

Banu Beşiköglü  
Dr. sc. hum.

## **Molekulare Analyse der Dysfunktion des AZFa Locus bei Männern und Frauen mit Keimzell-Tumoren**

Fach/Einrichtung: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Strowitzki

Kartierungsstudien aberranter Y-Chromosome konnten bei Gonadoblastom-Patientinnen mit 46,XY- oder 45,X0/46,XY-Karyotyp (XY-DSD) eine Region auf dem Y-Chromosom eingrenzen, die bei all diesen Patientinnen vertreten war. Dieser sogenannte GBY-Locus (Yp11-Yq11) ist mit der Entwicklung von Keimzelltumoren assoziiert. Der GBY-Locus umfasst in Yq11.1 den AZoospermia Factor a (AZFa) Locus und enthält drei proteinkodierende Gene, *USP9Y* (*ubiquitin specific protease 9, Y-linked*), *DDX3Y* (*DEAD box RNA helicase, Y-linked*) und *UTY* (*ubiquitous transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked*), die jeweils ein funktionelles Homolog auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms besitzen: *USP9X*, *DDX3X* und *UTX* in Xp11.4. Neuere Studienergebnisse weisen auf geschlechtsspezifische, dosisabhängige regulative Funktionen dieser X/Y-Homologe in unterschiedlichen Ebenen der Transkriptions- und Translationskontrolle, sowie der Stabilisierung von Zielproteinen, insbesondere in der Keimbahn, hin. Eine Dysregulation eines oder mehrerer dieser Gene im GBY-Locus wird mit der Entstehung von Keimzellneoplasien in XY-DSD-Patienten assoziiert. Im Fokus der Arbeit stand hierbei die regulativen Mechanismen der *DDX3Y*-Expression mittels komparativer Gen- und Proteinexpressionsanalyse herauszuarbeiten, um Hinweise auf die Transkriptionskontrolle und eine mögliche Rolle bei der Entstehung von Keimzellneoplasien zu gewinnen.

Um zunächst Erkenntnisse über die spatiotemporale *DDX3Y*-Expression in verschiedenen Keimzelleifestadien zu erhalten, wurde die Expression von *DDX3Y* in fötalen, perinatalen und präpuberalen Hoden immunhistochemisch untersucht und mit der Expression von *DDX3X* verglichen. Zudem wurde die *DDX3Y*-Proteinexpression in verschiedenen Gonadendysgenesen mit und ohne Keimzelltumor, in ITGCNU/CIS (*intratubular germ cell neoplasia, unclassified/Carcinoma in situ*)-Vorläuferläsionen und testikulären Typ-II- sowie Typ-III-Keimzelltumoren untersucht. Die dysgenetischen Gonadenbiopsien und die testikulären Typ-II-Keimzelltumore wurden auf mRNA-Ebene näher charakterisiert. Mittels quantitativer Genexpressionsanalyse wurde hierzu die Expression von *DDX3Y*, weiterer AZF-Gene und *TSPY* sowie ihrer X-Kopien in dysgenetischen Gonaden, testikulären Tumorbiopsien und angrenzenden Hodenparenchym vergleichend analysiert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die verschiedenen *DDX3Y*-Transkriptisoformen in testikulären Typ-II-Keimzelltumoren, dem angrenzenden Hodengewebe, sowie in einem Keimzell-Kontrollkollektiv ohne Keimzelltumor im Vergleich eruiert. Schließlich wurde die *DDX3Y*-Expression in verschiedenen *In-vitro*-Zellkultursystemen untersucht und geprüft, ob durch den Einsatz von Mediumzusätzen die Transkriptionskontrolle von *DDX3Y* veränderbar ist.

Eine zytoplasmatische und nukleäre *DDX3X*- und *DDX3Y*-Proteinexpression konnte erstmals ab der 17. GW in M-, T1- und späteren T2-Präspmatogonien detektiert werden.

