen des Maustestis detektiert. Das durchaus überlappende Expressionsmuster des humanen *TSPY*-Transgens mit dem murinen *EEF1A* im *TSPY*-transgenen Maustestis macht eine mögliche Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlich. *EEF1A1* werden neben der Funktion als Translationselongationsfaktor weitere Funktionen u.a. in der Embryogenese (Krieg *et al.*, 1989), der Zellalterung (Shepherd *et al.*, 1989), der onkogenen Transformation (Tatsuka *et al.*, 1992) und der Zellproliferation (Sanders *et al.*, 1996) zugesprochen. Da *EEF1A* auch in Keimzellen von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen abundant exprimiert wird, könnte *TSPY* über eine direkte Interaktion mit *eEF1A* Einfluss auf die Keimzellproliferation nehmen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob *TSPY* und *eEF1A* in den Keimzellen der *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen, ähnlich wie in den Untersuchungen von Kido und Lau (2008), colokalisieren. Dazu könnten *TSPY-eEF1A*-Immundoppelfärbungen durchgeführt werden.

5.2 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose im *TSPY*-transgenen embryonalen Testis

Die embryonale Expression von *TSPY* ist bislang nur lückenhaft erforscht. Zhang *et al.* (1992) wiesen erstmals mittels RT-PCR-Analysen in testikulärer RNA von 22 und 26 Wochen alten humanen Feten *TSPY*-Transkripte nach. Erste immunhistochemische Nachweise einer fetalen *TSPY*-Expression erfolgten durch Honecker *et al.* (2004), die in 14-40 Wochen alten humanen fetalen Testes *TSPY* abundant im Zytoplasma von Prä spermatogonien und zu einem geringeren Ausmaß in Gonozyten detektierten. Es ist bislang noch ungeklärt, ob die embryonale Expression von *TSPY* in den Keimzellen mit der Anlage des Testis einsetzt oder *TSPY* bereits vor der Testisanlage in primordialen Keimzellen exprimiert wird. Die *TSPY*-transgene Mauslinie *Tg(TSPY)9Jshm* wurde bereits im Rahmen einer biologischen Diplomarbeit von Kotsiari (2005) erfolgreich eingesetzt, um das Expressionsmuster von *TSPY* mittels immunhistochemischer Analysen im fetalen Testis näher zu untersuchen. Vorab hatte Schubert (2001) mittels RT-PCR-Analysen aus embryonaler Gesamt-RNA eine *TSPY*-Expression in den embryonalen *TSPY*-transgenen Mausstadien 5,5 dpc und 8,5 dpc bis 13,5 dpc gezeigt. Während bei den Altersstadien 8,5 dpc bis 13,5 dpc *full-length*-Transkripte amplifiziert werden konnten, die nach dem Spleißmuster von *TSPY^{major}* prozessiert waren, ließen sich bei dem Altersstadium 5,5 dpc ausschließlich aberrant gespleißte *TSPY*-Transkripte detektieren. Kotsiari (2005)

detektierte mittels Immunhistochemie mit dem polyklonalen Antiserum 837/3 eine *TSPY*-Expression in Gonozyten und Präespermatogonien von 12,5 bis 17,5 Tage alten *TSPY*-transgenen embryonalen Testes und beobachtete bei den Stadien 13,5 dpc bis 15,5 dpc eine kontinuierliche Zunahme *TSPY*-positiver Keimzellen, während in den Stadien 16,5 dpc und 17,5 dpc deutlich weniger immunreaktive Keimzellen präsent waren. Bis zum Tag 16,5 dpc proliferieren die Gonozyten der Maus und gehen anschließend in einen bis zur Geburt andauernden Arrest in die G_0/G_1 -Phase über (Vergouwen *et al.*, 1991). Kotsiari folgerte, dass dieses embryonale Expressionsmuster mit einem gonozytenspezifischen proliferativen Effekt des humanen *TSPY*-Transgens im Zusammenhang stehen könnte. Eine positive *TSPY*-Immunfärbung u.a. im entodermalen Dottersackepithel von 8,5 Tage alten Embryonen könnte auf primordiale Keimzellen zurückzuführen sein (Kotsiari, 2005). Es ist denkbar, dass auch der partielle *rescue* der Spermatogenese bei *TSPY*-transgenen *Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Mäusen durch einen proliferativen Effekt des humanen *TSPY* auf die frühen testikulären embryonalen primordialen Keimzellen bedingt ist. Andererseits wäre es auch möglich, dass *TSPY* einen Apoptose-protektiven Effekt auf die Gonozyten und Präespermatogonien ausüben könnte.

Vorab durchgeführte immunhistochemische *TSPY*-Ki67-Doppelfärbungen von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Leendert Looijenga (Department of Pathology, Erasmus MC-University Medical Center, Rotterdam) an *TSPY*-transgenen und NMRI-Wildtyptestes der Embryonalstadien 14,5 dpc und 17,5 dpc hatten gezeigt, dass *TSPY*-positive Keimzellen fast ausschließlich positiv für den Proliferationsmarker Ki67 waren und in embryonalen Testes der NMRI-Kontrollen deutlich weniger Ki67-positive Zellen präsent waren (L. Looijenga, persönliche Mitteilung). Deshalb wurden 14,5 und 17,5 Tage alte *TSPY*-transgene Mausembryonen der Linie *Tg(TSPY)9Jshn* im Rahmen dieser Doktorarbeit immunhistochemisch mittels TUNEL-Assays und Caspase 3- sowie Ki67-Immunfärbung untersucht (siehe Abschnitt 4.2). In den embryonalen 14,5 und 17,5 Tage alten Testes wurde kein nachweisbarer proliferativer und/oder anti-apoptotischer Effekt des humanen *TSPY*-Transgens gezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschied in der relativen Anzahl Ki67-, Caspase 3- bzw. TUNEL-positiver Keimzellen bei *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Embryonen der Embryonalstadien 14,5 und 17,5 dpc nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.2.3). Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz zu den vorab erzielten Ergebnissen bei 14,5 und 17,5 dpc *TSPY*-transgenen und Wildtyptestes könnten Unterschiede in der Präparation und/oder in der Wahl des Ki67-Antikörpers gewesen sein. Während die ersten Ki67-Immunfärbungen an 4% PFA fixierten Testes

durchgeführt wurden, erfolgten die Immunfärbungen dieser Arbeit an Paraffinschnitten von in 4% PFA fixierten Gesamtembryonen.

Generell wurden über die Caspase 3-Immunfärbung geringere Apoptoseraten als über die TUNEL-Methode ermittelt, ein Ergebnis, das sich mit den Untersuchungen von Hussein (2005) deckt. Eine statistische Analyse der über Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assay erhaltenen Ergebnisse ergab, dass die gewählten Detektionsmethoden zwar miteinander korrelieren (siehe Abschnitte 4.1.7 und 4.2.3), jedoch unterschiedlich große Werte messen, d.h. ein systematischer Fehler vorliegt. Duan *et al.* (2003) und Hussein (2005) postulierten eine guten Korrelation von Caspase 3-Immunfärbung und TUNEL-Assay. Eine Korrelationsanalyse nach Pearson, wie sie von Duan *et al.* (2003) und Hussein (2005) durchgeführt wurde, liefert jedoch keine Informationen, darüber, wie stark die eingesetzten Methoden in ihren einzelnen Messwerten übereinstimmen bzw. divergieren. Die Methode nach Bland und Altman (1986, 2003) prüft, inwieweit die Ergebnisse zweier Messmethoden übereinstimmen und bezieht nicht nur die durchschnittlichen Differenzen der Messwerte mit ein, sondern betrachtet auch die Streuung der Differenzen der einzelnen Messwertpaare, wodurch systematische Abweichungen, Ausreißer und Abhängigkeiten der Varianzen von der Größe der Messwerte beurteilt werden können (Grouven *et al.*, 2007). Obwohl eine Rangkorrelationsanalyse der in dieser Arbeit generierten Daten nach Spearman meist gute Korrelationswerte für die Caspase 3-Immundefektion und den TUNEL-Assay lieferte (siehe Abschnitte 4.1.7 und 4.2.3), wurde nach Bland-Altman-Analysen deutlich, dass die Mittelwerte der Messwertdifferenzen durch die durchweg höheren TUNEL-Messwerte verzerrt sind. Diese Abweichung wäre z.B. dadurch zu erklären, dass eine TUNEL-positive Apoptose auch ohne Aktivierung von Caspase 3 möglich ist, wie es für das anti-apoptotische Chaperon Heat shock protein 70 (Hsp70) in humanen Brustkrebszellen gezeigt werden konnte (Nylandsted *et al.*, 2000). Neben Caspasen werden auch andere Proteasen wie Cathepsine, Calpaine und Serinproteasen in zahlreiche Apoptosemodelle miteinbezogen (Lotem und Sachs, 1996; Ruggiero *et al.*, 1987; Wang, 2000; Wright *et al.*, 1994). Für Calpain (Shiraishi *et al.*, 2000, 2001; Somwaru *et al.*, 2004; Umemoto *et al.*, 2001), Cathepsin L (Kim und Wright, 1997) und die Serinprotease HtrA2 (Hayashi *et al.*, 2006) wurde bereits eine Beteiligung am murinen testikulären Keimzelltod durch Hitzestress und testikuläre Torsion gezeigt. Bei Auftreten einer durch andere Proteasen gesteuerten Apoptose wäre es also möglich, dass durch einen immunhistochemischen Nachweis aktivierter Caspase 3 nicht alle apoptotischen Zellen detektiert werden. Eine Limitierung der TUNEL-Methode wiederum besteht darin, dass bei

