

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Hamburg
Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

IN SITU-HYBRIDISIERUNG DER
GESCHLECHTSCHROMOSOMEN
AN PROBANDEN MIT KEIMZELLTUMOREN UND
DYSGENETISCHEN GONADEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

dem Fachbereich für Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Andreas Marker aus Bergkamen

Hamburg, Juni 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 06.02.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Schäfer
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Willig
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Finckh

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	5
1 Gonadendysgenesien	6
1.1 <i>Geschlechtsdeterminierung</i>	7
1.1.1 Männliche Geschlechtsdeterminierung.....	7
1.1.2 Weibliche Geschlechtsdeterminierung	8
1.2 <i>Geschlechtsdifferenzierung</i>	9
1.3 <i>Verschiedene Syndrome mit Gonadendysgenese</i>	10
1.3.1 Ullrich-Turner-Syndrom	10
1.3.2 XX-Männer (Karyotyp 46, XX; Phänotyp männlich).....	11
1.3.3 Reine Gonadendysgenese	12
1.3.4 Gemischte Gonadendysgenese.....	12
1.3.5 Hermaphroditismus verus	13
1.3.6 Pseudohermaphroditismus	14
1.4 <i>Neoplastische Veränderungen bei Gonadendysgenese</i>	15
1.4.1 Gonadoblastom	15
1.4.2 Andere Tumoren bei Gonadendysgenese	15
2 Keimzelltumoren	16
2.1 <i>Ätiologie von Keimzelltumoren</i>	16
2.2 <i>Wichtige Merkmale pädiatrischer Keimzelltumore</i>	17
3 Grundlagen zur In Situ-Hybridisierung	20
3.1 <i>Vorbehandlung des Gewebes</i>	21
3.2 <i>Hybridisierung</i>	22
3.3 <i>Stringenz</i>	22
3.4 <i>Satelliten-Sonden</i>	23
3.5 <i>Detektions - System</i>	23
4 Zielsetzung der Arbeit	24

II. Patienten, Material und Methoden	26
5 Methodik.....	26
5.1 Vorbereitung.....	26
5.2 Hybridisierung.....	27
5.3 Immunchemische Detektion.....	27
6 Darstellung des Patientenkollektivs und des untersuchten Materials	28
6.1 Kontrollen.....	29
6.2 Vergleichspräparate	29
6.3 Patienten mit Gonadendysgenese	30
6.4 Patienten mit Keimzelltumoren.....	32
6.5 Auswertung	33
III. Ergebnisse	35
7 Vorversuche, Kontrollen und Vergleichspräparate	35
7.1 Vorversuche	35
7.2 Kontrollen.....	35
7.3 Vergleichspräparate testikulärem Gewebe.....	36
7.4 Vergleichspräparate und Grenzwerte in ovariellen Gewebe.....	38
8 Ergebnisse an Gonadendysgenesen.....	40
8.1 Gruppe I: Pseudohermaphroditismus maskulinus mit XY-Karyotyp.....	40
8.2 Gruppe II: Echter Hermaphroditismus mit XX/XY bzw. XXY/XY-Konstellation.....	41
8.3 Gruppe III: Fälle mit X0/XY-Konstellation (Ullrich-Turner-Syndrom, Gemischte Gonadendysgenese)	48
8.4 Gonadendysgenese mit XY-Translokation.....	55
8.5 Ergebnisse an Keimzellen in den untersuchten Gonaden.....	56

9	Gonadale und extragonadale Keimzelltumoren - Ergebnisse.....	57
9.1	<i>Ergebnisse an reifen Teratomen.....</i>	57
9.1.1	Reife Teratome des Hodens	59
9.1.2	Reifen Teratome des Ovars.....	59
9.1.3	Sakrokokzygeale reife Teratome.....	59
9.2	<i>Partiell unreife Teratome.....</i>	61
9.3	<i>Gemischte Keimzelltumoren</i>	64
9.4	<i>Embryonales Karzinom.....</i>	68
10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	70
10.1	<i>Vorversuche, Kontrollen und Vergleichspräparate.....</i>	70
10.2	<i>Ergebnisse der Gonadendysgenesien</i>	71
10.3	<i>Ergebnisse der Keimzelltumoren.....</i>	73
IV. Diskussion.....		76
11	Gegenstand und Methode - Diskussion.....	76
11.1.1	Allgemeines	76
11.1.2	Einfluss verschiedener Faktoren auf Signalhäufigkeit und Stärke	76
11.1.3	Auswahl des Detektionssystems	77
11.1.4	Auswertung der Signale.....	78
11.2	<i>Vergleich mit anderen Methoden Bezug auf die Fragestellung.....</i>	78
11.2.1	Konventionelle Zytogenetik.....	79
11.2.2	Untersuchung von Material aus Zellkulturen.....	79
11.2.3	Vor- und Nachteile der Methode im Vergleich zu FISH-Technik.....	80
11.2.4	Vor- und Nachteile der angewandten Methode im Vergleich zur PCR.....	82
11.2.5	Zusammenfassung zum Vergleich mit anderen Methoden.....	84
12	Gonadendysgenesien – Diskussion	86
12.1	<i>Bedeutung der Mosaiksituation in gonadalem Gewebe.....</i>	86
12.1.1	Variabilität des Phänotyps	86
12.1.2	Nachweis der Mosaikkonstellationen in gonadalem Gewebe.....	87
12.1.3	Auswirkungen des gonadalen Karyotyps.....	87
12.2	<i>Gruppe III - Gemischte Gonadendysgenese und UTS.....</i>	89
12.2.1	Phänotyp-Karyotyp-Korrelation der Gruppe III.....	89

12.2.2	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren	93
12.3	<i>Gruppe I - Pseudohermaphroditismus maskulinus</i>	95
12.3.1	Phänotyp-Karyotyp-Korrelation.....	95
12.4	<i>Gruppe II - Echter Hermaphroditismus</i>	96
12.4.1	Genetische Heterogenität	96
12.4.2	Phänotyp-Karyotyp-Korrelation.....	97
12.4.3	Vergleich mit anderen Autoren.....	98
12.5	<i>Vergleich der Ergebnisse von Gruppe II und III</i>	99
12.6	<i>Keimzellen in dysgenetischen Gonaden</i>	100
12.7	<i>Keimzelltumore bei Gonadendysgenese</i>	102
13	Keimzelltumoren - Diskussion	104
13.1	<i>Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren</i>	104
13.1.1	Reife Teratome.....	104
13.1.2	Unreife Teratome	105
13.1.3	Gemischte Keimzelltumoren	105
13.1.4	Embryonales Karzinom.....	107
13.2	<i>Weitere genetische Befunde an Keimzelltumoren</i>	108
IV	Zusammenfassung	113
V	Anhang	115
a)	<i>Abkürzungen</i>	115
b)	<i>Chemikalien und Lösungen</i>	116
c)	<i>Quantitative Ergebnisse</i>	118
d)	<i>Literaturverzeichnis</i>	124
e)	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	131
	Lebenslauf	133
	Danksagung	134
	Eidesstattliche Erklärung	135

I. Einleitung

Ein chromosomales Mosaik ist definiert durch die Anwesenheit verschiedener Zelllinien in einem Individuum. Die Zelllinien unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Zusammensetzung des Chromosomensatzes. Bei einer 45,X0/46,XY Situation findet man neben Zellen mit einem 45,X0 Chromosomensatz solche mit einem 46,XY Bestand. Bei der 45,X0/46,XY-Situation wird vor allem ein Verlust des Y-Chromosoms während der Mitose vermutet.

Das resultierende Mosaikmuster hängt von der Art der Zelllinie und deren Wachstum ab. Je später das Mutationsereignis stattfindet, desto niedriger ist der Anteil des aberranten Zellklons und damit die Ausprägung des Phänotyps. Die Effekte auf den Phänotyp werden von den beteiligten Chromosomen, von dem Anteil der abnormen Zellen und von dem Zeitpunkt zu dem das *non-disjunction*-Ereignis stattfindet, bestimmt.

Durch Proliferationsnachteile des aberranten Zellklons im betroffenen Gewebe kann sich sein Anteil durch Zellselektion zugunsten einer anderen Zelllinie verkleinern und somit unter eine „gewisse“ Nachweisgrenze fallen. Zum Beispiel schließt ein mit konventionellen zytogenetischen Methoden diagnostizierter 45,X0-Status die Anwesenheit einer zweiten Zelllinie nicht aus. So kann eine weitere, seltenere Zelllinie verborgen bleiben, weil sie unter der Detektionsgrenze liegt oder die Untersuchungen im „falschen“ Gewebe durchgeführt wurden.

Die große Variabilität bei Patienten mit Gonadendysgenese lässt die Vermutung zu, dass in einigen Organen oder Geweben ein Mosaik vorliegt oder während bestimmter Phasen der Embryonalentwicklung vorgelegen hat.

Wie stark sich eine solche Mosaikbildung auf den Phänotyp auswirkt soll in dieser Arbeit in Bezug auf die Geschlechtschromosomen untersucht werden. Dazu wurde die In Situ-Hybridisierung der Geschlechtschromosomen an Paraffinmaterial von dysgenetischen Gonaden und Keimzelltumoren durchgeführt.

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Untersuchung der Zusammensetzung der Geschlechtschromosomen in unterschiedlichen Gewebekomponenten von gonadalen und extragonadalen Keimzelltumoren. Hier sollen die Ergebnisse mit den biologischen Eigenschaften der jeweiligen Tumorkomponente verglichen werden.

Zunächst werden in der *Einleitung* die wesentlichen Gesichtspunkte zu den Gonadendysgenesen und den Keimzelltumoren geschildert. Weiterhin werden hier die theoretischen Hintergründe zur In Situ-Hybridisierung erläutert. Im Kapitel „*Patienten, Material und Methoden*“ werden die einzelnen Arbeitsschritte erläutert und das untersuchte Patientenkollektiv vorgestellt. Im Kapitel „*Ergebnisse*“ werden die Daten in Form von Graphiken gegliedert und nach Gonadendysgenesen und Keimzelltumoren dargestellt. Bei der *Diskussion* wird neben methodischen Aspekten besonders auf die Phänotyp-Karyotyp-Korrelation der untersuchten Fälle mit Gonadendysgenese eingegangen.

1 Gonadendysgenesien

Abweichungen der normalen Geschlechtsentwicklung mit dem Bild der Intersexualität können durch eine Vielzahl von Störungen bedingt sein. Intersexualität beschreibt dabei eine Abweichung des phänotypischen Geschlechts vom gonadalen oder chromosomalen Geschlecht. Das äußere Genitale kann also völlig unauffällig und sicher einem Geschlecht zuordenbar sein und dennoch kann eine Intersexualität vorliegen, da z.B. bei äußerem männlichen Genitale ein 46,XX Karyotyp oder bei äußerlich komplett weiblichen Genitale ein 46,XY Karyotyp vorliegt.

Vor mehr als 40 Jahren wurde gezeigt, dass der Nachweis eines Y-Chromosoms normalerweise mit einer männlichen Entwicklung und dessen Fehlen mit einer weiblichen Entwicklung assoziiert ist. Eine normale weibliche Entwicklung ist von dem Vorhandensein zweier X-Chromosomen abhängig. Bei nur einem X-Chromosom (45,X) liegt ein Ullrich-Turner Syndrom vor; der Phänotyp ist zwar normal weiblich, aber es kommt zu einer Gonadendysgenese, so dass die Pubertätsentwicklung oft gestört ist.

Beim Chromosomensatz 47,XXY kommt es zu einem Klinefelter-Syndrom. Eine Besonderheit stellen Fehlverteilungen der Gonosomen mit einer Mosaikbildung dar, so z.B. 46,XY/45,X oder 46,XX/46,XY und ähnlich. Hierbei kann die Entwicklung der Gonaden erheblich gestört sein und konsekutiv ist meist auch das äußere Genitale intersexuell.

Neben den Störungen, die mit einer Aberration der Geschlechtschromosomen einhergehen, sind weitere molokulargenetische (monogene) Veränderungen der geschlechts-determinierenden Gene oder endokrinologische Ursachen bekannt. Letztere entstehen meist auf dem Boden autosomal-rezessiver Veränderungen [Murken u. Cleve 1994]

Chromosomenaberrationen

- Ullrich-Turner-Syndrom
- Klinefelter-Syndrom
- Gemischte Gonadendysgenese
- Karyotyp 47,XXX
- Karyotyp 47, XYY
- strukturelle Veränderungen

Monogen bedingte Störungen

- Echter Hermaphroditismus
- XX-Männer
- Reine Gonadendysgenese

Endokrinologische Störungen

- Pseudohermaphroditismus femininus
- Pseudohermaphroditismus maskulinus

Tabelle 1-1: Störungen der Geschlechtsentwicklung, nach Sinnecker et al. 1994

Eine endgültige Diagnose des jeweiligen Krankheitsbildes kann häufig erst anhand der Kombination aus zytogenetischem Befund, klinischer Ausprägung und des morphologischen und histologischen Aufbaus der Gonaden gestellt werden. Eine mögliche Determinante für die Variabilität des Phänotyps stellt dabei der Anteil und die gewebespezifische Verteilung von Zellen mit Y-chromosomalem Material dar [McLaren 1990]. Die Untersuchung der Verteilung der Geschlechtschromosomen ist einer der Schwerpunkte dieser Arbeit.

Mosaike mit strukturell veränderten Chromosomen

Strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen durch Umbauten innerhalb eines Chromosoms. Durch strukturelle Veränderungen des Y-Chromosoms kann es zum Verlust des SRY-Gens kommen. Bei Patienten mit strukturell verändertem Y-Chromosom reicht die phänotypische Variabilität von Frauen mit typischen Turner-Syndrom Stigmata bis zu Männern mit Azoospermie oder unterschiedlich ausgeprägter Virilisierung. Das hier untersuchte Kollektiv umfaßt lediglich numerische Abweichungen, dennoch sind die phänotypischen Merkmale denen mit strukturell veränderten Y-Chromosom sehr ähnlich.

1.1 Geschlechtsdeterminierung

Das Geschlecht eines Menschen wird zum Zeitpunkt der Gametenfusion durch die Kombination der Geschlechtschromosomen in der Zygote bestimmt. Obwohl die Reifung der geschlechtlichen Funktion nach der Geburt stattfindet, laufen die wichtigen geschlechtsbestimmenden Schritte bereits während der Embryogenese ab. Diese Schritte können in zwei Phasen unterteilt werden:

1. Die **Geschlechtsdeterminierung**, mit der sich entscheidet, ob sich aus der Gonadenanlage Hoden- oder Ovargewebe bildet.
2. Die **Geschlechtsdifferenzierung** bei der die phänotypische männliche oder weibliche Ausprägung abläuft.

Die Anwesenheit des Y-Chromosoms ist hier der wichtigste Faktor, der entscheidet, ob sich die Gonade zu Hoden oder zum Ovar entwickelt. Anschließend bestimmen die im Hoden gebildeten Hormone die männliche Geschlechtsdifferenzierung. Fehlt die endokrine Funktion des Hodens kommt es zur weiblichen Differenzierung.

1.1.1 Männliche Geschlechtsdeterminierung

Auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms (Yp), proximal der autosomalen Region, ist die nötige Information für die männliche Geschlechtsdeterminierung enthalten. Der 14 kb große Bereich beinhaltet das SRY-Gen (sex determining region gene) [Sinclair et al. 1990]. Weitere autosomale oder X-chromosomal gebundene Gene wirken nach SRY in der Determinierungskaskade. Das WT1 Gen, lokalisiert auf Chromosom 11, sowie SF1 (Chromosom 9) scheinen für die Formation der undifferenzierten Gonade verantwortlich

zu sein. SF1 und SOX 9 bewirken die weitere Differenzierung embryonaler testikulärer Strukturen.

Neben SRY ist MIS (auch Anti-Müller-Hormon, AMH) der erste biochemische Marker der männlichen Entwicklung. Die Expression des MIS-Gens in Sertolizellen ist bereits 48 Stunden nach Beginn der SRY-Transkription nachweisbar [Gubbay et al. 1990]. Das MIS-Genprodukt ist für die Rückbildung der weiblichen Müllerschen Gänge in männlichen Embryonen verantwortlich.

In Abwesenheit des SRY-Gens entwickelt sich die bipotente Gonadenanlage prinzipiell zum Ovar. SRY kann jedoch nicht isoliert wirken. Bei Mutation oder Deletion anderer Gene, die an dem Determinierungsprozess beteiligt sind, bildet sich eine reine oder gemischte Gonadendysgenese. Das Auftreten von XY-Frauen mit Gonadendysgenese, in denen SRY intakt vorliegt und das Auftreten von XX-Männern, die keine SRY-Region tragen, impliziert das Vorhandensein anderer wichtiger Gene in der Kaskade. [Koopman 1999; Parker et al. 1999].

1.1.2 Weibliche Geschlechtsdeterminierung

In Abwesenheit eines Y-Chromosoms entwickelt sich die bipotente Gonadenanlage zum Ovar. Dieser Prozess läuft nicht automatisch ab, sondern ist durch mehrere ovarideterminierende Gene gesteuert. Wahrscheinlich kommt dem x-gebundenem DAX1 Gen eine solche Rolle zu. DAX1 kodiert einen nukleären Hormonrezeptor, der im Embryonalstadium in Zellen der Urogenitalrinne exprimiert wird [Parker et. al. 1999].

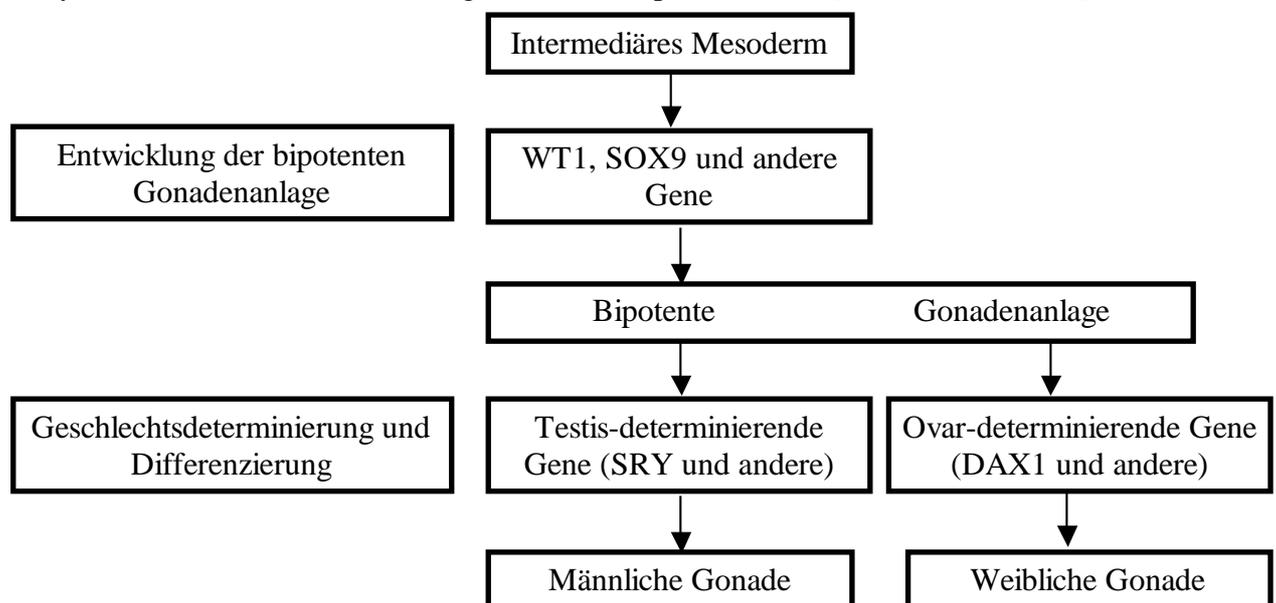


Abbildung 1-1: Zwei-Stufen-Modell der Geschlechtsdeterminierung (modifiziert nach Koopman, 1999). SRY hat keinen Einfluss auf die Entstehung der Gonadenanlage selbst, sondern steuert nachfolgende Differenzierungsprozesse. WT1 spielt eine Rolle bei der Umbildung des intermediären Mesoderms und bei der Erhaltung des Testisgewebes. DAX1 ist Mediator der ovariellen Entwicklung

1.2 Geschlechtsdifferenzierung

Bereits in der 4. Woche der embryonalen Entwicklung ist die undifferenzierte Gonadenanlage in Form von beidseitigen Verdickungen des **Zöломepithels** (Mesothel, das die Zöломhöhle auskleidet) erkennbar. Diese Teile der Urogenitalfalten werden als Genital- oder Gonadalleisten bezeichnet. Das **Zöломepithel**, das die primitiven Gonaden bedeckt, beginnt zu proliferieren. Es bildet die primitiven **Keimstränge**, die in das Mesenchym der Gonaden einwachsen.

Die primordialen Keimzellen wandern aus ihrem Ursprungsort, dem Dottersack, in die Gonade ein und gelangen in die **Keimstränge**. Bei weiblichen Individuen ordnen sie sich in der Rinde, bei männlichen im Mark der Gonade an.

Bei der **Entwicklung des Hodens** differenzieren die primären **Keimstränge** zu den samenbildenden Keimsträngen, den späteren Tubuli seminiferi. Innerhalb dieser Kompartimente bilden sich aus den Urgeschlechtszellen die Spermatogonien. Aus dem Mesenchym zwischen den Tubuli bilden die Leydigzellen, die bereits vor dem Ende der Embryonalperiode Testosteron produzieren.

Beim **Aufbau des Ovars** erfolgt die Differenzierung erst ab der 10. bis 12. Woche nach der Befruchtung. Die Rindenanteile proliferieren und bilden die sekundären Keimstränge. Während sie sich vergrößern nehmen sie die Urgeschlechtszellen auf. Etwa in der 16. Woche zerfallen die Rindenstränge in isolierte Zellhaufen, die Primärfollikel. Jede Oogonie ist nun von einer Lage Follikelepithelzellen umgeben. Bis zur Geburt sind alle Oogonien zu den primären Oozyten gereift. Sie treten in die erste meiotische Prophase ein und bleiben in diesem Stadium bis zur Geburt [Moore 1996; Huges et al. 1999].

Die **inneren Genitalien** entwickeln sich beim Mann aus dem Wolffschen, bei der Frau aus dem Müllerschen Gangsystem. Das männliche phänotypische Geschlecht entsteht, wenn in den Hoden die Sertolizellen das Anti-Müller-Hormon (AMH) produzieren. Diese steuert die Rückbildung der Strukturen der Müllerschen Gänge.

Testosteron ist für die Differenzierung der Strukturen der Wolffschen Gänge verantwortlich. Hieraus bilden sich Samenblase, Duktus deferens und Nebenhoden. Für die Differenzierung des Sinus urogenitalis und des äußeren Genitales ist Dihydrotestosteron verantwortlich. Es wird durch die 5-alpha-Reduktase aus Testosteron gebildet.

Bei der Frau findet normalerweise wegen des Fehlens von Testosteron keine Virilisierung statt. Die Ausbildung des weiblichen Phänotyps ist Östrogen-indiziert [Krege et al. 2000; Murken u. Cleve 1994; Sinnecker 1994].

1.3 Verschiedene Syndrome mit Gonadendysgenese

Fehlentwicklungen der Keimdrüsen werden allgemein als Gonadendysgenese bezeichnet. Die Beschreibung des Krankheitsbildes wird anhand des Karyotyps, der Anatomie der inneren und äußeren Genitalien und weiteren somatischen Veränderungen vorgenommen. Weiterhin ist der histologische Aufbau der Gonaden von besonderer Bedeutung. Übergänge zwischen den separaten Kategorien sind möglich, wodurch eine konkrete Zuordnung schwierig werden kann. Daneben ist häufig eine umfangreiche endokrinologische Diagnostik notwendig. In der Tabelle sind die häufigsten Chromosomenaberrationen bei Patienten mit dysgenetischen Gonaden angegeben:

Kein Mosaik	Mosaik ohne strukturelle Veränderungen	Mosaik mit strukturellen Veränderungen
46,XX	45,X/46,XX	45,X/46,X, + mar
46,XY	45,X/46,XX/47,XXX	45,X/ X,r(X)
45,X0	45,X/47,XXX	45,X/46,X,r(Y)
46,X,idic(Xq)	45,X/46,XY	45,X/46,X,idic(Xq)
46,X,r(X)	45,X/46,XY/47,XYY	45,X/46,X,idic(Xp)
46,X,del(Xp)	45,X/47,XYY	45,X/46,X,del(Xp)
46,X,del(Xq)		45,X/46,X,del(Xq)
46,X,idic(Yp)		45,X/46,X,idic(Yp)
46,X,idic(Yq)		45,X/46,X,idic(Yq)
46,X,del(Yp)		
46,X,del(Yq)		

Tabelle 1-2: Geschlechtschromosomen bei Gonadendysgenese [modifiziert nach Lippe et al. 1991].

1.3.1 Ullrich-Turner-Syndrom

Das Ullrich-Turner-Syndrom ist ein klinisch und zytogenetisch definiertes Erscheinungsbild. Es stellt eine der häufigsten Chromosomenaberrationen des Menschen dar und kommt in etwa 1 von 2500 lebend geborenen Individuen mit weiblichem Phänotyp vor [Lippe et al. 1991]. Die häufigsten somatischen Merkmale sind Minderwuchs, kardiale Anomalien und die Gonadendysgenese. Durch Ausfall der von den Ovarien produzierten Hormone kommt es zu einem hypergonadotrophen Hypogonadismus.

Man geht heute davon aus, dass bei den meisten lebend geborenen Fällen mit UTS eine Mosaikkonstellation vorliegt [Quilter et al. 1998]. Bei über 95% der Feten mit 45,X0-Status kommt es bis zur 28. Schwangerschaftswoche zum Abort. Zum Überleben in Utero wird die Anwesenheit einer weiteren Zelllinie angenommen, von deren Komplement ein fetoprotektiver Effekt ausgeht [Held et al. 1992; Fernandez-Garcia et al. 2000].

Beim Vorliegen einer Y-Chromosom tragenden Zelllinie neben der XO-Linie kann das UTS Übergänge zur gemischten Gonadendysgenese aufweisen [Bergendi et al. 1997]. Insbesondere bei einer Virilisierung der äußeren Genitalen ist an das Vorhandensein eines Y-Chromosoms zu denken [Bisat et al. 1993]. Neben dem klassischen Fall des 45,X0-

Karyotyps sind weitere strukturelle Aberrationen eines Gonosoms sowie verschiedene numerische Veränderungen zu beobachten :

Karyotyp	Häufigkeit
45,X	20,7
45,X/46,X,+mar	18,4
45,X/46,XX	17,2
45,X/46,X,i(Xq)	12,6
45,X/47,XXX oder 45,X/46,XX/47,XXY	6,9
45,X,i(Xq)	5,7
weitere komplexe Mosaik	5,7
45,X,del(Xq)	3,5
45,X/46,X,r(X)	3,5
45,X,del(Xp)	2,3
45,X/46,XY	2,3
weitere strukturelle Abweichungen	1,2

Tabelle 1-3 Typische Veränderungen und ihre Häufigkeit beim UTS (n=87), nach Held et al. 1992

Nach der Auswertung von Held et al. enthalten 79,3% aller Patienten mit Turner-Syndrom einen Mosaik-Karyotyp. Die äußeren Genitalien dieser Patienten können phänotypisch normal weiblich sein, oder in unterschiedlicher Ausprägung Zeichen der Virilisierung zeigen [Held et al. 1992; Bisat et al. 1993]. Insbesondere für die Prognoseabschätzung bei solchen Patienten im Sinne der Virilisierung und der Bildung eines Gonadoblastoms kommt dem Nachweis von Y-Chromosomen oder Y-Markerchromosomen eine besondere Bedeutung zu [Osipova et al. 1998]. Ist das Y-Chromosom nur in einigen Zellen vorhanden, entgeht es möglicherweise dem Nachweis durch die konventionelle Zytogenetik [Quilter et al. 1998].

Die Anwesenheit eines Y-Chromosoms wird mit einer Häufigkeit von 12% bis 15% für Patienten mit einem UTS beschrieben [Hanson et al. 2001].

Eine wichtige Determinante für die Variabilität des Phänotyps stellt auch bei Patienten mit UTS der Anteil und die gewebespezifische Verteilung von Zellen mit Y-chromosomalem Material dar [Bisat et al. 1993].

1.3.2 XX-Männer (Karyotyp 46, XX; Phänotyp männlich)

Bei diesen Patienten handelt es sich um regelrecht entwickelte Männer mit entsprechender Geschlechtsdifferenzierung. Zahlreiche Autoren beschreiben innerhalb der Gruppe der XX-Männer eine phänotypische Heterogenität [Fechner et al. 1993; McElreavey et al. 1992].

Die Hodenentwicklung erfolgt ohne zytogenetisch nachweisbares Y-Chromosom. Bei einem Teil der Patienten findet man kleine Hoden, eine Azoospermie und Infertilität. Es besteht ein primärer Hypogonadismus. Die sekundären Geschlechtsmerkmale sind dementsprechend unterentwickelt. Häufig besteht zusätzlich eine Gynäkomastie. Der Phänotyp dieser Männer ähnelt somit dem des Klinefelter-Syndroms [Murken u. Cleve

1994]. Bei XX-Männern liegt häufig eine Translokation der SRY-Region auf ein anderes Chromosom vor [Boucekkine et al. 1994].

1.3.3 Reine Gonadendysgenese

Genotypisch unterscheidet man bei der reinen Gonadendysgenese Krankheitsbilder mit dem Karyotyp 46,XY oder solche mit 46,XX. Phänotypisch sind **beide rein weiblich** differenziert. Bei der 46,XY Gonadendysgenese wird daneben eine **partielle** von einer **kompletten** Form unterschieden, wobei letztere als Swyer-Syndrom bezeichnet wird [Guidozzi et al. 1994; Berkovitz et al. 1991].

Bei **kompletter**, reiner Gonadendysgenese kommt es zu einer schnellen und frühzeitigen Degeneration der Gonaden. Das Krankheitsbild ist geprägt von einem hypergonadotrophen Hypogonadismus. Diese Form ist durch ein vollständiges Fehlen von testikulären Strukturen gekennzeichnet. Dabei liegen hier Streak-Gonaden vor, wobei der Gehalt an ovariellen Stroma variabel ist. Die äußeren Genitalien sind vollständig weiblich. Die Müllerschen Strukturen sind normal ausgebildet, da die Produktion des AMH fehlend oder unvollständig ist. [Berkovitz et al. 1991].

Die **partielle** Form weist eine teilweise testikuläre Differenzierung und ein intersexuelles Genitale auf. Die Gonaden können atrophisches Hodengewebe und Anteile ovariellen Stromas enthalten. Neben den endokrin aktiven Geweben können Gameten vorhanden sein. Es besteht häufig eine primäre Amenorrhoe. Die inneren Genitalien bestehen aus einer Mischung aus Wolffschen und Müllerschen Strukturen. Eine Virilisierung ist aufgrund der testikulären Funktion (Produktion von Androgenen durch Leydig-Zellen) möglich.

Hier besteht ein Übergang zum echten Hermaphroditismus, für dessen Diagnose der Nachweis von eindeutig differenziertem Hodengewebe und gleichzeitig von ovariellen Stroma gefordert ist.

Während bei der gemischten Gonadendysgenese Mosaikkonstellationen der Geschlechtschromosomen für die asymmetrische Struktur der Gonade verantwortlich sind, werden bei reinem 46,XY Karyotyp Mutationen des SRY-Gens oder anderer an der Geschlechtsdifferenzierung beteiligter Gene verantwortlich gemacht. Mutationen und Deletionen des SRY-Gens wurden in 20-30% der Fälle gefunden [Röpke et al. 2004; Krege et al. 2000; Städtler u. Helpap 1997; Murken u. Cleve 1994].

1.3.4 Gemischte Gonadendysgenese

Die gemischte Gonadendysgenese ist am häufigsten mit einer Mosaikkonstellation bestehend aus einem 45,X0/46,XY Chromosomensatz verbunden. Daneben werden Mosaiken mit strukturell veränderten Y-Chromosomen beobachtet [Petruveska et al. 1996; Reddy et al. 1996; Hsu 1994; Mendez et al. 1993]. Das Krankheitsbild ist charakterisiert durch das Auftreten einer **seitenungleichen Fehlbildung** mit einer **Streak-Gonade** auf der einen Seite und Gonadenentwicklung mit überwiegend Hodengewebe oder einer

rudimentären Ovaranlage auf der anderen Seite. Häufig wird hier von einer asymmetrischen Gonadendysgenese gesprochen. Daneben sind Fälle mit beidseitig rudimentären Ovarien oder Hoden bekannt. Insbesondere bei diesen Fällen besteht ein Übergang zum echten Hermaphroditismus [Städler u. Helpap 1997]. Bei Vorliegen einer Y-Chromosom tragenden Zelllinie neben der XO-Linie kann auf der anderen Seite das Turner-Syndrom Übergänge zur gemischten Gonadendysgenese aufweisen [Bergendi et al. 1997].

Ein Nebeneinander von Müllerschen und Wolffschen Strukturen ist in diesen dysgenetischen Gonaden möglich. Auf der Seite, auf der sich der Hoden differenziert hat, kann sowohl ein Duktus deferens als auch eine Tube entwickelt sein. Die fehlende Rückbildung der Müller-Gänge ist dabei auf eine unzureichende Hodenfunktion zurückzuführen. Im Bereich rudimentärer Ovarien sind Tuben oder ein hypoplastischer Uterus nachweisbar [Mendez et al. 1993]. Die äußeren Genitalien sind meist zwittrig, variieren jedoch zwischen normalem weiblichen Genitale, verbunden mit Minderwuchs und weiteren Turner Syndrom Stigmata, und männlichem Genitale mit Hypospadie oder Kryptorchismus. In einem Drittel der Fälle wird ein Gonadoblastom oder ein Dysgerminom beschrieben [Krege, S. et al. 2000].

1.3.5 Hermaphroditismus verus

Zur Definition eines echten Hermaphroditismus gehört der **gleichzeitige Nachweis** von **eindeutig differenziertem** Hodengewebe und typischen ovariellen Strukturen. Der äußere Phänotyp kann unauffällig männlich oder weiblich sein, ist meist jedoch intersexuell. Zur Zeit der Pubertät tritt eine Gynäkomastie auf. Die Betroffenen haben Menstruationen, die beim männlichen Phänotyp, z. B. als zyklische Hämaturie bemerkbar werden. Nach der Pubertät degenerieren die Hodenelemente.

Histologisch kann auf einer Seite ein Hoden und auf der kontralateralen Seite ein Ovar entwickelt sein. Man spricht dann von einem **lateralen** Hermaphroditismus. Eine **unilaterale** Form liegt vor, wenn auf der einen Seite ein Hoden oder ein Ovar gefunden wird und auf der Gegenseite ein Ovotestis vorliegt [Krege et al. 2000; Murken u. Cleve 1994].