Während DDX3X mit der Transition der T2-Prä spermatogoen zu A-Spermatogonien ausfällt, wird DDX3Y kontinuierlich in allen weiteren Keimzellreifstadien, vor allem in A<sub>pale</sub>- und B-Spermatogonien exprimiert. DDX3Y zeigt eine verstärkte Proteinexpression in allen untersuchten ITGCNU/CIS-Zellen, während DDX3X nur in einigen wenigen ITGCNU/CIS-Zellen nachgewiesen wurde. Die Untersuchung verschiedener Typ-II-TGCTs zeigte ein heterogenes Expressionsmuster in Seminomen, gekennzeichnet durch Fälle mit einer starken, mittleren oder sehr schwachen DDX3Y-Proteinexpression. In Nicht-Seminomen wird DDX3Y nicht exprimiert. Die Untersuchung der verschiedenen keimbahnspezifischen *DDX3Y*-Transkriptisofor men in Typ-II-TGCTs und ihrem angrenzenden Hodenparenchym mittels komparativer Genexpressionsanalyse zeigte deutlich, dass sowohl in den Tumorbiopsien, als auch teilweise bereits in dem angrenzenden Hodengewebe eine keimzellspezifische *DDX3Y*-Transkriptionskontrolle fehlt. Ein sehr ähnliches Expressionsmuster fand sich zudem im Keimzell-Kontrollkollektiv ohne Keimzelltumor bei den Fällen, die durch pathologische Veränderungen, einschließlich verschiedener Spermatogenese-Arreste gekennzeichnet sind. Die quantitative Expression von *DDX3Y* und weiteren AZF-Genen sowie *TSPY* und ihren X-Homologen zeigte, dass die untersuchten TGCT-Fälle entsprechend ihrem Expressionsmuster verschiedenen Expressionsgruppen zugeordnet werden können. Eine direkte Korrelation mit Krankheitsbild, Tumorprogression oder Proteinexpression war nur bedingt möglich. Auffällig waren die Unterschiede in den Expressionsmustern der AZF-Gene und ihrer X-Kopien gegenüber von *TSPY* und *TSPX*. Die Untersuchung der *DDX3Y*-Expression in XY-DSD-Patienten ergab Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Genexpressionsmuster, insbesondere der AZF-Gene, und der Differenzierungsform der Gonade. In Fällen mit nachgewiesenen Keimzellneoplasien zeigt *TSPY* als einziges Gen ein auffälliges mRNA-Expressionsmuster, wohingegen sich die Expressionshöhen der untersuchten AZF-Gene nicht zwischen den Fällen mit und ohne Keimzellneoplasie unterschieden. Dagegen zeigte die immunhistochemische Evaluierung der XY-DSD-Gonaden, dass DDX3Y – in Überschneidung mit der Expression von OCT3/4 und *TSPY* – mitotisch aktive Keimzellen und Vorläuferläsionen in dysgenetischen Gonaden markiert. Die Charakterisierung und Untersuchung verschiedener *In-vitro*-Zellkulturmodelle in Hinblick auf ihr *DDX3Y*-Gen- und -Proteinexpressionsprofil zeigte, dass die untersuchten Zelllinien alle DDX3Y als Protein im Zellkern und im Zytoplasma exprimieren. Eine Aktivierung der keimzellspezifischen *DDX3Y*-Transkription war unter den gewählten Bedingungen aber nicht möglich.

Die gesamten Ergebnisse im Zusammenhang betrachtet zeigen deutlich, dass die *DDX3Y*-Expression durch keimzellspezifische Faktoren eingeleitet wird und *DDX3Y* einer Transkriptions- und Translationskontrolle unterliegt, die stark an die Interaktion mit der Keimzellnische gekoppelt zu sein scheint. Die Expression von DDX3Y in fötalen Keimzellen, ITGCNU-Zellen, Gonadoblastom-Zellen, Typ-II-, Typ-III-Keimzelltumoren und verschiedenen Tumorzelllinien, im Kontext mit der zellulären Funktion in der Zellzyklus-Kontrolle gesehen, macht DDX3Y zu einem potentiell wichtigen Protein, das bei Dysregulation am pathologischen Prozess der klonalen Expansion entarteter Keimzellen sowohl in 46,XY-Männern als auch in den verschiedenen Formen der XY-DSD-Patienten, beteiligt zu sein scheint. Folglich kann DDX3Y als ein geeigneter Marker zur Abschätzung eines Keimzelltumorrisikos bei XY-DSD-Patienten eingesetzt werden.