dieser nicht nur DNA-Fragmentierung sondern auch DNA-Einzelstrangbrüche mit freien 3'-OH-Enden detektiert werden (Gavrieli *et al.*, 1992; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995), wie sie typisch für nekrotische Zellen sind. So detektierten Yasuda *et al.* (1995) mittels TUNEL-Färbung nekrotische oder degenerative Zellen in ischämischen Läsionen in humanem Endometrium- und Plazentagewebe bei Anwendung der TUNEL-Originalmethode nach Gavrieli *et al.* (1992) und einem TdT-Enzym der Firma Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim). Weiterhin belegen die Untersuchungen von Kockx *et al.* (1998), dass auch lebende Zellen über die TUNEL-Methode fälschlicherweise als apoptotisch klassifiziert werden können. Atherosklerotische Plaques in humanen Gewebeproben aus Karotis-Endarterektomien enthielten eine große Anzahl TUNEL-positiver Zellen, welche mit einem Antikörper gegen den Spleißfaktor SC-35 positive Immunreaktionen aufwiesen und über *In-situ*-Hybridisierung mit poly-dT-Sonden Polyadenylierungssignale zeigten, wie sie eigentlich nur für transkriptionell aktive Zellen typisch sind. Kockx *et al.* (1998) führten die falsch-positiven TUNEL-Ergebnisse auf die Konformationsänderungen in der DNA-Struktur während der Transkription zurück. Es ist nun denkbar, dass bei der Analyse der apoptotischen Keimzellen mittels TUNEL-Methode und aktivierte Caspase 3-Immundetektion nicht alle apoptotischen Zellen erfasst wurden und dass transkriptionell aktive Keimzellen fälschlicherweise als apoptotisch klassifiziert wurden. Weitere Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang könnten für eine Absicherung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse herangezogen werden. Außerdem könnten neben Caspase 3-Detektionen Analysen z.B. der Proteasen Calpain, Cathepsin L und HtrA2 durchgeführt werden, um mögliche andere Apoptosemechanismen mit zu berücksichtigen. Für die hier untersuchte *TSPY*-transgene Mauslinie *Tg(TSPY)9* kann eine etwaige proliferationsfördernde oder Apoptose-inhibierende Rolle des *TSPY* während der embryonalen Keimzellentwicklung in einem anderen Entwicklungsstadium als den hier untersuchten trotz der negativen Ergebnisse der Apoptose- und Proliferationsanalysen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher sollten in weiterführenden Untersuchungen der transgenen Linie *Tg(TSPY)9* weitere Stadien der Embryonalentwicklung auf eine proliferative und/oder Apoptose-protective Wirkung des humanen Transgens hin analysiert werden (siehe auch Abschnitt 5.3).

5.3 Ausblick auf mögliche weiterführende Untersuchungen bei *TSPY*-transgenen Mäusen der Linien *Tg(TSPY)9Jsh* und *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion des TSPY während der Spermatogenese. Unter suboptimalen Spermatogenesebedingungen konnte bei *TSPY*-transgenen Kit-defizienten Mäusen der Linie *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J* im Gegensatz zu der Linie *Tg(TSPY)9Jsh* mit NMRI-Hintergrund ein transgener testikulärer Phänotyp beobachtet werden. Die Untersuchungen der *TSPY-C57BL/6J-Kit^{W^v}/J*-Mauslinie deuten auf eine spermatogenesefördernde Wirkung des humanen TSPY hin, die ausreichend ist, um einen partiellen *rescue* der beeinträchtigten Spermatogenese und Fertilität in *Kit^{W^v}/Kit^{W^v}*-Männchen zu bewirken. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus um eine proliferative und/oder Apoptose-hemmende Funktion des humanen Transgens handelt. Da bei den untersuchten postnatalen Stadien (4,5 dpp bis 30,5 dpp) weder eine verstärkte Proliferation noch eine verminderte Apoptose der Keimzellen in *TSPY-Kit^{W^v}/Kit^{W^v}*-Männchen detektiert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass die spermatogenesefördernde Wirkung des TSPY-Transgens bereits früher, nämlich während der Embryonalentwicklung einsetzt. Denkbar wäre eine Auswirkung des transgenen Peptids auf die Proliferation bzw. Apoptose der primordialen Keimzellen, welche ab Tag 8,5 der embryonalen Entwicklung in die indifferenten Gonadenanlagen einwandern (de Kretser, 1993). *Full-length TSPY*-Transkripte wurden von Schubert (2001) ab Tag 8,5 dpc nachgewiesen, und Kotsiari (2005) bestätigte in diesem Stadium eine Expression des transgenen Proteins im embryonalen Entoderm und Dottersack. Eine abschließende Klärung, ob es sich bei den mit dem Antiserum 837/3 immungefärbten Zellen um PGCs handelt, steht allerdings noch aus. Dieser Nachweis wäre beispielsweise durch eine TSPY-PLAP- oder TSPY-Oct3/4-Immundoppelfärbung zu erbringen (Honecker *et al.*, 2004; Surani, 2001). PGCs besitzen im Hinblick auf die weitere Analyse der *TSPY-Kit^{W^v}/Kit^{W^v}*-Mäuse eine besondere Bedeutung, welche sich aus der embryonalen *c-kit*-Expression in den PGCs (7,5 bis 13,5 dpc) und der Funktion des Kit/SCF-Systems sowohl bei der Proliferation und Apoptose als auch bei der Migration dieser Zellen von den Genitalleisten zu den Gonaden ergibt (Dolci *et al.*, 1991; Godin *et al.*, 1991; Manova und Bachvarova, 1991; Matsui *et al.*, 1990, 1991; Pesce *et al.*, 1997; Runyan *et al.* 2006). SCF der Zellen entlang des PGC-Migrationspfades und auf den

Sertolizellen vermittelt über den Kit-Rezeptor der PGCs neben einer anti-apoptotischen Wirkung (Dolci *et al.*, 1991) auch eine Adhäsion der PGCs an somatische Zellen (Pesce *et al.*, 1997), wodurch das Überleben und die migratorische Aktivität der PGCs begünstigt werden. Neuere Untersuchungen von Runyan *et al.* (2006) haben gezeigt, dass das Kit/SCF-System die Apoptose der primordialen Keimzellen über einen zytoplasmatischen, intrinsischen, BAX-abhängigen Signalweg reprimiert. Über diesen werden ab Tag 10,5 dpc ektopische PGCs, welche den Migrationspfad verlassen haben, eliminiert: Bei fehlender Interaktion des Kit-Rezeptors der PGCs mit dem Kit-Liganden SCF auf den somatischen Zellen entlang des Migrationspfades erfolgt eine Hochregulation pro-apoptotischer Bcl2-Proteine des intrinsischen Signalweges (Bax, Bak, Bad, Bim) und von Caspase 3 innerhalb der PGCs, wodurch es zur Apoptose kommt. Nach Besiedelung der Gonaden werden diese Proteine in den PGCs herunterreguliert (Runyan *et al.*, 2006). Die durch die *Kit*^{W^v}-Mutation verminderte Kit-Rezeptoraktivität könnte eine gestörte Interaktion mit SCF und damit eine beeinträchtigte Kit/SCF-Signalgebung bewirken und so zu einer Hochregulation der intrinsischen pro-apoptotischen Proteine führen. Dies bedeutet, dass der testikuläre homozygote *Kit*^{W^v}-Phänotyp bereits in der Embryonalentwicklung durch eine verstärkte Apoptose von PGCs seine Initialisierung findet. Es wäre denkbar, dass das zytoplasmatisch lokalisierte TSPY bei diesem Apoptosemechanismus als Inhibitor einer der zytoplasmatischen pro-apoptotischen Faktoren eingreift und damit zu einer verringerten Apoptoserate und einem verstärkten Überleben der PGCs führt, wodurch mehr Keimzellen die embryonalen Gonaden erreichen. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung früher *TSPY*-transgener Kit-defizienter Embryonalstadien von Bedeutung. Ebenso sollten frühere Embryonalstadien der transgenen Linie *Tg(TSPY)9Jshm* und männliche *TSPY-Kit*^{W^v}/*Kit*^{W^v}-Embryonen auf eine Expression und Funktion des TSPY in PGCs hin analysiert werden. Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit keine proliferative und/oder Apoptose-inhibierende Wirkung des humanen TSPY auf die Gonozyten bzw. Prä spermatogonien in den Stadien 14,5 und 17,5 dpc nachgewiesen werden, eine solche Wirkung ist allerdings für ein früheres Stadium, insbesondere im Hinblick auf die PGCs, nicht auszuschließen. In diesem Rahmen wäre es interessant, den C-terminalen Antikörper Klon #7 in verschiedenen transgenen Embryonalstadien zu testen, um zu überprüfen, ob sich das Expressionsmuster mit diesem Antikörper von dem mit den Antikörpern 837/3 und Klon #2 detektierten Muster unterscheidet, was wiederum auf eine Expression verkürzter TSPY-Proteine während der Embryonalentwicklung schließen ließe.