Das rein ovarielle Gewebe liegt häufig in einem funktionstüchtigen Zustand vor. Dagegen werden die testikulären Anteile weitgehend als unreif beschrieben. Dementsprechend werden in den ovariellen Anteilen Follikel in allen verschiedenen Reifungsstadien gefunden. Alle Zeichen einer intakten Ovulation (z.B. Korpus luteum, Korpus albicans) können nachgewiesen werden. In den testikulären Anteilen sind bei jüngeren Patienten noch intakte Spermatogonien zu finden. Nach einem durchschnittlichen Alter von 8 Jahren wird dagegen überwiegend dysgenetisches Gewebe ohne intakte Spermio-genese gefunden [Krob et al. 1994]. Die Entwicklung der Wolffschen und Müllerschen Strukturen ist abhängig von der primären Differenzierung der jeweiligen Gonade [Berkovitz et al. 1982].

Bei Ausbildung eines Ovars kommt es überwiegend zur Bildung einer Tube, bei Ausbildung eines Hodens sind überwiegend Anteile des vas deferens und des Duc. Epididymis zu finden. In Zusammenhang mit einem Ovotestis können beide Strukturen nebeneinander gefunden werden [Boucekkine et. al. 1994]. Gonadale Tumoren werden in 5% der Fälle beschrieben. Am häufigsten werden ein Gonadoblastom, ein Dysgerminom oder ein Seminom beschrieben [Cortez et al. 1994].

Die Ursachen des echten Hermaphroditismus sind vielfältig und im einzelnen noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben einer Mosaikkonstellation mit einem Y-Chromosom werden eine Translokation von Y-chromosomalen Sequenzen und eine autosomale oder x-gebundene Mutation diskutiert [Torres et al. 1996; McElreavey, et al. 1993]. In 10% aller Individuen mit einem XX-Karyotyp konnte der Nachweis des SRY-Gens erbracht werden [Berkovitz et al. 1992]. Die Chromosomenanalyse ergibt in 60% einen 46,XX, in 7% einen 46,XY - Befund. In 33% der Fälle werden Mosaik gefunden, bei denen die zweite Zelllinie ein Y-Chromosom enthält [Krob et al. 1994]. Dabei werden Gonosomenmosaik wie (46,XX/46,XY), (45,X0/46,XY) oder (45,XX/46,XXY) beschrieben [Torres et al 1996].

1.3.6 Pseudohermaphroditismus

Bei diesem Krankheitsbild sind die Gonaden immer eindeutig differenziert. Bei dem Pseudohermaphroditismus **maskulinus** sind immer Hoden und bei dem Pseudohermaphroditismus **femininus** stets Ovarien nachweisbar.

Pseudohermaphroditismus femininus

Bei diesem Krankheitsbild sind das chromosomale und gonadale Geschlecht weiblich, das äußere Erscheinungsbild jedoch männlich. Dies ist durch eine vermehrte Androgenzufuhr oder fetale Eigenproduktion von Androgenen während der Embryonalphase begründet. Als Ursachen sind hier zu nennen:

- Androgenitales Syndrom (meist Cytochrom P450-Defekt)
- Andere Enzym-Defekte (z.B. 21-Hydroxylase-Mangel)

Pseudohermaphroditismus maskulinus

Beim männlichen Pseudohermaphroditismus, der auch unter der Bezeichnung „hairless women“ oder testikuläre Feminisierung bekannt ist, aber auch beim oben beschriebenen Swyer-Syndrom besteht ein 45,XY-Karyotyp, und es liegen normale Hoden vor. Das äußere Genitale ist jedoch von der Norm abweichend. Es kann vollständig weiblich, intersexuell oder männlich ausgebildet sein. Dem Krankheitsbild des Pseudohermaphroditismus maskulinus können jedoch verschiedene Ursachen zugrunde liegen [Krege et al. 2000; Murken u. Cleve 1994; Sinnecker 1994]: Letztlich ist durch eine unzureichende Testosteronwirkung das äußere Genitale unzureichend maskulinisiert. Aufgrund einer mangelhaften Wirkung des AMH kann das innere Genitale mehr oder weniger weiblich sein. Im Gegensatz dazu liegt beim Swyer-Syndrom eine genetische Entwicklungsstörung vor.

- gonadale HCG / LH-Resistenz (Leydigzellhyoplasie)
- Störungen der Testosteron-Biosynthese (verschiedene Enzymdefekte)
- Androgen-Rezeptor-Mangel oder Resistenz (testikuläre Feminisierung)
- Störungen des Androgenmetabolismus (alpha-Reduktase-Mangel)

1.4 Neoplastische Veränderungen bei Gonadendysgenese

1.4.1 Gonadoblastom

Das Gonadoblastom wird als Tumor, bestehend aus undifferenzierten Zellen die sich aus der Gonadenentwicklung herleiten, beschrieben. Das Gonadoblastom wird praktisch nur bei Patienten mit dysgenetischen Gonaden mit einem vollständigen oder auch mit einem strukturell veränderten **Y-Chromosom** gefunden. Es kann sich in 30% der Fälle zu einem Dysgerminom entwickeln [Sulatna et al. 1995]. Es handelt sich um einen endokrinologisch aktiven, malignen Tumor, dessen Aufbau an eine undifferenzierte Gonade erinnert. Die endokrine Aktivität der Tumorzellen manifestiert sich als Hyperandrogenismus [Mendes et al. 1999]. Da etwa 5% aller Patienten mit UTS solche Merkmale tragen, und da hier häufig Mosaik mit einem Y-Chromosom vorkommen, ist eine sorgfältige Suche nach der Tumorerläsion oder eine prophylaktische Gonadektomie indiziert [Lippe et al. 1991]. Bei Patienten mit gemischter Gonadendysgenese und einer 45,X0/46,XY-Konstellation wurde ein Risiko von 15 bis 20% zur Bildung eines Gonadoblastoms gefunden [Verp, M.S. et. al. 1987]. Canto et al. fanden bei Patienten mit Turner-Syndrom eine Inzidenz von 33% für das Gonadoblastom [Canto et al. 2004].

1.4.2 Andere Tumoren bei Gonadendysgenese

In der Literatur werden verschiedene Gonadendysgenese-Syndrome beschrieben, die mit Keimzelltumoren und anderen Neoplasien assoziiert sind. Patienten mit Klinefelter-Syndrom haben das höchste Risiko zur Bildung einer Neoplasie [Verp et al. 1987; Hasle et al 1992]. Besonders häufig werden beim Klinefelter-Syndrom extragonadale (mediastinale und abdominelle) Keimzelltumoren beobachtet [Wysocka et al. 1996]. Die Tabelle soll eine Übersicht über die, in der Literatur beschriebenen Keimzelltumoren bei Gonadendysgenese geben.

Quelle	Gonadendysgenese	Lokalisation	Tumor
Czauderna et al. 1998	Klinefelter-Syndrom	retroperitoneal	reifes Teratom
Hasle et al. 1992	Klinefelter-Syndrom	mediastinal	reifes Teratom und unreifes Teratom embryonales Karzinom, Chorionkarzinom
Seraj et al. 1993	Reine Gonadendysgenese 46,XY	Gonade	unreifes,malignes Teratom, Dysgerminom Dottersacktumor, gKZT: Chorioid CA und Anteile eines reifen Teratoms
Koo et al. 1992	Reine Gonadendysgenese 46,XY	Gonade (Ovar)	gKZT: unreifes malignes Teratom, reifes Teratom, Dottersacktumor
Bremer et al. 1993	Reine Gonadendysgenese 46,XY	Gonade	Gonadoblastom, Dottersacktumor reifes Teratom

Tabelle 1-4 Keimzelltumoren bei Gonadendysgenese. gKZT: gemischter Keimzelltumor

Das Carcinoma in situ des Hodens wird ebenfalls in Zusammenhang mit verschiedenen Störungen der Geschlechtsdifferenzierung beschrieben. Es konnte bei Fällen mit testikulärer Differenzierung und den verschiedenen Formen der Gonadendysgenese nachgewiesen werden [Ramani et al. 1993; Cortez et al. 1994].

2 Keimzelltumoren

Keimzelltumoren (KZT) sind benigne oder maligne Tumoren, die von den Keimzellen abstammen und unterschiedliche Differenzierungsmuster besitzen. Sie sind gonadal oder extragonadal lokalisiert. Das biologische Verhalten der Tumoren resultiert aus dem histologischen Typ, Lebensalter, Geschlecht und der Lokalisation [Harms 1997].

In Deutschland beträgt die Inzidenz für KZT des Kindesalters 0,9/100.000 für Mädchen und 2,6/100.000 für Jungen. Maligne Keimzelltumoren machen 2,9% aller malignen Tumoren bei Kindern bis zum 15. Lebensjahr aus [Göbel et al. 2000]. Bei Neugeborenen werden am häufigsten gutartige, reife und unreife Teratome oder Dottersacktumoren diagnostiziert [Hart 1997]. Bei Kleinkindern dominieren, extragonadal das Steißbeinteratom und gonadal der Dottersacktumor des Hodens, während Dysgerminome und Dottersacktumoren des Ovars hauptsächlich bei älteren Mädchen vorkommen [Harms 1997].

2.1 Ätiologie von Keimzelltumoren

Als Ausgangs- oder Ursprungszelle der Keimzelltumoren wird eine primitive, omnipotente Keimzelle angesehen. Sie kann sich zu Neoplasien mit embryonaler oder extraembryonaler Differenzierung entwickeln [Göbel et al. 2000; Dietel 1997; Harms 1997; Gonzalez-Crussi 1970].

Derzeit wird von den meisten Autoren die Hypothese vertreten, dass sich sämtliche Keimzelltumoren von dieser unreifen primordialen Keimzelle ableiten. Man spricht dabei von der „holistischen“ - Keimzelltheorie. Der Dottersacktumor und das Chorionkarzinom folgen dabei einer extraembryonalen Differenzierung. Sie sind durch ihre endokrine Aktivität charakterisiert. Das embryonale Karzinom ist ein Tumor aus hochmalignen totipotenten Zellen. Teratome weisen ebenfalls eine embryonale Differenzierung auf. Hier finden sich differenzierte Gewebe aller drei Keimblätter nebeneinander. Unreife Teratome werden durch den Anteil der undifferenzierten Gewebeanteile definiert. Germinomatöse Tumoren, wie das Seminom (Hoden) und das Dysgerminom (Ovar) oder das Germinom (extragonadal), können als Tumoren bezeichnet werden, die morphologisch Anzeichen undifferenzierter Keimzellen aufweisen. Besonders häufig werden gemischte Tumoren beschrieben, bei denen mehrere histologische Differenzierungsmuster nebeneinander vorliegen [Harms 1997; Hart 1997].

Für die Theorie, dass sich die KZT aus einer gemeinsamen Ursprungszelle ableiten sprechen folgende Argumente [Schneider et al. 2001; Göbel et al. 2000; Harms 1997]:

- häufige Manifestation/Ähnlichkeiten der histologischen Muster (Tumoren von mehr als einem histologischen Typ mit ähnlicher Zusammensetzung)
- gleichartige Tumoren gonadal und extragonadal
- Homologie in männlichen und weiblichen Gonaden
- nahezu identische genomische Konstitution der malignen KZT

Entstehung extragonadaler Tumoren

Eine unvollständige Migration der Keimzellen wird als Ursache für die extragonadalen KZT angesehen. Alternativ wird diskutiert, dass extragonadale KZT aus versprengten embryonalen Zellen entstehen, die sich der Organisation des embryonalen Zellverbandes entzogen haben [Perlman 1998].

Entstehung von Teratomen

In früheren Untersuchungen wurde darauf hingewiesen, dass sich Teratome auch durch die Parthenogenese, also durch Fusion zweier haploider Keimzellen entwickeln können. Hier würde in weiblichen Individuen stets ein XX-Karyotyp und bei männlichen Individuen z.T. eine XX oder eine XY-Konstellation vorliegen.

Weiterhin kann es schwierig sein, zwischen einem Teratom und Anteilen eines abortiven Zwillings zu unterscheiden. Hier wird die Möglichkeit diskutiert, dass es sich bei einem Teratom um versprengtes embryonales Gewebe handelt. Dabei ist die Trennung zwischen einer echten Zwillingbildung, einer parasitären Doppelmißbildung (Verschmelzung zweier Keimzellen), einem Fetus-in-Fetu und einer echten Neoplasie zu beachten.

Fetus-in-Fetu

Bei dem Fetus-in-Fetu handelt es sich um einen monozygoten Zwilling und nicht um eine Neoplasie. Hier werden ein identisches Geschlecht, Blutgruppe und identische molekulargenetische Marker beschrieben [Kumar et al. 1999; Shin et al. 1999; Thakral et al. 1999]. Im Gegensatz zum Fetus-in-Fetu findet sich beim Teratom keine strukturelle Organisation im Sinne von Extremitäten und Organanlagen [Hart 1997].

2.2 Wichtige Merkmale pädiatrischer Keimzelltumore

Im Folgenden soll auf einige Merkmale der wichtigsten Tumoren eingegangen werden, wobei der Schwerpunkt auf den histologischen Parametern liegt:

Dysgerminom - DYS (Germinom, Gonozytom, Seminom)

Diese Tumoren stellen einen der häufigsten malignen KZT des Kindesalters dar. Besonders häufig finden sich diese Tumoren in Zusammenhang mit dysgenetischen Gonaden und einem Gonadoblastom [Dietel, M. 1997; Harms, D. und Schmidt, D. 1997]. Die Tumoren

werden von wasserklaren, relativ großen Zellen mit deutlich erkennbaren Zellmembranen gebildet. Die Kerne sind auffallend groß, vesikulär und enthalten deutliche Nukleolen.

Teratome

Teratome im Kindesalter sind benigne Keimzelleoplasien. In ihrer Zusammensetzung weisen sie häufig Derivate aller drei Keimblätter auf. Daneben sind monodermale Läsionen mit nur einer Keimblattendifferenzierung zu finden.

Reifes Teratom - TD

Der Tumor besteht ausschließlich aus ausgereiften Geweben. Es können oragnoiden Strukturen vorkommen. Mitosen sind äußerst selten oder fehlen. Dabei können alle im Körper vorkommenden Gewebestrukturen von diesen Tumoren nachgebildet werden. Am häufigsten sind ektodermale Strukturen mit Haut, Hautanhangsgebilden und die verschiedensten Epithelverbände.

Unreifes Teratom - IT

Die meisten unreifen Teratome werden im Kindesalter in extragonadalen Lokalisationen gefunden. Zumeist besteht hier eine Mischung aus unreifen und reifen Gewebeanteilen. Dabei finden sich neben den üblichen reifen Komponenten, überwiegend ektodermale und mesodermale unreife (embryonale) Elemente. Die häufigste unreife ektodermale Differenzierung sind neurogene (neuroektodernale) Strukturen. Hier finden sich glio-, neuro- und medulloblastomatöse sowie ependymale Anteile. Die Zellen sind häufig in Form primitiver Neurotubuli angeordnet [Dietel 1997]. Diese bestehen meist aus Aggregaten kleiner Zellen mit hyperchromatischen Kernen. Die mitotische Aktivität ist variabel und nimmt mit dem Grad der Unreife zu [Harms 1997]. Da der Umfang der inkomplett differenzierten Gewebeanteile stark variiert, werden zur Beurteilung die verschiedenen Grade der Unreife quantitativ beschrieben. Dabei wird nach einem Schema von Thrubeck und Scully das Ausmaß der unreifen Gewebeanteile berücksichtigt [Harms 1997].

<i>Anteil unreifen Gewebes</i>	
Grad 1	< 10 %
Grad 2	10 - 50 %
Grad 3	Über 50 %

Tabelle 2-1: Klassifikation nach Gonzalez-Crussi 1970, zitiert nach Harms 1997.

Teratom mit maligner Transformation

Diese Tumoren werden am häufigsten im Adoleszentenalter und bei jungen Erwachsenen gefunden. Das Teratom enthält eine maligne Komponente von einer Art, die auch in Malignomen anderer Organe oder Gewebe anzutreffen ist. Hier stellen Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und Sarkome die häufigsten Formen dar. Dabei besteht eine „sekundäre Kanzerisierung“ von primär reifen Strukturen (z.B. Plattenepithelkarzinom) [Harms 1997].

Dottersacktumor - YST (endodermaler Sinustumor)

Die meisten YST sind in der sakrokokzygealen Region zu finden und treten bevorzugt in den ersten Lebensjahren auf. Auch bei den Tumoren mit mehr als einem histologischen Typ ist dieses Neoplasma die häufigste maligne Komponente [Perlman 1998]. Dottersacktumoren zeichnen sich durch einen morphologischen Formenreichtum aus, wobei hier häufig Gewebestrukturen der frühen Embryonalphase auftreten. Das Tumorgewebe zeigt einige „Basismuster“: Es werden eine girlandenförmige Anordnung („*festoon pattern*“), retikuläre, solide oder polyvesikuläre Anordnungen beschrieben [Harms 1997]. Typisch für Dottersacktumoren sind knopfförmige, epithelbedeckte Gefäßvorwölbungen, sogenannte Schiller-Duval Körperchen [Dietel 1997].

Tumoren von mehr als einem histologischen Typ - gKZT

Tumoren, die sich aus zwei oder mehreren der oben genannten Einzelformen aufbauen, werden als gemischte Keimzelltumoren beschrieben. Die WHO versteht hierunter die Kombination sämtlicher Keimzelltumoren miteinander. In der Literatur wird dann von „Tumoren mit mehr als einem histologischen Typ“ gesprochen [Harms 1997; Städtler u. Helpap 1997]. Der Begriff Teratokarzinom wird nach der WHO-Klassifikation für die Kombination aus einem embryonalen Karzinom und einem Teratom vergeben

3 Grundlagen zur In Situ-Hybridisierung

Allgemeines

In der hier vorliegenden Arbeit werden die Geschlechtschromosomen an Paraffinmaterial dargestellt. Die gewonnenen Präparate sind mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop ausgewertet worden. Dabei ist nach der Applikation der Y-Chromosom-spezifischen Sonde in Zellen mit männlichem Kerngeschlecht ein Signal erkennbar, während „weibliche“ Zellen negativ bleiben. Die In Situ-Hybridisierung (ISH) mit der X-Chromosom-spezifischen Sonde ergibt in den weiblichen Zellen zwei Signale, in männlichen Zellen hingegen nur ein Signal.

Zahlreiche ISH-Studien in Form von Interphase-zytogenetischen Untersuchungen wurden an neoplastischen Geweben durchgeführt. Dagegen sind Arbeiten an Geweben mit bekannten numerischen Aberrationen, wie bei den Gonadendysgenesien an Paraffin-eingebettetem Material, in geringerem Umfang mit der konventionellen ISH durchgeführt worden. Hier stehen Untersuchungen mit der FISH-Technik an Zellkulturen oder PCR-Untersuchungen im Vordergrund.

Die In Situ-Hybridisierung dient der direkten Lokalisation von Chromosomen, Genen oder RNA/DNA-Sequenzen [Chan et al. 1990]. Im Jahr 1969 führten Gall und Pardue erstmals eine In Situ-Hybridisierung durch. Vor etwa zehn Jahren begann man, nicht-radioaktive Verfahren zu entwickeln. Dafür werden die Sonden mit Biotin oder Digoxigenin markiert. Die Hybride können anschließend durch enzymatische Verfahren sichtbar gemacht werden [Herrington et al. 1989], wobei eine Signalverstärkung durch immunocytochemische Verfahren zur Anwendung kommt [Edberg 1985].

Cremer prägte 1986 den Begriff der Interphasen-Zytogenetik. Dies bedeutet, dass die Chromosomen direkt im Interphasekern untersucht werden können [Cremer et al. 1986]. Hier besteht die Möglichkeit, die Chromosomen in sich nicht teilenden Geweben zu untersuchen. Erste Anwendungen der Interphase-Zytogenetik werden bei der Bestimmung von Aneuploidien an Interphasekernen von malignen Tumoren beschrieben [Anastasi et al. 1991; Arnoldus et al. 1991; Hopman et al. 1991]. Eine weitere Entwicklung ist die mehrfarbige FISH-Technik (Floureszenz In Situ-Hybridisierung). Hier sind die Sonden für die getrennt zu lokalisierenden DNA-Sequenzen mit unterschiedlichen Flouorchromen, markiert. So können mehrere, verschiedenfarbige Signale gleichzeitig im Floureszenzmikroskop sichtbar gemacht werden [Höfler 1990].

Prinzip der In Situ - Hybridisierung (ISH)

Im Verlauf dieses Verfahrens wird ein histologischer Schnitt oder eine Kernpräparation mit spezifischen DNA-Sonden (200 - 800 bp lange DNA-Sequenzen) hybridisiert. Diese Sonden binden an die jeweilige gesuchte Ziel-DNA (hier die Geschlechtschromosomen) in den Zellkernen des untersuchten Gewebes. Um dies zu ermöglichen, muss das Gewebe zunächst aufgelockert werden, um eine Penetration der Sonde zu erreichen. Anschließend

werden Sonde und Ziel-DNA denaturiert, so dass diese einzelsträngig vorliegen. Da die DNA-Sequenz der Sonden komplementär zu der gesuchten chromosomalen DNA ist, bindet diese dort, und es entsteht ein neues „Hybrid“ aus Chromosomen-DNA und Sonde. Die eingesetzten Sonden wurden zuvor mit einem chemisch veränderten Nukleotid (z.B. durch Biotin oder Digoxigenin) versehen. Dadurch können die im Hybrid gebundenen Sonden mit Hilfe der Immundetektion direkt im histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden. Die hier verwendeten kommerziell erhältlichen Sonden werden vom Hersteller mit Digoxigenin markiert geliefert.

Schematisch lässt sich die In Situ-Hybridisierung durch verschiedene Schritte beschreiben:

1. Vorbehandlung des zu untersuchenden Gewebes
2. Hybridisierung der Ziel-DNA mit einer Sonde
3. Detektion der erfolgten Hybridisierung

Die Fixierung der Gewebe macht eine Vorbehandlung erforderlich, um die Penetration der Sonde an die Ziel-Nukleinsäure zu ermöglichen [Arnoldus et.al. 1991]. Die eigentliche Hybridisierung besteht aus einer Aneinanderlagerung korrespondierender Basenpaare zwischen einer markierten Sonde und der Ziel-Sequenz. Dabei bedeutet „*In - Situ*“, dass die Hybridisierung sich in der Zelllokalisierung ereignet, in der sich die zu untersuchende Nukleinsäuresequenz befindet. Zur Sichtbarmachung werden Enzyme eingesetzt, die dann mit einem Substrat einen unlöslichen Farbkomplex bilden. Als Bindeglied und zur Verstärkung der Signale kann ein Zweitantikörper verwendet werden, der die spezifischen Strukturen des Primärantikörpers erkennt.

3.1 Vorbehandlung des Gewebes

Auf Grund der Gewebefixierung entstandene Proteinvernetzungen müssen diese durch einen enzymatisch-proteolytischen Schritt so weit aufgelöst werden, dass die Chromosomsonde zur Ziel-DNA gelangen kann. Bei der enzymatischen Andauung muss in jedem individuellen Fall durch die experimentelle Ermittlung von Andauzeiten ein Kompromiss zwischen Zellmorphologie und Signalintensität gefunden werden [Arnoldus et al. 1991].

Die besten Ergebnisse sind durch eine Vorbehandlung der Gewebe mit Natrium-Thiocyanat (NaSCN) und einer folgenden enzymatisch-proteolytischen Andauung mit Pepsin zu erreichen [Arnoldus et al. 1991; Hopman et al. 1991]. NaSCN als effektives Protein-denaturierendes Agens führt zu einer Trennung oder Denaturierung der DNA-Histon-Komplexe [Hopman et al 1990]. Vor dieser proteolytischen Behandlung ist eine Vorbehandlung mit Citronensäure-Puffer in der Mikrowelle günstig. Dieser Schritt reduziert die anschließende Pepsinzeit und trägt zur Erhaltung der Gewebemorphologie bei [Henke, R.P. et.al. 1994/97].

3.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung ist abhängig von der Fähigkeit der denaturierten DNA, mit komplementären Nukleinsäuresequenzen eine Bindung einzugehen. Die Temperatur bei der Denaturierung soll gerade unter dem Schmelzpunkt der DNA liegen. Hierbei liegt die Hälfte der DNA als Einzelstrang vor. Eine Herabsetzung des Schmelzpunktes ist wünschenswert, da hierdurch die Morphologie der Präparate besser erhalten bleibt. Bei zu hohen Temperaturen kommt es zudem zu einer Zerstörung der Chromosomen. Eine Senkung des Schmelzpunktes der Ziel-DNA wird durch bestimmte Faktoren, wie Formamid- und Ionenkonzentration erreicht. Damit ist der Hybridisierungsprozess von bestimmten Parametern abhängig [Höfler 1990]:

T_m =	Schmelzpunkt [°C] der DNA, bei der die Hälfte der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen denaturiert ist
%G-C =	Gehalt an den Nukleotiden Guanin und Cytidin (je höher der Gehalt an G und C, desto höher ist T_m)
L =	Länge des Doppelstrangs [kB, Kilobasen] der Sonde (je länger der Doppelstrang, desto stabiler ist das Hybrid)
M =	Konzentration von monovalenten Kationen [mol/l]
F =	Menge an Formamid [%]

Die genaue Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches ist im Anhang angegeben [nach Hopman et al. 1991].

Auf Grund dieser Überlegungen werden die DNA-Sonden in einem Hybridisierungsgemisch verwendet, das sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

- Formamid, welches die Hybridisierungstemperatur senkt und somit hilft, die Morphologie der Chromosomen aufrecht zu erhalten. Daneben soll es unspezifische Bindungen der Sonde verhindern.
- SSC-Puffer; liefert Natriumionen, welche die negativen Phosphationen der Einzelstränge neutralisieren und somit die Abstoßung der Einzelstränge herabsetzen. Hohe Ionenkonzentrationen fördern deshalb die Basenpaarung, setzen aber die Spezifität herab.
- Dextransulfat beschleunigt die Hybridisierung, die Sonde wird durch die gebildete Matrix des Dextransulfats lokal konzentriert.
- Heringssperma-DNA verhindert die unspezifische Bindung der Sonde durch Blockade von Sequenzen im Zytoplasma und im Zellkern.

3.3 Stringenz

Die Stringenz, mit der die Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den Prozentsatz korrekt gepaarter Nucleotide im Doppelstrang aus Sonde und Ziel-DNA. Sie wird ebenfalls von den oben beschriebenen Faktoren beeinflusst. In der Waschlösung nach der Hybridisierung erschwert Formamid die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Einzelsträngen und löst zusammen mit SSC falsch hybridisierte Signale. Hierdurch wird die Stringenz erhöht [Leitch et al. 1994].

3.4 Satelliten-Sonden

<i>DXZ1</i>	Fa. Oncor	X-Chromosom
<i>DYZ3</i>	Fa. Oncor	Y-Chromosom
<i>DYZ2</i>	Fa. Boehringer	Y-Chromosom.

Tabelle 3-1: Verwendete Sonden

Die hier eingesetzten Chromosomensonden sind hochspezifisch gegen die jeweiligen menschlichen Chromosomen gerichtet. Die Sonden DXZ1 und DYZ3 (Alpha-Satelliten-Sonden) hybridisieren mit hochrepetitiven Sequenzen der Zentromerregion der jeweiligen Chromosomen [Waye et. al 1985]. Diese wird als Alphaliod-Region oder Alpha-Satelliten-DNA bezeichnet. Diese DNA besteht aus Monomeren die etwa 170 Basenpaare lang sind. Da hunderte bis tausende dieser Monomere am menschlichen Zentromer lokalisiert sind, sind sie ein ideales Ziel für die ISH [Anastasi et al. 1991]. Die Sonde DYZ2 hingegen bindet an der Satelliten-DNA im Heterochromatin des langen Arms des Y-Chromosoms. [Cooke et. al 1982]. Die Länge dieser Sonde umfasst ca. 200 - 500 Basen [Produktinfo Fa. Böhrringer].

3.5 Detektions - System

Bei dem hier verwendeten Detektionssystem werden die Digoxigenin-markierten Sonden durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen und dieses Reaktionsprodukt durch Immundetektion verstärkt sowie mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht [Cremers et al. 1987]. Der Maus-Anti-Digoxigenin-Antikörper dient zum Nachweis der Nucleinsäuresequenz (Sonde). Die Detektion des gebundenen Antikörpers wird in zwei weiteren Schritten mit Anti-Maus-Biotin-Konjugat und einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex durchgeführt. Das Streptavidin geht eine hochspezifische und feste Bindung mit Biotin ein. Da Biotin mehrere Streptavidinmoleküle binden kann, lässt sich so das Signal verstärken [Leitch et al. 1994]. Das im Komplex gebundene Enzym (Meerrettich-Peroxidase, HRPO) wird zur Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gebracht. Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von DAB, so dass an der Hybridisierungsstelle ein brauner Präzipitat entsteht [Leitch et al. 1994]. Auf diese Weise entstehen um jede Sonden-Antikörper-Einheit Farbanlagerungen, die unter dem Mikroskop als kleiner, internukleär gelegener brauner Punkt (Signal) erkennbar sind. In dem DAB-System kommen Edelmetalle zur Signalverstärkung zum Einsatz [Cremers et al. 1987]. Die Detektion digoxigener Sonden weist keine Nachteile gegenüber der Anwendung Biotin-markierter Sonden auf: Digoxigener Sonden können mit der gleichen Sensitivität nachgewiesen werden wie biotinylierte Sonden [Herrington et al. 1989 und 1990]

Das mehrstufige Nachweisverfahren ist im allgemeinen sensitiver als ein einstufiges, da an jedem primären Antikörper mehrere sekundäre Bindungen entstehen und so das Signal verstärkt wird [Leitch et al. 1994].

4 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der Interphasenzytogenetik kann eine direkte Darstellung der Chromosomen im Gewebe erfolgen. Dabei soll die Anwendbarkeit der Methode an Paraffinmaterial getestet werden. Hierzu wurden Vorversuche durchgeführt und Vergleichspräparate angefertigt. Im Hinblick darauf wurden folgende Gesichtspunkte bearbeitet:

Etablierung der Interphasen-Zytogenetik an Paraffinschnitten von männlichen und weiblichen Gonaden zur Darstellung der Geschlechtschromosomen:

- Testen verschiedener kommerzieller Sonden für das X- und das Y-Chromosom.
- Testen verschiedener Modifikationen der Ausgangsmethode, besonders hinsichtlich der Gewebepreparation und Andauung von gonadalem Gewebe.
- Optimierung der Schnittdicke und Sondenkonzentration an gonadalem Gewebe.

Die folgende Zielsetzung und Fragestellung bezieht sich auf die Auswertung der Vergleichspräparate und Vorversuche:

Zielsetzung / Fragestellung in Bezug auf die Anwendbarkeit der Methode:

- Ist die Darstellung des zu erwartenden Chromosomensatzes mit dieser Methode möglich ?
- Ist eine Geschlechtsbestimmung mit dieser Methode möglich ?
- Kann mit der In Situ-Hybridisierung unterschieden werden, ob ein Mosaik oder eine einheitliche Chromosomenkonstellation vorliegt ?
- Lässt sich die Kopienzahl der Geschlechtschromosomen in unterschiedlichen Gewebekomponenten bestimmen ?
- Ist die Darstellung der Geschlechtschromosomen in männlichen und weiblichen Keimzellen möglich ?

Zwischen den verschiedenen Formen mit Gonadendysgenese bestehen jeweils Übergänge, so dass eine Zuordnung zu einem bestimmten Krankheitsbild häufig schwierig ist. Ursächlich werden bei diesen Krankheitsbildern häufig gonosomale Mosaik innerhalb der Gonaden angenommen.

Vor diesem Hintergrund soll geklärt werden, ob sich die fraglichen Differenzialdiagnosen anhand der Verteilung der Geschlechtschromosomen innerhalb der Gonade klären bzw. ausschließen lassen. Hierbei soll untersucht werden, ob sich die (quantitative) Verteilung der Geschlechtschromosomen innerhalb der Gonaden eignet, eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Krankheitsbildern zu treffen.

Die Ergebnisse sollen mit denen anderer Autoren verglichen werden, wobei hier besonderes Augenmerk auf die gewebespezifische Verteilung der Chromosomen gelegt wird. Insbesondere steht hier die Korrelation der phänotypischen Ausprägung (Histologie) und der Verteilung der Geschlechtschromosomen (ISH-Ergebnis) im Vordergrund. Dabei werden bei der Untersuchung der Gonadendysgenesen folgende Fragen erörtert:

Untersuchung an Gonadendysgenesien

- Ist die Darstellung eines Chromosomenmosaiktes möglich ?
- Lässt sich die quantitative Ausprägung der verschiedenen Zelllinien ermitteln ?
- Vergleich der Ergebnisse an Gonadendysgenesien mit denen der Routinezytogenetik. Lässt sich die humangenetisch ermittelte Mosaiksituation bestätigen / darstellen?
- Ist die Verteilung der Geschlechtschromosomen bei allen Fällen mit Gonadendysgenese gleich ?
- Lassen sich bestimmte Verteilungsmuster unterschiedlichen Syndromen mit Gonadendysgenese zuordnen ?
- Wie verhalten sich die Geschlechtschromosomen in unterschiedlichen Gewebekomponenten ?
- Lassen sich bei einer Mosaiksituation bestimmte Verteilungsmuster männlichen bzw. weiblichen Geweben zuordnen ?
- Wie verhalten sich die Geschlechtschromosomen in Keimzellen bei Patienten mit Gonadendysgenese und Mosaikkonstellation ?
- Lässt sich ein Einfluss der Mosaikkonstellation auf den Phänotyp feststellen ?

Darüber hinaus sollen die Aberrationen der Geschlechtschromosomen an Keimzelltumoren bestimmt und diese Ergebnisse mit den biologischen Eigenschaften der jeweiligen Tumorkomponente verglichen werden. Da sich gutartige Tumoren histologisch schwer von parasitären Doppelfehlbildungen (ektopy Schwangerschaft; Fetus in Fetu) unterscheiden lassen, soll die In Situ-Hybridisierung hier als diagnostisches Mittel getestet werden. Folgende Punkte sind Gegenstand dieser Untersuchung:

Untersuchung an Keimzelltumoren

- Liegen numerische Aberrationen der Geschlechtschromosomen in pädiatrischen Keimzelltumoren vor ?
- Stimmt das Ergebnis der In Situ-Hybridisierung mit dem Geschlecht des Trägers überein ?
- Lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse zur Pathogenese reifer Teratome ziehen ?
- Liegt eine einheitliche Verteilung der Geschlechtschromosomen im Tumorgewebe vor ?
- Vergleich der Tumoreigenschaften (Dignität) mit der Chromosomenkonstellation.
- Vergleich der Ergebnisse an gemischten Tumoren zwischen gutartigen und malignen Gewebekomponenten.
- Vergleich der Resultate mit denen anderer Autoren.

II. Patienten, Material und Methoden

5 Methodik

Dem folgenden Verfahren liegt ein von Hopman et al. 1991 beschriebenes Protokoll zugrunde. Für die Anwendung erwies sich eine nach Henke beschriebene Modifizierung dieses Protokolls als zweckmäßig. Henke et al. stellen der eigentlichen proteolytischen Behandlung eine zusätzliche Vorbehandlung mit Citronensäure-Puffer in der Mikrowelle voran [Henke et al. 1993a und 1994].

