

VII. Zusammenfassung

Eine Cosmidgenbank der Zelllinie 3E7 wurde erstellt. Mit einer TSPY-cDNA spezifischen Sonde konnten in 3×10^5 Klonen 8 Klone mit 15 TSPY-Kopien identifiziert werden. Einer der Klone (cEMT) wurde isoliert und weiter untersucht. Die Restriktionskarte identifizierte den klonierten Y-chromosomalen Abschnitt als Teil des DYZ5-Repeatgebiets. Der Nachweis von TSPY-Sequenzen in einem bekannten Cosmidklon (cY91) des DYZ5-Gebiets und eine genomische Kopienzahl, die ähnlich der Ausdehnung von DYZ5 variiert, klassifizieren TSPY-Elemente als konstitutiven Bestandteil der DYZ5-Untereinheiten.

Die Mehrzahl der TSPY-Elemente verhält sich bei Verdauung mit Restriktionsenzymen einheitlich, Abweichungen sind meist anhand der bekannten TSPY-Elemente erklärbar.

Deutliche Mikroheterogenität der TSPY-Elemente zeigt sich bei der Sequenzierung von PCR-Produkten, amplifiziert aus genomischer DNA und Testis-RNA.

Ein TSPY-Element (ME3.3/4) aus cEMT wurde subkloniert und sequenziert. Die Sequenz ist bis auf 3 Basenaustausche (C->T) mit der korrigierten TSPY-cDNA identisch. Alle Austausche sind stille Mutationen in der ableitbaren Aminosäurefolge, die jedoch gegenüber der früheren cDNA-Version um 22 Aminosäuren verkürzt ist. Die Zerstörung einer *SphI*-Schnittstelle ermöglichte die Klassifizierung von ME3.3/4 als Einzel- oder "Low-copy" Element, die Positionierung an den Rand des DYZ5-Gebiets in die Nähe des Pseudogens JA36B2, und den Nachweis ME3.3/4-typischer Transkripte in Testis-RNA. Im vermuteten Promotorbereich des ME3.3/4-TSPY-Gens konnten vier mögliche Bindungsregionen des Transkriptionsfaktors Sp1 und eine CAAT-Box identifiziert werden. Ob sie eine Bedeutung in der Regulation der TSPY-Elemente besitzen, ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten, in der die Funktion der TSPY-Genfamilie entschlüsselt werden soll.

Eberhard Manz:

"Characterization of the human TSPY locus harbouring a multi-gene-family; cloning, sequencing and expression studies."

VIII. Summary

A cosmid library was established from cell line 3E7. Screening of 3×10^5 clones with a cDNA-specific hybridization probe yielded 8 genomic clones containing a total of 15 copies of TSPY-like sequence elements. One of the clones (cEMT) was isolated for further analysis. This cloned DNA was identified to contain repeat units of DYZ5. Two TSPY elements could be detected in another cosmid clone (cY91) known to be part of DYZ5. The genomic TSPY copy number correlates with the variable array size of DYZ5. The restriction maps of cEMT and cY91 classify TSPY-like sequences as constitutive elements of the DYZ5 repeat units.

Most of the genomic TSPY-elements are identical with respect to the majority of restriction sites tested. Some of the polymorphic sites could be demarcated based on known sequence data.

Sequence data from PCR products reveal further extensive single base pair heterogeneity among both genomic TSPY elements and TSPY transcripts.

One of the TSPY elements of cEMT (ME3.3/4) was subcloned and sequenced. Sequence analysis revealed complete homology to the revised TSPY cDNA (JA923), with the exception of three C->T transitions. None of the transitions affects the postulated amino acid sequence, which has been shortened by 22 amino acids as compared to the earlier cDNA version. Through the abolition of an *SphI* restriction site caused by one of the transitions, the ME3.3/4 element could be classified as a single or low-copy variant. ME3.3/4 is located in the outer part of the DYZ5 array, close to the JA36B2 pseudogen. Digestion of TSPY-specific RT-PCR products from human testis RNA revealed *SphI*-resistant fragments. Five putative binding regions for transcription factors were found in the 5' promotor region of ME3.3/4 (four GC-rich regions and one H2B-CAAT-Box). Their contribution to the regulation of the TSPY genes will be analysed in future analyse of TSPY function.