Außerdem sind weiterführende Untersuchungen verschiedener embryonaler bis postnataler Stadien *TSPY*-transgener Mäuse denkbar, die Whole Mouse Genome Oligo Microarray-Analysen einschließen könnten. Hierbei wäre eine Analyse der Transkriptionsprofile verschiedener Keimzellpopulationen interessant, z.B. embryonale Gonozyten und Präspmatogonien, postnatale Spermato gonien (z.B. Tag 5 dpp), primäre Spermatozyten und runde Spermato den. Die verschiedenen Keimzelltypen könnten z.B. mittels entsprechender keimzellspezifischer Primärantikörper und *Magnetic Beads* (Firma Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) separiert und angereichert werden. Da z.B. spermato goniale Stammzellen (As-Spermato gonien) im Maustestis lediglich in einer Konzentration von $2 \text{ pro } 10^4$ Testiszellen vorliegen (Meistrich und van Beek, 1993; Tegelenbosch und de Rooij, 1993), ist eine solche Anreicherung des gewünschten Zelltyps notwendig, um das Ergebnis der Microarray-Analyse nicht durch andere testikuläre Zelltypen zu verfälschen. Durch einen direkten Vergleich von *TSPY*-transgenen und nicht transgenen Testes könnten so in transgenen Keimzellen aberrant exprimierte Kandidatengene ermittelt werden, die eine pro-apoptotische, Apoptose-protective, chromatinmodifizierende und zellzyklusregulierende Wirkung ausüben. Putative Kandidatengene könnten anschließend z.B. mittels Real-Time-PCR-Analysen und auf Proteinebene per Peptid-Co-Lokalisationsstudien über Immunhistochemie, GST-Pull-down-Assays, 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie verifiziert und weiter analysiert werden.

Darüber hinaus stellt Cyclin B1 einen möglichen Ansatzpunkt weiterführender Untersuchungen dar. Li *et al.* (2007) wiesen im testikulären Carcinoma *in situ* Stadium eine Co-Expression von *TSPY* und Cyclin B1 in denselben Tumorzellen auf Proteinebene nach. Dabei waren beide Proteine im Zytoplasma und Nukleus lokalisiert. Transient mit *TSPY* transfizierte HeLA-Zellen zeigten in Mikroarrayanalysen eine Heraufregulierung der *FOXMI*- und *CCND2*-Expression (Oram *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). *FOXMI* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription diverser Zellzyklusregulatoren, wie u.a. von Cyclin B1 reguliert. *CCND2* kodiert für Cyclin D2, das durch Bindung die cyklinabhängige Kinase CDK4/6 aktiviert, welche essentiell für das Verlassen der G₀-Phase und den Eintritt in die G₁-Phase oder den Übergang von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus ist (Aleem und Kaldis, 2006; Malumbres und Barbacid, 2005). Durch die Hochregulation von Cyclin D2 könnte *TSPY* einen positiven Effekt auf die Zellproliferation ausüben (Li *et al.*, 2007).

Die Studien von Li und Lau (2008) zeigten, dass TSPY *in vitro* Cyclin B1 bindet, welches entscheidend auf den G₂/M-Übergang des Zellzyklus einwirkt. Außerdem stimuliert TSPY *in vitro* und *in vivo* die Kinaseaktivität des Cyclin B1-CDK1(*cyclin-dependent kinase 1*)-Komplexes (Li und Lau, 2008). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es interessant zu untersuchen, ob in den Keimzellen von *Tg(TSPY)9Jshm*- und *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen Cyclin B1 aberrant exprimiert ist.

In dieser Arbeit konnte mittels Immunhistochemie eine Lokalisation des humanen TSPY in runden Spermatiden von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen demonstriert werden. Kido und Lau (2006) haben gezeigt, dass Tspy in der Ratte spezifisch in elongierenden Spermatiden exprimiert wird und dort mit Histon H2B co-lokalisiert und interagiert. Es wird derzeit postuliert, dass rTspy im Rattenhoden als Chaperon agieren könnte, wenn die Histone in den Spermatiden durch Protamine ersetzt und ins Zytoplasma exportiert werden. Weil das humane TSPY *in vitro* an H2B bindet und TSPY in Mäusen der Linie *Tg(TSPY)9Jshm* auch in runden Spermatiden exprimiert wird (Kido und Lau, 2005; Lau, persönliche Mitteilung), wäre es nun möglich, eine direkte Interaktion von TSPY mit verschiedenen Histonen und eine mögliche Funktion von TSPY als Chaperon bei der Spermiogenese im transgenen Maustestis eingehender zu untersuchen. Erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion von TSPY mit H2A, H2B, H3 und H4 könnten immunhistochemische Co-Lokalisationsanalysen in Testes von adulten *TSPY*-transgenen Mäusen liefern. In der vorliegenden Arbeit konnten in runden Spermatiden von *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen immunhistochemisch lediglich transgene *full-length*-Proteine nachgewiesen werden, deren Funktion in diesem Zelltyp noch unklar ist. Obwohl mit dem TSPY-spezifischen monoklonalen Antikörper Klon #2 (Kido und Lau, 2005) das TSPY-Transgen vornehmlich im Zytoplasma von runden Spermatiden immunhistochemisch nachgewiesen wurde, wurde in geringerem Maße das transgene Peptid auch im Nukleus von runden Spermatiden detektiert (siehe Abbildung 4-7), sodass die nukleäre Lokalisation von TSPY in runden Spermatiden einen möglichen Einfluss von TSPY als Chaperon auf die Chromatinstruktur nicht gänzlich ausschließt. Bei der Maus erfolgt der Ersatz der Histone durch Transitionsproteine erst in elongierenden Spermatiden der Stadien 11 bis 12 und der anschließende Austausch der Transitionsproteine durch Protamine in elongierten Spermatiden der Stadien 13 bis 15 (Meistrich *et al.*, 1994, 2003; Einteilung der Stufen nach Russell *et al.*, 1990). Die fehlende Expressionsnachweis des humanen Transgens in sich elongierenden Spermatiden in *TSPY-Kit^{W-v}/Kit^{W-v}*-Männchen schließt eine rTSPY-analoge Funktion des humanen Transgens aus. Eine mögliche Rolle des TSPY in runden

Spermatiden jedoch ergibt sich aus der Beobachtung, dass haploide runde Spermatiden vor der Differenzierung zu elongierenden Spermatiden eine hohe Transkriptionsaktivität aufweisen, durch welche Transkripte für die Proteinexpression in der späten Spermiogenese zur Verfügung gestellt werden (Kimmins *et al.*, 2004). Für die Transkriptionsinitiation ist eine Entfernung von Histonen aus den Nukleosomen erforderlich (Chen *et al.*, 1994). Eine Rolle als Histonchaperon beim Abbau und Wiederaufbau der Nukleosomen während der Transkriptionsinitiation wurde bereits für NAP-1 postuliert (Park *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Homologie zu NAP-1 wäre eine ähnliche Rolle auch für TSPY denkbar. Da für das humane TSPY *in vitro* bereits eine Bindung an Histon 2B gezeigt wurde (Kido und Lau, 2006), lässt die in dieser Arbeit demonstrierte TSPY-Expression in runden Spermatiden eine Funktion als Histonchaperon auch in der TSPY-transgenen Maus vermuten. Weiterführende Untersuchungen wie Co-Lokalisationsstudien von TSPY und Histonen z.B. mittels Immunfluoreszenz sollten zur Überprüfung dieser Hypothese herangezogen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit der TSPY-transgenen Mauslinie *Tg(TSPY)9Jshn* und der in dieser Doktorarbeit etablierten Linie *TSPY-C57BL/6J-KitW^v/J* geeignete Mausmodelle zur Untersuchung der möglichen Funktion(en) des humanen TSPY während der Spermatogenese zur Verfügung stehen, die zukünftig noch viele weitere Analysemöglichkeiten offenbaren werden.