Darüber hinaus wurde bei der hier eingesetzten Methode ein Digoxigenin-markierte Sonde und ein entsprechender primärer Antikörper angewendet, während die oben genannten Autoren mit Biotin-markierten Sonden arbeiteten. Zum Herstellen der Präparate wurden jeweils mehrere Schnitte von einem Block mit unterschiedlichen Pepsinzeiten angefertigt. Zur Auswertung wurde anschließend der Schnitt mit der höchsten Signaldichte verwendet. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden die Überschichtungen gegen das X- bzw. das Y-Chromosom jeweils an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

5.1 Vorbereitung

1. Anfertigen der Paraffinschnitte

6µm dicke Paraffinschnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen und für 1 Stunde bei 60° C aufbewahrt, um das Haften des Gewebes auf dem Objektträger zu verstärken. Die Verwendung speziell beschichteter Objektträger ist ebenfalls für die Haftung der Schnitte entscheidend.

2. Entparaffinierung des Gewebes

Die Schnitte wurden in Xylol für zwei mal fünf Minuten entparaffiniert, für weitere 10 Minuten in Methanol gespült und anschließend an der Luft getrocknet.

3. Andauung

Die Schnitte wurden zunächst in einer Kunststoffküvette mit der Citronensäure-Lösung (ph 6) in einer Mikrowelle bei 720W Leistung für zwei Minuten erhitzt.

Nach einer Abkühlphase von zwei Minuten erfolgte die Behandlung mit Natriumthiozyanat (1M) bei 80° C im Wasserbad für 10 Minuten. Die NaSCN-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt: 8,17g/100ml. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit Aqua dest. gewaschen und auf 37° C im Wasserbad temperiert.

Die Proteolyse erfolgte mit 3mg/ml Pepsin in 0,2 M HCl. Die Andauungszeit musste für jeden einzelnen Fall individuell ermittelt werden. Hierzu wurde der jeweilige Schnitt mit der Pepsin-Lösung in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert und die Gewebemorphologie in Abständen von 2 bis 3 Minuten unter dem Mikroskop kontrolliert. Zur hierdurch ermittelten (maximalen) Andauzeit wurden anschließend zwei weitere identische Schnitte mit reduzierten Andauzeiten im gleichen Versuchsdurchgang überschichtet. Am häufigsten lagen die Pepsinzeiten in einem Bereich von 4 bis 8 Minuten.

Zum Beenden der Proteolyse wurden die Schnitte zweimal kurz und einmal für 5 Minuten mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Präparate an der Luft getrocknet und auf einer Heizplatte bei 80° C für 30 Minuten temperiert, da die nachfolgende Denaturierung der Sonden ebenfalls bei dieser Temperatur stattfindet.

5.2 Hybridisierung

Vorbereitung und Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die Sonden DYZ3 und DXZ1 (Fa. Oncor) mit 6µl und die Sonde DYZ2 (Fa. Böhlinger) mit 3µl auf 100 µl Hybridisierungslösung verdünnt.

Für die Hybridisierung müssen die Sonden sowie die Ziel-DNA denaturiert werden. In dem hier gewählten Protokoll wurde die gemeinsame Denaturierung durchgeführt:

- Je nach Schnittgröße wurden 15 bis 30 µl Hybridisierungsgemisch auf den Schnitt gegeben und mit einem Deckglas geschützt abgedichtet (mit Fixogum-Montagekleber).
- Denaturierung bei 80° C im Wasserbad für 10 Minuten.
- Hybridisierung zwischen Sonde und Ziel-DNA bei 37° C über Nacht (12h bis 14h).

Stringenz - Waschschrift

Um ungebundene DNA zu entfernen, müssen nach der Hybridisierung Waschvorgänge abgeschlossen werden:

- Entfernen des Fixogumklebers und der Deckgläschen
- Waschschrift: 15' bei 40° C in einer Waschlösung aus 10 ml SSC 20x, 40 ml Aqua bidest. und 50 ml Formamid.
- zweimal Spülen in Aqua dest.

5.3 Immunchemische Detektion

Blocken der endogenen Peroxidase

Da die Detektion des Hybrids durch die Umwandlung eines Farbstoffes mittels Antikörpergekoppelte Peroxidase erfolgt, muss die endogene Peroxidase zunächst blockiert werden.

- Inkubation des Gewebes mit 1% H₂O₂ in PBS für 15 min.

Alle folgenden Schritte wurden bei 37° C in der feuchten Kammer, die ein Austrocknen der Schnitte verhindern soll, durchgeführt.

Inkubation mit Ziegenserum

Das Ziegenserum soll unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern.

- Überschichtung mit Ziege-Normalserum (1:10 in PBS) für 10 min.

Immunchemische Detektion und Signalverstärkung

Da es sich um digoxigenierte-markierte Sonden handelt, erfolgt zunächst das Auftragen des Primärantikörpers.

- Maus-Anti-Digoxigenin-AK (1:250 in PBS mit 1% BSA) für 30 min.
- zweimal Waschen mit PBS

In gleicher Weise wird anschließend der Brückenantikörper aufgetragen.

- Ziege-Anti-Maus-AK, biotinyliert (1:1000 in PBS) für 30 min.
- zweimal Waschen in PBS

Der Streptavidin-Peroxidase Komplex geht eine hochspezifische und feste Bindung mit Biotin ein. Er trägt das Enzym zur anschließenden Farbreaktion.

- Streptavidin-Peroxidase (1:1000 in PBS) für 30 min.
- zweimal Waschen in PBS

Darstellung der Peroxidase-abhängigen Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Hierzu wurde das Metal-Enhanced Substrat-Kit der Firma Pierce verwendet.

- Inkubation für 15 min. und Stoppen der Reaktion unter fließendem Wasser.

Gegenfärbung und Eindeckeln

- Spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 30 sec.
- Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min.
- Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt

6 Darstellung des Patientenkollektivs und des untersuchten Materials

In allen hier untersuchten Fällen handelt es sich um archivierte, formalinfixierte und in Paraffin eingebettetes Gewebe von 12 Patienten mit Gonadendysgenese und 21 Patienten mit einem Keimzelltumor. Daneben wurden 9 weitere Fälle als Kontrollgruppe mit in die Arbeit einbezogen, bei denen keine Veränderung der Geschlechtschromosomen vorliegt und klinisch als auch histologisch hier kein Verdacht auf eine Chromosomenstörung besteht.

Sämtliche Fälle stammen aus der Abteilung für Kinderpathologie im Institut für Pathologie der Universität Hamburg. Diese sind in den Jahren 1983 bis 2000 hier zur pathologischen Diagnostik untersucht worden. Die Bezeichnung der Fälle wurde in den einzelnen Gruppen chronologisch nach dem Eingangsdatum gewählt und mit einem Kürzel für die jeweilige Gruppe versehen:

g:	Gonadendysgenese
h:	Kontrollgruppe testikuläres / männliches Gewebe
o:	Kontrollgruppe ovarielles / weibliches Gewebe
to:	Tumoren des Ovars
th:	Tumoren des Hodens
ts:	Steißbeintumoren

Die bereits vorliegenden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Routinepräparate wurden nachmikroskopiert. Die histologische Einteilung erfolgte anhand der WHO-Klassifikation.

Die pathologisch-anatomische Diagnose wurde anhand von HE-Schnitten gestellt. Hierzu wurden die Schnitte der jeweiligen Gonaden durchgesehen und die repräsentativen Blöcke ausgewählt. Die Histologie wurde in einem weiteren HE-Schnitt der aktuellen Schnittfläche der ausgewählten Blöcke überprüft. Von dieser Schnittfläche wurden die Präparate für die ISH angefertigt. Um den komplexen Aufbau der dysgenetischen Gonaden und einiger Tumoren zu erfassen, wurden z.T. pro Fall mehrere Blöcke ausgewählt und überschichtet. Als Auswahlkriterien wurden folgende Punkte überprüft:

- ausreichende Menge an Material in Form von Paraffinblöcken
- eine eindeutige histologisch-pathologische Diagnose
- vorhandene Angaben zu humagenetischen Untersuchungen (bei Gonadendysgenese)
- weitere Angaben zu den Patienten: Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation

In fünf Fällen mit Gonadendysgenese und in sieben Fällen mit einem Keimzelltumor konnte die Untersuchung nicht durchgeführt werden, da hier kein oder nur sehr wenig Paraffinmaterial zur Verfügung stand. In fünf weiteren Fällen (zwei Gonadendysgenese und drei Tumorfälle) konnten trotz mehrfacher Wiederholungsversuche keine ISH-Signale gefunden werden.

6.1 Kontrollen

Obwohl die ISH für falsch-positive Resultate nicht sehr anfällig ist, wurden stets eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Zur Prüfung der Methode wurde in sämtlichen Versuchsdurchgängen jeweils ein bekanntes Kontrollpräparat (positiver Referenzschnitt) mit der jeweiligen Sonde als Positivkontrolle überschichtet. Weiterhin dienen zur Sicherung der Spezifität Kontrollpräparate, bei denen die Hybridisierungsschritte ohne die jeweilige Sonde durchgeführt wurden. Unspezifische Reaktionen waren nicht nachweisbar.

6.2 Vergleichspräparate

Die Signalverteilung in den unterschiedlichen Gewebekomponenten ist von deren jeweiligen Morphologie abhängig. Unterschiede der Kerngrößen und somit unterschiedlich häufige Überlappungen oder Anschnitte der Kerne spielen hier eine besondere Rolle. Zum Vergleich wurden jeweils Präparate von Patienten mit bekanntem Karyotyp angefertigt. Durch die Auswertung dieser Präparate konnten Vergleichswerte für die einzelnen Gewebekomponenten ermittelt werden. Diese sollen zum einen dazu dienen, das Spektrum der Signalverteilung in Abhängigkeit von der jeweiligen Kern- und Zellmorphologie besser beurteilen zu können. Zum anderen sollen diese „Grenzwerte“ dazu dienen, Mosaike von reinen Zelllinien abzugrenzen. Die ausgewählten Fälle sind in der Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2 zusammengefasst.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Gewebe</i>	<i>Diagnose</i>
<i>h1</i>	17 J	Hoden	Altersentsprechendes Hodengewebe, gering aktive Orchitis
<i>h2</i>	11 J	Hoden	Altersentsprechendes Hodengewebe mit mäßig reduzierter Spermio-genese bei bekannter Leukämie; Z.n. Chemotherapie
<i>h3</i>	65 J	Hoden	Normalbefund, Hoden, Nebenhoden und Samenstrang
<i>h4</i>	53 J	Hoden	Reguläres altersentsprechendes Hodengewebe
<i>h5</i>	1 J	Samenleiter	Samenleitersegment und Bauchhoden mit ansonsten normaler Morphologie

Tabelle 6-1: Kontrollgruppe männliche Patienten

Neben vier Präparaten mit Hodengewebe und drei Präparaten mit ovariellen Anteilen wurde zusätzlich je ein Fall mit Anschnitten eines Samenleiters und einer Tube ausgewählt.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Gewebe</i>	<i>Diagnose</i>
<i>o1</i>	12 J	Ovar	Ovargewebe mit mehreren Follikelzysten und einer Gelbkörperzyste
<i>o2</i>	12 J	Ovar	Ovar mit multiplen Follikelzysten, einer Gelbkörperzyste und herdförmigen Einblutungen.; Z.n. Torsion
<i>o3</i>	2 M	Ovar	Ovar mit Follikelzysten
<i>o4</i>	1 M	Tube	Hämorrhagisch infarziertes Ovar und Tubensegment mit normalem Befund

Tabelle 6-2: Kontrollgruppe weibliche Patienten

6.3 Patienten mit Gonadendysgenese

Das untersuchte Gewebe stammt von Patienten mit Aberrationen der Geschlechtschromosomen und der anatomisch-pathologischen Diagnose einer Gonadendysgenese.

Wegen des Verdachts auf eine chromosomale Störung wurde bei diesen Patienten im Rahmen der klinischen Diagnostik eine Chromosomenanalyse aus dem peripheren Blut (Lymphozyten) durchgeführt. Da bei diesen Patienten ein erhöhtes Risiko zur Bildung eines Keimzelltumors besteht, wurde hier eine prophylaktische Gonadektomie durchgeführt. Aus diesem Material wurden die weiteren Untersuchungen für diese Arbeit durchgeführt. Bei den 12 untersuchten Fällen liegt die Altersverteilung zwischen einem Monat und 15 Jahren.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Klinik</i>	<i>Histologie (Übersicht)</i>
g 1	1M	46,XY	Pseudohermaphroditismus maskulinus	Intersexuelles Äußere; komplexes Fehlbildungsyndrom: Gesichtsdysmorphie, Hexadaktylie, Handskelettanomalie, Hydrozephalus	Hypoplastisches Hoden und Nebenhodengewebe, keine Ovaranteile.
g 2	4 J	46,XX/XY	Hermaphroditismus versus	Hypospadie, Kryptorchismus, Leistenhoden.	Dysgenetische zwitterige Gonade; Anteile von atrophischem Hoden- u. Nebenhodengewebe, ovariellen Stroma, Tube.Nebenhoden, Samenleiter.
g 3	11J	45,X0/46,X Y +18	Turner Syndrom und Trisomie 18	Turner stigmata: Pt. Colli, Hand und Fußödeme, (als NG), jetzt Minderwuchs.	Streak-Gonade, ovariellen Stroma, Hoden u. Nebenhoden im Befund aber nicht im vorliegenden Material.
g 4	13J	46,XY/47,XY	Hermaphroditismus versus	Als NG Hypoton mit Trinkschwäche, Jetzt Hydrozele testis, Gynäkomastie, Hochwuchs, deutl. geistige Retardierung.	Dysgenetische, zwitterige Gonade; gonadoblastoide Dysplasie; Seminom (Cis); reifes Teratom.
g 5	1M	45,X0/46,X Y	Gemischte Gonadendysgenese	Intersexuelles Genitale, Klitorishypertrophie.	Hypoplastisches Hodengewebe, Anteile einer Tube, kein ovariellen Stroma, hyperplastischer Schwellkörper.
g 6	6 J	k.A. mutmaßlich 45,X0/46XY	Gemischte Gonadendysgenese	Keine Angaben	Atrophische Streak Gonade, fokale Dysplasie, Gonadoblastom. Keine ausdifferenzierten Ovar- oder Hodenanteile.
g 7	6 M	45,X0/46,X Y	Gemischte Gonadendysgenese	Hypospadie, Leistenhoden.	Dysgenetische zwitterige Gonade: Hoden und Ovaranteile, Tube, Nebenhoden,
g 8	2 J	k.A. mutmaßlich 46XY	Pseudohermaphroditismus maskulinus	männlicher Phänotyp	Dysgenese des Hodens, ausgeprägt atrophische Hodentubuli. Übrige Strukturen normal.
g 9	8 J	46,X, t (X;Y)	Gonadendysgenese XY-Translokation	bei Minderwuchs; Behandlung mit Wachstumshormon, sonst unauffällig	Atrophisches Hodengewebe, Ovar m. Follikelzysten und Gelbkörper.
g 10	8 M	45,X0/46,X Y	Gemischte Gonadendysgenese	Intersexuelles äußeres Genitale, Nierenagenese	Überwiegend unreifes Hodengewebe, wenig ovariellen Stroma, hyperplastischer Schwellkörper.
g 11	7 T	45,X0/46,X Y	Gemischte Gonadendysgenese	Sektionsfall: reifes NG, zwitteriges äußeres Genitale, keine weiteren Mißbildungen; Fibroelastose des Endokards.	Rechts atrophisches Hodengewebe, links Streak-Gonade u. Nebenhoden; Ovargewebe, einzelne Primärfollikel.
g 12	16 J	k.A. mutmaßlich 46,XX / XY	Hermaphroditismus versus	Phänotypisch männlich, sonst keine Angaben	Ovariellen Stroma, Primärfollikel, Gelbkörper, Hoden und Nebenhodengewebe, teilw. atrophischer Samenleiter.

6.4 Patienten mit Keimzelltumoren

Insgesamt wurden 24 Patienten mit einem KZT in diese Arbeit einbezogen. Die Altersverteilung liegt zwischen einem Tag und 24 Jahren.

Keimzelltumoren des Hodens

Das untersuchte Gewebe bei den Fällen mit einem Keimzelltumor stammt von Patienten, bei denen auf Grund eines klinisch diagnostizierten Tumors eine Gonadektomie durchgeführt wurde. Bei den Fällen th1 bis th 9 handelt es sich um Hodentumoren. In dieser Gruppe konnte für den Fall th 7 keine In Situ-Hybridisierung durchgeführt werden.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Diagnose</i>
<i>th 1</i>	1 M	Unreifes Teratom	Teratom des Hodens mit reifen und unreifen Gewebeanteilen. Grad 2
<i>th 2</i>	7 M	Unreifes Teratom	Unreifes Hodenteratom, Grad 2
<i>th 3</i>	7 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom des Hodens, altersentspr. Hodengewebe mit vereinzelt Leydigzellen.
<i>th 4</i>	5 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom des Hodens, randlich altersentspr. Hodengewebe.
<i>th 5</i>	17 J	Gemischter Keimzelltumor	Gemischter Keimzelltumor: Embryonales Karzinom, unreifes Teratom.
<i>th 6</i>	17 J	Gemischter Keimzelltumor	Gemischter Keimzelltumor: Ausgedehntes embryonales Karzinom, Dottersacktumor, intratubuläre Neoplasie, reifes Teratom.
<i>th 7*</i>	1 J	Gemischter Keimzelltumor	Maligner Dottersacktumor (endodermaler Sinustumor), embryonales Karzinom, reifes Teratom.
<i>th 8</i>	19 J	Embryonales Carcinom	Embryonales Karzinom
<i>th 9</i>	28 J	Seminom	Intratubuläres Seminom

Tabelle 6-3 Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens; * konnte nicht überschichtet werden

Keimzelltumoren des Ovars

Die Fälle to1 bis to 8 enthalten ovarielle Tumoren. Für to 3 konnte in dieser Gruppe kein auswertbares Ergebnis erzielt werden.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Diagnose</i>
<i>to 1</i>	8 J	Unreifes Teratom	Überwiegend reifes, fokal immatures Teratom des Ovars; Gliomatosis Peritonei. Grad 2
<i>to 2*</i>	5 J	Unreifes Teratom	Malignes Teratom v. Typ eines malignen Dottersacktumors (endodermaler Sinustumor). Grad 2
<i>to 3</i>	6 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom. Multiple Follikelzysten.
<i>to 4</i>	13 J	Unreifes Teratom	Gemischter Keimzelltumor: Embryonales Karzinom; reifes und immatures Teratom; Dottersacktumor.
<i>to 5</i>	15 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom des Ovars.
<i>to 6</i>	3 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom des Ovars.
<i>to 8</i>	12 J	Reifes Teratom	Reifes Teratom des Ovars.
<i>to 7</i>	2 J	Reifes Teratom	Zystisches, reifes Teratom.

Tabelle 6-4 Patienten mit Keimzelltumoren des Ovars * konnte nicht überschichtet werden

Sakrokokzygeale Keimzelltumoren

Die Fälle ts 1 bis ts 8 beinhalten Tumoren männlicher und weiblicher Patienten, die in der Steißbeinregion lokalisiert waren. Hier konnte bei der Überschichtung von ts 7 kein Ergebnis erreicht werden.

<i>Fall</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Diagnose</i>
<i>ts 1</i>	6 T	wbl.	Reifes Teratom	Steißbeinteratom, keine unreifen Anteile.
<i>ts 2</i>	1 T	männlich	Unreifes Teratom	Unreifes Steißbeinteratom; Grad 1
<i>ts 3</i>	1 J	wbl.	Gemischter Keimzelltumor	Hochmaligner Keimzelltumor (emb. Karzinom, Dottersacktumor)
<i>ts 4</i>	1 T	wbl.	Unreifes Teratom	Teils immatures Teratom; Grad 2
<i>ts 5</i>	3 T	wbl.	Unreifes Teratom	Gemischtes, teils reifes, teils unreifes (immatures) Teratom. Grad 2
<i>ts 6</i>	3 T	wbl.	Reifes Teratom	Reifes Steißbeinteratom.
<i>ts 7*</i>	11 T	wbl.	Reifes Teratom	Reifes sacroccocygeales Teratom
<i>ts 8</i>	4 T	wbl.	Reifes Teratom	Reifes sacroccocygeales Teratom

Tabelle 6-5 Patienten mit sakrokokzygealen Keimzelltumoren * konnte nicht überschichtet werden

6.5 Auswertung

Die Auswertung, der bei der Hybridisierung und anschließenden Detektion entstehenden Signale, erfolgt mit einem Lichtmikroskop bei einer 500fachen Vergrößerung. Dabei entspricht ein Signal, das den Auswertungskriterien genügt, einer Kopie des darzustellenden Chromosoms. Da in den meisten Fällen mehrere Versuchsdurchläufe nötig waren und durch die Anwendung unterschiedlicher Pepsinzeiten mehrere Präparate zur Verfügung standen, wurden die auszuwertenden Schnitte zunächst folgendermaßen ausgewählt:

Kriterien für die Auswahl der Schnitte:

- Nur Schnitte mit ausreichender Anzahl an Signalen
- Nur Schnitte mit optimaler Geweberhaltung
- Nur Schnitte, bei denen in allen (oder möglichst viele) unterschiedlichen Gewebekomponenten Signale zu finden waren

So konnte bei mehreren Pepsinzeiten jeweils die optimale Zeit und Gewebemorphologie ausgewählt werden. Anschließend wurden mehrere Gesichtsfelder in die quantitative Auswertung der Signale einbezogen. Dabei wurden pro Fall zwischen 100 und 900 Zellkernen ausgewertet. Für die Bestimmung der Signalzahl gelten folgende Auswertungskriterien [Hopman et al. 1988]:

Kriterien für die In Situ-Signale und für die einzelnen Zellen:

- Nur Signale gleicher Intensität und Größe (spezifisches Signal) verwenden
- Paarig aneinanderliegende Signale („splitted spots“) werden als ein Signal gezählt
- Zellkerne sollen eindeutig erkennbar sein
- Kerne sollten sich nicht überlappen

Daraus ergibt sich folgendes Vorgehen:

1. Qualitative Auswahl der optimal hybridisierten Schnitte
2. Semiquantitative Auswertung → Ermittlung der optimalen Hybridisierung und Pepsinzeiten
3. Ermittlung der erreichbaren Anzahl an Signalen am Normalgewebe (Positivkontrolle und Vergleich)
4. Quantitative Auswertung der Präparate zum Nachweis von Aneuploidien/Mosaiken

III. Ergebnisse

Die Auswertungskriterien, anhand derer die nachfolgenden Ergebnisse gewonnen wurden, sind im Kapitel „Patienten, Material und Methoden“ beschrieben. Ausgewertet wurden nur Präparate, bei denen eine aussagekräftige Zellmorphologie sowie Signalintensität erhoben werden konnte. Zur Analyse der unterschiedlichen Gewebekomponenten wurden z.T. mehrere Präparate oder Blöcke von einem Fall bearbeitet, wobei deren Ergebnisse hier zusammengefasst wurden. Die vollständigen Ergebnisse der Auszählungen befinden sich in den Tabellen des Anhangs.

7 Vorversuche, Kontrollen und Vergleichspräparate

Als Kontrollen und zur Erstellung der Vergleichspräparate dienten Proben (Hoden, Ovar und Adnexe) von Patienten, bei denen kein Verdacht auf eine gonosomale Aberration bestand. Hier wurden Präparate von fünf männlichen und vier weiblichen Patienten untersucht, die aus dem Routinebetrieb der Abteilung stammten.

7.1 Vorversuche

Um die Spezifität und Sensitivität der DNA-Sonden zu untersuchen, und den Versuchsablauf zu optimieren, wurde die Methode in Vorversuchen auf ihre Anwendbarkeit getestet. Die ermittelten Signale entsprachen denen des zu erwartenden Genotyps und konnten zunächst zur Geschlechtsbestimmung herangezogen werden. Dabei wurde Nierengewebe von männlichen und weiblichen Probanden überschichtet. Bei diesen Versuchen konnte das gonosomale Geschlecht bestimmt, und somit eine Geschlechtsbestimmung durchgeführt werden.

Nach der Applikation der Y-Chromosom-spezifischen Sonde in Zellen mit männlichem Kerngeschlecht ist ein Signal erkennbar, während „weibliche“ Zellen negativ bleiben. Die In Situ-Hybridisierung mit der X-Chromosom-spezifischen Sonde ergibt in den weiblichen Zellen zwei Signale, in männlichen Zellen hingegen nur ein Signal.

In den Vorversuchen zeigte sich jedoch eine deutlich stärkere Reaktion auf die Sonde DYZ2 gegenüber der Sonde DYZ1. Somit wurden die weiteren Überschichtungen mit erstgenannter Sonde durchgeführt.

7.2 Kontrollen

Zur Überwachung der Versuchsabläufe wurde in jedem Durchgang zusätzlich ein Kontrollpräparat aus dem Vergleichskollektiv angefertigt. Anhand dieser Ergebnisse konnte die Qualität des jeweiligen Versuchsablaufs beurteilt werden. Insgesamt wurden 75 Versuchsansätze benötigt, um die zu untersuchenden Fälle zu überschichten. Davon mussten 12 (16%) Wiederholungsversuche durchgeführt werden, da hier keine auswertbaren Ergebnisse gefunden wurden.

Auf Grund methodischer Grenzen, durch Kernüberlappungen oder Kernanschnitte kann das Ergebnis der Interphase-Zytogenetik nicht mit dem tatsächlichen Chromosomensatz übereinstimmen. Die Ergebnisse der Vergleichspräparate sollen dazu dienen, das Spektrum der Signalverteilung besser interpretieren zu können. Daneben konnten hier gewebeabhängige Schwankungen der Signalverteilung erfasst werden. Mit diesen Werten der Signalverteilung werden die quantitativen Ergebnisse der untersuchten Gonadendysgenesen und Keimzelltumoren verglichen.

7.3 Vergleichspräparate testikulärem Gewebe

Histologie:	<p>h1: Reguläres Hodengewebe; gering aktive Orchitits mit interstitiellem Entzündungsinfiltrat bestehend aus Granulozyten und Lymphozyten. An einer Stelle ist ein Nebenhodengang mit angeschnitten. Dort in der Umgebung auch reichlich Gefäß- und Bindegewebe.</p> <p>h2: Hier Hodengewebe mit mäßig reduzierter Spermiogenese. Klin. angeg. Leukämie und Z.n. Chemotherapie. Kein leukämisches Infiltrat. Regulärer Anteil an Leydigzellen.</p> <p>h3: Hoden und Nebenhodengewebe. Die Nebenhodengänge sind mit einem prismatischen zweireihigem Epithel ausgekleidet. Daneben Anschnitte eines Samenstanges mit zahlreichen starkwandigen Gefäßanschnitten.</p> <p>h4: Altersentsprechendes Hodengewebe mit verringerter Spermatogenese. Am Rand des Präparats gelegene Anteile eines Rete Testis mit länglichen Spalträumen. Diese sind durch ein einschichtiges isoprismatisches Epithel ausgekleidet. Unter dem Epithel kommen glatte Muskelzellen vor. Daneben zahlreich Blut- und Nervenfaserbündel.</p> <p>h5: Anschnitte eines Samenleiters mit regulärer Epithelauskleidung. Unterschiedlich starke Lichtung der getroffenen Samenleitersegmente.</p>
--------------------	--

Neben den Graphiken sind zur Ergänzung hier die Mittelwerte aus den fünf untersuchten Fällen in einer Tabelle dargestellt. Im Anhang sind Ergebnisse der einzelnen Präparate aufgelistet.

Signalhäufigkeit für das X-Chromosom und das Y-Chromosom in testikulärem Gewebe:

	0 Signale		1 Signal		2 Signale	
	X	Y	X	Y	X	Y
Sertolizellen	18%	19%	78%	80%	1%	1%
Leydigzellen	28%	28%	70%	71%	1%	1%
Nebenhoden (Epithel)	22%	21%	73%	75%	5%	4%
Samenleiter (Epithel)	18%	18%	78%	77%	4%	5%
Rete Testis (Epithel)	26%	27%	71%	66%	3%	7%
Endothel	24%	26%	74%	72%	1%	2%
Glatte Muskulatur	23%	24%	77%	69%	1%	0%
Spermatozyten	32%	51%	64%	54%	4%	4%

Tabelle 7-1: Signalhäufigkeit in testikulärem Kontrollgewebe

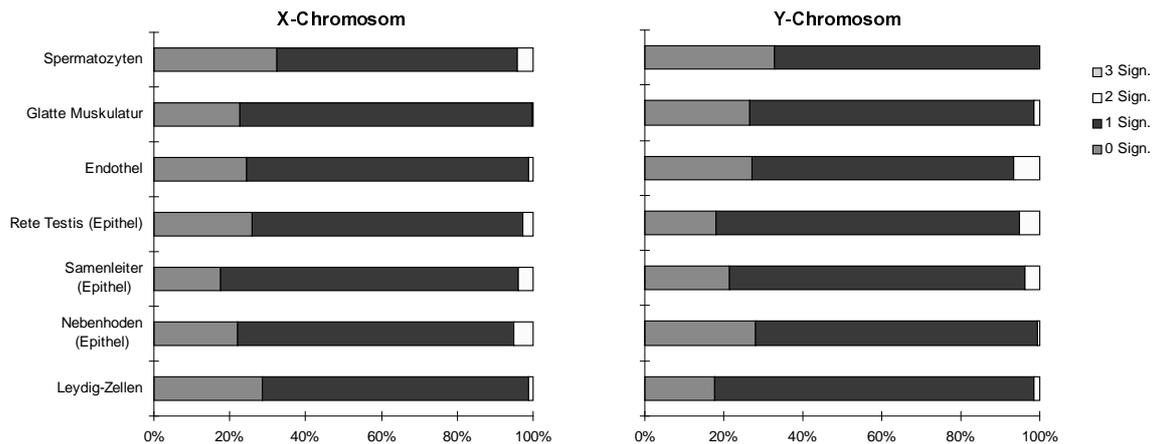


Abbildung 7-1: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms im testikulären Gewebe

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass sich die Werte für das X- und das Y-Chromosom nicht unterscheiden. Bei der Reaktion auf die Geschlechtschromosomen in testikulärem Gewebe wurden die meisten Signale in den Sertolizellen (80%) gefunden. Dagegen zeigten die Leydigzellen die geringste Signalfrequenz. In den epithelialen Strukturen konnten einige Kerne mit zwei Signalen ausgewertet werden (3%-5%).

Die schlechteste Signaldichte, auf Grund von Kernanschnitten, ist demnach in den Leydigzellen zu erwarten. Die meisten Kernüberlagerungen sind im Epithel des Nebenhodens und in anderen epithelialen Strukturen zu finden.

7.4 Vergleichspräparate und Grenzwerte in ovariellm Gewebe

Untersucht wurde das ovarielle Gewebe von 3 Patientinnen (o1 - o3) sowie Gewebe mit Anschnitten einer Tube von einer weiteren Patientin (o4).

Histologie: **o1:** Mehrere unterschiedlich große, mit Follikelepithel ausgekleidete ovarielle Zysten, daneben Anschnitte einer größeren Gelbkörperzyste, ovariellm Stroma mit ödematösen Auflockerungen und einer Einblutung. Weiterhin zahlreiche Primärfollikel und ein Tertiärfollikel im untersuchten Material.

o2: Ovar mit zahlreichen Follikelzysten, dazwischen Stroma mit ödematös aufgelockertem Bindegewebe und herdförmigen Einblutungen, im ovariellen Stroma zahlreiche Primärfollikel, daneben ein großer zystisch aufgeweiteter Gelbkörper mit Granulosaluteinzellen.

o3: Anschnitte eines Ovars mit Zystenbildung, diese mit einem abgeflachten Follikelepithel ausgekleidet. Dazwischen ein schmaler Saum ovariellen Stromas mit zahlreichen intakten Primärfollikeln zu finden.

o4: Hämorrhagisch infarziertes Ovar und eine regulär ausgebildete Tube mit erhaltener Lichtung und intaktem Schleimhautepithel.

Signalhäufigkeit für das X-Chromosom in ovariellm Gewebe

	0 Signale	1 Signal	2 Signale	3 Signale
	X	X	X	X
Ovariellm Stroma	9%	19%	70%	1%
Follikelepithel (Zysten)	15%	14%	69%	3%
Gelbkörper, Granulosazellen	19%	19%	58%	3%
Endothel	10%	15%	74%	2%
Glatte Muskulatur	12%	17%	72%	0%
Epithelauskleidung (Tube)	10%	15%	68%	7%

Tabelle 7-2: Signalhäufigkeit in ovariellm Kontrollgewebe

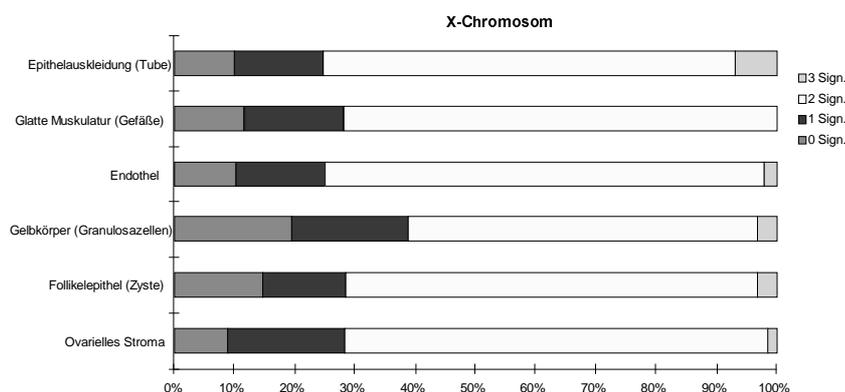


Abbildung 7-2: Signalverteilung des X-Chromosoms im ovariellen Gewebe

Die meisten Kerne mit zwei Signalen für das X-Chromosom finden sich im ovariellen Stroma, im Endothel und in der glatten Muskulatur. Die geringste Signaldichte findet sich in den Granulosaluteinzellen des Gelbkörpers.