6 Literaturverzeichnis

- ADACHI Y, PAVLAKIS GN, COPELAND TD. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem* 1994; 269: 2258-2262.
- ADHAM IM, BURKHARDT E, BENAHMED M, ENGEL W. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 26668-26672.
- ALBRECHT KH, EICHER EM. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 2001; 240(1): 92-107.
- ALBRECHT KH, YOUNG M, WASHBURN LL, EICHER EM. Sry expression level and protein isoform differences play a role in abnormal testis development in C57BL/6J mice carrying certain Sry alleles. *Genetics* 2003; 164: 277-288.
- ANAND N, MURTHY S, AMANN G, WERNICK M, PORTER LA, CUKIER IH, COLLINS C, GRAY JW, DIEBOLD J, DEMETRICK DJ, Lee JM. Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 2002; 31(3): 301-305.
- ARNEMANN J, EPPLEN JT, COOKE HJ, SAUERMAN U, ENGEL W, SCHMIDTKE J. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8713-8724.
- BAKER LA, NEF S, NGUYEN MT, STAPLETON R, NORDENSKJOLD A, POHL H, PARADA LF. The insulin-3 gene: lack of a genetic basis for human cryptorchidism. *J Urol* 2002; 167: 2534-2537.
- BERTA P, HAWKINS JR, SINCLAIR AH, TAYLOR A, GRIFFITHS BL, GOODFELLOW PN, FELLOUS M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448-450.
- BISHOP CE, BOURSOT P, BARON B, BONHOMME F, HATAT D. Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* 1985; 315: 70-72.
- BISHOP CE, HATAT D. Molecular cloning and sequence analysis of a mouse Y chromosome RNA transcript expressed in the testis. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 2959-2969.
- BISHOP CE, MITCHELL MJ. Mouse Y chromosome. *Mamm Genome* 1999; 10: 962.

- BLANCO-RODRIGUEZ J, MARTINEZ-GARCIA C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29: 13-31.
- BLAND JM, ALTMAN DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 22(1): 85-93.
- BLAND JM, ALTMAN DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476): 307-10.
- BRINSTER RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296: 2174-2176.
- BURGOYNE PS, MAHADEVAIAH SK, SUTCLIFFE MJ, PALMER SJ. Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermiogenesis" gene mapping to the long arm. *Cell* 1992; 71: 391-398.
- CANELA N, RODRIGUEZ-VILARRUPLA A, ESTANYOL JM, DIAZ C, PUJOL MJ, AGELL N, BACHS O. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 1158-1164.
- CHABOT B, STEPHENSON DA, CHAPMAN VM, BESMER P, BERNSTEIN A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 1988; 335(6185): 88-89.
- CHAI Z, SARCEVIC B, MAWSON A, TOH BH. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 33665-33674.
- CHAMBERS DM, PETERS J, ABBOTT CM. The lethal mutation of the mouse wasted (wst) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1alpha, encoded by the Eef1a2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(8): 4463-4468.
- CHAREST NJ, ZHOU ZX, LUBAHN DB, OLSEN KL, WILSON EM, FRENCH FS. A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 573-581.
- CHEN H, LI B, WORKMAN JL. A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J* 1994; 13(2): 380-390.

- CHEN L, MADURA K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res* 2005; 65: 5599-5606.
- COLEMAN DL, HUMMEL KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (*ob*) gene in the mouse. *Diabetologia* 1973; 9: 287-293,
- COMPAGNONE NA, ZHANG P, VIGNE JL, MELLON SH. Novel role for the nuclear phosphoprotein SET in transcriptional activation of P450c17 and initiation of neurosteroidogenesis. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 875-888.
- CONWAY SJ, MAHADEVAIAH SK, DARLING SM, CAPEL B, RATTIGAN AM, BURGOYNE PS. Y353/B: a candidate multiple-copy spermiogenesis gene on the mouse Y chromosome. *Mamm Genome* 1994; 5: 203-210.
- COOKE HJ, FANTES J, GREEN D. Structure and evolution of human Y chromosome DNA. *Differentiation* 1983; 23 Suppl: S48-55.
- COOKE HJ, MCKAY RD. Evolution of a human Y chromosome-specific repeated sequence. *Cell* 1978; 13: 453-460.
- COOLS M, DROP SL, WOLFFENBUTTEL KP, OOSTERHUIS JW, LOOIJENGA LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev* 2006; 27: 468-484.
- DASARI VK, DENG D, PERINCHERY G, YEH CC, DAHIYA R. DNA methylation regulates the expression of Y chromosome specific genes in prostate cancer. *J Urol* 2002; 167: 335-338.
- DAVIDOFF M, SCHULZE W. Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. *Histochemistry* 1990; 93: 531-536.
- DE KRETZER DM. Molecular Biology of the Male Reproductive System. *Academic Press, Inc.*, San Diego, 1993.
- DE ROOIJ DG, GROOTEGOED JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694-701.
- DE ROOIJ DG, OKABE M, NISHIMUNE Y. Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *S117H/S117H*, and cryptorchid mice. *Biol Reprod* 1999; 61: 842-847.

- DECHEND F, SCHUBERT S, NANDA I, VOGEL T, SCHMID M, SCHMIDTKE J. Organization and expression of rat Tspy. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 83: 270-274.
- 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: 67-71.
- 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; 15: 131-136.
- DELBRIDGE ML, LONGEPED G, DEPETRIS D, MATTEI MG, DISTECHE CM, MARSHALL GRAVES JA, MITCHELL MJ. TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X - implications for Y chromosome evolution. *Chromosome Res* 2004; 12: 345-356.
- DOLCI S, WILLIAMS DE, ERNST MK, RESNICK JL, BRANNAN CI, LOCK LF, LYMAN SD, BOSWELL HS, DONOVAN PJ. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 1991; 352: 809-811.
- DONOVAN PJ, STOTT D, CAIRNS LA, HEASMAN J, WYLIE CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986;44(6): 831-838.
- DUAN WR, GARNER DS, WILLIAM SD, FUNCKES-SHIPPIY CL, SPATH IS, BLOMME EAG. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections for PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 2003; 199(2): 221-228.
- EDDY EM, CLARK JM, GONG D., FENDERSON BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gam Res* 4:333-362, 1981.
- EHRMANN IE, ELLIS PS, MAZEYRAT S, DUTHIE S, BROCKDORFF N, MATTEI MG, GAVIN MA, AFFARA NA, BROWN GM, SIMPSON E, MITCHELL MJ, SCOTT DM. Characterization of genes encoding translation initiation factor eIF-2gamma in mouse and human: sex chromosome localization, escape from X-inactivation and evolution. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1725-1737.
- EICHER EM, HUTCHISON KW, PHILIPS SJ, TUCKER PK, LEE B. A repeated segment on the mouse Y chromosome is composed of retroviral related Y enriched and Y specific sequences. *Genetics* 1989; 122: 181-192.