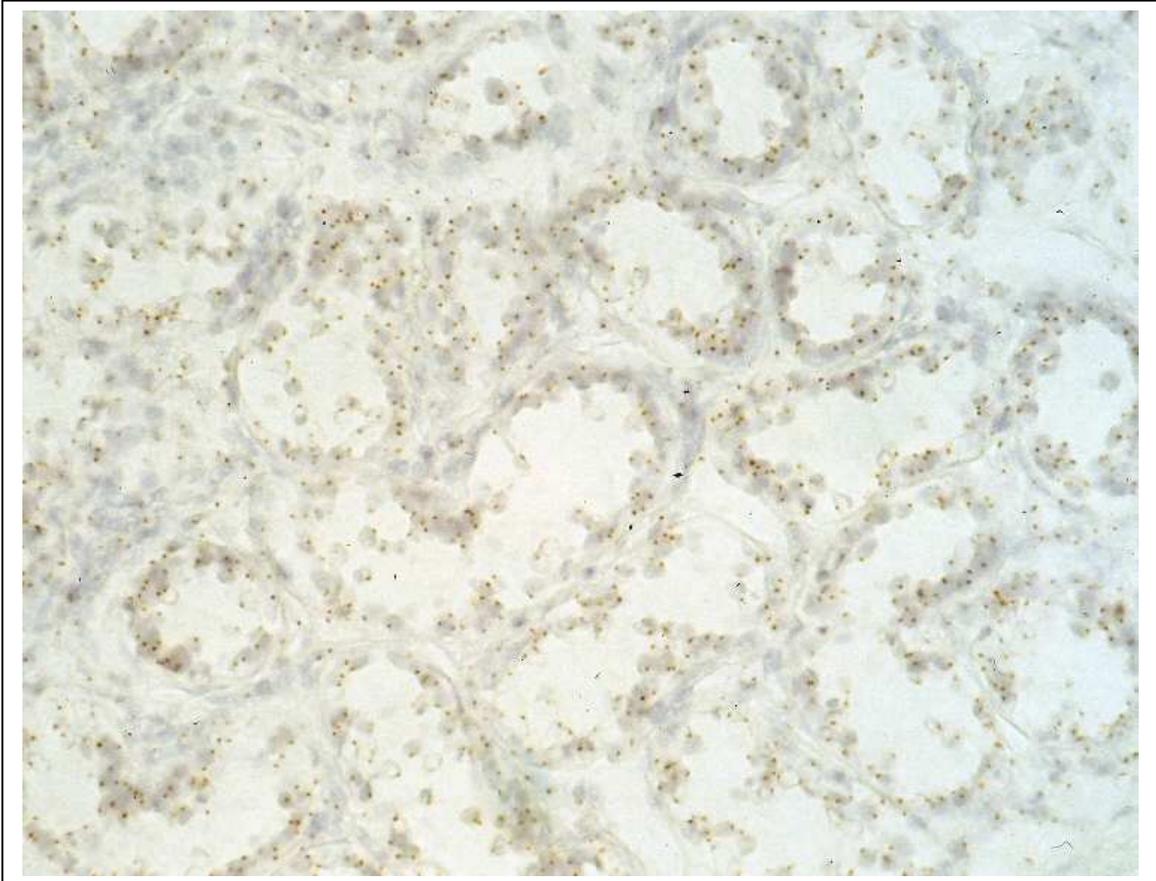


Abbildung 7-3: Normaler Chromosomenbefund mit Signalen für das Y-Chromosom in unreifen Hodentubuli, Sertoli- und Leydigzellen; Alter 5 Jahre, 100x.

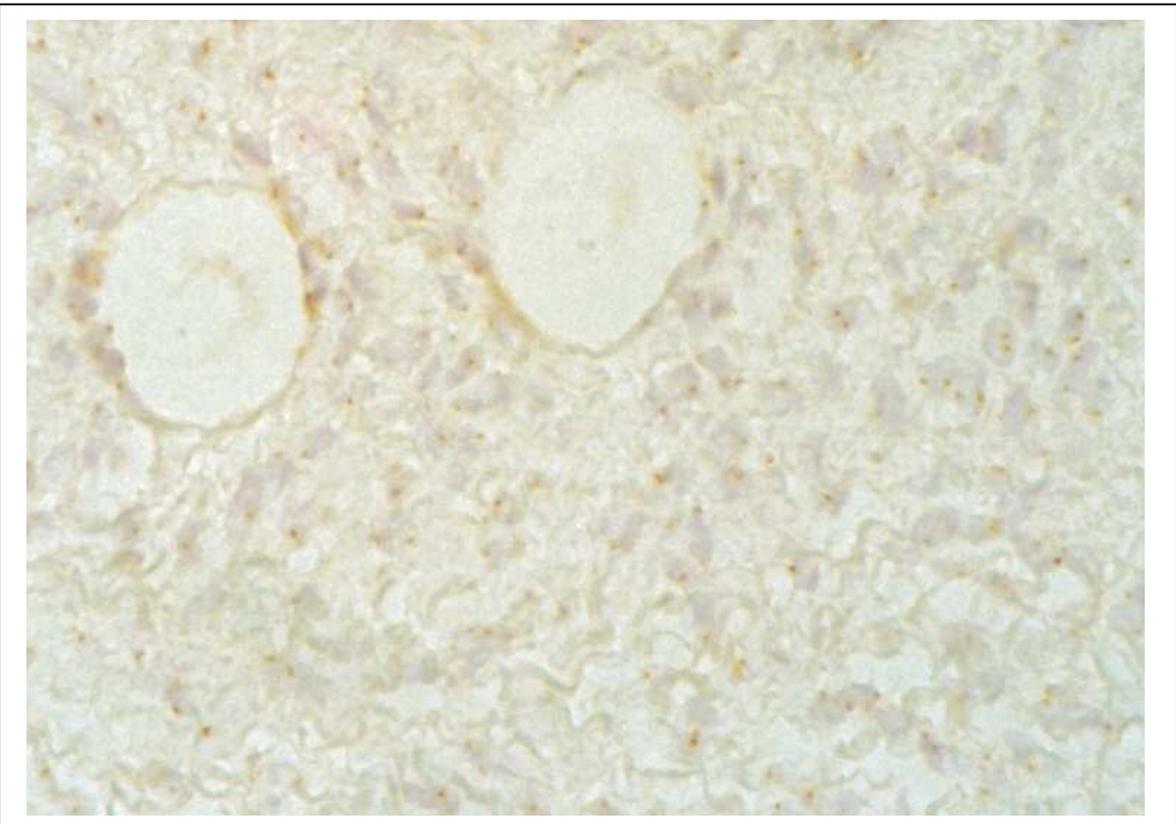


Abbildung 7-4: Regelrechtes Ovar mit Primärfollikeln, Doppelmarkierung für das X-Chromosom im ovariellen Stroma, Alter 12 Jahre, 100x.

8 Ergebnisse an Gonadendysgenesien

8.1 Gruppe I: Pseudohermaphroditismus maskulinus mit XY-Karyotyp

Fall g1: Hypoplastisches Hoden- und Nebenhodengewebe bei klinisch angegebenen intersexuellen Äußeren.

Histologie: Stellenweise normal angeordnete Hodentubuli, an anderen Stellen weit auseinanderliegende, hypoplastische Tubuli mit wenigen Leydigzellen, außerdem regulär aufgebautes Nebenhodengewebe und Anschnitte eines Samenleiters, daneben reichlich Gefäß- und Bindegewebe. Anteile weiblicher Gonaden sind im vorliegenden Material nicht enthalten.

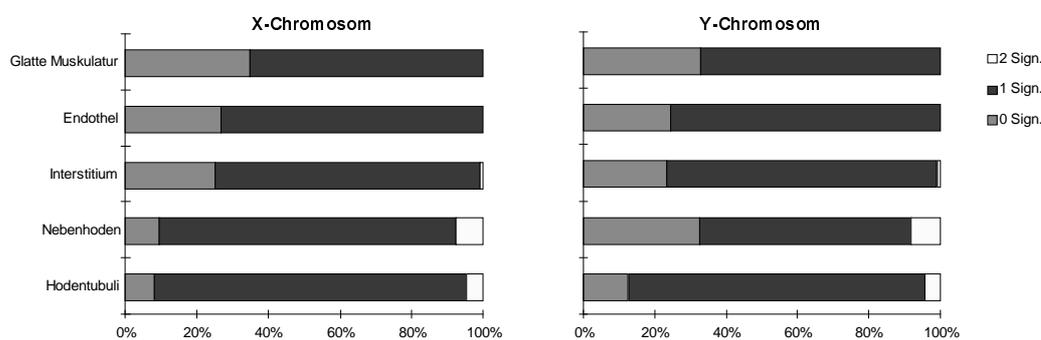


Abbildung 8-1: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g1

Die Untersuchung auf die Geschlechtschromosomen zeigte in allen untersuchten Gewebeanteilen jeweils ein Signal pro Zellkern. Daraus ergibt sich ein reiner XY-Karyotyp ohne Anhalt für ein gonosomales Mosaik.

Fall g8: Dysgenese des Hodens, ausgepr. Atrophische Hodentubuli. Übrige Strukturen normal.

Histologie: Orchektomiepräparat mit spärlichen, locker in Gruppen gelagerten Hoden und Nebenhodentubuli, dazwischen reichlich gefäß- und nervenfaserhaltiges Bindegewebe und vereinzelte Leydigzellen. Keine Spermio-genese und keine ovariellen Strukturen. Weiterhin Anschnitte eines Samenleiters. Das untersuchte Material enthält keine ovariellen Anteile.

In dem Fall g8 liegt eine Dysgenese des Hodens vor. Die Untersuchung der Geschlechtschromosomen ergab einen regulären XY-Genotyp. In allen Gewebekomponenten konnte mit der ISH je ein Signal für das X-Chromosom und eines für das Y-Chromosom gefunden werden. Das Ergebnis ist mit dem von Fall g1 vergleichbar, weshalb auf eine graphische Darstellung hier verzichtet wurde.

8.2 Gruppe II: Echter Hermaphroditismus mit XX/XY bzw. XXY/XY-Konstellation

Der echte Hermaphroditismus ist charakterisiert durch die gleichzeitige Entwicklung von testikulärem und ovariellen Gewebe. In dieser Arbeit wurden zwei Patienten mit 46,XX/XY-Karyotyp und ein Patient mit 46,XY/47,XXY-Karyotyp untersucht. Bei den Patienten (g12, 14 Jahre und g4, 13 Jahre) wurde ein frischer sowie ein vernarbter Gelbkörper als Hinweis auf einen intakten ovariellen Zyklus gefunden.

Fall g2: Dysgenetische zwitterige Gonade mit Anteilen von Hodengewebe sowie Anteilen eines Ovars. XX/XY-Konstellation.

Histologie: Zwitterige asymmetrische Gonade, links bestehend aus atrophischem Hodengewebe mit weit auseinander liegenden Hodentubuli, dazwischen Bindegewebe, keine Spermio-genese, nur spärlich eingestreute Leydigzellen. Rechts ein Ovotestis, am Rand Übergang in Ovargewebe mit Primärfollikeln und zellreichem ovariellen Stroma, einige zystisch erweiterte Follikel. Außerdem regulär aufgebaute Nebenhoden, Samenleiter sowie Anteile einer Tube.

Im vorliegenden Material findet man ein Gonosomenmosaik bestehend aus den beiden Zelllinien (46,XX und 46,XY). In allen untersuchten Gewebekomponenten sind sowohl Zellen mit XX- als auch mit XY-Konstellation zu finden.

Dabei zeigt sich regional ein uneinheitliches Verteilungsmuster und eine unterschiedliche quantitative Ausprägung der einzelnen Zelllinien.

In Endothel, Bindegewebe, ovariellen Stroma und den Leydigzellen ist das Y-Chromosom gleichmäßig verteilt. In den Epithelien von Tube, Nebenhoden, Follikelzysten und der Epithelauskleidung des Samenleiters der rechten Gonade findet man fokale Unterschiede. Hier gibt es Areale mit sehr unterschiedlicher Signaldichte für das Y-Chromosom. Um eine quantitative Aussage in diesen Arealen zu treffen, wurden mehrere Präparate ausgewertet.

Innerhalb der linken Gonade, die nur atrophische Hodentubuli enthält, finden sich 62 % der Zellen mit zwei X-Chromosomen und 22 % mit einem Y-Chromosom. Daraus ergibt sich für die linke Gonade eine XX/XY Konstellation mit Überwiegen der XX-Komponente.

Die Hodentubuli der rechten Gonade (Ovotestis) zeigen, wie bereits erwähnt, ein heterogenes Verteilungsmuster. Hier finden sich Areale mit einer sehr hohen Signaldichte für Y (78 %), neben Anteilen, in denen das Y-Chromosom nicht nachzuweisen ist. Insgesamt ergibt sich eine Signaldichte von 34%. Die ovariellen Anteile dieser Gonade enthalten mit 21 % weniger Y-Chromosomen als die testikulären Anteile. Das Epithel der Tube zeigt neben den Hodentubuli die meisten Y-Chromosomen (60%) und entsprechend weniger Zellen mit zwei X-Chromosomen (18 %). Es ergibt sich ein Chromosomenmosaik mit einer XX/XY Konstellation. Zellen mit einem Y-Chromosom sind sowohl in den speziell weiblichen als auch in männlichen Gewebeanteilen zu finden.

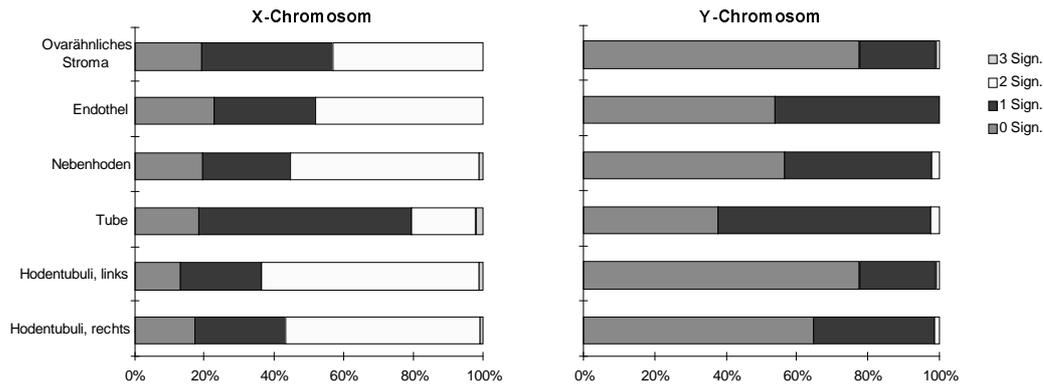


Abbildung 8-2 Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 2

Fall g12: Dysgenetische atrophische Gonade mit Hoden und Ovaranteilen, Gelbkörper und Einblutungen. XX/XY-Konstellation.

Histologie: Ovotestis mit teilweise atrophischem Hodengewebe. In den Hodentubuli Sertolizellen, jedoch keine Spermiogenese, interstitiell in Gruppen angeordnete Leydigzellen. Daneben regulär aufgebauter Nebenhoden. An einer Stelle Anschnitte eines Samenleiters mit regulärer Epithelauskleidung. Ovarielle Anteile (links) mit Primär- und Sekundärfollikeln, sowie einigen zystisch erweiterten Follikeln, außerdem Anschnitte eines frischen Gelbkörpers, in dessen Umgebung eine flächenhafte Einblutung zu finden ist, sowie Anschnitte einer atrophischen Tube.

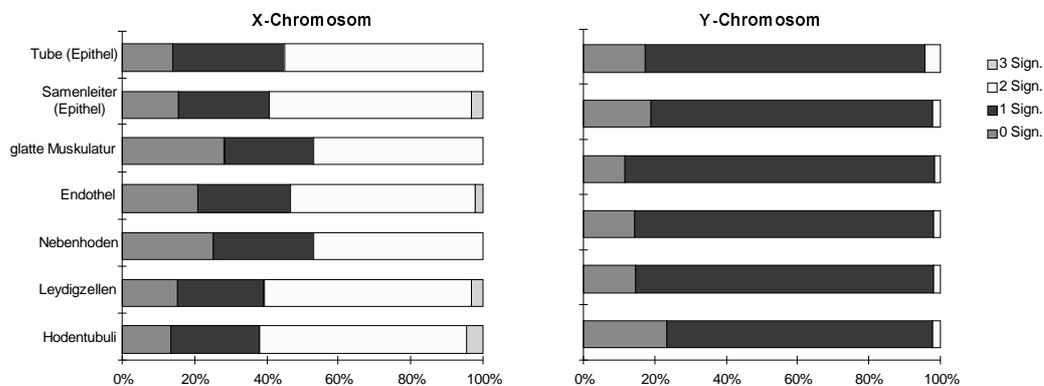


Abbildung 8-3: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 12

Bei den Präparaten aus Fall g12 handelt es sich ebenfalls um einen echten Hermaphroditismus mit einer Gonosomenkonstellation aus einem XX/XY-Mosaik. In den meisten Zellen wurden zwei Signale für das X-Chromosom oder ein Signal für das Y-Chromosom gefunden. Die Reaktion auf die Chromosomen im ovarähnlichen Anteil der Gonade zeigte nur eine Reaktion auf zwei X-Chromosomen (72% mit zwei Signalen), jedoch keine Signale auf Y. In Tube, Nebenhoden und Samenleiter war dagegen eine andere Zusammensetzung zu finden. Insgesamt ist hier ein Überwiegen der XY-Komponente festzustellen. Wegen des hohen Anteils des Y-Chromosoms ist daher von einer deutlich schwächeren Ausprägung der XX-Komponente auszugehen.

Fall g4: Dysgenetische zwittrige Gonade; gonadobalstoide Dysplasie; Seminom (Cis); reifes Teratom. XXY/XY-Konstellation.

Histologie: Komplex aufgebaute zwittrige Gonade, überwiegend mit dichtem ovarähnlichen Stroma mit einzelnen Primärfollikeln und zahlreichen zystisch aufgeweiteten Follikeln mit kubischen bis zylindrischen Deckzellbelag. In den ovariellen Anteilen sind einige Vernarbungsherde (Gelbkörper) zu erkennen. Außerdem an einer Stelle ein zystisch aufgeweiteter frischer Gelbkörper. Ferner atrophisches Hodengewebe, die Tubuli mit verbreiteter Basalmembran, lediglich Sertolizellen, im Interstitium in Gruppen gelagerte Leydigzellen, keine Spermiogenese. An einer anderen Stelle dicht gelagerte Hodentubuli die atypische Zellen enthalten. Diese enthalten Seminom-Zellen aus hyperchromatischen großen Kernen und einem unscharf begrenzten Zytoplasma. Diese Zellpopulation ist auf die Tubuli begrenzt. Randlich gelegen eine weitere Stelle mit Gonadalzellproliferaten bestehend aus kleinen kompakten Zellkernen im Sinne eines Gonadoblastoms. Außerdem eine von unverhorntem Plattenepithel ausgekleidete kleine Zyste im Sinne eines reifen Teratoms sowie regulär aufgebauter Nebenhoden.

Abbildung 8-4: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 4, rechte Gonade

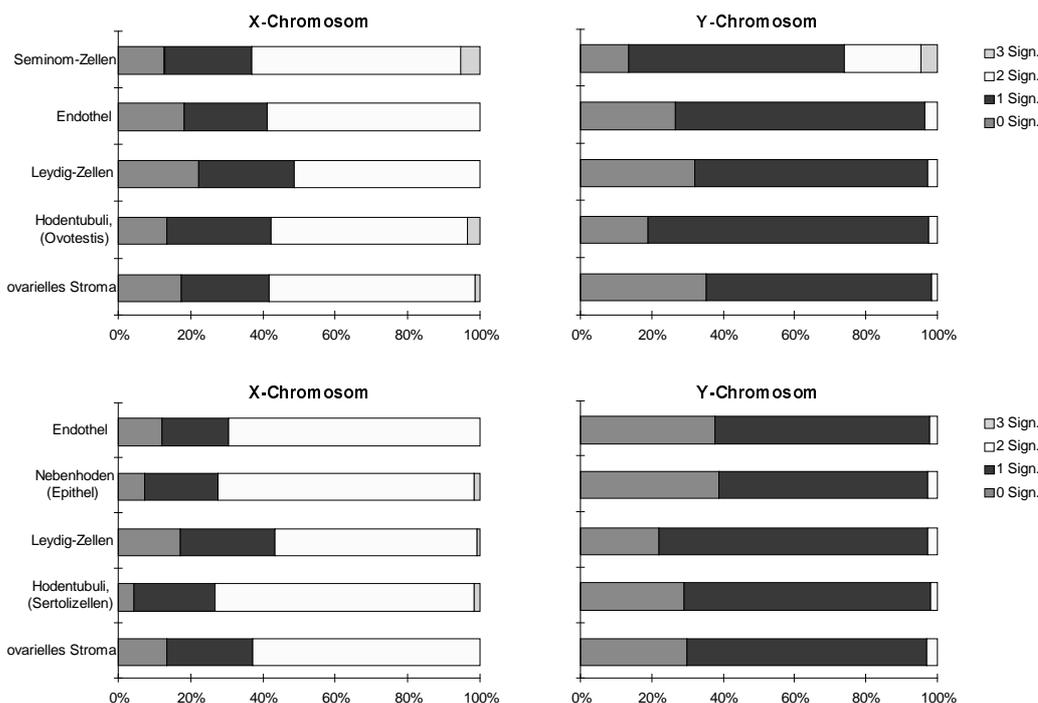


Abbildung 8-5: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 4, linke Gonade

Die ISH ergab ein Mosaik auf die beiden Zelllinien XY und XXY. Dabei zeigt sich ein deutliches Übergewicht des XXY-Derivats. In allen untersuchten Gewebekomponenten sind zwei X-Chromosomen sowie ein Y-Chromosom zu finden.

Der Anteil der Doppelmarkierungen auf das X-Chromosom beträgt in den Sertolizellen (72%), im Epithel des Nebenhodens (71%), im Endothel (70%) sowie im ovariellen Stroma (63%).

Damit ist von einem deutlichen Überwiegen der XXY-Komponente auszugehen. Eine schwache Ausprägung der XY-Zelllinie ist jedoch nicht auszuschließen.

Im Seitenvergleich zwischen der rechten und linken Gonade sind jedoch Unterschiede in der Verteilung der Gonosomen festzustellen. In den Hodentubuli des Ovotestis (rechts) waren 54% und im ovariellen Stroma 57% der Zellen mit zwei Signalen für das X-Chromosom zu finden. Auf der linken Seite war in den Hodentubuli ein Gehalt von 72% und im ovariellen Stroma von 63% für zwei X-Chromosomen zu finden. Außerdem wurde in den Seminom-Zellen ein Zugewinn an Y-Chromosomen festgestellt, hier zeigten 22% der Zellen zwei Y-Chromosomen.

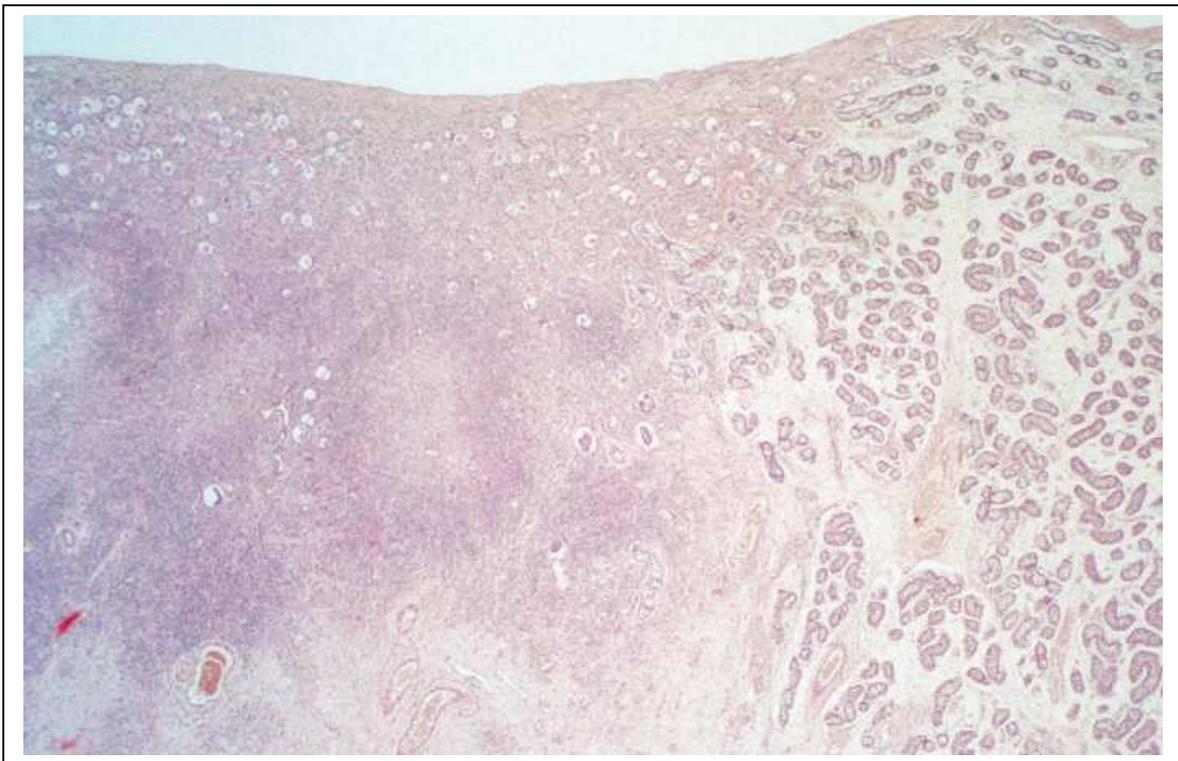


Abbildung 8-6: Übersicht Ovotestis: Gonade bestehend aus unreifen Hodentubuli, Übergang in Ovargewebe, Primär- und Sekundärfollikeln, zellreiches ovarielles Stroma mit Vernarbungsherden (Gelbkörper) und einzelnen Primärfollikeln; Fall g2, HE 25x.

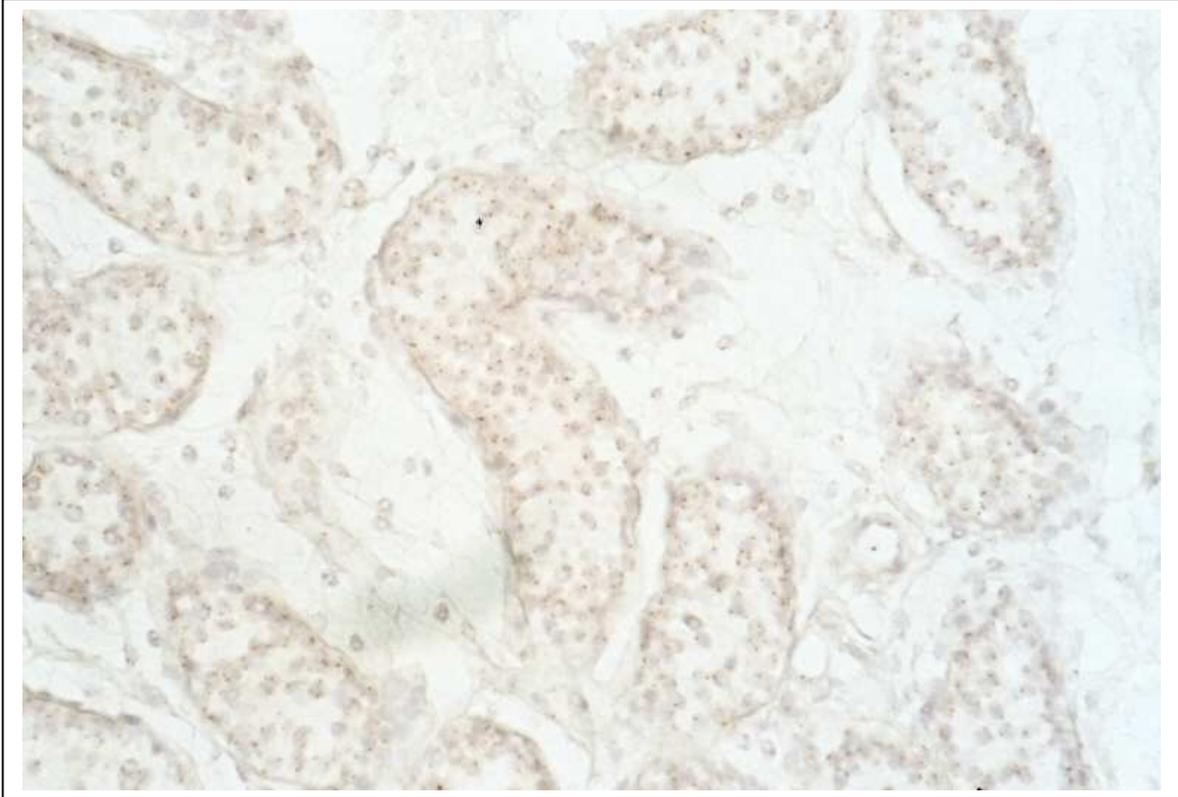


Abbildung 8-7: XX-Konstellation in Hodentubuli, Hermaphroditismus verus; Fall g 2, Genotyp XX/XY, Alter 4 Jahre, 100x.

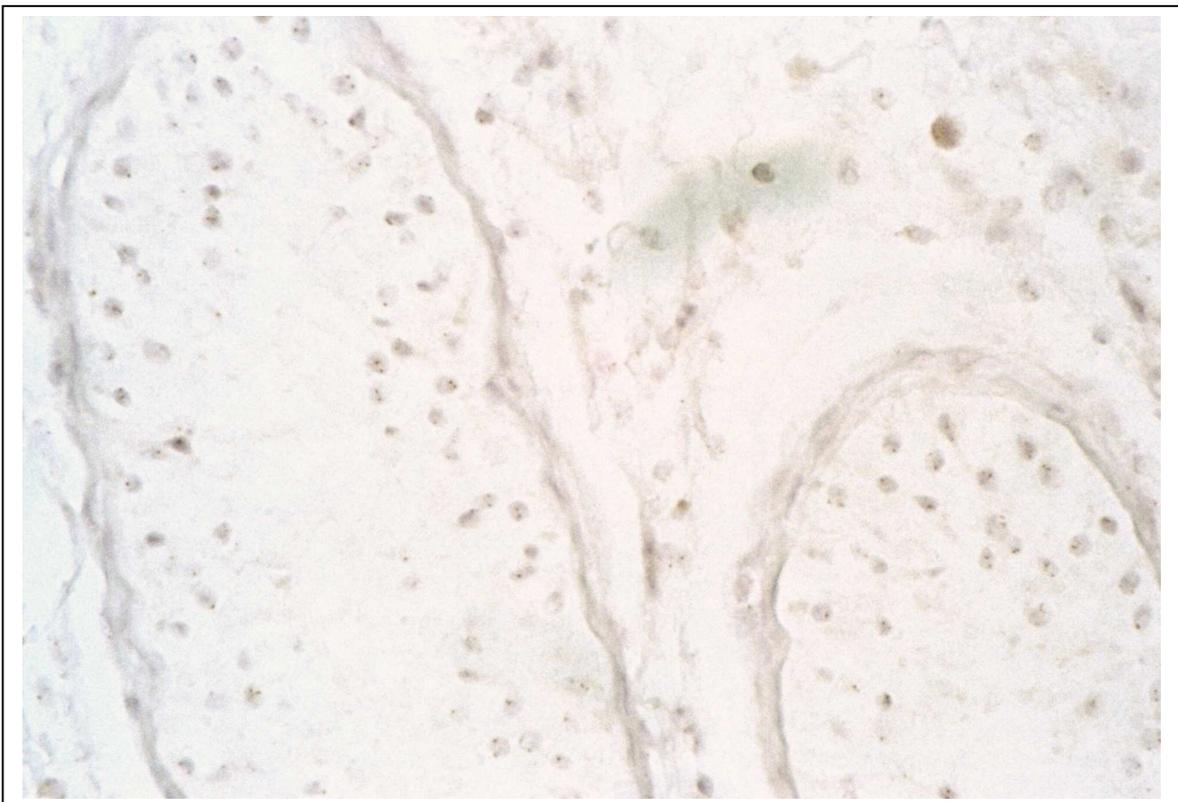


Abbildung 8-8: XX-Konstellation in Hodentubuli, Hermaphroditismus verus; Fall g 12, Genotyp XX/XY, Alter 15 Jahre, 100x.

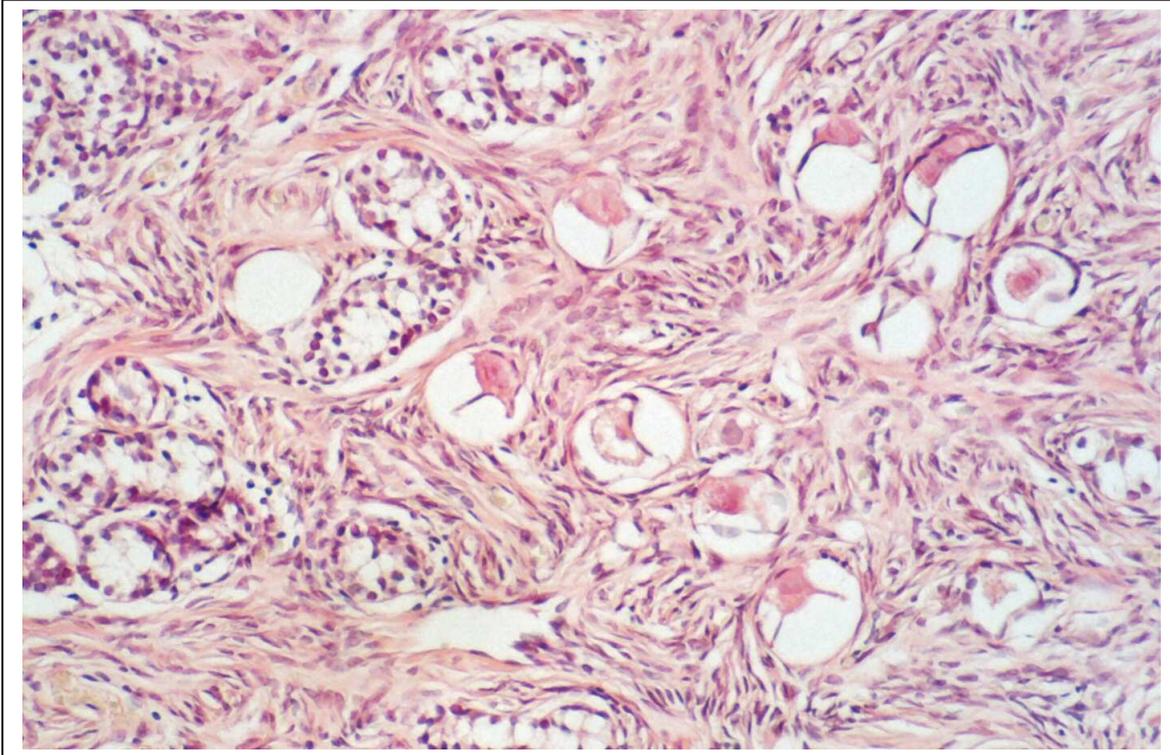


Abbildung 8-9: Ovotestis mit atrophischen Hodentubuli und Primärfollikeln, Fall g2, XX/XY-Konstellation HE 50x.