- ELLIS PJ, CLEMENTE EJ, BALL P, TOURÉ A, FERGUSON L, TURNER JM, LOVELAND KL, AFFARA NA, BURGOYNE PS. Deletions on mouse Yq lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids. *Hum Mol Genet* 2005; 14(18): 2705-2715.
- ELLIS PJ, FERGUSON L, CLEMENTE EJ, AFFARA NA. Bidirectional transcription of a novel chimeric gene mapping to mouse chromosome Yq. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 171.
- EMMEN JM, MCLUSKEY A, ADHAM IM, ENGEL W, GROOTEGOED JA, BRINKMANN AO. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. *Endocrinology* 2000; 141: 4720-4727.
- ERICKSON RP. Mouse models of human genetic disease: Which mouse is more like a man? *Bioessays* 1996; 18: 993-998.
- 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; 274: 33161-33165.
- FEKETE E, LITTLE CC, CLOUDMAN AM. Some effects of the gene W^v (dominant spotting) in mice. *Proc Nat. Acad Sci U S A* 1941; 27(2): 114-117.
- FENG LX, RAVINDRANATH N, DYM M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem* 2000; 275(33): 25572-25576
- FENNELLY J, HARPER K, LAVAL S, WRIGHT E, PLUMB M. Co-amplification to tail-to-tail copies of MuRVY and IAPE retroviral genomes on the *Mus musculus* Y chromosome. *Mamm Genome* 1996; 7: 31-36.
- FERGUSON L, ELLIS PJ, AFFARA NA. Two novel mouse genes mapped to chromosome Yp are expressed specifically in spermatids. *Mamm Genome* 2009 [Online-Veröffentlichung vor Abdruck].
- FORESTA C, FERLIN A. Role of INSL3 and LGR8 in cryptorchidism and testicular functions. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 294-298.
- FRESE S, SCHAPER M, KUSTER JR, MIESCHER D, JÄÄTTELÄ M, BUEHLER T, SCHMID RA. Cell death induced by down-regulation of heat shock protein 70 in lung cancer cell lines is p53-independent and does not require DNA cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(3): 748-754.

- GALLAGHER WM, BERGIN OE, RAFFERTY M, KELLY ZD, NOLAN IM, FOX EJ, CULHANE AC, MCARDLE L, FRAGA MF, HUGHES L, CURRID CA, O'MAHONY F, BYRNE A, MURPHY AA, MOSS C, MCDONNELL S, STALLINGS RL, PLUMB JA, ESTELLER M, BROWN R, DERVAN PA, EASTY DJ. Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1856-1867.
- GAMBLE MJ, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, FREEDMAN LP, FISHER RP. The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 797-807.
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
- GEISSLER EN, RYAN MA, HOUSMAN DE. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988; 55(1): 185-192.
- GenBank, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- GODIN I, DEED R, COOKE J, ZSEBO K, DEXTER M, WYLIE CC. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1991; 352: 807-809.
- GRASL-KRAUPP B, RUTTKAY-NEDECKY B, KOUDELKA H, BUKOWSKA K, BURSCH W, SCHULTE-HERMANN R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21(5): 1465-1468
- GRAVES JA, WAKEFIELD MJ, TODER R. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1991-1996.
- GRAVES JA. Genomics. Recycling the Y chromosome. *Science* 2005; 307: 50-51.
- GRAVES JA. The degenerate Y chromosome--can conversion save it? *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 527-534.
- GREEN EL. Biology of the laboratory mouse. *McGraw-Hill*, New York, 1966.
- GROUVEN U, BENDER R, ZIEGLER A, LANGE S. Vergleich von Messmethoden. *Dtsch Med Wochenschr* 2007;132: e69-e73.

- GUBBAY J, COLLIGNON J, KOOPMAN P, CAPEL B, ECONOMOU A, MUNSTERBERG A, VIVIAN N, GOODFELLOW P, LOVELL-BADGE R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245-250.
- HANLEY NA, HAGAN DM, CLEMENT-JONES M, BALL SG, STRACHAN T, SALAS-CORTÉS L, McELREAVEY K, LINDSAY S, ROBSON S, BULLEN P, OSTRER H, WILSON DI. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000; 91(1-2): 403-407.
- 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; 189: 623-626.
- HOEI-HANSEN CE, SEHESTED A, JUHLER M, LAU YF, SKAKKEBAEK NE, LAURSEN H, RAJPERT-DE MEYTS E. New evidence for the origin of intracranial germ cell tumours from primordial germ cells: expression of pluripotency and cell differentiation markers. *J Pathol* 2006; 209: 25-33.
- HOGAN B, COSTANTINI F, LACY E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, Gold Spring Harbor, New York, 1994.
- HONECKER F, STOOP H, DE KRIJGER RR, CHRIS LAU YF, BOKEMEYER C, LOOIJENGA LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* 2004; 203: 849-857.
- HSU SM, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- HSU SM, RAINE L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1349-1353.
- HUCKINS C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 1971; 169: 533-557.
- HUMMEL KP, COLEMAN DL, LANE P. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse C57BL/KsJ and C57BL/6J strains. *Biochem Genet* 1972; 7: 1-13.

- HUSSEIN, K. Untersuchungen zur Funktion von humanem TSPY an einer transgenen kryptorchiden *hTSPY⁺/Insl3^{-/-}*-Mauslinie. Dissertation, *Medizinische Hochschule Hannover*, 2005.
- HUTSON JM, HASTHORPE S, HEYNS CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997; 18: 259-280.
- 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; 266: 7025-7029.
- JAKUBICZKA S, SCHNIEDERS F, SCHMIDTKE J. A bovine homologue of the human TSPY gene. *Genomics* 1993; 17: 732-735.
- JINNAH HA, JONES MD, WOJCIK BE, ROTHSTEIN JD, HESS EJ, FRIEDMANN T, BREESE GR. Influence of age and strain on striatal dopamine loss in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J Neurochem* 1999; 72: 225-229.
- KANDILCI A, GROSVELD GC. SET-induced calcium signaling and MAPK/ERK pathway activation mediate dendritic cell-like differentiation of U937 cells. *Leukemia* 2005; 19: 1439-1445.
- KARWACKI V, KOVAC J, MAUCERI G, BACKHAUS A, FOHSE L, SCHMIDTKE J, SCHUBERT S. Tspy is nonfunctional in the Mongolian gerbil but functional in the Syrian hamster. *Genomics* 2006; 88: 65-73.
- 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; 130: 661-673.
- KHALYFA A, BOURBEAU D, CHEN E, PETROULAKIS E, PAN J, XU S, WANG E. Characterization of elongation factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 protein expression in normal and wasted mice. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22915-22922.
- KIDO T, LAU YF. A Cre gene directed by a human TSPY promoter is specific for germ cells and neurons. *Genesis* 2005; 42: 263-275.
- KIDO T, LAU YF. The human Y-encoded testis-specific protein interacts functionally with eukaryotic translation elongation factor eEF1A, a putative oncoprotein. *Int J Cancer* 2008; 123: 1573-1585.

- KIDO T, LAU YF. The rat Tspy is preferentially expressed in elongated spermatids and interacts with the core histones. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 56-67.
- KIM HS, HIRAI H, TAKENAKA O. Molecular features of the TSPY gene of gibbons and Old World monkeys. *Chromosome Res* 1996; 4: 500-506.
- KIMMINS S, KOTAJA N, FIENGA G, KOLTHUR US, BRANCORSINI S, HOGEVEEN K, MONACO L, SASSONE-CORSI P. A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(5): 496-500.
- KNIPPERS A. Molekulare Genetik, *Thieme Verlag*, Stuttgart; 5. Auflage, 1990.
- KOCKX MM, MUHRING J, KNAAPEN MWM, DE MAYER GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998; 152: 885-888.
- KOOPMAN P, MUNSTERBERG A, CAPEL B, VIVIAN N, LOVELL-BADGE R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990; 348: 450-452.
- KOTSIARI A. Untersuchungen zur Expression und Funktion des humanen TSPY-Genlocus an einem transgenen Mausmodell. Diplomarbeit, *Universität Hannover*, 2005.
- KRICK R, JAKUBICZKA S, ARNEMANN J. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes. *Gene* 2003; 302: 11-19.
- KRIEG PA, VARNUM SM, WORMINGTON WM, MELTON DA. The mRNA encoding elongation factor 1-a (EF-1 a) is a major transcript at the midblastula transition in *Xenopus*. *Dev Biol* 1989; 133: 93-100.
- KUBOTA Y, NEF S, FARMER PJ, TEMELCOS C, PARADA LF, HUTSON JM. Leydig insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent. *J Urol* 2001; 165: 1673-1675.
- KUHL H, ROTTGER S, HEILBRONNER H, ENDERS H, SCHEMPP W. Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 2001, 3: 215-222.
- KULKARNI G, TURBIN DA, AMIRI A, JEGANATHAN S, ANDRADE-NAVARRO MA, WU TD, HUNTSMAN DG, LEE JM. Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102: 31-41.

- KVALOY K, GALVAGNI F, BROWN WR. The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 1994, 5: 771-778.
- LAHN BT, PAGE DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997; 278: 675-680.
- LAM MY, YOUNGREN KK, NADEAU JH. Enhancers and suppressors of testicular cancer susceptibility in single- and double-mutant mice. *Genetics* 2004; 166: 925-933.
- LAMBERTI A, CARAGLIA M, LONGO O, MARRA M, ABBRUZZESE A, ARCARI P. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. *Amino Acids* 2004; 26: 443-448.
- LAU YF, LAU HW, KOMUVES LG. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 250-260.
- LAU YF, ZHANG J. Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer. *Mol Carcinog* 2000; 27: 308-321.
- LAWSON KA, DUNN NR, ROELEN BA, ZEINSTRA LM, DAVIS AM, WRIGHT CV, KORVING JP, HOGAN BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424-436.
- LEE J, RICHBURG JH, YOUNKIN SC, BOEKELHEIDE K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-2088.
- LEE S, FRANCOEUR AM, LIU S, WANG E. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family. *J Biol Chem* 1992; 267(33): 24064-24068.
- LEE S, WOLFRAIM LA, WANG E. Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development. *J Biol Chem* 1993; 268(32): 24453-24459.
- LI L, HAMER DH. Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum Mol Genet* 1995, 11: 2013-2016.
- LI R, WANG H, BEKELE BN, YIN Z, CARAWAY NP, KATZ RL, STASS SA, JIANG F. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach. *Oncogene* 2006; 25: 2628-2635.

- LI Y, LAU YF. TSPY and its X-encoded homologue interact with cyclin B but exert contrasting functions on cyclin-dependent kinase 1 activities. *Oncogene* 2008; 27(47): 6141-6150.
- LI Y, TABATABAI ZL, LEE TL, HATAKEYAMA S, OHYAMA C, CHAN WY, LOOIJENGA LH, LAU YF. The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 2007; 38(10): 1470-1481.
- LITTLE CC, CLOUDMAN AM. The Occurrence of a Dominant Spotting Mutation in the House Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1937; 23: 535-537.
- LOOIJENGA LH, HERSMUS R, OOSTERHUIS JW, COOLS M, DROP SL, WOLFFENBUTTEL KP. Tumor risk in disorders of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21: 480-495.
- LUND A, KNUDSEN SM, VISSING H, CLARK B, TOMMERUP N. Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics* 1996; 36(2): 359-361.
- LYON MF, HAWKES SG. X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 1970; 227: 1217-1219.
- MAHADEVAIAH SK, ODORISIO T, ELLIOTT DJ, RATTIGAN A, SZOT M, LAVAL SH, WASHBURN LL, MCCARREY JR, CATTANACH BM, LOVELL-BADGE R, BURGOYNE PS. Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 715-727.
- MANGS AH, MORRIS BJ. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics* 2007; 8(2): 129-136.
- MANOVA K, BACHVAROVA RF. Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev Biol* 1991; 146: 312-324.
- MANOVA K, HUANG EJ, ANGELES M, DE LEON V, SANCHEZ S, PRONOVOST SM, BESMER P, BACHVAROVA RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993; 157: 85-99.

- MANOVA K, NOCKA K, BESMER P, BACHVAROVA RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1990; 110: 1057-1069.
- 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; 17: 726-731.
- MATHIAS N, BAYES M, TYLER-SMITH C. Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 115-123.
- MATSUDA Y, MOENS PB, CHAPMAN VM. Deficiency of X and Y chromosomal pairing at meiotic prophase in spermatocytes of sterile interspecific hybrids between laboratory mice (*Mus domesticus*) and *Mus spretus*. *Chromosoma* 1992, 8: 483-492.
- MATSUI Y, TOKSOZ D, NISHIKAWA S, NISHIKAWA S, WILLIAMS D, ZSEBO K, HOGAN BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991; 353: 750-752.
- MATSUI Y, ZSEBO KM, HOGAN BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 1990; 347: 667-669.
- MAYER A, MOSLER G, JUST W, PILGRIM C, REISERT I. Developmental profile of Sry transcripts in mouse brain. *Neurogenetics* 2000; 3: 25-30.
- MAZEYRAT S, MITCHELL MJ. Rodent Y chromosome TSPY gene is functional in rat and non-functional in mouse. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 557-562.
- MAZEYRAT S, SAUT N, MATTEI MG, MITCHELL MJ. RBMY evolved on the Y chromosome from a ubiquitously transcribed X-Y identical gene. *Nat Genet* 1999; 22: 224-226.
- 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; 7: 1713-1724.
- MCLAREN A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 2003; 262: 1-15.
- MCLEAN DJ, FRIEL PJ, JOHNSTON DS, GRISWOLD MD. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 2085-2091.
- MEISTRICH ML, MOHAPATRA B, SHIRLEY CR, ZHAO M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003; 111(8): 483-488.

- MEISTRICH ML, TROSTLE-WEIGE PK, VAN BEEK ME. Separation of specific stages of spermatids from vitamin A-synchronized rat testes for assessment of nucleoprotein changes during spermiogenesis. *Biol Reprod* 1994; 51(2): 334-344.
- MEISTRICH ML, VAN BEEK ME. Spermatogonial stem cells. In: Cell and Molecular Biology of the Testis. *Oxford Univ. Press*, New York, 1993.
- MERRICK WC. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 1992; 56(2): 291-315.
- MOHANDAS TK, SPEED RM, PASSAGE MB, YEN PH, CHANDLEY AC, SHAPIRO L. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am J Hum Genet* 1992, 3: 526-533.
- MOHARREGH-KHIABANI D. Untersuchungen zur androgenvermittelten Regulation der TSPY-Expression an einem transgenen Mausmodell. Dissertation, *Universität Hannover*, 2002.
- MOORE KL, PERSAUD TVN, Embryologie, *Schattauer Verlag*, Stuttgart, New York, 4.Auflage, 1996.
- MORIWAKI K, SUH D-S, STYRNA J. Genetic factors effecting sperm morphology in the mouse. *Mouse News Lett* 1988; 82: 138.
- MORIWAKI K. Genetics in Wild Mice. *Japan Sci. Soc. Press*. Tokyo/S.Karger, Basel, 1994.
- MOSER AR, DOVE WF, ROTH KA, GORDON JI. The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: Its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J Cell Biol* 1992; 116: 1517-1526.
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273.
- NAGATA K, KAWASE H, HANDA H, YANO K, YAMASAKI M, ISHIMI Y, OKUDA A, KIKUCHI A, MATSUMOTO K. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4279-4283.
- NAVIN A, PREKERIS R, LISITSYN NA, SONTI MM, GRIECO DA, NARAYANSWAMI S, LANDER ES, SIMPSON EM. Mouse Y-specific repeats isolated by whole chromosome representational difference analysis. *Genomics* 1996; 36: 349-353.
- NEF S, PARADA LF. Cryptorchidism in mice mutant for Ins13. *Nat Genet* 1999; 22: 295-299.

- NGUYEN MT, SHOWALTER PR, TIMMONS CF, NEF S, PARADA LF, BAKER LA. Effects of orchiopexy on congenitally cryptorchid insulin-3 knockout mice. *J Urol* 2002; 168: 1779-1783.
- NISHIOKA Y, DOLAN BM, FIORELLINO A, PRADO VF. Nucleotide sequence analysis of a mouse Y chromosomal DNA fragment containing Bkm and LINE elements. *Genetica* 1992; 85: 7-15.
- NISHIOKA Y, DOLAN BM, PRADO VF, ZAHED L, TYSON H. Comparison of mouse Y-chromosomal repetitive sequences isolated from *Mus musculus*, *M. spicilegus*, and *M. spretus*. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 54-58.
- NISHIOKA Y, DOLAN BM, ZAHED L. Molecular characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence amplified in distantly related species in the genus *Mus*. *Genome* 1993; 36: 588-593.
- NISHIOKA Y, LAMOTHE E. Isolation and characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence. *Genetics* 1986; 113: 417-432.
- NYLANDSTED J, ROHDE M, BRAND K, BASTHOLM L, ELLING F, JÄÄTTELÄ M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14): 7871-7876.
- OHNO S. Sex chromosomes and sex-linked genes. *Springer Verlag*, Berlin, 1967.
- OHTA H, TOHDA A, NISHIMUNE Y. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the w/wv mutant mouse testis. *Biol Reprod* 2003; 69: 1815-1821.
- OHTA H, YOMOGIDA K, DOHMAE K, NISHIMUNE Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 2000; 127: 2125-2131.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM-Nummern: #300068 (letztes Update: 3/26/2009), #312300 (letztes Update: 1/30/2009). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- OOSTERHUIS JW, LOOIJENGA LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 210-222.