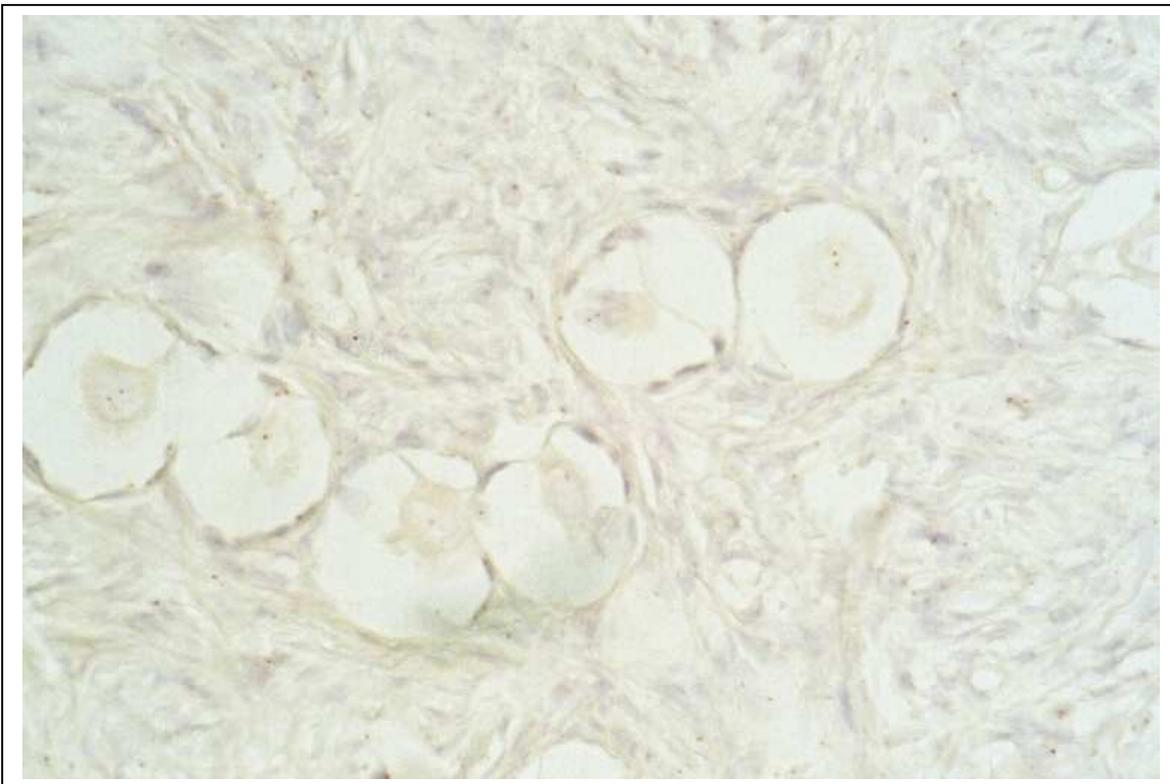


Abbildung 8-10: Doppelmarkierung für das X-Chromosom in Keimzellen der Primärfollikel, Fall g2, XX/XY-Genotyp 100x.

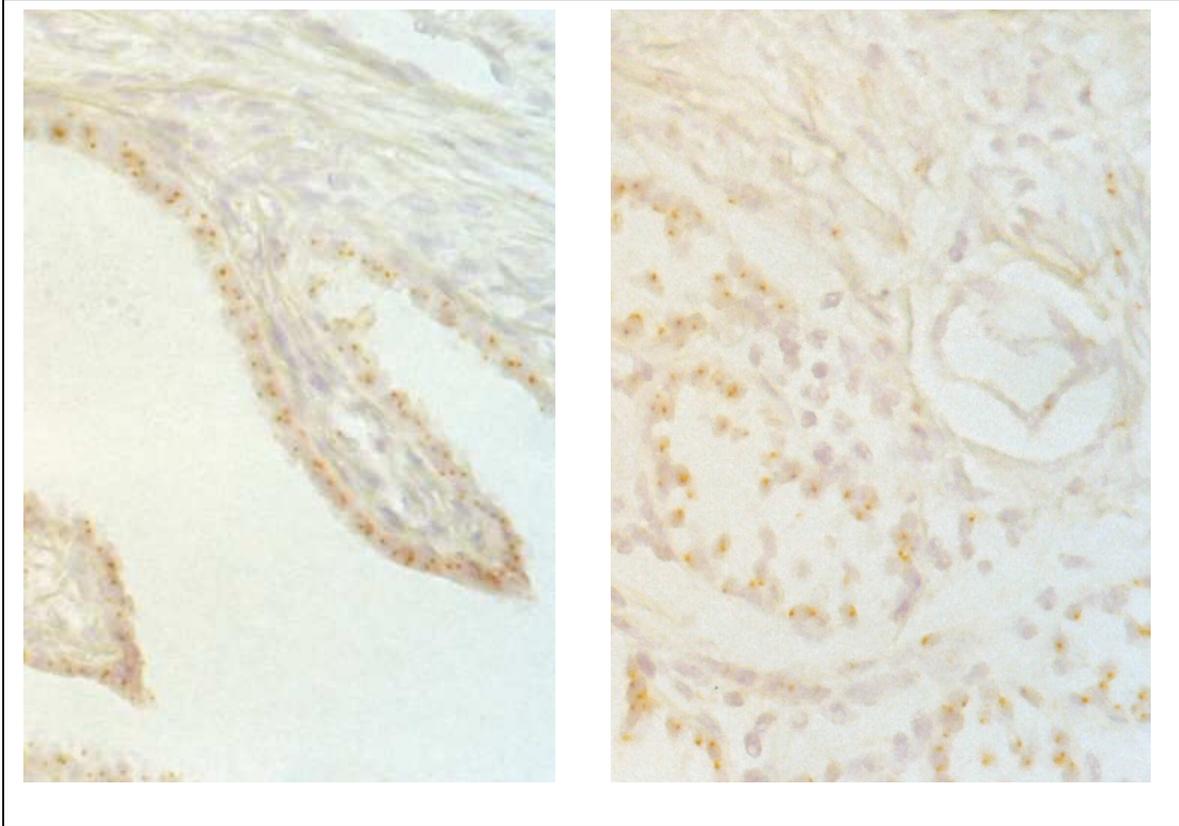


Abbildung 8-9: LINKS: Einfache Markierung für das Y-Chromosom im Tubenepithel; hier sehr dicht liegende Zellen, wobei die Signale als Doppelmarkierung erscheinen. RECHTS: Einfache Markierung für das Y-Chromosom im Ovotestis; beide Fall g 2, XX/XY-Genotyp, 100x.

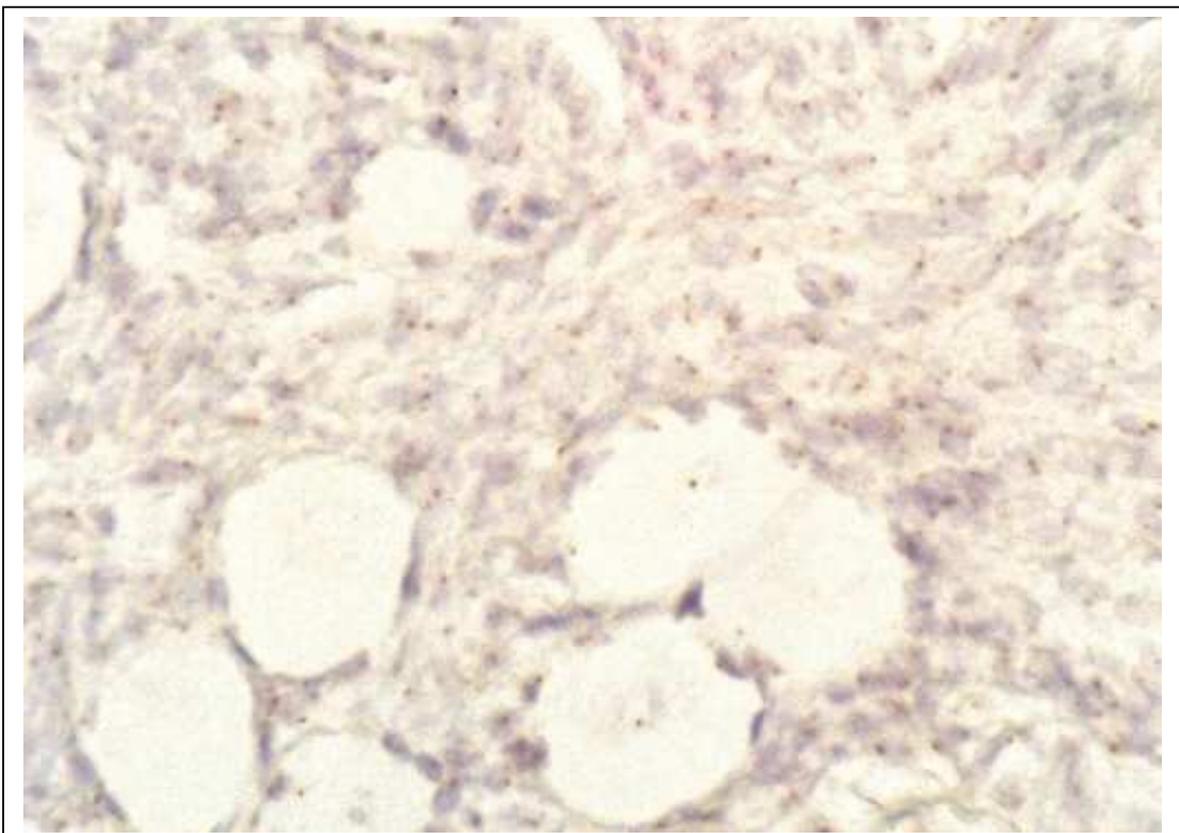


Abbildung 8-10: Einfache Markierung für das Y-Chromosom in Primärfollikeln und im ovariellen Stroma, Fall g 2, XX/XY-Situation, 100x.

8.3 Gruppe III: Fälle mit X0/XY-Konstellation (Ullrich-Turner-Syndrom, Gemischte Gonadendysgenese)

Fall g3: Ausgeprägte Gonadendysgenese mit atrophischem Hodengewebe bei angeg. Turner-Syndrom und Trisomie 18.

Histologie: Streak-Gonade bestehend aus einem länglich ausgezogenen Gebiet mit spindelzelligem Keimdrüsenstroma. In den zur Verfügung stehenden Blöcken waren keine Hodentubuli oder Anteile eines Nebenhodens zu finden. Die testikulären Strukturen waren jedoch im ursprünglichen Befund beschrieben.

In dem vorliegenden Material ist eine X0/XY-Konstellation zu erkennen. Ein einfaches Signal für das X-Chromosom taucht in allen Gewebekomponenten auf. Das Y-Chromosom konnte im vorliegenden Material in 5 - 10 % der Zellen gefunden werden. Es liegt ein Mosaik mit einer X0/XY-Konstellation vor. Die XY-Komponente ist allerdings nur schwach ausgeprägt. Das ovarähnliche Stroma der Streak-Gonade verhält sich wie die übrigen Gewebeanteile.

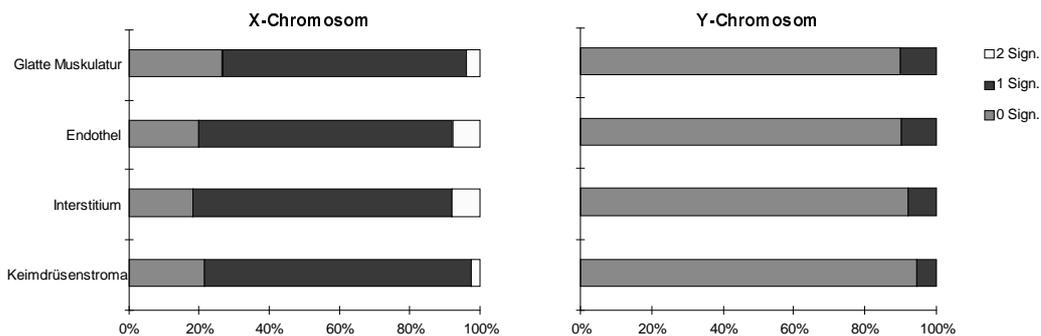


Abbildung 8-11: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 3.

Fall g5: Gemischte Gonadendysgenese. Hypoplastisches Hodengewebe, Anteile einer Tube, keine ovariellen Anteile.

Histologie: Teilweise locker und teilweise dichter gelagerte Hodentubuli. Dazwischen in Gruppen liegende Leydigzellen, an anderer Stelle auch reichlich Bindegewebe zwischen den Tubuli. Daneben finden sich Anschnitte von Nebenhodengewebe, einer Tube und eines Samenleiters. Ovarielle Strukturen sind nicht nachweisbar.

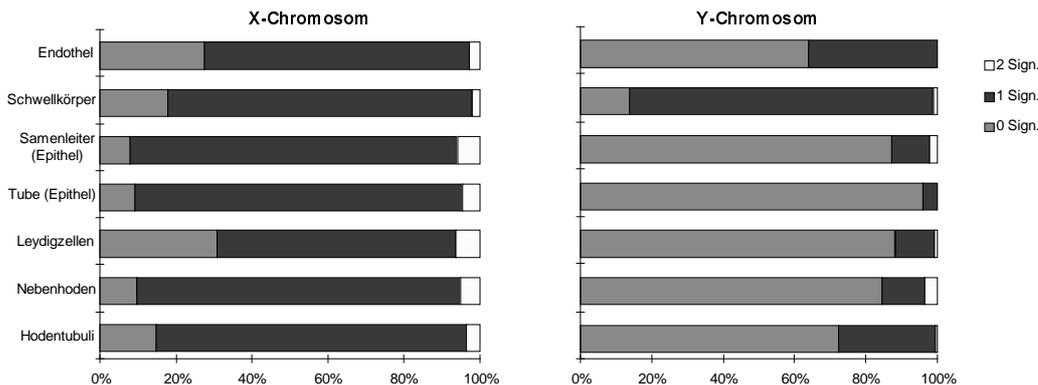


Abbildung 8-12: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 5

Im vorliegenden Gewebe liegt eine X0/XY-Konstellation der Geschlechtschromosomen vor. Bei der Reaktion auf das X-Chromosom zeigte sich in allen Nuclei ein Signal. Dabei ist eine Signaldichte von 86% im Epithel der Tube und des Samenleiters, von 82% in den Sertolizellen und 63% in den Leydigzellen zu nennen.

Die Zelllinie mit dem Y-Chromosom konnte ebenfalls in allen Gewebekomponenten nachgewiesen werden. Hier besteht ein unterschiedliches Verteilungsmuster für das Y-Chromosom. Besonders in der Epithelauskleidung von Nebenhoden, Samenleiter und Tube, aber auch in den Sertolizellen der Hodentubuli ist das Y-Chromosom fokal unterschiedlich häufig verteilt. Hier findet man Areale mit sehr hoher Signaldichte neben Abschnitten, in denen kein Y-Chromosom vorkommt. In den Gefäßwandzellen und in dem Bindegewebe, sowie in den Leydigzellen sind die Signale gleichmäßig verteilt.

Daneben gibt es auch quantitative Unterschiede bei der Reaktion auf das Y-Chromosom. Während im Plattenepithel des untersuchten Schwellkörpergewebes fast alle Zellen (85%) ein Signal zeigen, kommt es im Endothel (36%), in den Sertolizellen (27%), im Epithel des Nebenhodens (12%) und im Samenleiter nur mit 10% vor. Im Epithel der Tube zeigt sich das Y-Chromosom nur an einer Stelle (< 5%).

Damit besteht ein Chromosomenmosaik mit ungleicher Gewebeteilung. Insgesamt ist die XY-Komponente seltener vertreten als die Zellen mit X0-Konstellation.

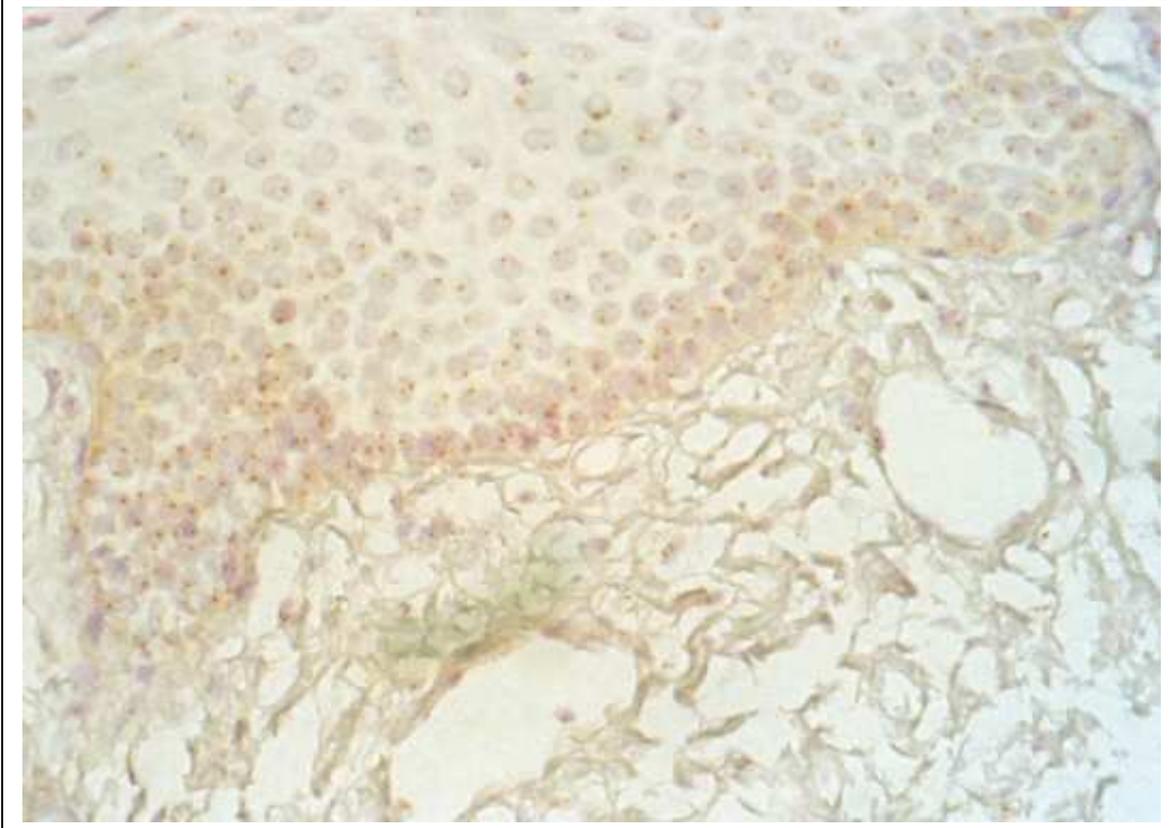


Abbildung 8-13: Oberflächenepithel eines klinisch als Klitorishypertrophie bezeichneten Schwellkörpergewebes mit einfacher Markierung gegen das X-Chromosom, Fall g 5, X0/XY-Genotyp, 100x.

Fall g6: Gem. Gonadendysgenese; Gonadoblastom, Tuben- und Nebenhodenstrukturen, keine ausdifferenzierten Ovar- oder Hodenanteile.

Histologie: Vor allem aus Bindegewebe aufgebaute dysgenetische Gonade. An einer Stelle ein dünner Saum ovarähnlichen Stromas ohne nachweisbare Primärfollikel. Außerdem eine Tube mit regulärer Epithelauskleidung sowie Nebenhodenkanälchen mit verringerter Lichtung. An einer Stelle Gonadoblastomherde. Diese Tumorzellnester mit großen zytoplasmareichen Keimzellen mit prominenten Nucleoli sowie verkalkten Einschlüssen. Keine ausdifferenzierten Hodenanteile.

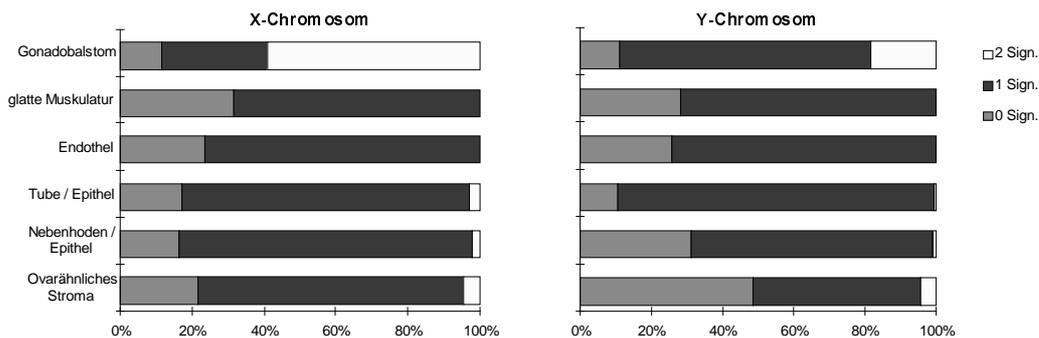


Abbildung 8-14: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 6

Die Diagnose eines Hermaphroditismus konnte hier nicht gestellt werden. Histologisch liegt nur an einer Stelle ein dünner Saum ovarähnlichen Stromas ohne nachweisbare Primärfollikel vor.

Hier wurde in den meisten Zellen ein Signal für das X-Chromosom sowie für das Y-Chromosom gefunden. Die Gonosomenkonstellation besteht somit aus einer X0- sowie aus einer XY-Zelllinie. Dabei herrscht ein deutliches Übergewicht der Zellen mit XY-Konstellation.

Des Weiteren besteht hier ein quantitativer Unterschied zwischen den ovariellen Strukturen (47%) und den Signalen im Nebenhoden (68%) für das Y-Chromosom. Im Seitenvergleich der beiden Gonaden ist die Verteilung der Gonosomen gleich.

In den Keimzellen der Gonadoblastomherde wurden Kerne mit 59% für eine XX-Konstellation, sowie 18% mit zwei Y-Chromosomen gefunden.

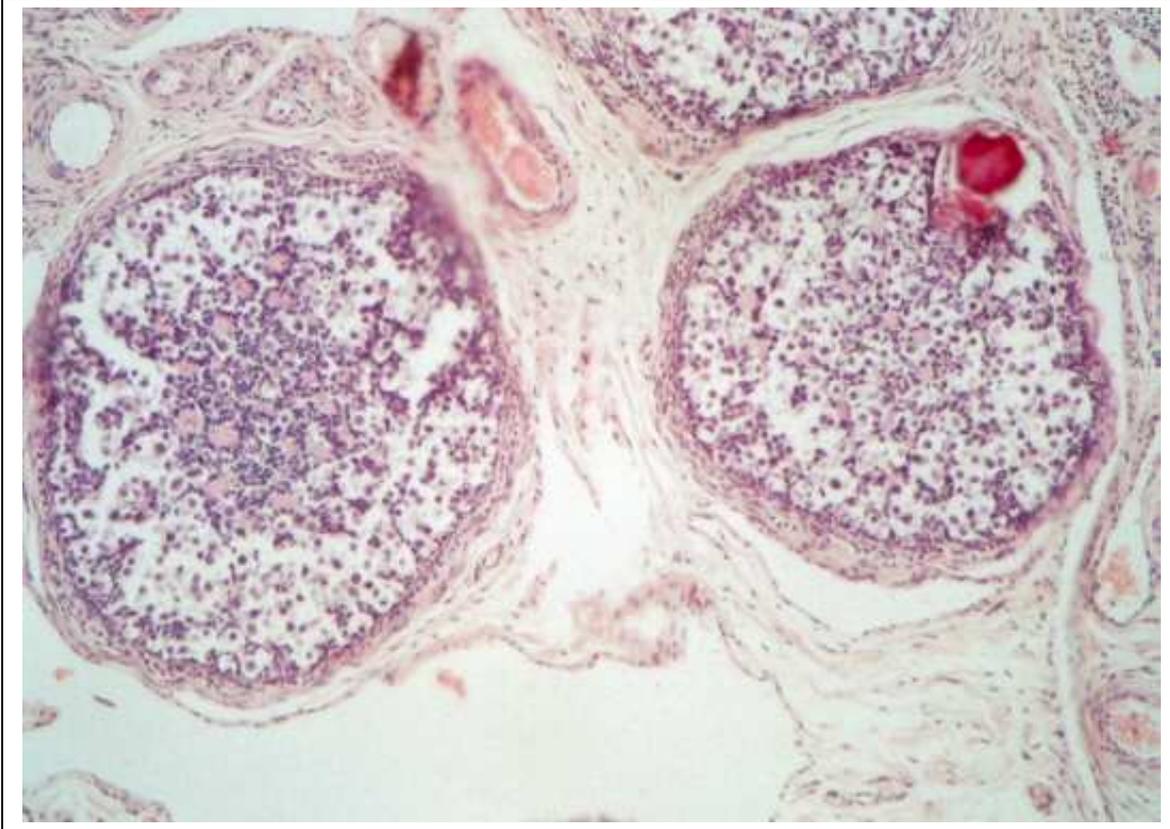


Abbildung 8-16: Gonadoblastomherde in einer dysgenetischen Gonade mit X0/XY-Genotyp; Fall g6, Alter 6 Jahre, HE 25x.

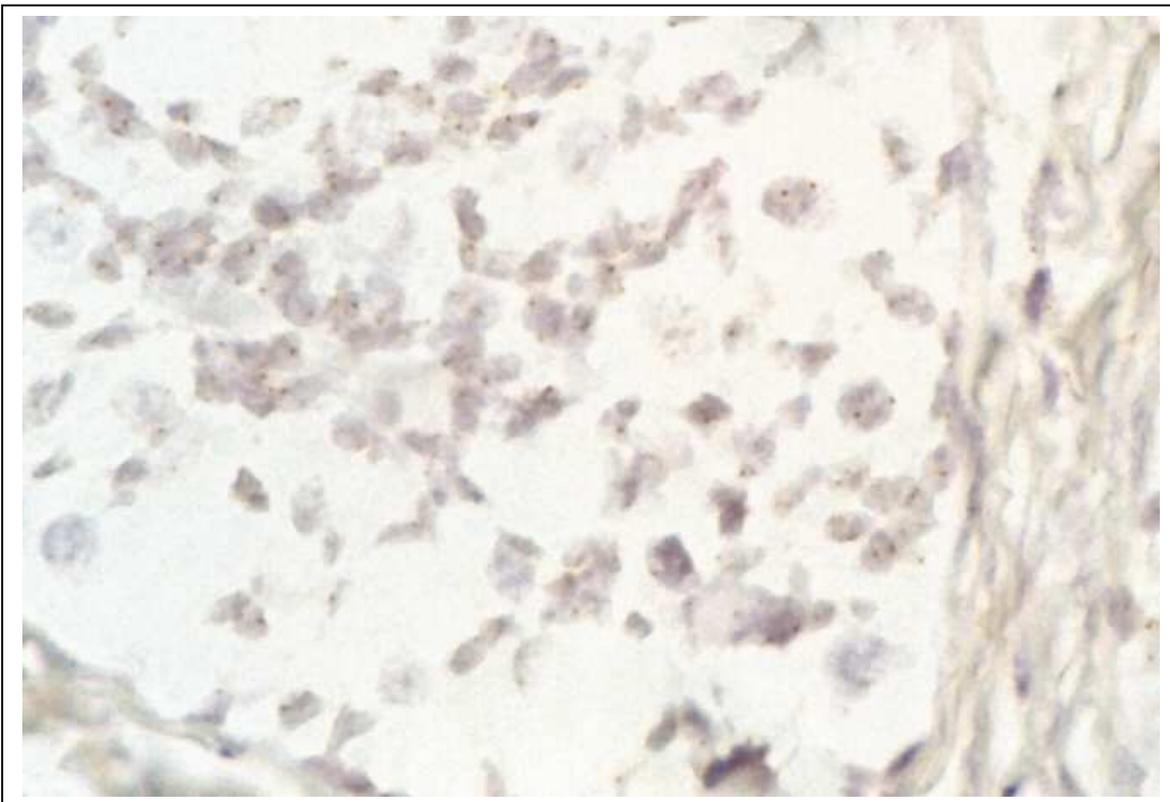


Abbildung 8-15: XX-Situation in Zellkernen des Gonadoblastoms, Fall g6, X0/XY-Genotyp, 100x.

Fall g7: Gemischte Gonadendysgenese; zwitterige dysgenetische Gonade.

Histologie: Undifferenzierte gemischte Gonade mit hodentubulus-artigen Formationen und einzelnen prominenten Spermatogonien. Weiterhin finden sich:

- a) zellreiches spindelzelliges ovarähnliches Stroma
- b) Nebenhodenkanälchen
- c) eine Struktur als muskelkräftiger Gang und abgeflachter Schleimhaut (Samenleiter)
- d) eine Tube mit papillär geformtem Schleimhautrelief
- e) gefäß- und nervenfaserhaltiges Bindegewebe mit einschichtigem Deckzellbelag.

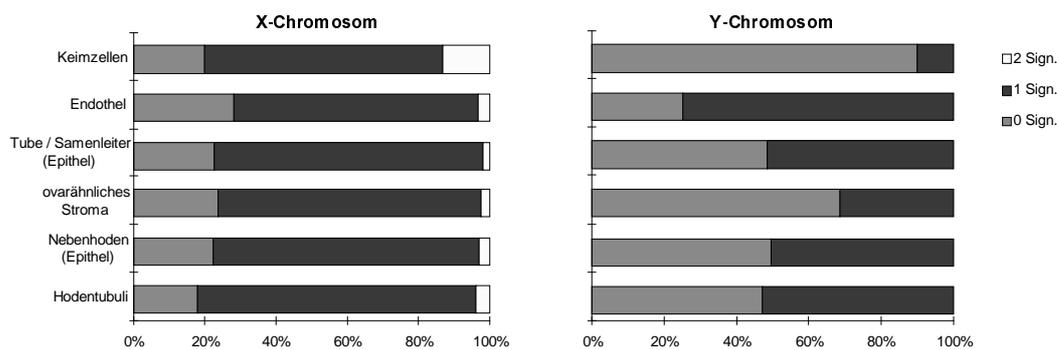


Abbildung 8-17: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 7

Bei diesem Fall wurde die Diagnose einer gem. Gonadendysgenese gestellt, da es sich bei den beschriebenen ovarähnlichen Anteilen nur um einen Bereich mit spindelzelligem Stroma handelt. Ein differenziertes Ovar oder dessen Anteile war hier nicht zu finden. Somit konnte dieser Fall nicht als Hermaphroditismus verus klassifiziert werden.

Bei der In Situ-Hybridisierung zeigte sich ein Mosaik bestehend aus einer X0/XY Gonosomenkonstellation. Die beiden Zelllinien sind in allen untersuchten Gewebekomponenten enthalten. Sowohl die testikulären als auch die ovariellen, speziell weiblichen Anteile (z.B. Tube) enthalten ein Y-Chromosom. Dabei ist das XY-Derivat unterschiedlich stark vertreten. Im Endothel findet man 75% aller Kerne mit einem Y-Chromosom. In den Epithelien von Tube, Nebenhoden und Samenleiter 50% aller Kerne mit einem Y-Chromosom. Im ovarähnlichen Stroma reagierten nur 31% der Zellen positiv auf Y. Auch in diesem Fall liegen in den epithelialen Strukturen die Zellen mit einem Y-Chromosom fokal gehäuft vor. Es besteht eine X0/XY-Konstellation mit unterschiedlich starker Ausprägung der beiden Komponenten. Die XY-Komponente ist am häufigsten im Endothel und in einigen Bereichen des Nebenhodens zu finden. Die geringste Ausprägung findet sich im ovarähnlichen Stroma.

Fall g10: Gemischte Gonadendysgenese mit überwiegend unreifem Hodengewebe, wenig ovariellem Stroma; Schwellkörperhyperplasie.

Histologie: Unreifes Hodengewebe mit unterschiedlich dicht gelagerten Tubuli und Übergang in ein spärliches Rete testis. An einer Stelle Übergang in ein zellreiches ovarähnliches Stroma. Keine Primärfollikel und Eizellen. Vereinzelt Leydigzellen. An der Oberfläche der Gonade kubische Deckzellen. Außerdem Präparate eines hyperplastischen Schwellkörpers.

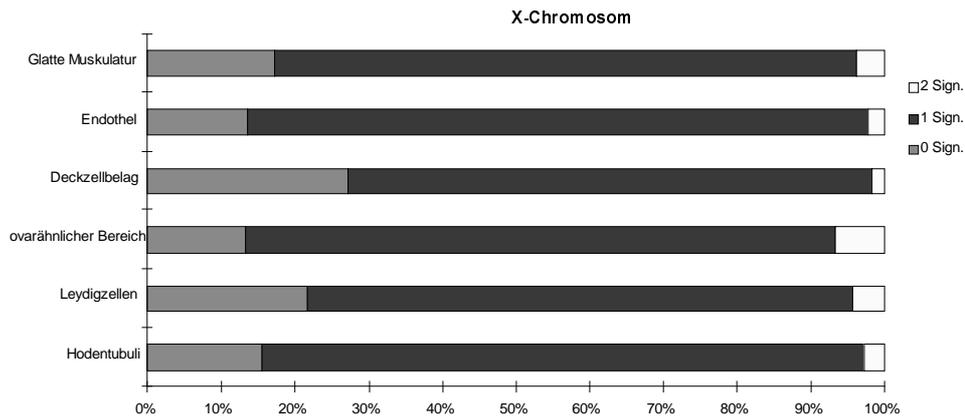


Abbildung 8-18: Signalverteilung des X-Chromosoms in g 10

Bei diesem Fall konnten keine eindeutigen Anteile eines Ovars nachgewiesen werden. Somit ist auch hier die Diagnose einer gemischten Gonadendysgenese und nicht die eines Hermaphroditismus gestellt worden.

Im Rahmen der zytogenetischen Untersuchungen konnte eine X0/XY-Gonosomenkonstellation festgestellt werden. Bei der In Situ-Hybridisierung wurde in allen Gewebeanteilen das X-Chromosom mit einem Signal pro Zellkern nachgewiesen. Das Y-Chromosom konnte im vorliegenden Material nicht nachgewiesen werden. Als Untersuchungsmaterial stand reguläres Material als Resektat, bestehend aus einer Gonade und einem weiteren Block mit Schwellkörpergewebe zur Verfügung. Aus dem Resektat wurden 6 und aus dem zweiten Block weitere 4 Präparate zum Nachweis des Y-Chromosoms in unterschiedlichen Versuchsdurchläufen angefertigt. Während die Kontrollpräparate jeweils Signale für das Y-Chromosom zeigten blieb hier der Nachweis negativ. Die Darstellung des X-Chromosoms war dagegen unproblematisch. Aus dem Ergebnis der In Situ-Hybridisierung ging eine einfache X0-Konstellation hervor.

Fall g11: Gemischte Gonadendysgenese: Rechts atrophischer Hoden, links Streak-Gonade, zwitteriges äußeres Genitale.

Histologie: (Rechts): Hodengewebe mit atrophischen Hodentubuli. Interstitiell Leydigzellen und lockeres Bindegewebe. Hier keine ovariellen Anteile.

(Links): Spärliche, stark atrophische Hodentubuli sowie Anteile des Nebenhodens.

Randlich ein Bereich aus ovarähnlichem Gewebe, dort ganz vereinzelt Primärfollikel.

Im Fall g11 liegt ebenfalls ein klinisch angegebener XY/X0 Karyotyp vor. Das Untersuchungsmaterial ist hier im Rahmen einer Sektion entnommen worden. Der Nachweis erbrachte in allen Zelltypen ein Signal für das X-Chromosom und ein Signal für das Y-Chromosom. Im spärlich vorhandenen ovariellen Anteil konnten die Geschlechtschromosomen nicht nachgewiesen werden. Insgesamt ist die Qualität der In Situ-Hybridisierung am Sektionsmaterial unbefriedigend.

Neben der spärlichen Signalausbeute ist bei diesem Material eine starke Hintergrundfärbung aufgetreten. Eine Gonosomenkonstellation mit einer X0 und einer XY-Zelllinie konnte dennoch eindeutig nachgewiesen werden. Das Mosaik findet sich auch hier in allen untersuchten Zellverbänden.

8.4 Gonadendysgenese mit XY-Translokation

Fall g9: Dysgenetische Gonade mit Ovar und zystisch aufgeweiteten Follikeln, Gelbkörper, atrophisches Hodengewebe.

Histologie: Dysgenetische Gonade bestehend aus einem Saum mit ovariell spindelzelligem Stroma, darin eingelagert zahlreiche Primärfollikel. Nach innen zystisch aufgeweitete Follikel mit kubischem Epithelbelag sowie mehrere vernarbte Gelbkörper. Außerdem eine Tube und eine Region mit spärlichen, atrophischen hoden- bzw. nebenhodenähnlichen Strukturen. Keine Leydigzellen.