- OZBUN LL, MARTINEZ A, ANGDISEN J, UMPHRESS S, KANG Y, WANG M, YOU M, JAKOWLEW SB. Differentially expressed nucleolar TGF-beta1 target (DENTT) in mouse development. *Dev Dyn* 2003; 226: 491-511.
- PALMER S, PERRY J, KIPLING D, ASHWORTH A. A gene spans the pseudoautosomal boundary in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12030-12035.
- PARK YJ, CHODAPARAMBIL JV, BAO Y, MCBRYANT SJ, LUGER K. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 1817-1825.
- PESCE M, DI CARLO A, DE FELICI M. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 1997; 68: 37-44.
- PRABHU SM, MEISTRICH ML, MCCLAUGHLIN EA, ROMAN SD, WARNE S, MENDIS S, ITMAN C, LOVELAND KL. Expression of c-Kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis. *Reproduction* 2006; 131(3): 489-499.
- 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: 159-162.
- REYNARD LN, COCQUET J, BURGOYNE PS. The Multi-Copy Mouse Gene Sycp3-Like Y-Linked (Sly) Encodes an Abundant Spermatid Protein That Interacts with a Histone Acetyltransferase and an Acrosomal Protein. *Biol Reprod* 2009 [Online-Veröffentlichung vor Abdruck].
- RODRIGUEZ I, ODY C, ARAKI K, GARCIA I, VASSALLI P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 16: 2262-2270.
- ROSS MT, GRAFHAM DV, COFFEY AJ, SCHERER S, MCLAY K, MUZNY D, PLATZER M, HOWELL GR, BURROWS C, BIRD CP, FRANKISH A, LOVELL FL, HOWE KL, ASHURST JL, FULTON RS, SUDBRAK R, WEN G, JONES MC, HURLES ME, ANDREWS TD, SCOTT CE, SEARLE S, RAMSER J, WHITTAKER A, DEADMAN R, CARTER NP, HUNT SE, CHEN R, CREE A, GUNARATNE P, HAVLAK P, HODGSON A, METZKER ML, RICHARDS S, SCOTT G, STEFFEN D, SODERGREN E, WHEELER DA, WORLEY KC, AINSCOUGH R, AMBROSE KD, ANSARI-LARI MA, ARADHYA S, ASHWELL RI, BABBAGE AK, BAGGULEY CL, BALLABIO A, BANERJEE R, BARKER GE, BARLOW KF, BARRETT IP, BATES KN, BEARE DM, BEASLEY H, BEASLEY O, BECK A, BETHEL G, BLECHSCHMIDT K, BRADY N, BRAY-

- ALLEN S, BRIDGEMAN AM, BROWN AJ, BROWN MJ, BONNIN D, BRUFORD EA, BUHAY C, BURCH P, BURFORD D, BURGESS J, BURRILL W, BURTON J, BYE JM, CARDER C, CARREL L, CHAKO J, CHAPMAN JC, CHAVEZ D, CHEN E, CHEN G, CHEN Y, CHEN Z, CHINAULT C, CICCODICOLA A, CLARK SY, CLARKE G, CLEE CM, CLEGG S, CLERC-BLANKENBURG K, CLIFFORD K, COBLEY V, COLE CG, CONQUER JS, CORBY N, CONNOR RE, DAVID R, DAVIES J, DAVIS C, DAVIS J, DELGADO O, DESHAZO D, ET AL. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; 434: 325-337.
- ROSSI P, ALBANESI C, GRIMALDI P, GEREMIA R. Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 910-914.
- ROSSI P, MARZIALI G, ALBANESI C, CHARLESWORTH A, GEREMIA R, SORRENTINO V. A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev Biol* 1992; 152: 203-207.
- ROZMAHEL R, WILSCHANSKI M, MATIN A, PLYTE S, OLIVER M, AUERBACH W, MOORE A, FORSTNER J, DURIE P, NADEAU J, BEAR C, TSUI LP. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 1996; 12: 280-287.
- RUEST LB, MARCOTTE R, WANG E. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(7): 5418-5425.
- RUSSEL LD, ETTLIN RA, HIKIM AP, CLEGG ED. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Cache River, Clearwater*, 1. Auflage, 1990.
- RUSSELL ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 1979; 20: 357-459.
- SAKATA S, SAKAMAKI K, WATANABE K, NAKAMURA N, TOYOKUNI S, NISHIMUNE Y, MORI C, YONEHARA S. Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient *W^v/W^v* mutant mice. *Cell Death Differ* 2003; 10: 676-686.
- SALMAN FT, ADKINS ES, FONKALSRUD EW. Morphologic effects of unilateral cryptorchidism on the contralateral descended testis. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 439-443.
- SANDERS J, BRANDSMA M, JANSSEN GM, DIJK J, MOLLER W. Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1b gamma delta in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 1996; 109: 1113-1117.

- 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; 5: 1801-1807.
- SCHUBERT S, DECHEND F, SKAWRAN B, KRAWCZAK M, SCHMIDTKE J. Molecular evolution of the murine tspy genes. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91: 239-242.
- 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; 11: 288-291.
- SCHUBERT S, KAMINO K, BOHM D, ADHAM I, ENGEL W, VON WASIELEWSKI R, MOHARREGH-KHIABANI D, MAUCERI G, VASKE B, MEINHARDT A, SCHONER A, GONZALEZ-FASSRAINER D, SCHMIDTKE J. TSPY expression is variably altered in transgenic mice with testicular feminization. *Biol Reprod* 2008; 79: 125-133.
- SCHUBERT S, SKAWRAN B, DECHEND F, NAYERNIA K, MEINHARDT A, NANDA I, SCHMID M, ENGEL W, SCHMIDTKE J. Generation and characterization of a transgenic mouse with a functional human TSPY. *Biol Reprod* 2003; 69: 968-975.
- SCHUBERT S. Untersuchung zur Funktion des TSPY-Genlocus an einem transgenen Mausmodell und die evolutionäre Konservierung von tspy bei den Murinae. Dissertation, *Universität Hannover*, 2001.
- SEO SB, MCNAMARA P, HEO S, TURNER A, LANE WS, CHAKRAVARTI D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 2001; 104: 119-130.
- SETTE C, BEVILACQUA A, BIANCHINI A, MANGIA F, GEREMIA R, ROSSI P. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 1997; 124: 2267-2274.
- SETTE C, BEVILACQUA A, GEREMIA R, ROSSI P. Involvement of phospholipase Cgamma1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the C-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J Cell Biol* 1998; 142: 1063-1074.
- SHEPHERD JC, WALLDORF U, HUG P, GEHRING WJ. Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7520-7521.

- 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; 74: 119-126.
- SIMPSON EM. An expanded collection of mouse Y chromosome RDA clones. *Mamm Genome* 1997; 8: 510-512.
- SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL, SMITH MJ, FOSTER JW, FRISCHAUF AM, LOVELL-BADGE R, GOODFELLOW PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240-244.
- SINGH AP, BAFNA S, CHAUDHARY K, VENKATRAMAN G, SMITH L, EUDY JD, JOHANSSON SL, LIN MF, BATRA SK. Genome-wide expression profiling reveals transcriptomic variation and perturbed gene networks in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2008; 259(1): 28-38.
- SINOWATZ F, SEITZ J, BERGMANN M, PETZOLDT U, FANGHÄNEL J. Embryologie des Menschen, *Deutscher Ärzte-Verlag*, Köln, 1.Auflage, 1999.
- 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; 423: 825-837.
- SKAWRAN B, SCHUBERT S, DECHEND F, VERVOORTS J, NAYERNIA K, LUSCHER B, SCHMIDTKE J. Characterization of a human TSPY promoter. *Mol Cell Biochem* 2005; 276: 159-167.
- SKAWRAN B. Analyse des TSPY-Promotors und die Rolle von TSPY bei der spermatogonialen Proliferation. Dissertation, *Universität Hannover*, 2002.
- SORRENTINO V, GIORGI M, GEREMIA R, BESMER P, ROSSI P. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 1991; 6: 149-151.