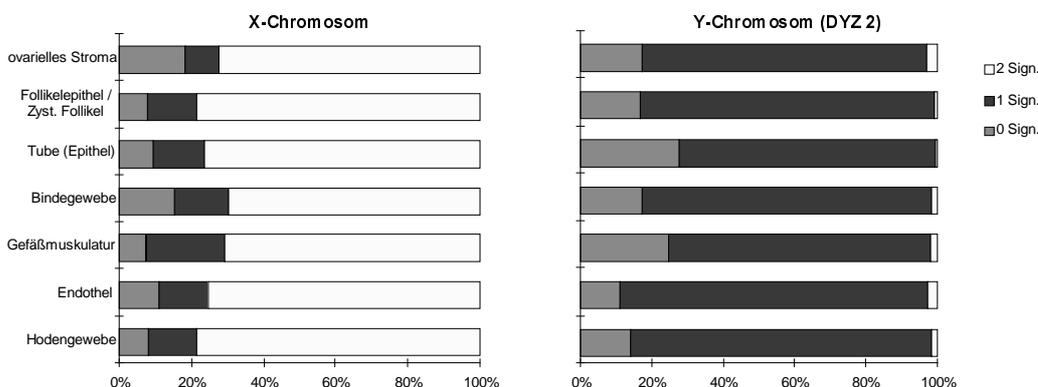


Abbildung 8-19: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 9

Im vorliegenden Material ist eine XY-Translokation durch die vorausgegangene humangenetische Untersuchung nachgewiesen worden. Es wurde eine Konstellation beschrieben, bei der vom Y-Chromosom der vollständige heterochromatische Bereich des langen Arms auf das X-Chromosom transloziert wurde. Im Bereich des X-Chromosoms

liegt der Bruchpunkt im kurzen Arm. Die Untersuchung des X-Chromosoms mit der In Situ-Hybridisierung erbrachte in allen Gewebekomponenten zwei Signale. Bei der Überschichtung mit der Sonde DYZ 2 (Fa. Böhlinger) gegen das Y-Chromosom konnte eine einheitliche Markierung mit einem Signal je Zellkern gefunden werden. Gemäß der prozentualen Verteilung der Signale ist hier kein Mosaik zu erkennen. Zusätzlich wurden Präparate mit einer zentromerspezifischen Sonde (DYZ 3, Fa. Oncor) angefertigt. Diese zeigt keine Reaktion mit den vorhandenen Y-chromosomalen Sequenzen. Die Sonde DYZ 3 bindet am Zentromer, die Sonde DYZ 2 hingegen im distal gelegenen Heterochromatin des langen Arms des Y-Chromosoms. Die verwendete Sonde gegen das X-Chromosom (DXZ 1) richtet sich ebenfalls gegen dessen zentromeren Bereich.

Eine genaue Beschreibung der verwendeten Sonden findet sich in der Einleitung (4.3.2. Satelliten-Sonden).

Ohne Information über die strukturellen Aberrationen würde man in diesem Fall zunächst auf eine XXY-Konstellation schließen. Die fehlende Reaktion mit DYZ 3 zeigt jedoch die Abwesenheit der heterochromatischen Region des Y-Chromosoms an.

8.5 Ergebnisse an Keimzellen in den untersuchten Gonaden

In drei der untersuchten Fälle mit Gonadendysgenese konnte in den Keimzellen des Ovars eine Anfärbung der Chromosomen gewonnen werden.

Fall	Karyotyp	Gruppe	Gonade / äußeres Genitale	Keimzellen
g2	46,XX/46,XY	Hermaphroditismus	re.: Ovar, Hoden li. Hoden	Oozyten: XX, X, Y
g7	45,X0/46,XY	Gem. Gonadendysgenese	Ovaranteile, atrophischer Hoden, Steakgonade	Oozyten: XX, X, Y, YY
g9	46X,t,(X:Y)	Gonadendysgenese bei Translokation	Ovar, überwiegend unreifes Hodengewebe, intersex. Genitale	Oozyten: X, Y

Tabelle 8-1: Keimzellen in den untersuchten Gonaden

Fall g2: In den Präparaten wurden Keimzellen (primäre Oozyten) mit einem und mit zwei X-Chromosomen sowie andere mit einem Y-Chromosom beobachtet.

Fall g7: Hier finden sich ebenfalls Zellen mit einem als auch Zellen mit zwei Signalen für X. Außerdem sind hier einige einfache und doppelte Signale bei der Reaktion auf das Y-Chromosom zu finden.

Fall g9: Auch hier wurden Keimzellen mit einem Signal für das X- und einem für das Y-Chromosom dargestellt.

Eine quantitative Aussage ist bei der Auswertung jedoch schwierig. In einem HE-Schnitt wurden 60 intakte Primärfollikel mit einer Eizelle gefunden, während in einem ISH-Präparat nur 15 zu identifizieren waren. Wegen der geringen Zahl der Zellen in denen ein Signal zu finden war, wurde auf die quantitative Auswertung verzichtet.

9 Gonadale und extragonadale Keimzelltumoren - Ergebnisse

9.1 Ergebnisse an reifen Teratomen

Histologie des untersuchten Materials

Die untersuchten Tumoren enthalten ein gemischtes Bild an unterschiedlichen Gewebeanteilen. Sowohl bei den sakrokokzygealen als auch bei den ovariellen und testikulären Teratomen finden sich wiederkehrende histologische Muster, so dass diese hier zusammengefasst dargestellt werden.

Histologie: Am häufigsten fanden sich entodermale Epithelien. Darunter sind respiratorisches und schleimbildendes, darmähnliches Epithel sowie ausgereifte Drüsenanteile. Zu den ektodermalen Gewebekomponenten gehören Haut mit Anhangsgebilden, Neurogliazellen, verhorntes und nicht verhorntes Plattenepithel. Die epithelialen Bestandteile umkleiden zahlreiche unterschiedlich große Zysten. Anteile, die dem Mesoderm entstammen, sind Knorpel und Knochengewebe, glatte Muskulatur sowie Fett- und Bindegewebe.

<i>Fall</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Ektoderm</i>	<i>Mesoderm</i>	<i>Entoderm</i>
<i>th3</i>	Hoden	verhorntes Plattenepithel		mukoide Drüsen
<i>th4</i>	Hoden	verhorntes Plattenepithel Hautanhangsgebilde	Knorpelgewebe	mukoide Drüsen
<i>to3</i>	Ovar	verhorntes Plattenepithel, Hautanhangsgebilde	gliöses Gewebe, Fett, Knorpelgewebe	mukoide Drüsen
<i>to5</i>	Ovar	verhorntes und nicht verhorntes Plattenepithel, Hautanhangsgebilde	Fettgewebe und Muskulatur	respiratorisches und intestinales Epithel, muzinös-azinäre Drüsen
<i>to6</i>	Ovar	Plattenepithel	Binde- und Fettgewebe, Muskulatur, gliöses Gewebe	
<i>to7</i>	Ovar	Plattenepithel, Hautanhangsgebilde	Fett und Bindegewebe, gliöses Gewebe	respiratorisches Epithel
<i>to8</i>	Ovar	Plattenepithel	gliöses Gewebe, Fett und Bindegewebe	respiratorisches interstinales Epithel
<i>ts1</i>	Steißbein, wbl.	Plattenepithel	gliöses Gewebe, Fett und Bindegewebe, lymphatisches Gewebe, Muskulatur	respiratorisches intestinales Epithel
<i>ts6</i>	Steißbein, wbl.	Plattenepithel	Fett und Bindegewebe, quergestreifte Muskulatur, gliöse Strukturen, Knorpel	gemischte Drüsen respiratorisches intestinales Epithel
<i>ts8</i>	Steißbein, wbl.	Plattenepithel	gliöses Gewebe, Fett und Bindegewebe	hochprismatisches Epithel, Drüsenanteile

Tabelle 9-1: Histologische Zusammensetzung der untersuchten reifen Teratome

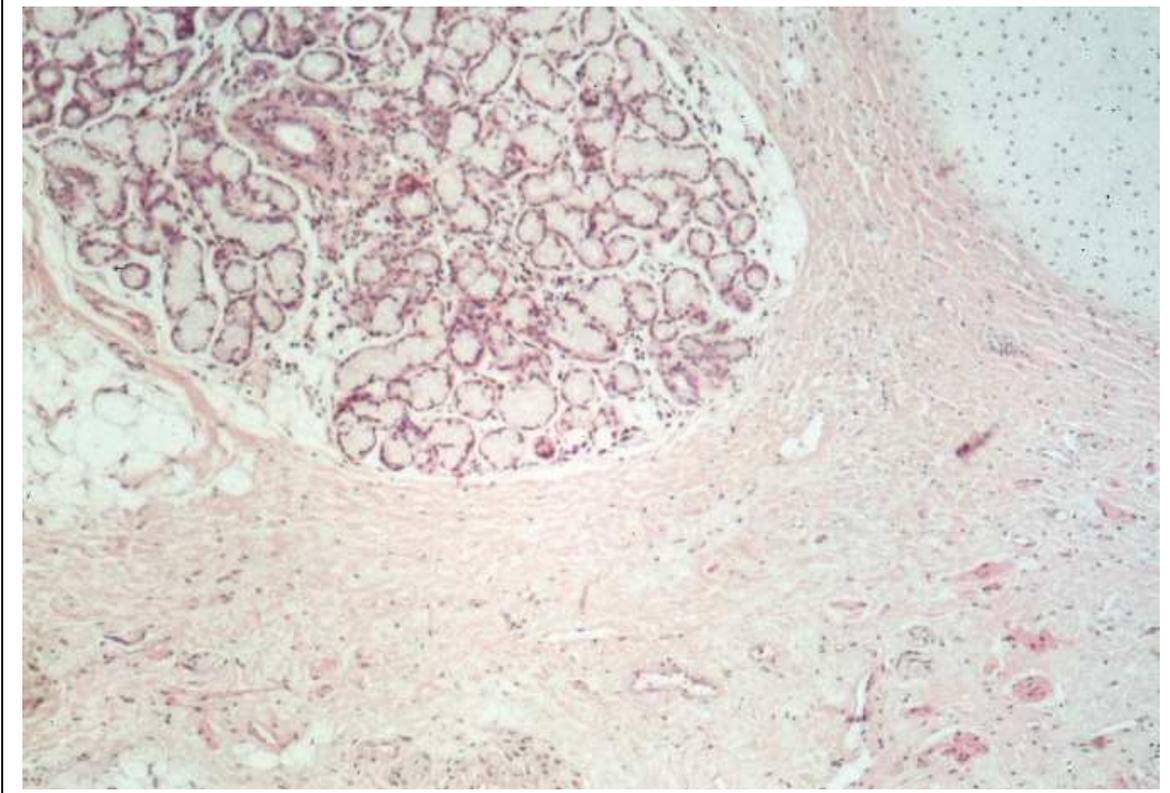


Abbildung 9-1: Reifes Teratom des Ovars mit Gliazellen und Drüsenformationen; Fall to3, Alter 6 Jahre, HE 25x.

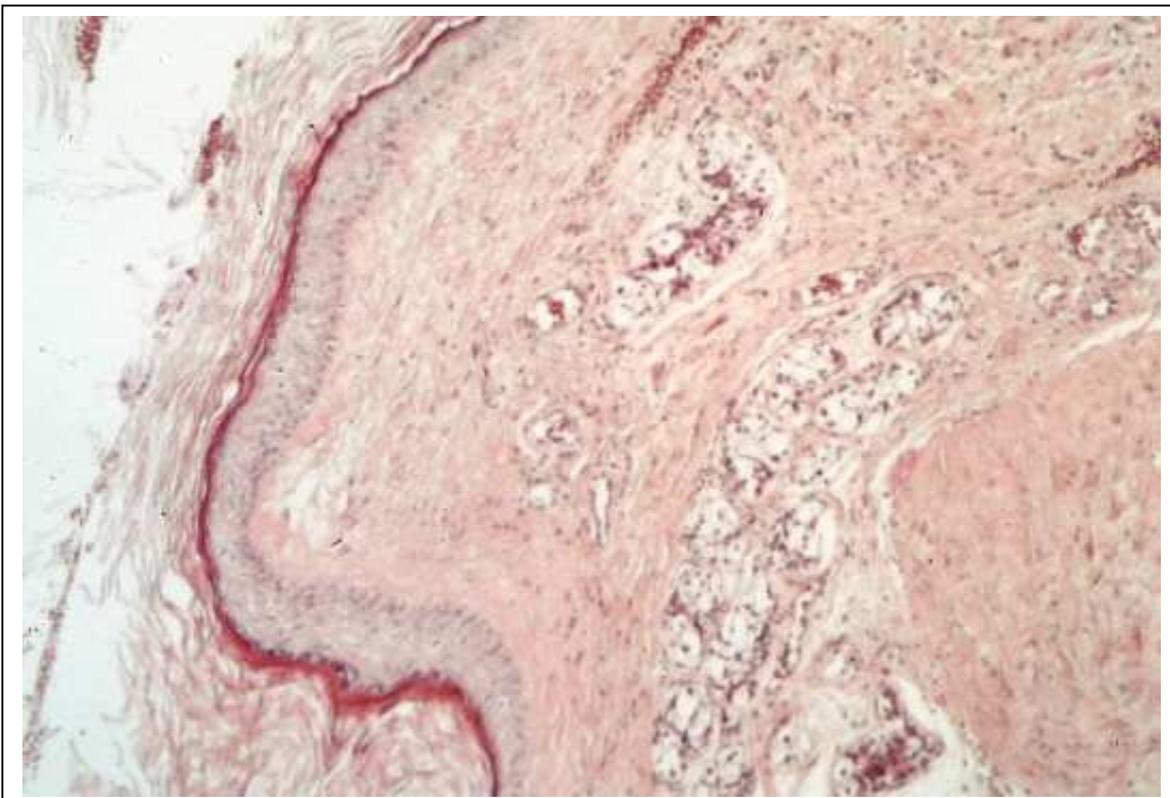


Abbildung 9-2: Reifes Teratom des Hodens, mit verhorntem Plattenepithel ausgekleidete Zysten, randlich altersentsprechende Hodentubuli; Fall th3, Alter 7 Jahre, HE 25x.

9.1.1 Reife Teratome des Hodens

Die Präparate zeigen einen regulären Gonosomenbestand. In allen Gewebeanteilen wurde ein Signal für das X-Chromosom und ein Signal für das Y-Chromosom gefunden. Doppelmarkierungen (bis zu 7% für Y) wurden auf die Überlappung von Zellkernen zurückgeführt und nicht als Disomie gewertet.

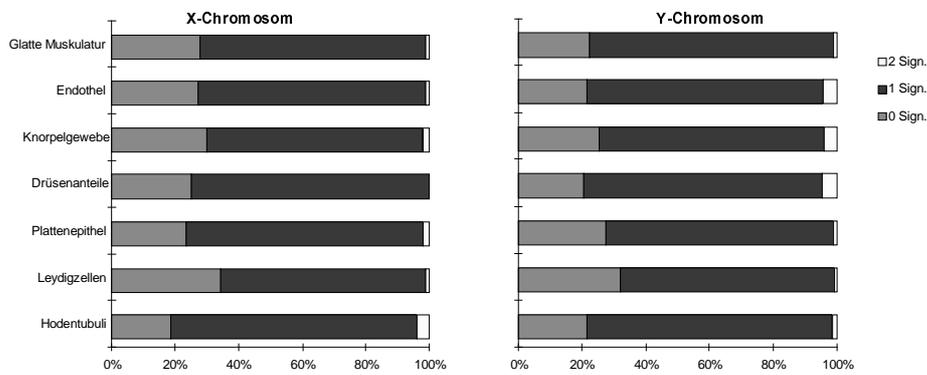


Abbildung 9-3: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms reifen Teratomen des Hodens

9.1.2 Reifen Teratome des Ovars

Alle untersuchten Teratome des Ovars zeigten den entsprechenden Gonosomenbestand des Trägers. Bei den weiblichen Tumoren (Steißbein und Ovar) fanden sich in 60% bis 81% der Zellen zwei Signale für das X-Chromosom. Drei Signale (Überlappungen) wurden in maximal 3% der Kerne gefunden.

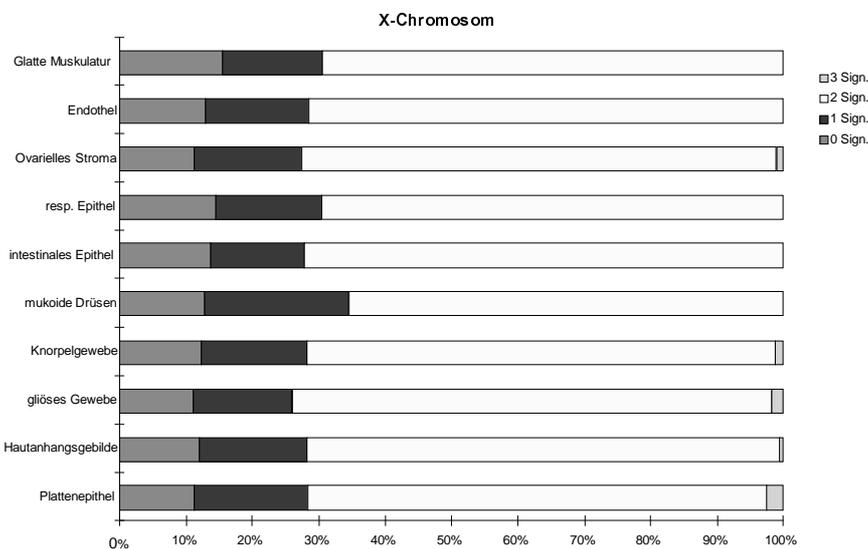


Abbildung 9-4: Signalverteilung des X-Chromosoms in reifen Teratomen des Ovars

9.1.3 Sakrokokzygeale reife Teratome

Es wurden Tumoren von drei weiblichen Patienten untersucht. Die Signalverteilung ist entsprechend der reifen Teratome des Ovars. Genauere Angaben finden sich in den Tabellen des Anhangs.



Abbildung 9-5: Reifes Teratom des Hodens, einfache Markierung für das Y-Chromosom im Plattenepithel der Tumorkomponente; Fall th 4, Alter 7 Jahre, 100x.

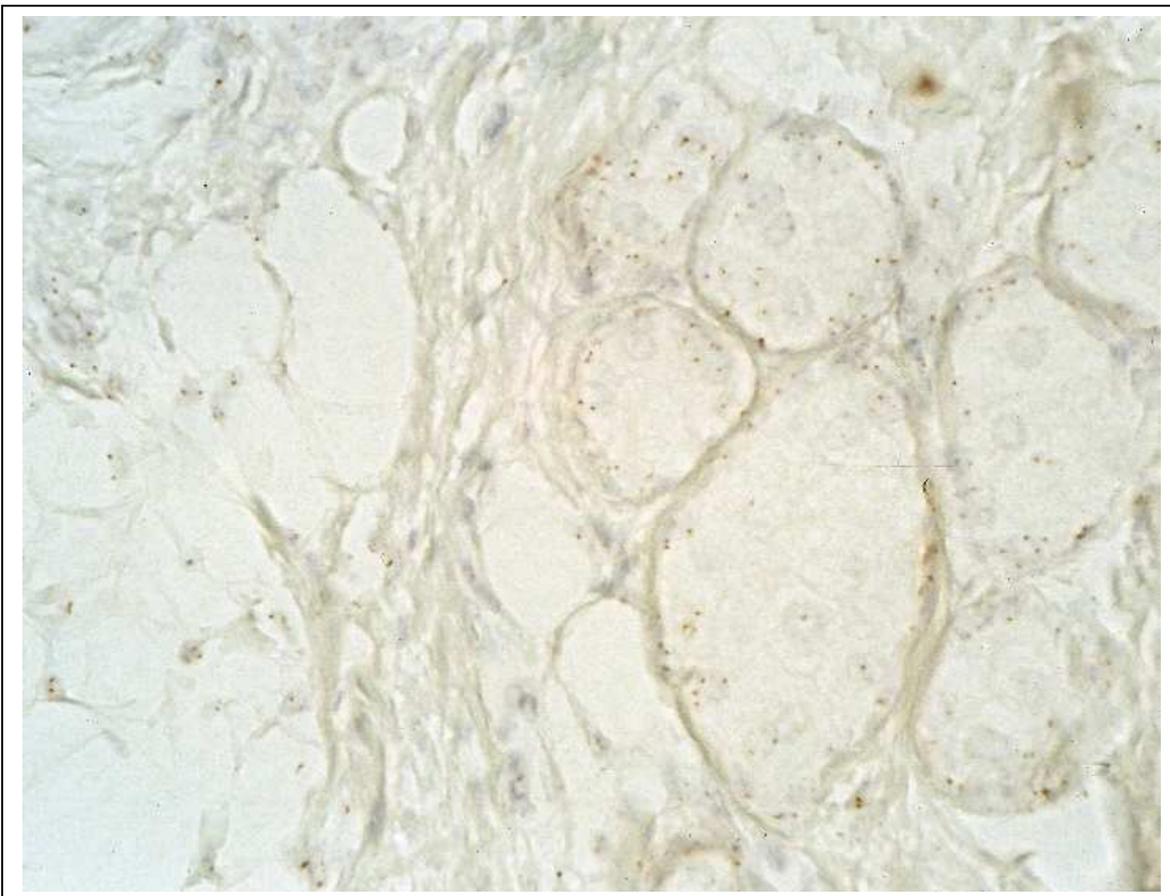


Abbildung 9-6: Reifes Teratom des Ovars, Doppelmarkierung für das X-Chromosom in Tumoranteilen; Fall to 3, Alter 6 Jahre, 100x.

9.2 Partiiell unreife Teratome

Diese Gruppe umfasst ebenfalls Tumoren des Hodens, des Ovars, sowie sakrokokzygeale Tumoren. Zur besseren Übersicht sind diese Fälle hier noch zunächst kurz dargestellt.

Fall	Lokalisation	Zusammensetzung
th1	Hoden	Teratom des Hodens mit reifen und unreifen Gewebeanteilen, II° nach Gonzales-Crussi
th2	Hoden	Unreifes Hodenteratom, II° nach Gonzales-Crussi.
to1	Ovar	Überwiegend reifes, fokal immatures Teratom des Ovars; Gliomatosis Peritonei, II° nach Gonzales-Crussi
ts2	Steißbein, männlich	Unreifes Steißbeinteratom (I° nach Gonzales-Crussi)
ts4	Steißbein, weiblich	Teils immatures Teratom (II° nach Gonzales-Crussi)
ts5	Steißbein, weiblich	Teilweise unreifes Gewebe; (II° nach Gonzales-Crussi)

Tabelle 9-2 Übersicht über die partiell unreifen Teratome.

Fall th1: Teratom des Hodens mit reifen und unreifen Gewebeanteilen. II° nach Gonzales-Crussi

Histologie: Bei den reif ausgebildeten Strukturen handelt es sich um Anschnitte einiger Zysten, die mit schleimbildenden und respiratorischem Epithel sowie nicht verhorntem Plattenepithel ausgekleidet sind. Daneben reichlich Bindegewebe und glatte Muskulatur. Die unreifen Anteile nehmen etwa die Hälfte des Schnittes ein. Hier finden sich unreife Neurotubuli, die teilweise rosettenartig angeordnet sind. Weiterhin Anschnitte unterschiedlich dicht gelagerter Hodentubuli deren Lumen teilweise stark reduziert ist.

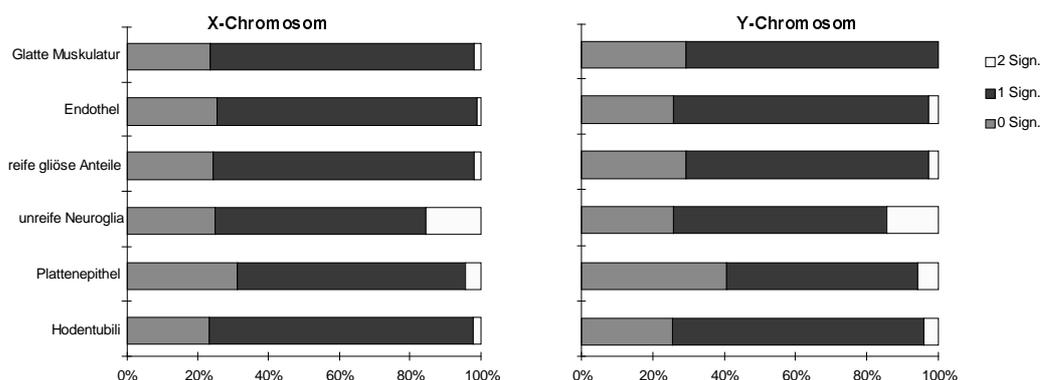


Abbildung 9-7: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 1

Die Grafiken zeigen die Signalverteilung der beiden Geschlechtschromosomen. In den unreifen, neuroglösen Strukturen finden sich häufiger zwei Signale für das X- und das Y-Chromosom.

Fall th2: Unreifes Hodenteratom, Grad II, n. Gonzales-Crussi

Histologie: Unterschiedlich dicht gelagerte Hodentubuli, altersentsprechend fehlende Spermiogenese, vereinzelt Leydigzellen. Tumor aus unreifen gliösen und neurotubulären Strukturen mit dicht zusammengelagerten kleinen Zellen. Diese mit einem hyperchromatischen Kernen, daneben reife gliöse Anteile. In weiteren Präparaten Anteile des Nebenhodens. Tumoranteile hier aus Zysten mit verhorntem Plattenepithel und schleimbildendem Epithel.

Fall to1: Überwiegend reifes, fokal immatures Teratom des Ovars; Gliomatosis Peritonei. Grad II nach Gonzales-Crussi.

Histologie: Zysten mit unterschiedlicher Epithelauskleidung. Daneben reichlich gliöses Gewebe mit Glia- und Ganglienzellen. Unreife Anteile aus neurotubulusartigen Formationen mit erhöhter Mitoserate und höherer Zelldichte. Diese als zottenartige, teilweise papillär aufgeworfene Zellverbände mit stark basophilen und unterschiedlich großen Kernen.

Fall ts4 und ts5, weiblich: Sakrokokzygeales Teils immatures Teratom (Grad 2 nach Gonzalez-Crussi)

Histologie: Buntes Zellbild, Zysten mit unterschiedlicher Auskleidung, Zylinderepithel unterschiedlich differenziert. Außerdem reife, drüsige Anteile und Knorpelgewebe. Fokal unreifes gliöses Gewebe und unreife Neurotubuli mit erhöhter Mitoserate. Die ausgereiften epithelialen Komponenten bestehen aus respiratorischem, teilweise schleimbildenden Epithel.

Bei diesen Tumoren ergab die ISH einen regulären, dem Geschlecht entsprechenden Chromosomensatz. Die unreifen Tumoranteile reagieren wie die ausdifferenzierten Komponenten. Bei der Reaktion auf das Y-Chromosom konnten in den weiblichen Tumoren keine Signale nachgewiesen werden.

Fall ts2, männlich: Unreifes Steißbeinteratom (Grad 1 nach Gonzales-Crussi)

Histologie: Zahlreiche verschiedene Gewebearten, insbesondere Zysten mit unterschiedlicher Auskleidung. Außerdem ausgeprägte neurogliöse Anteile, die teilweise tubulär und teilweise rosettenartig angeordnet sind. Diese mit unterschiedlicher Zellreife. Vereinzelt unreife neuroepitheliale Anteile mit erhöhter Mitoserate.

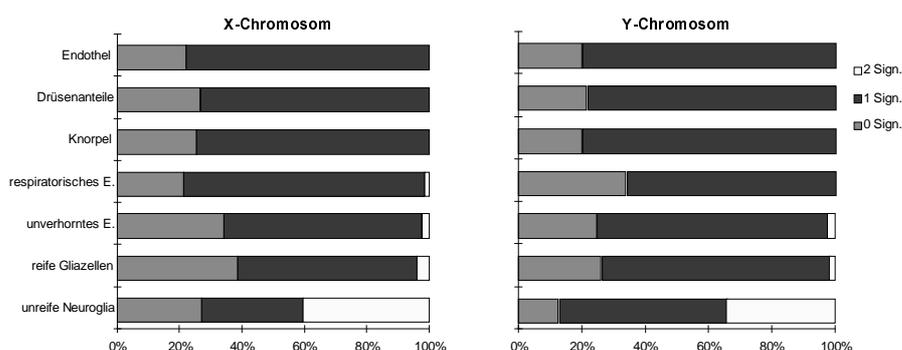


Abbildung 9-8: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in ts 2

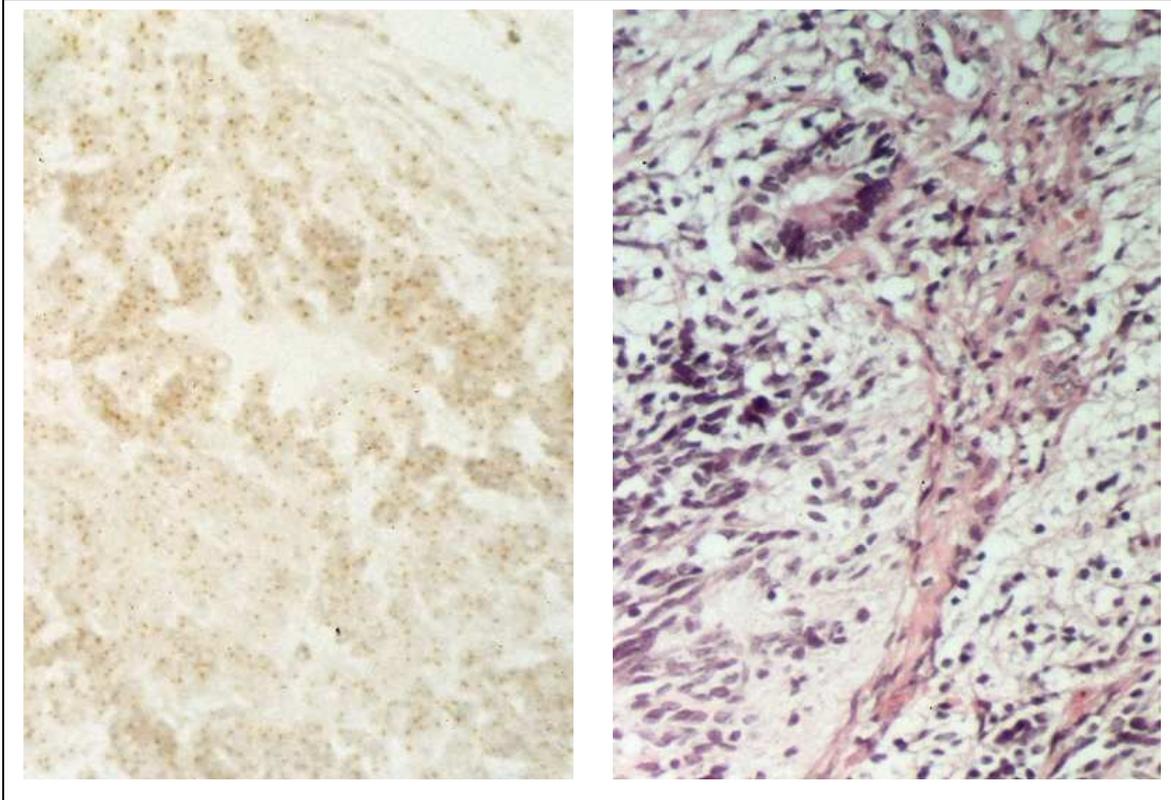


Abbildung 9-9: LINKS: Doppelmarkierung für das Y-Chromosom in den unreifen neuroglösen Anteilen, RECHTS: unreife neuroglöse Anteile eines Steißbeinteratoms; beide Fall ts 2HE, 50x.

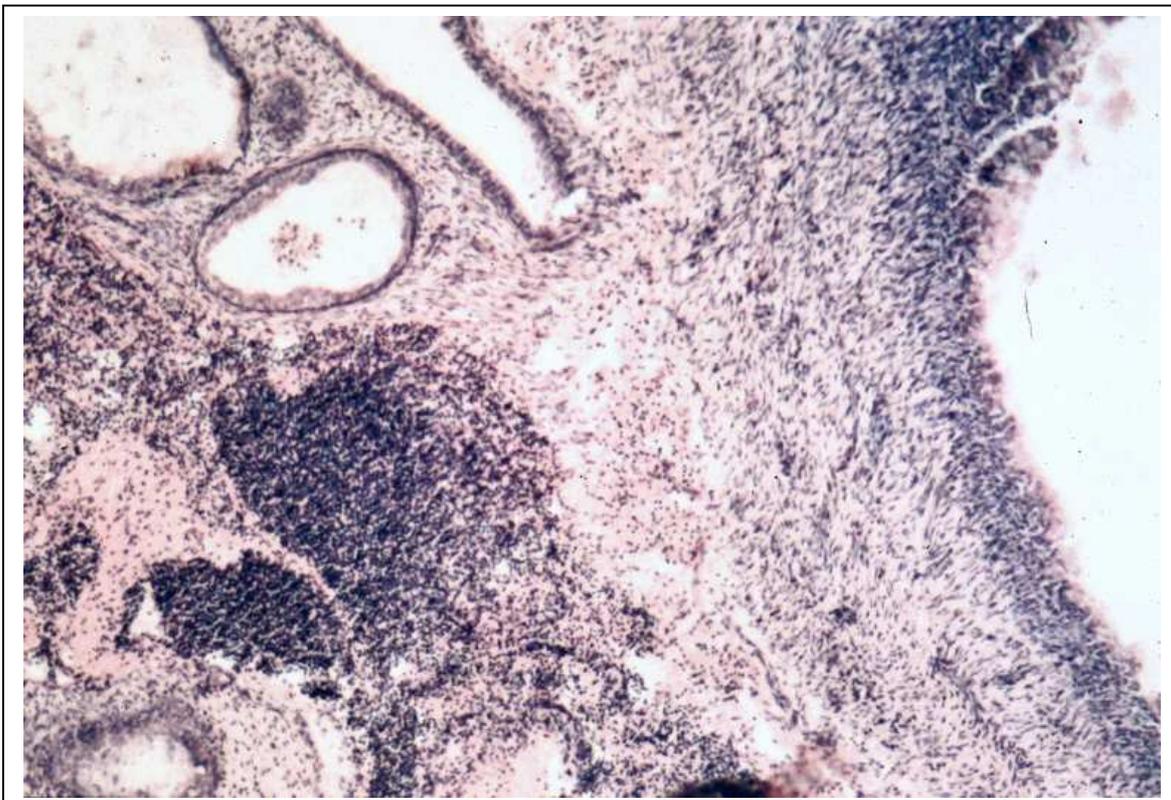


Abbildung 9-10: Partiiell unreifes Teratom des Steißbeins mit unreifen neuroglösen Anteilen; Fall ts 2, mnl., Alter 1 Tag, HE 25x.

9.3 Gemischte Keimzelltumoren

Fall th5: Gem. Keimzelltumor des Hodens: Embryonales Karzinom, unreifes Teratom.

Histologie: Maligner gemischter Keimzelltumor pT1, aus Anteilen eines embr. Karzinoms und eines unreifen Teratoms. Überwiegend atypische große Zellen mit hyperchromatischem Kernen und prominentem Nucleolus. Daneben Hodengewebe mit intakter Spermio-genese.