- STALLOCK J, MOLYNEAUX K, SCHAIBLE K, KNUDSON CM, WYLIE C. The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development* 2003; 130: 6589-6597.
- STERNBERGER LA. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1657.
- STRACHAN T, READ AP. Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage 1996.
- STYRNA J, BILINSKA B, KRZANOWSKAA H. The effect of a partial Y chromosome deletion in B10.BR-Ydel mice on testis morphology, sperm quality and efficiency of fertilization. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14: 101-108.
- STYRNA J, IMAI HT, MORIWAKI K. An increased level of sperm abnormalities in mice with a partial deletion of the Y chromosome. *Genet Res* 1991; 57: 195-199.
- STYRNA J, KLAG J, MORIWAKI K. Influence of partial deletion of the Y chromosome on mouse sperm phenotype. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 187-195.
- SUH D-S, STYRNA J, MORIWAKI K. Effect of Y chromosome and H-2 complex derived from Japanese wild mouse on sperm morphology. *Genet Res Camb* 1989; 53: 17-19.
- SURANI MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 2001; 414: 122-128.
- SUTCLIFFE MJ, BURGOYNE PS. Analysis of the testes of H-Y negative XOS^{xrb} mice suggests that the spermatogenesis gene (Spy) acts during the differentiation of the A spermatogonia. *Development* 1989; 107: 373-380.
- TAKAGI H, SHARP R, HAMMERMEISTER C, GOODROW T, BRADLEY MO, FAUSTO N, MERLINO G. Molecular and genetic analysis of liver oncogenesis in transforming growth factor alpha transgenic mice. *Cancer Res* 1992; 52: 5171-5177.
- TATSUKA M, MITSUI H, WADA M, NAGATA A, NOJIMA H, OKAYAMA H. Elongation factor-1a gene determines susceptibility to transformation. *Nature* 1992; 359: 333-336.
- TEGELENBOSCH RA, DE ROOIJ DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290: 193-200.

- THORNTON S, ANAND N, PURCELL D, LEE J. Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med* 2003; 81: 536-548.
- THREADGILL DW, DLUGOSZ AA, HANSEN LA, TENNENBAUM T, LICHTI U., YEE D, LAMANTIA C, MOURTON T, HERRUP K, HARRIS RC, BARNARD JA, YUSPA SH, COFFEY RJ, MAGNUSON T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269: 230-234.
- TOMLINSON VA, NEWBERY HJ, WRAY NR, JACKSON J, LARIONOV A, MILLER WR, DIXON JM, ABBOTT CM. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer* 2005; 5: 113.
- TOURE A, CLEMENTE EJ, ELLIS PJ, MAHADEVAIAH SK, OJARIKRE OA, BALL PA, REYNARD L, LOVELAND KL, BURGOYNE PS, AFFARA NA. Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biol* 2005; 6(12): R102.
- TOURE A, GRIGORIEV V, MAHADEVAIAH SK, RATTIGAN A, OJARIKRE OA, BURGOYNE PS. A protein encoded by a member of the multicopy Ssty gene family located on the long arm of the mouse Y chromosome is expressed during sperm development. *Genomics* 2004; 83: 140-147.
- TOURE A, SZOT M, MAHADEVAIAH SK, RATTIGAN A, OJARIKRE OA, BURGOYNE PS. A new deletion of the mouse Y chromosome long arm associated with the loss of Ssty expression, abnormal sperm development and sterility. *Genetics* 2004; 166: 901-912.
- TSUCHIYA K, REIJO R, PAGE DC, DISTECHE CM. Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1400-1407.
- 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; 203: 837-848.
- TYLER-SMITH C. An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility. *Int J Androl* 2008 Aug; 31(4): 376-82.
- UPADHYA P, CHURCHILL G, BIRKENMEIER EH, BARKER JE, FRANKEL WN. Genetic modifiers of polycystic kidney disease in intersubspecific KAT2J mutants. *Genomics* 1999; 58: 129-137.

- VERA J, JAUMOT M, ESTANYOL JM, BRUN S, AGELL N, BACHS O. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. *Oncogene* 2006; 25: 260-270.
- VERGOUWEN RP, JACOBS SG, HUISKAMP R, DAVIDS JA, DE ROOIJ DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 1991; 93(1): 233-243.
- VERKAAR EL, ZIJLSTRA C, VAN 'T VELD EM, BOUTAGA K, VAN BOXTEL DC, LENSTRA JA. Organization and concerted evolution of the ampliconic Y-chromosomal TSPY genes from cattle. *Genomics* 2004; 84: 468-474.
- VODICKA R, VRTEL R, DUSEK L, SINGH AR, KRIZOVA K, SVACINOVA V, HORINOVA V, DOSTAL J, OBORNA I, BREZINOVA J, SOBEK A, SANTAVY J. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 579–587.
- VOGEL T, BOETTGER-TONG H, NANDA I, DECHEND F, AGULNIK AI, BISHOP CE, SCHMID M, SCHMIDTKE J: A murine TSPY. *Chrom Res* 1998; 6: 35–40.
- VOGEL T, BORGMANN S, DECHEND F, HECHT W, SCHMIDTKE J. Conserved Y-chromosomal location of TSPY in Bovidae. *Chromosome Res* 1997; 5: 182-185.
- 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; 8: 491-496.
- 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: 265-270.
- VOGEL T, SCHMIDTKE J. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80: 209-213.
- 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; 12(8): 3346-3355.

- WADE CM, KULBOKAS EJ, 3RD, KIRBY AW, ZODY MC, MULLIKIN JC, LANDER ES, LINDBLAD-TOH K, DALY MJ. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* 2002; 420: 574-578.
- WANG RA, NAKANE PK, KOJI T. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 1998; 58: 1250-1256.
- WARD MA, BURGOYNE PS. The effects of deletions of the mouse Y chromosome long arm on sperm function – intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-based analysis. *Biol Reprod* 2006; 74(4): 652-658.
- WEHNER R, GEHRING W. Zoologie. *Thieme*, Stuttgart, 23. Auflage 1995.
- XIAN M, AZUMA S, NAITO K, KUNIEDA T, MORIWAKI K, TOYODA Y. Effect of a partial deletion of Y chromosome on in vitro fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1992; 47: 549-553.
- YAN W, SUOMINEN J, TOPPARI J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci* 2000; 113: 161-168.
- YASUDA M, UMEMURA S, OSAMURA Y, KENJO T, TSUTSUMI Y. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 185–190.
- YIN Y, STAHL BC, DEWOLF WC, MORGENTALER A. P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 2002; 23(1): 64-70.
- YIN YH, LI YY, QIAO H, WANG HC, YANG XA, ZHANG HG, PANG XW, ZHANG Y, CHEN WF. TSPY is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 93: 458-463.
- YOSHINAGA K, NISHIKAWA S, OGAWA M, HAYASHI S, KUNISADA T, FUJIMOTO T, NISHIKAWA S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 1991; 113(2): 689-699.
- 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; 1: 717-726.
- ZHAO GQ, GARBERS DL. Male germ cell specification and differentiation. *Dev Cell* 2002; 2: 537-547.

ZIMMERMANN S, SCHOTTLER P, ENGEL W, ADHAM IM. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 30-38.

ZIMMERMANN S, STEDING G, EMMEN JM, BRINKMANN AO, NAYERNIA K, HOLSTEIN AF, ENGEL W, ADHAM IM. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 681-691.

Publikationsliste

Originalartikel

1. Schubert S., Kamino K., Böhm D., Adham I., Engel W., von Wasielewski R., Moharreg-Khiabani D., Mauceri G., Vaske B., Meinhardt A., **Schöner A.**, Gonzalez-Fassrainer D., Schmidtke J.

TSPY expression is variably altered in transgenic mice with testicular feminization.

Biol Reprod. 2008 Jul;79(1):125-33.

Posterbeiträge

1. **Schöner A.**, Schmitt O., Schierwater B., Hadrys H.

Antp Genes in Odonata.

98. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 03. - 06. Oktober 2005, Bayreuth.

2. **Schöner A.**, Kotsiari A., Gonzalez D., Schmidtke J., Schubert S.

Human TSPY is specifically expressed in fetal germ cells in TSPY transgenic mice.

18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 07. - 10. März .2007, Bonn.

3. **Schöner A.**, Adham I., Engel W., Schmidtke J., Schubert S.

Partial rescue of the Kit-deficient testicular phenotype in TSPY-W^v/W^v mice.

19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 08. -10. April 2008, Hannover.

4. Schubert S., Kamino K., Böhm D., Adham I., Engel W., Moharreg-Khiabani D., **Schöner A.**, Gonzalez-Fassrainer D., Schmidtke J.

TSPY expression is variably altered in transgenic mice with testicular feminization.

19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 08. -10. April 2008, Hannover.

5. Schubert S., Hussein K., Azvolynska L., **Schöner A.**, Adham I., Engel W., Schmidtke J.

The TSPY transgenic Insl3 deficient mouse model – an approach to understanding TSPY function in spermatogenesis.

20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 01. - 03. April 2009, Aachen.

Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Expression und Funktion des humanen TSPY während der Keimzellentwicklung und gonadalen Tumorgenese – Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Master-, Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 11.08.2009

Anja Schöner