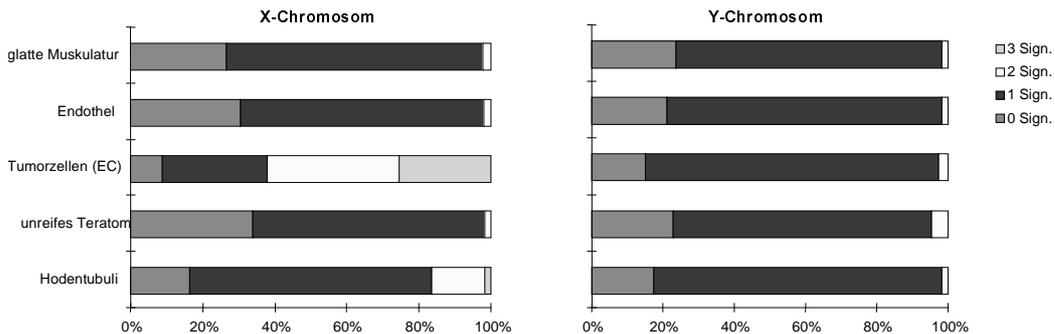


Abbildung 9-11: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 5

In den Tumorzellen besteht eine deutliche Hyperploidie für das X-Chromosom. Das Y-Chromosom ist regulär verteilt.

Fall th6: Gemischter Keimzelltumor des Hodens: Ausgedehntes embryonales Karzinom, Dottersacktumor, intratubuläre Neoplasie, reifes Teratom.

Histologie: Komplex aufgebauter Tumor, außen tumorfreies Hodengewebe. Tumor aus Zysten mit unterschiedlichem Epithel. Überwiegender Teil des Tumors jedoch aus girlandenartigen, epithelialen Formationen, hier Zelltypen und atypische Mitosen. Ausgedehnte herdförmige Nekrosen. Der maligne Teratomanteil ist überwiegend von einem embryonalen Karzinom gebildet. Daneben Anteile eines Dottersacktumors.

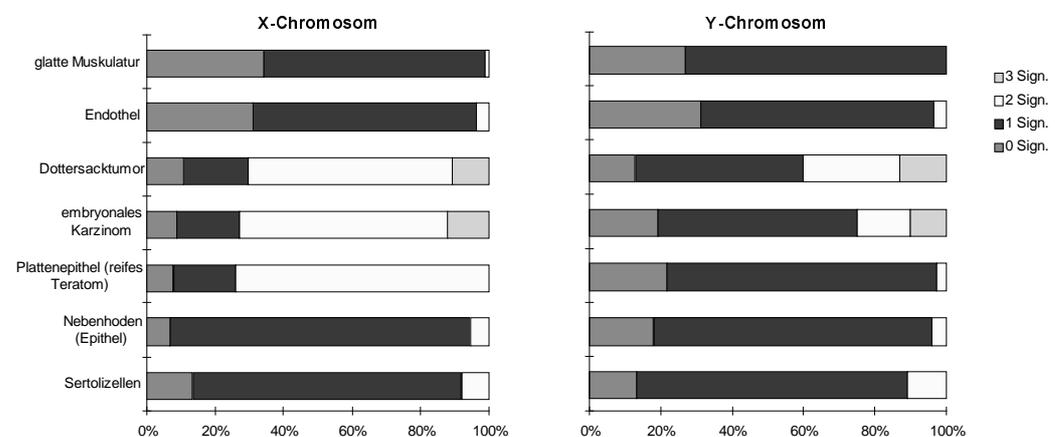


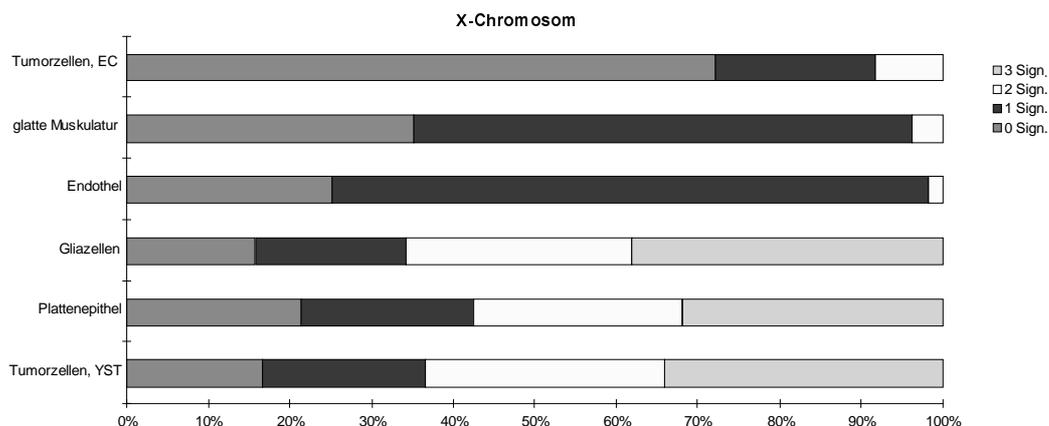
Abbildung 9-12: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 6

In den Hodentubuli kommen einige prominente Zellen mit XX-Konstellation vor. Daneben finden sich reichlich aneuploide Tumorzellen. Diese tragen zwei oder drei X-Chromosomen und 10-13% zwei Y-Chromosomen. Auch die Zellen des Plattenepithels zeigen überwiegend zwei X-Chromosomen. Das Endothel zeigt einen regulären männlichen Gonosomenbefund.

Fall to4: Gemischter Keimzelltumor des Ovars: Vorwiegend embryonales Karzinom; reifes und immatures Teratom; maligner Dottersacktumor.

Histologie: Gemischter maligner Keimzelltumor, bestehend aus
 a) embryonalem Karzinom mit fokalen Anteilen eines malignen Dottersacktumors,
 b) reifem Teratom
 c) unreifem Teratom
 Hauptsächlich atypische, girlanden- bzw. netzartig angeordnete Formationen mit großen, polymorphen Zellen und zahlreichen Mitosen. Tumor mit weiteren reifen und unreifen Gewebsanteilen: Knorpel, Zysten mit respiratorischem Epithel, neurotubuläre Formationen.

Abbildung 9-13: Signalverteilung des X-Chromosoms in to 4



Bei der In Situ-Hybridisierung zeigte sich eine deutliche Hyperploidie für das X-Chromosom in folgenden Gewebeanteilen: Tumorzellen, Gliazellen, Plattenepithel. In diesen Anteilen finden sich zwei oder drei X-Chromosomen.

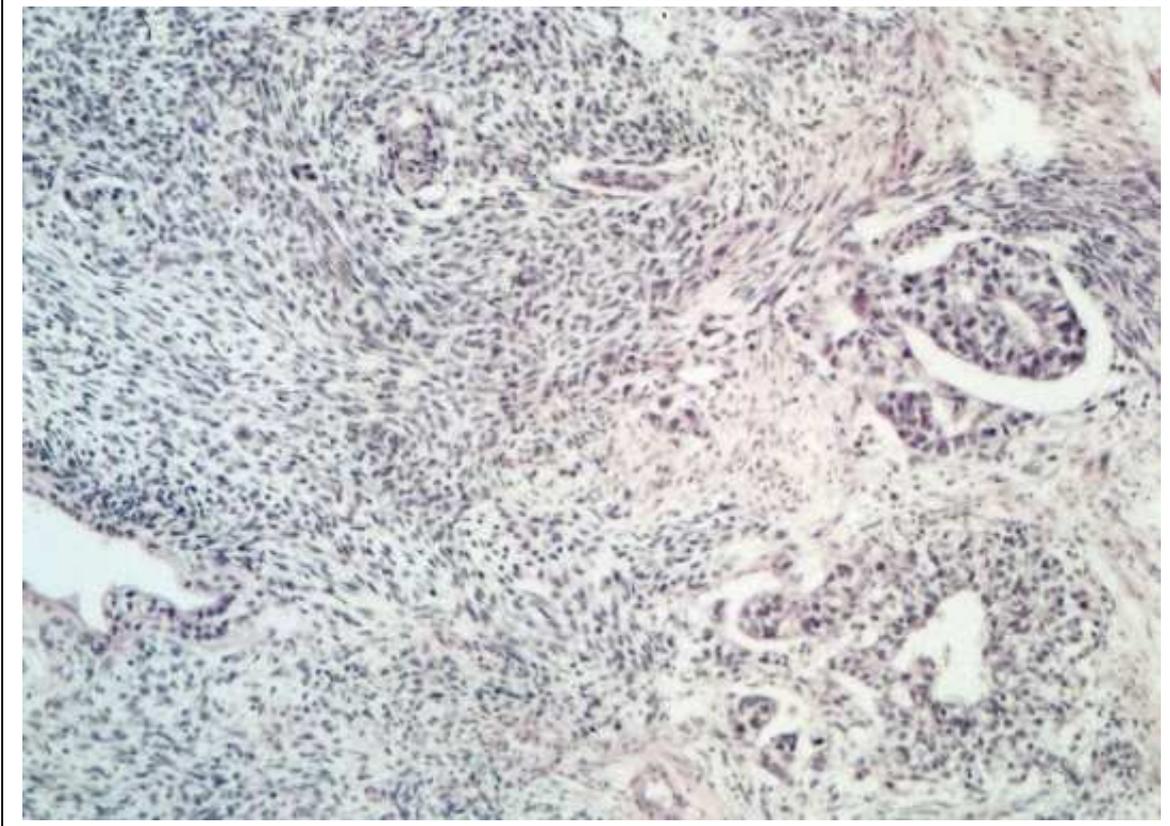


Abbildung 9-14: Maligner, gemischter Keimzelltumor bestehend aus embryonalem Carcinom und unreifem Teratom, Fall th 5, Alter 17 Jahre, HE 25x

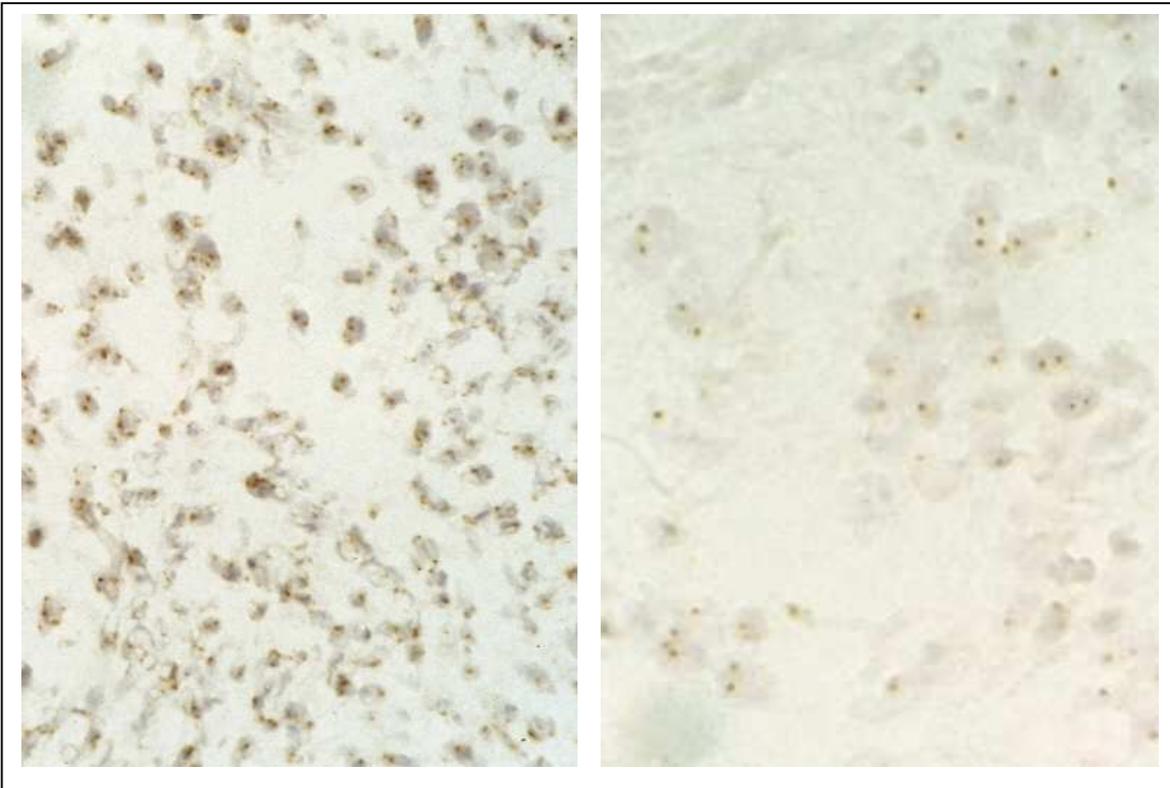


Abbildung 9-15: LINKS: Ein, zwei und drei Signale für das X-Chromosom in Zellkernen des EC-Anteils, th 5, 100x; RECHTS: Doppelmarkierung für das Y-Chromosom im YST-Anteil, Fall th 6, 100x.

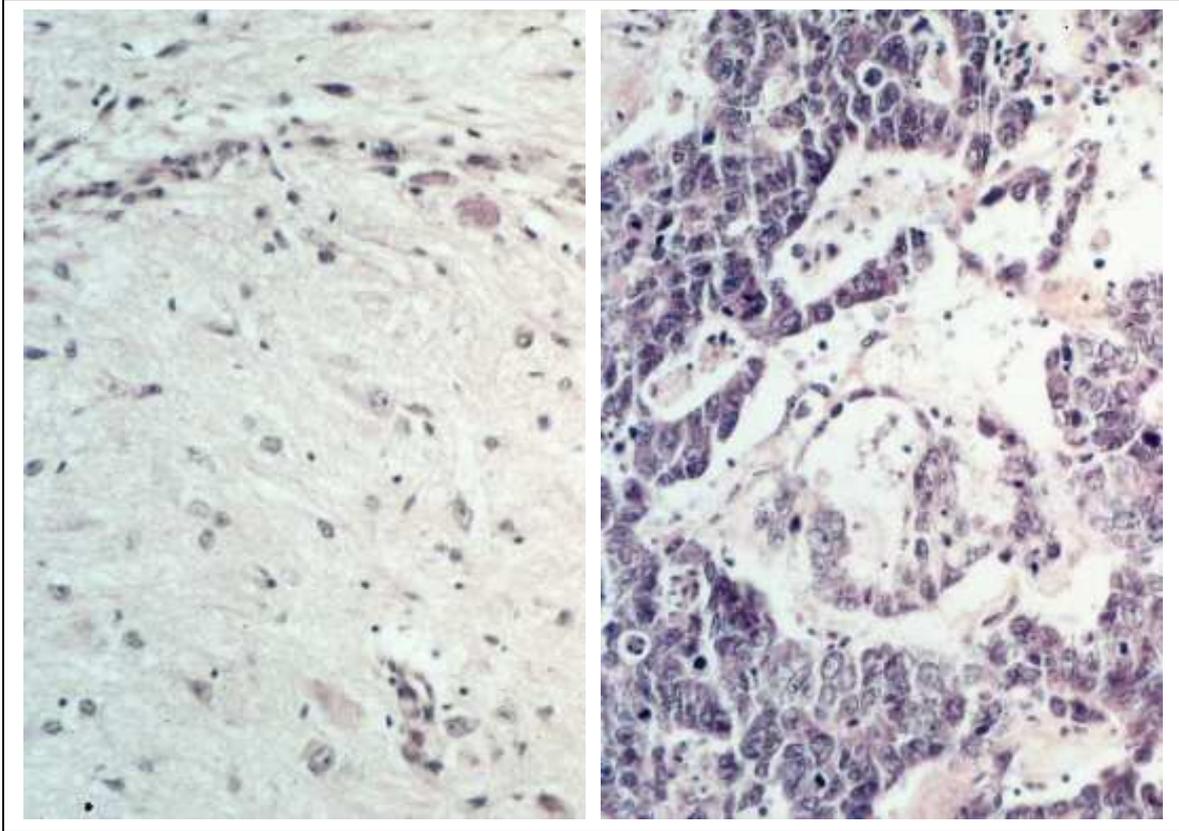


Abbildung 9-16: LINKS: Gemischter Keimzelltumor des Ovars, unreife Gliazellen; RECHTS: Anteile des embryonalen Carcinoms; beide Fall to 4, Alter 13 Jahre, HE 50x.

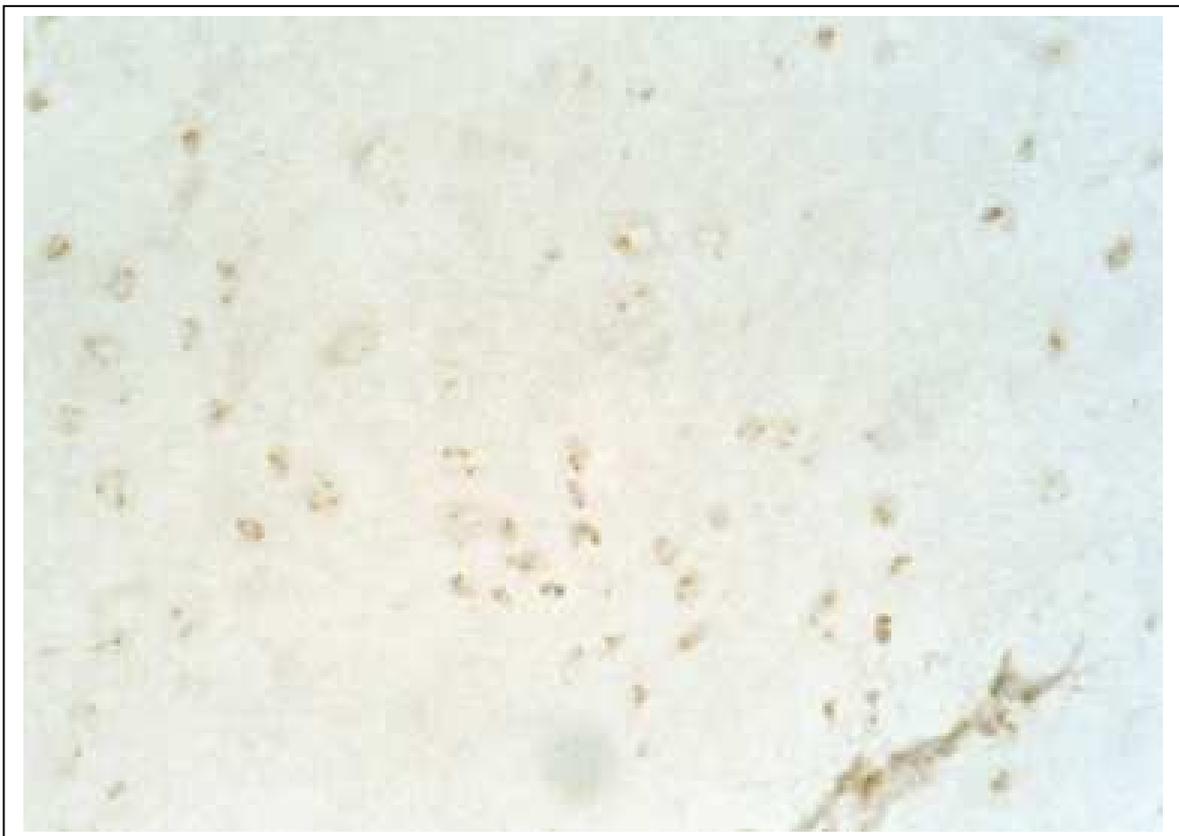


Abbildung 9-17: Kerne mit zwei und mit drei Signalen für das X-Chromosom in unreifen Gliazellen, Fall to 4, 100x.

Fall ts3: Hochmaligner gemischter Keimzelltumor (embryonales Karzinom, Dottersacktumor), Steißbein, weiblich.

Histologie: Solide bis girlandenförmige, teils drüsige Zellverbände. Große polymorphe Tumorzellen mit prominentem Nukeolus. An einer Stelle auch unterschiedlich große, stark basophile Zellen. Teilweise retikuläre Anordnung mit Schiller-Duval-Körperchen. Atypische Mitosefiguren, choriale Riesenzellen, herdförmige Nekrosen, unscharfe Begrenzung, Infiltration. Der Tumor enthält überwiegend Anteile eines embryonalen Karzinoms, daneben auch Anteile eines Dottersacktumors, die nur fokal ausgeprägt sind.

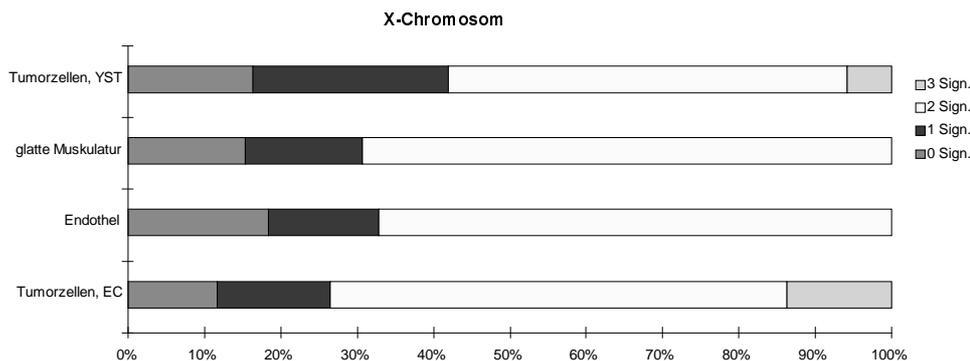


Abbildung 9-18: Signalverteilung des X-Chromosoms in ts 3

Einige Tumorzellen enthalten drei oder teilweise sogar vier X-Chromosomen. Ein Y-Chromosom wurde nicht gefunden.

9.4 Embryonales Karzinom

Fall th8: Embryonales Karzinom des Hodens

Histologie: Maligner Keimzelltumor, hauptsächlich mit Anteilen eines embryonalen Karzinoms. Dieser aus girlandenartigen und teilweise retikulären Strukturen. Einige sogenannte Schiller-Duval-Körperchen. Die großen Tumorzellen besitzen einen polymorphen hyperchromatischen Kern, das Zytoplasma ist unscharf begrenzt. Randlich einige reguläre Hodenanteile, teilweise mit reduzierter Lichtung.

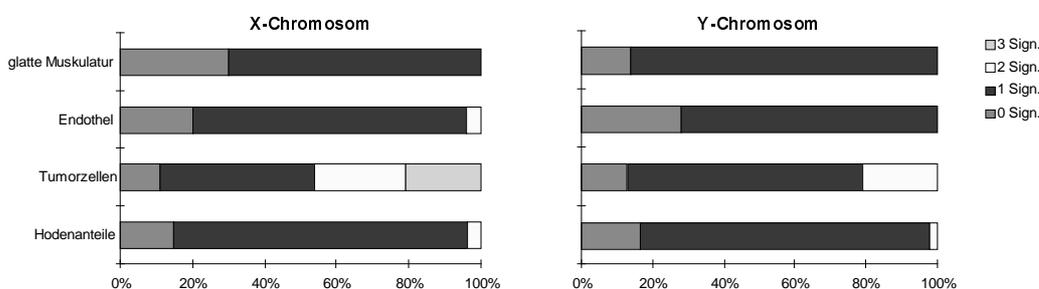


Abbildung 9-19: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 8

In den Tumorzellen konnten deutlich Kerne mit zwei oder drei X-Chromosomen und 10% der Kerne mit 2 Y-Chromosomen nachgewiesen werden.

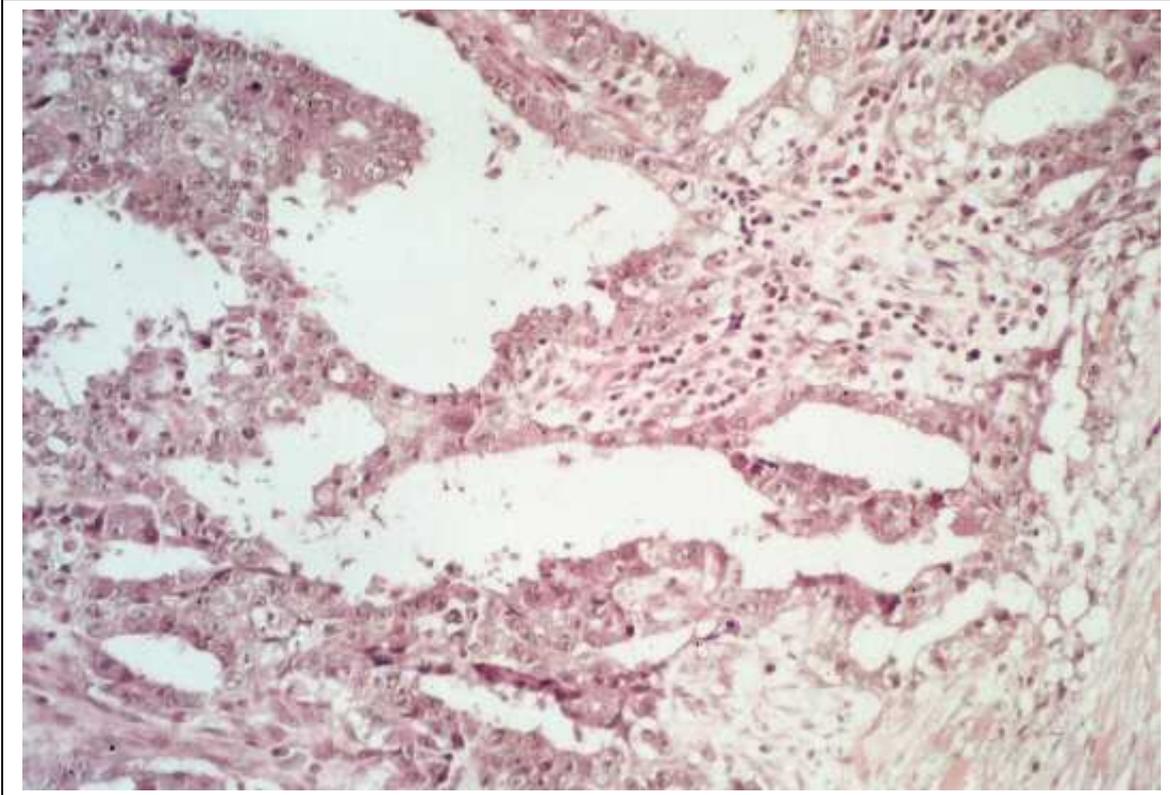


Abbildung 9-20: Embryonales Carzinom (EC) des Hodens mit und polymorphen Tumorzellen; Fall th 8, Alter 19 Jahre, HE 50x

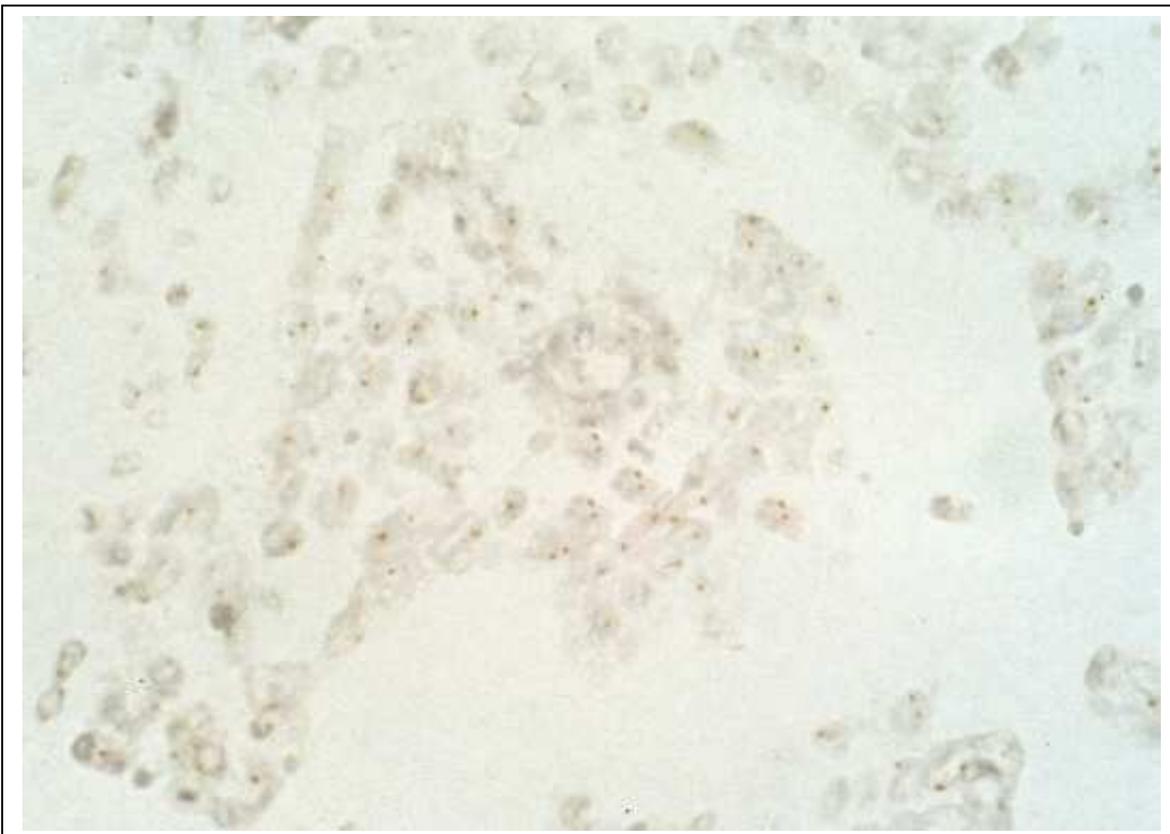


Abbildung 9-21: Doppelmarkierung (Hyperloidie bei Tumorpheriferation) für das Y-Chromosom in den Zellen des EC-Anteils; Fall th 8, Alter 19 Jahre, 100x

10 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden 12 Fälle mit Gonadendysgenese und 21 Patienten mit einem Keimzelltumor untersucht. Zuvor wurden Vorversuche und Vergleichspräparate angefertigt. In dieser Zusammenfassung soll noch einmal auf die wesentlichen Befunde eingegangen werden.

10.1 Vorversuche, Kontrollen und Vergleichspräparate

- Mit der hier verwendeten Methode lassen sich die Geschlechtschromosomen in Paraffinschnitten von ovariellen und testikulärem Gewebe nachweisen.
- Die Signalverteilung entspricht dem Geschlecht des untersuchten Individuums.
- Die Methode kann zur Geschlechtsbestimmung herangezogen werden.
- Die verschiedenen Zellen der Spermatogenese lassen sich hier nicht auswerten.
- An weiblichen Keimzellen wurden Signale für das X-Chromosom gefunden.

Vorversuche

In den Vorversuchen wurde zunächst die Anwendbarkeit sowie die Sensitivität und Spezifität der DNA-Sonden getestet. Zur Erstellung dieser Präparate wurden Gewebeproben (Hoden, Ovar, Adnexe und Samenleiter) von Patienten überschichtet, bei denen kein Verdacht auf eine gonosomale Aberration bestand.

Die Signalverteilung für das X- und das Y-Chromosom entsprach hier dem jeweiligen Genotyp: In Zellkernen männlicher Individuen wurde ein Signal für das X- und ein Signal für das Y-Chromosom gefunden. In „weiblichen“ Zellen wurden mit der Sonde gegen das X-Chromosom zwei Signale, mit der y-spezifischen Sonde dagegen kein Signal gefunden.

Da bei der Interphasezytogenetik die Morphologie der Gewebeschnitte weitgehend erhalten bleibt, können die unterschiedlichen Gewebekomponenten getrennt ausgewertet werden. In jeder einzelnen Gewebeart konnte somit das Vorhandensein der Geschlechtschromosomen nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde Nierengewebe von männlichen und weiblichen Patienten überschichtet. Auch hier konnte die Verteilung des X- und des Y-Chromosoms bestimmt, und somit eine Geschlechtsbestimmung mit der hier angewendeten Methode durchgeführt werden.

Zellen der Spermatogenese

An den Zellen der Spermatogenese konnte keine eindeutige Auswertung der Signalverteilung in den unterschiedlichen Zellen durchgeführt werden. Die unterschiedlichen Zellstadien lassen sich mit den hier angewendeten Färbeverfahren nicht voneinander unterscheiden. Die gewonnenen Signale konnten somit nicht den Spermatozyten 1.Ordnung (diploid) und den Spermatozyten 2.Ordnung (haploid) zugeordnet werden. Insgesamt konnten in den Zellen der Spermatogenese 64% der Kerne mit einem Signal für das X- und 54% mit einem Signal für das Y-Chromosom nachgewiesen werden. Dieser vergleichsweise hohe Wert lässt darauf schließen, dass in der

zu untersuchenden Zellpopulation die diploiden Spermatozyten häufiger vertreten sind. Die Hybridisierung und Auswertung der Signale an reifen Spermien ist auf Grund des hohen Kondensationszustandes des Kernmaterials dieser Zellen nicht möglich.

Zellen der Oogenese

In den Präparaten des Vergleichkollektivs konnten ein oder zwei Signale für das X-Chromosom in den weiblichen Keimzellen dargestellt werden. Eine quantitative Auswertung ist hier nicht möglich, da sich nur wenige Zellen mit einem Signal finden ließen. Der große Durchmesser einer Keimzelle führt zwangsläufig zum Verlust des Kernmaterials. Die Oozyten der Primär- und Sekundärfollikel sind stets diploid, wobei nur eine Keimzelle kurz vor der Ovulation die Reifeteilung abschließt.

10.2 Ergebnisse der Gonadendysgenesien

- Das humangenetische Ergebnis konnte (mit einer Ausnahme) in allen Fällen bestätigt werden.
- Der Nachweis einer Mosaikkonstellation gelang in allen untersuchten Gewebekomponenten des entsprechenden Individuums
- Bei den Patienten mit männlichem Pseudohermaphroditismus fanden sich keine Chromosomenaberrationen.
- Bei den Fällen mit echten Hermaphroditismus wurden ebenfalls die humangenetisch beschriebenen Situationen bestätigt.
- Hier sind in den testikulären und in den ovariellen Anteilen XX- bzw. XY-Konstellationen zu finden.
- Die quantitative Auswertung zeigte beim Hermaphroditismus in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen als in den übrigen Komponenten.
- In weiblichen Keimzellen konnten bei diesen Fällen Y-Chromosomen nachgewiesen werden.
- Für epitheliale Strukturen konnte eine fokal unterschiedliche Verteilung des Y-Chromosoms nachgewiesen werden.
- Auch bei den Fällen mit gemischter Gonadendysgenese konnten die jeweiligen Mosaik nachgewiesen werden, wobei hier im Unterschied zum Hermaphroditismus eine gleichmäßige Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Strukturen bezüglich des Y-Chromosoms besteht.

Bei der Untersuchung an dysgenetischen Gonaden wurden die jeweiligen Gonosomen und Mosaik mit Hilfe der In Situ-Hybridisierung dargestellt. Von den 12 untersuchten Fällen konnte in 8 Fällen (Gruppe II und III) ein Gonosomenmosaik nachgewiesen werden.

Dabei wurde hier das vorliegende humangenetische Ergebnis bestätigt. Der Nachweis der Mosaiksituation gelang in den meisten Gewebekomponenten. Bei den Fällen mit XX/XY-Karyotyp sind in den männlichen und in den weiblichen Gewebeanteilen Zellen mit XX- bzw. XY- Status zu finden. Insbesondere auf die Anwesenheit von Y-Chromosomen in weiblichen Keimzellen (Fälle g2, g7 und g9) muss in diesem Zusammenhang hingewiesen werden. Bei den Fällen mit X0/XY-Karyotyp (Gruppe III) besteht eine gleichmäßige Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Strukturen. Bei den Fällen mit

Hermaphroditismus (Gruppe II) wurden in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen gefunden als im testikulären Gewebe.

Gruppe I - Pseudohermaphroditismus

Die Gruppe I enthält zwei Fälle mit männlichem Pseudohermaphroditismus. Die Untersuchung der Geschlechtschromosomen ergab hier einen regulären XY-Genotyp in allen Gewebekomponenten. Quantitativ entsprechen die Ergebnisse jeweils denen der Vergleichsgruppe. Das vorliegende humangenetische Ergebnis konnte hier bestätigt werden.

Gruppe II - Hermaphroditismus

An den Präparaten dieser Gruppe konnten die humangenetisch beschriebenen Chromosomenkonstellationen nachgewiesen und somit bestätigt werden.

Sowohl in den speziell männlichen, wie auch in den weiblichen Gewebekomponenten sind Zellen mit XX- oder XY-Konstellation erfasst worden. Bei einem XX/XY-Karyotyp finden sich auch in den Hodentubuli (z.B. Sertolizellen) Kerne mit zwei X-Chromosomen. In den weiblichen Strukturen (z.B. ovarielle Stromazellen) wurden dagegen auch Zellen einem Y-Chromosom nachgewiesen. Das vorherrschende Mosaik betrifft also alle untersuchten Gewebe.

Die einzige Ausnahme bildet hier das ovarielle Gewebe von *g12*, in dem keine Y-Chromosomen festzustellen waren. Für *g2* konnte im Ovar ein niedrigerer Anteil der Zellen mit einem Y-Chromosom als in den übrigen Gewebekomponenten nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von *g4* (XY/XXY-Karyotyp) wurde in allen Geweben eine XXY- und eine XY-Zelllinie gefunden. Dabei ist die XY-Konstellation in der rechten Gonade häufiger vertreten. In *g2* und *g12* ist somit eine Differenz in der Zusammensetzung zwischen ovariellen und testikulären Strukturen zu finden.

Gruppe III - gemischter Gonadendysgenese und Ullrich-Turner-Syndrom

Diese Gruppe umfasst fünf Patienten mit gemischter Gonadendysgenese und einen Patienten mit Ullrich-Turner-Syndrom. Somit wurden hier die Fälle mit humangenetisch beschriebenen X0/XY-Karyotyp zusammengefasst. Dieses Mosaik konnte mit der ISH bestätigt werden. Dabei waren die XY- sowie die X0-Situation in männlichen und weiblichen Gewebeanteilen zu finden. Die einzige Abweichung vom humangenetischen Ergebnis besteht hier für den Fall *g10*, bei dem keine Y-Chromosomen nachzuweisen waren. Bei dem Patienten mit UTS fanden sich weniger Y-Chromosomen als bei den übrigen Fällen dieser Gruppe.

In Bezug auf die quantitative Verteilung der Geschlechtschromosomen besteht bei zwei Fällen (*g6* und *g7*) ein Unterschied zwischen testikulären und ovariellen Strukturen. Hier wurden in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen gefunden, als in den testikulären Anteilen.

Bei drei Fällen wurde daneben ein fokal gehäuftes Auftreten einiger Zelllinien dargestellt. Diese betreffen die epithelialen Gewebe von Tube, Samenleiter, Nebenhoden sowie die Sertolizellen der Hodentubuli.

In der Tabelle 10-1 sind die untersuchten Fälle gegliedert nach den jeweiligen Gruppen und der vorherrschenden Zelllinie dargestellt. Die Tabelle 10.6 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse in Bezug auf den Karyotyp und die jeweiligen untersuchten Gewebeanteile.

• Gruppe I	Pseudohermaphroditismus maskulinus
g1, g8:	XY-Konstellation, kein Mosaik
• Gruppe II	Hermaphroditismus verus
g2:	XX/XY-Mosaik, fokal unterschiedliche Ausprägung
g12:	XX/XY-Mosaik, Überwiegen des XY-Derivats
g4:	XXY/XY-Mosaik, Überwiegen des XXY-Derivats
• Gruppe III	Gem. Gonadendysgenese und Turner-Syndrom
g3:	XY-Komponente schwach ausgeprägt
g5:	fokal unterschiedliche Verteilung
g6:	Übergewicht der XY-Komponente
g7:	fokal unterschiedliche Verteilung
g10:	nur X0-Komponente gefunden
g11:	Übergewicht der X0-Komponente
• Gruppe IV	Turner-Syndrom mit Translokation
g9:	XY - Translokation, kein Mosaik

Tabelle 10-1: Ergebnisübersicht Gonadendysgenesien

10.3 Ergebnisse der Keimzelltumoren

- An den untersuchten Tumoren konnte stets das Geschlecht des Trägers nachgewiesen werden.
- An reifen Teratomen zeigte sich keine Veränderung.
- Der Nachweis parthenogentisch gebildeter Teratome wäre mit der hier verwendeten Methode möglich.
- An unreifen Teratomen und malignen Tumoren konnte jeweils ein Zugewinn der Geschlechtschromosomen nachgewiesen werden.
- Die häufigste Veränderung ist dabei der Zugewinn des X-Chromosoms

Bei der Reaktion auf die Geschlechtschromosomen an Keimzelltumoren konnte in allen untersuchten Fällen jeweils der entsprechende Gonosomensatz des Trägers nachgewiesen werden. Darüber hinaus fanden sich folgende numerische Aberrationen der Geschlechtschromosomen:

Bei den reifen Teratomen konnte keine Veränderung festgestellt werden. In der Gruppe der partiell unreifen Teratome sind in zwei Fällen (th1 und ts2) jeweils zwei X-Chromosomen und zwei Y-Chromosomen in den unreifen gliösen Anteilen nachzuweisen. Bei dem

Hodenteratom *th1* handelt es sich um ein partiell unreifes Teratom mit Grad II nach Gonzales-Crussi; bei dem Steißbeinteratom *ts2* um einen Grad I-Tumor.

Der Zugewinn des X-Chromosoms stellt in den malignen Keimzelltumoren die häufigste Veränderung dar. Der Verlust eines Chromosoms wurde nicht festgestellt.

Die gemischten Keimzelltumoren zeigten alle eine Veränderung des Gonosomenbestandes. In den Tumorzellen konnte hier in jeweils eine Hyperploidie der Gonosomen beobachtet werden. Auch hier wurde der Zugewinn des X-Chromosoms als häufigste Veränderung beobachtet.

In früheren Untersuchungen wurde diskutiert, dass sich Teratome auch durch die Parthenogenese, also die Fusion zweier haploider Keimzellen entwickeln können. Hier wäre in männlichen Individuen eine XX- oder eine XY-Situation im Tumor nachzuweisen. Der Nachweis einer solchen Konstellation im Tumormaterial ist mit der hier angewendeten Methode möglich. In dieser Arbeit wurden zwei reife Hodenteratome (*th3* und *th4*) untersucht, an denen sich in allen Gewebekomponenten eine XY-Konstellation zeigte.

Im Gegensatz dazu konnten Zugewinne der Geschlechtschromosomen in den reifen Teratomenteilen der gemischten Keimzelltumoren festgestellt werden.

Karyotyp	Sertolizellen	Leydigzellen	Neben hoden	Samenleiter	ovarähnliches Stroma	Follikel	Tube	Endothel	glatte Muskulatur	Keimzellen
g1 46, XY	X, Y		X, Y					X, Y	X, Y	
g2 46, XX / 46, XY	X, XX, Y [*]		X, XX, Y [*]	X, XX, Y [*]	X, XX, Y	X, XX, Y [*]	X, XX, Y [*]	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y
g3 45, X0 / 46, XY					X, Y			X, Y, (XX)	X, Y, (XX)	
g4 46, XY / 47, XXY	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y		X, XX, Y	X, XX, Y		X, XX, Y	X, XX, Y	
g5 45, X0 / 46, XY	X, Y [*]	X, Y	X, Y [*]	X, Y [*]			X, (Y) [*]	X, Y	X, Y	
g6 45, X0 / 46, XY			X, Y		X, Y		X, Y	X, Y	X, Y	
g7 45, X0 / 46, XY	X, Y [*]	X, Y	X, Y [*]	X, Y [*]	X, Y		X, Y [*]	X, Y	X, Y	X, XX, Y
g8 46, XY	X, Y	X, Y	X, Y					X, Y	X, Y	
g9 46, X, t, (X;Y)	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y		X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y
g10 45, X0 / 46, XY	X	X			X			X	X	
g11 45, X0 / 46, XY	X, Y	X, Y	X, Y		n			X, Y	n	
g12 46, XX / 46, XY	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y	X, XX, Y	n	n	n	X, XX, Y	X, XX, Y	

Tabelle 10.6: Übersicht zur Gonosomenkonstellation der untersuchten Fälle und Gewebekomponenten

- fokale unterschiedliche Signaldichte
 - n nicht ausgewertet
 - () nur geringe Ausprägung dieser Zelllinie
- ohne Angabe: Gewebestruktur nicht vorhanden

IV. Diskussion

11 Gegenstand und Methode - Diskussion

11.1.1 Allgemeines

Numerische Aberrationen der Geschlechtschromosomen konnten mit der ISH an Paraffinmaterial von Gonaden nachgewiesen werden. Die Interphasen-Zytogenetik erlaubt hier das Verteilungsmuster der Chromosomen darzustellen. Im Vergleich zur klassischen Karyotypisierung können bei der Interphasen-Zytogenetik auch diejenigen Gewebe untersucht werden, die nur schwer oder gar nicht kultivierbar sind. Darüber hinaus ist hier eine Beurteilung einer wesentlich größeren Anzahl an Zellen möglich. Die Gefahr von Kulturartefakten wird dabei ausgeschlossen. Die Verwendung von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material bietet zudem den Vorteil, dass die histologischen Strukturen erhalten bleiben und die einzelnen Zellen innerhalb des Zellverbandes beurteilt werden können. Die In Situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten hat jedoch Nachteile:

Bei der Anfertigung der Paraffinschnitte kommt es zu einem Anschneiden oder Überlappen der Zellkerne. Somit kann es zu einer Fehlinterpretation bei der Bestimmung der Chromosomenzahl kommen [Ramaekers 1993; Hopman 1991]. Weitere Einflüsse auf die Qualität der Ergebnisse nehmen die Vorbehandlung der Gewebe mit enzymatischen Verfahren sowie die (bei hohen Temperaturen stattfindende) Denaturierung der Sonden und Ziel-DNA, wodurch die Morphologie zerstört werden kann. Hier müssen Kompromisse zwischen der Hybridisierung und Gewebemorphologie gefunden werden [Arnoldus et al. 1991]. Im Gegensatz zur konventionellen, hier angewendeten Methode, bringt der Einsatz von Fluoreszenz-Farbstoffen eine zusätzliche Problematik durch eine schwer zu beherrschende Hintergrundfärbung mit sich [Arnoldus et al. 1991].

11.1.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf Signalhäufigkeit und Stärke

Bedeutung der Schnittdicke

Der Schnittdicke kommt eine besondere Bedeutung bei der Auswertung der Signale zu. Analog zum Protokoll von Hopman et al. [1991] wurden für diese Arbeit 6µm dicke Präparate angefertigt, nachdem in Vorversuchen Schnitte zwischen 4 und 10 µm getestet wurden. Wählt man eine zu große Schnittdicke, so resultiert daraus gerade bei zellreichem Gewebe eine Überlagerung der Zellkerne, so dass eine Unterscheidung einzelner Kerne und die Zuordnung der Signale zu einem Zellkern nicht mehr exakt möglich ist [Hopman et al. 1991]. Außerdem kann die Penetration der Sonden bei zu großer Schnittdicke erschwert werden, so dass eine zuverlässige Hybridisierung ausbleibt [Hopman et al. 1991].

Ist die Schnittdicke zu gering, so kommt es zum Anschneiden und zum Verlust von Kernmaterial. Letztlich können die Ziel-DNA oder ganze Chromosomen verloren gehen, was zur Signalreduktion und damit zu einer artifiziellen Hypoploidisierung führt [Hopman et al. 1991]. Eine Limitierung der Methode stellt somit insbesondere die

geringere Sensitivität für die Entdeckung einer Monosomie dar [Anastasi et al 1990; Henke et al. 1993b]. Dies äußert sich in der relativ hohen Anzahl falsch-positiver monosomer Zellen. Ein geringer Anteil tatsächlich monosomer Zellen kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies bezieht sich insbesondere auf die Erkennung einer 45,X0-Zelllinie neben einer 46,XX-Population. Der Nachweis von Hyperploidien ist dagegen relativ sensitiv.

Emmerich et al. konnten für testikuläres sowie Diebold et al. für ovarielles Gewebe ebenfalls die besten Resultate mit einer Schnittdicke von 6µm gewinnen [Diebold et al. 1997; Emmerich et al. 1989]. Dieser Wert scheint für die meisten Gewebearten einen Kompromiss in Bezug auf die oben genannte Problematik darzustellen. Bei dieser Schnittdicke ist maximal ein „cut-off Level“ von 20% zu erwarten [Sauter et al. 1995; Hopman et al. 1991]. Andere Autoren favorisieren hingegen eine Schnittdicke von 4µm [van Dekken et al. 1992/93; Henke et al. 1993b].

Gewebevorbehandlung und Denaturierung

Die Fixierung der Gewebe macht eine Vorbehandlung der Schnitte erforderlich, um eine Penetration der Sonde zu ermöglichen [Arnoldus 1991]. Die Qualität der Hybridisierung hängt in entschiedenem Maße von der Vorbehandlung ab. Da für archiviertes Material unterschiedliche Fixierungszeiten und evtl. auch Lösungen angenommen werden müssen, trifft dieses Problem hier besonders zu [Arnoldus et al 1991; van Dekken et al. 1992]:

Um eine optimale Hybridisierung bei gleichzeitig erhaltener Morphologien zu finden, müssen für jeden zu untersuchenden Block, die jeweiligen Einwirkzeiten der Pepsinlösung neu ermittelt werden [van Dekken et al. 1993].

Weiteren Einfluss auf die Morphologie nimmt der Denaturierungsvorgang von Sonden und Ziel-DNA [van Dekken et al 1992]. Auch hier muss ein Kompromiss zwischen Signalintensität und Zellmorphologie gefunden werden. In Bezug auf die Denaturierung gilt, dass Hopman et al. [1991] eine gemeinsame Denaturierung von Gewebe- und Sonden-DNA beschreiben, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Eine generelle Überlegenheit der getrennten Denaturierung wurde bisher nicht beschrieben.

11.1.3 Auswahl des Detektionssystems

In dieser Studie kam zur Sichtbarmachung der Peroxidase-markierten Antikörper 3,3-DAB zur Anwendung, das ein dauerhaftes Signal generiert. Gegen den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe, die in einer Vielzahl von Arbeiten zur Anwendung kommen, spricht, dass eine Auswertung der Ergebnisse in der FISH-Technik nur mit einem Fluoreszenz-Mikroskop möglich ist. Außerdem nehmen hier die Signale mit der Zeit an Intensität ab.

Am Paraffinschnitt kommt als zusätzlicher Nachteil eine relativ schwache Signalintensität der Fluoreszenzsignale und eine ausgeprägte Hintergrundfärbung im Vergleich zur konventionell immunzytochemisch detektierten Sonden hinzu [Dhingra et al. 1992].

11.1.4 Auswertung der Signale

Die Qualität der ISH hängt stark von der Zugänglichkeit der Hybridisierungs-Reagenzien zur Ziel-DNA-Sequenz und von dem Maß, in welchem es zu unspezifischen Bindungen gekommen ist ab. Da es auf den anderen Chromosomen kleine Regionen gibt, die homolog zu den Gonosomen sind, entsteht durch die Bindung der Sonden an Autosomen eine leichte Hintergrundfärbung [Leitch et al. 1994].

Durch Überlagerung einzelner Chromosomen oder kompletter Kerne besteht die Möglichkeit einer optischen Fusion der Hybridisierungssignale und damit die Wahrnehmung von weniger Signalen als tatsächlich Chromosomen vorhanden sind [Hopman et al. 1988]. Im Gegensatz dazu kann durch die Überlagerung von Kernen auch der Eindruck von zu vielen Signalen entstehen [Tianen et al. 1992]. Den gleichen Effekt findet man auch bei einer gewissen Zerstörung der Zellmorphologie [Arnoldus et al 1991; Hopman et al 1991; van Dekken et al 1990]. Da man davon ausgehen kann, dass Normalgewebe in gleicher Weise wie das zu untersuchende Gewebe geschnitten und hybridisiert wurde, kann man die Ergebnisse des Gonaden- und Tumorgewebes mit denen des Normalgewebes vergleichen und das Normalgewebe als Referenz benutzen.

11.2 Vergleich mit anderen Methoden Bezug auf die Fragestellung

Strukturelle Aberrationen der Geschlechtschromosomen wie Deletionen, Mutationen oder Translokationen sind mit der hier angewendeten In Situ-Hybridisierung nur sehr schwer nachzuweisen. Auch die Darstellung von niedrig frequenten Y-chromosomal Mosaiken oder Markerchromosomen ist nur bedingt möglich. Auf der anderen Seite bietet die PCR eine Möglichkeit zum Nachweis einzelner Gene. Mit der FISH-Technik lassen sich strukturelle Veränderungen an Chromosomen nachweisen.

In diesem Abschnitt soll auf die verschiedenen Techniken eingegangen werden. In Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit werden die Ergebnisse und Nachweismethoden anderer Autoren erörtert.

Fernández et al. beschreiben vier verschiedene Faktoren, die die Möglichkeit, ein Mosaik darzustellen und zu quantifizieren, begrenzen [Fernandez et al. 1996]:

- Anzahl und Art der untersuchten Gewebekomponenten
- Anzahl der untersuchten Zellen
- die Sensitivität der jeweiligen Untersuchungsmethode
- die Möglichkeit einer Selektion einer Zelllinie durch Kulturartefakte

In den letzten Jahren wurden spezifischere Methoden der In Situ-Hybridisierung entwickelt, die aber gleichzeitig die hohe Sensitivität der PCR ausnutzen (In Situ PCR). Hier steht ein besonders hoher Aufwand und hohe Kosten als wesentlicher Nachteil dieser Applikationen im Vordergrund. Dabei existieren kaum etablierte Protokolle, die, wie bei der konventionellen ISH, zu reproduzierbaren Ergebnissen führen [Schiller et al. 1998].

11.2.1 Konventionelle Zytogenetik

Die früher häufig verwendete Karyotypisierung, auf der Basis der Chromosomenbänderung an Kernmaterial kultivierter Zellen, spielte eine wichtige Rolle bei der Aufdeckung chromosomaler Aberrationen. Der große Nachteil liegt hier in der Notwendigkeit, eine ausreichende Anzahl der sich teilenden Zellen zu erhalten.

Dabei ist die Aussagefähigkeit zytogenetischer Methoden durch die begrenzte Anzahl, der in Mitose vorliegenden Zellen, limitiert [Osipova et al. 1998; Fernández et al. 1996; Kocova et al. 1995]. Zur konventionellen Zytogenetik werden routinemäßig Lymphozyten aus peripherem Blut untersucht. Die konventionelle Analyse wird an 30 Metaphasezellen durchgeführt. Niedrig frequente Mosaik ($<10\%$) entgehen hier der Diagnostik. Zudem stimmt die Verteilung der Chromosomen im Blut nicht immer mit der in den Gonaden oder anderen Gewebeanteilen überein. Zahlreiche Untersucher fordern daher die Analyse von mindestens einer weiteren Zelllinie [Quilter et al. 1998]. Bei der Interphasezytogenetik dagegen ist die Untersuchung von statistisch signifikanten Zahlen von Zellkernen möglich. In dieser Arbeit sind pro Schnittpräparat durchschnittlich 500 Zellkerne ausgewertet worden. In Bezug auf die einzelnen Gewebekomponenten wurden im Durchschnitt 100 Kerne untersucht. Die Nachweisgrenze für niedrig frequente Mosaik mit der In Situ-Hybridisierung wird mit 2% angegeben.

In einer neueren Untersuchung zeigten Fernández et al., dass die Nachweisgrenze bei 1% der untersuchten Zellen liegt. Dabei wurden zwischen 300 und 1326 Metaphasekerne ausgewertet. Von 40 untersuchten Patienten mit UTS wurde bei 16 Patienten eine zusätzliche Mosaiksituation dargestellt. [Fernández, R. et al. 1996 u. 2000].

11.2.2 Untersuchung von Material aus Zellkulturen

In zahlreichen älteren Arbeiten wird der Karyotyp von Lymphozyten oder kultivierten Zellen mit dem Phänotyp verglichen. Es zeigte sich, dass der Karyotyp der Lymphozyten nicht mit der Ausprägung der Geschlechtsmerkmale korreliert.

Bei der Untersuchung von Gewebeanteilen, die in einer Biopsie gewonnen werden können, bietet sich die Möglichkeit der Kultivierung dieser Zellen und der anschließenden Analyse mit der FISH/ISH Technik. Gerade bei längerer Kulturdauer ergibt sich eine quantitativ unterschiedliche Zusammensetzung der Zellsysteme im Vergleich zu Voruntersuchungen [Raff et al. 1998]. Da Zellen mit Monosomie (z.B. für das X-Chromosom) einen etwas kürzeren Zellzyklus aufweisen, kann hier als Ursache ein Kulturartefakt vorliegen. Die monosomen Zellen vermehren sich in der Kultur schneller, was als eine quantitativ veränderte Zusammensetzung des Mosaiks aus den unterschiedlichen Zellpopulationen gedeutet werden kann [Raff et al. 1998].

Die Interphasen-Zytogenetik an Paraffinmaterial hat demnach gegenüber der Untersuchung von Zellkulturen folgende Vorteile [Hopman et al. 1993; Ramaekers et al. 1993]:

1. Chromosomenaberrationen können in histologisch definierbaren Gebieten erkannt werden; es erfolgt keine Selektion der Zellen.
2. Eine heterogene Zusammensetzung in den jeweiligen Arealen kann nachgewiesen und quantitativ erfasst werden.

11.2.3 Vor- und Nachteile der Methode im Vergleich zu FISH-Technik

Zur Beurteilung der FISH-Technik ist es notwendig, das jeweilige untersuchte Material näher zu beschreiben: In zahlreichen Arbeiten wurde FISH an Metaphasezellen zur Analyse des Karyotyps eingesetzt [Fernandez et al. 2000; Hanson et al. 2001]. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter der Anwendung dieser Technik Mosaik dargestellt werden konnten, die zuvor mit konventionellen Verfahren nicht nachweisbar waren. Die Untersuchung von Interphasezellen beschränkt sich dabei häufig auf Materialien wie isolierte Lymphozyten. Bei der Anwendung dieser Technik am Paraffinmaterial treten zudem Probleme im Sinne einer Hintergrundfärbung auf.

FISH an isolierten Zellkernen

Werden isolierte Zellen verwendet sind keinerlei Aussagen über die gewebespezifische Verteilung einer Zelllinie möglich. Im Gegensatz zu der hier verwendeten Methode können Monosomie-Situation mit der FISH-Technik an isolierten Zellen jedoch zuverlässiger nachgewiesen werden. Röpke et al. [2004] beschreiben ein XY/X0-Mosaik bei Patienten mit reiner Gonadendysgenese. Dabei wurde bei 2,9% bis 17,1% der untersuchten Interphasezellen aus den Gonaden eine X0-Situation gefunden. Als weitere Gewebekomponente wurden Lymphozyten aus dem Blut untersucht. Hier konnte keine Mosaiksituation nachgewiesen werden.

Strukturell veränderte Chromosomen

In diesem Abschnitt soll des Weiteren auf besondere Befunde von strukturell veränderten Y-Chromosomen eingegangen werden.

Während der Mitose kommt es häufig zum Verlust dieser strukturell veränderten Chromosomen. Daraus resultieren zum Beispiel Mosaik mit einer 45,X0-Zelllinie. Bei diesen Patienten findet man dann eine ähnliche phänotypische Ausprägung wie bei den hier untersuchten Fällen, weshalb auch auf die Bedeutung und den Nachweis strukturell veränderter Chromosomen, insbesondere auf das Y-Chromosom, eingegangen werden soll.

FISH bei isodizentrischem Y-Chromosomen

Die meisten Fälle mit einem dizentrischen oder isodizentrischen Y-Chromosom werden als Mosaikbefund mit einer 45,X0-Zelllinie beschrieben [Fujimoto et al. 1991; Alexander et al. 1978]. Das klinische Erscheinungsbild variiert von phänotypisch weiblichen Patienten bis zu männlichen Patienten mit dysgenetischen Gonaden [Reddy et al. 1996]. Ein identisches Spektrum wird auch bei Patienten mit 45,X0/46XY-Konstellation beschrieben. Die Zusammensetzung des Mosaiks, insbesondere in den Gonaden, scheint auch hier für die Variation des Phänotyps verantwortlich zu sein [Reddy et al. 1996].

In Untersuchungen bei Patienten mit isodizentrischen Y-Chromosomen konnten Jenderny [1998] sowie Raff [1998] durch die Anwendung der FISH-Technik Signale für die DYZ3 Region nachweisen. Hier wurden Patienten mit einem isodizentrischen Chromosom des kurzen Armes untersucht (45,X0/46,X,idicYp). Dabei zeigten sich zwei distal gelegene Signale für DYZ3 [Jenderny et al. 1998; Raff et al. 1998]. Die für die männliche Geschlechtsentwicklung relevanten Gene (z.B. SRY) sind im kurzen Arm des Y-Chromosoms (Yp) lokalisiert. Auf Grund der veränderten Struktur des Y-Chromosoms bei einer 45,X/46,X,idic(Yp)-Konstellation liegen diese Bereiche verdoppelt vor, was praktisch einer XYY-Konstellation entspricht.

FISH bei Translokationen

Kocova et al. untersuchten ebenfalls die Geschlechtschromosomen in Gonadengewebe mit Hilfe der FISH-Technik. Der gonadale Karyotyp bestand aus einem Mosaik mit 45,XO/46,XXp⁻-Konstellation: In der Gonade (Paraffinmat.), in Fibroblastenkulturen der Haut und in den Lymphozyten konnten Signale für die Y-chromosomale Sequenzen dargestellt werden. Auch hier zeigt sich die Anwendbarkeit der entsprechenden Sonden an strukturell veränderten Chromosomen. Ein Teil des Xp⁻ Chromosoms enthält Y-chromosomales Material. Größe und Form dieses Chromosoms weisen darauf hin, dass es als Produkt einer Translokation entstanden ist [Kocova et al. 1995].

Zur Aufklärung dieser Konstellation hat insbesondere die simultane Darstellung der beiden Geschlechtschromosomen mit der FISH-Technik beigetragen [Kocova et al. 1995].

Bei der Untersuchung von Patienten mit echtem Hermaphroditismus und einer 46,XX-Konstellation gelang Queipo et al. der Nachweis von y-chromosomalen Sequenzen innerhalb der Gonade [Queipo et al. 2002]. Es wurden eine gegen SRY gerichtete sowie eine Paintig-Sonde eingesetzt. Obwohl hier eine Quantifizierung der Signale möglich war, gelang die eindeutige Zuordnung zu bestimmten Zelltypen nicht.

Allgemeines

Die FISH Technik bietet Vorteile bei strukturell veränderten Chromosomen. An Metaphasen lassen sich hier die jeweiligen Veränderungen und deren Lokalisation darstellen. Doch auch hier ist die Aussagefähigkeit durch die Anzahl der Zellen eingeschränkt. Eine wesentlich größere Zellpopulation kann hingegen bei der Untersuchung von Interphasekernen erreicht werden [Kocova et al. 1995].

Aus den hier genannten Gründen wird die FISH-Technik von den meisten Autoren bevorzugt.

Die konventionelle ISH, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen ist, bietet hingegen die Möglichkeit, die Präparate an einem herkömmlichen Lichtmikroskop auszuwerten. Dieses Verfahren bietet dabei den Vorteil, dass die histologischen Strukturen erhalten bleiben und die einzelnen Zellen innerhalb des Zellverbandes beurteilt werden können.

Die Tabelle zeigt Arbeiten von Autoren, die mit Hilfe von FISH zusätzliche y-chromosomale Sequenzen nachweisen bzw. differenzieren konnten:

<i>Quelle</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>Phänotyp</i>	<i>FISH – Ergebnisse</i>
Reddy et al. 1996	45,X/46,X,psu dic Y	Intersex. Genitale, Hypospadie, Re: Hoden, Sertoli+Leydig-Zellen Li: Streak-Gonade, ovarielles Gewebe, Tube	DYZ3: Re: 14 - 21% (Hoden) Li: 7 - 9% (Ovar)
Bergendi et al. 1997	45,X/46,X,idic(Yq)	UTS, Klitorishypertrophie	DYZ3: (Lym), zwei in der Mitte des Chromosoms gelegene Signale
Jenderny et al. 1998	45,X/46,X,idic(Yp)	UTS, Streak-Gonaden, ovarielles Stroma	DYZ3: (Lym) Zwei distal gelegene Signale
Raff et al. 1998	45,X/46,X,idic(Yp)	Kryptorchismus, Leistenhoden	DYZ1: (Gonade, Fibroblasten d. Haut), zwei distal gelegene Signale
Kocova et al. 1995	45,XO/46,XXp ⁻	UTS, Virilisierung Re: Streak-Gonade Li: testikuläres Gewebe	(Gonade, Fibroblasten d. Haut) Re: DYZ1, DYZ3, SRY neg Li: DYZ1, DYZ3, SRY pos.
Queipo et al. 2002	46,XX/47,XX,del(Y)p	weiblich, Hermaphroditismus, ovarielles und testikuläres Gewebe	14% SRY in testikulärem Gewebe

Tabelle 11-1 FISH-Technik an Gonadenmaterial

11.2.4 Vor- und Nachteile der angewandten Methode im Vergleich zur PCR

Niedrig frequente Mosaik und Turner-Syndrom

Bei 30% dieser Patienten können Y-chromosomale Sequenzen mit der PCR festgestellt werden [Mendes et al. 1999]. Insbesondere bei Zeichen der Virilisierung, welche auf ein vorhandenes Y-Chromosom oder dessen Teile hinweisen, sollte eine genauere Suche nach Y-spezifischen Sequenzen durchgeführt werden [Osipova et al. 1998; Gubbay et al. 1990]. Bisat et al. [1993] untersuchten ein Mädchen mit Turner-Phänotyp und virilisierten äußeren Genitalien. Im peripheren Blut fanden sich weder mit zytogenetischen Verfahren, noch mit der PCR Anteile des Y-Chromosoms. Im gonadalen Gewebe konnten sie mit Hilfe der PCR Anteile des Y-Chromosoms nachweisen. Dabei wurden Primer für den distalen Teil des langen Arms (DYZ1), die Zentromerregion (DYZ3) und den kurzen Arm (SRY) des Y-Chromosoms verwendet.

Auch Kocova et al. [1993] veröffentlichten erstaunliche Zahlen. Sie hatten 18 Patienten mit UTS untersucht. Bei vier von zehn Fällen mit reinem 45,X0-Karyotyp hatten sie mittels PCR und Southern-Blotting das SRY-Gen, nicht jedoch das mituntersuchte DYZ3-Repeat nachgewiesen. Die Sensitivität wurde hier mit 1:100.000 angegeben, das heisst, eine Zelle die SRY-enthält kann unter 100.000 anderen nachgewiesen werden. Diese Darstellung eines Mosaikzustandes lässt jedoch keine Aussage über dessen gewebespezifische Verteilung und quantitative Ausprägung zu, da hier lediglich aus den Gonaden extrahierte DNA untersucht wurde. Die Limitierung der ISH liegt hier in der geringeren Sensitivität im Vergleich zur PCR bei der Darstellung niedrig frequenter Mosaik. In weiteren Untersuchungen von Patienten mit Ullrich-Turner-Syndrom konnte ebenfalls eine Diskrepanz zwischen dem zytogenetisch ermittelten Gonosomenbefund und der Untersuchung auf das SRY-Gen mit der PCR an Gonadenmaterial gezeigt werden.

<i>Quelle</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>Klinik</i>	<i>Gonaden</i>	<i>Material (PCR)</i>	<i>Sequenzen</i>	<i>Kommentar</i>
Bisat et al. 1993	45,X0	UTS, wbl., virilisiertes ext. Genitale	Dysg. testikuläres Gewebe, re. Streak-Gonade li.	Lymphozyten: Gonade:	SRY, DYZ1 u DYZ3 neg. SRY, DYZ1 u DYZ3 pos.	Mosaik mit Y-chromosomalen Sequenzen in der Gonade →45,X0/46XY (Gon)
Osipova et al. 1998	46,X + mar	UTS, wbl. Zeichen der Virilisierung	Streak-Gonaden	Gonade:	SRY pos.	SRY-Sequenz, in der Gonade nachgewiesen
	45,X0	UTS, wbl. Klitorishyp.	Re.: Hoden Li.: ovarähnlich	Gonade re.: Gonade li.:	SRY neg. SRY pos.	s.o.
Mendes et al. 1999	45,X0	UTS, wbl.		Lymphozyten: Gonade:	SRY; DYZ3; ZFY pos. SRY; DYZ3; ZFY pos.	Bei reinem X0-Karyotyp Nachweis von SRY und anderen Y-Sequenzen.
	45,X0	UTS, wbl., Hirsutismus		Gonade:	SRY; DYZ3; ZFY neg.	Trotz Zeichen der Virilisierung kein Nachweis v. SRY.
	45,X0/46Xr (Xo.Y)	UTS, wbl.	Gonadoblastom	Lymphozyten: und Gonade:	SRY; DYZ3; ZFY pos.	
Kocova et al. 1994	45, X0	Intersexuelles Genitale, Virilisierung	Re.: Tube, ovarähnliche Streakgonade Li.: Hodengewebe	Gonade re.: Gonade li.:	Y-spezifische Sequenzen neg. SRY, ZFY,DYZ1, DYZ3, pos.	Im Gegensatz zu meiner Untersuchung hier nur Nachweis von Y-Sequenzen in der männlich ausgebildeten Gonade
Copelli et al. 2000	45, X0	Azoospermie, mnl. Phänotyp	regelrechte Gonaden	Leukozyten	SRY pos. Weitere Y-Sequenzen negativ	Vermutlich autosomale Translokation, oder niedrig frequentes Mosaik.
Uehara et al. 1999	46, XY	Wbl., Primäre Amenorrhoe	Li.:Gonadoblastom Re.: Streakgonade	Gonade: Lymphozyten:	DYZ1 pos., SRY neg. SRY und weitere pos.	Vermutlich Punktmutationen in der SRY-Sequenz.
Jenderny et al. 1998	45,X/46X,idi c(Yp)	UTS, wbl.	Streak-Gonaden, ovarähnliches Stroma	Gonade:	SRY, DYZ3, AZFa - AZFc pos.	Bestätigung der Y-Sequenzen auf dem isodizentrischen Y-Chromosom.
Kuchiera et al. 1994	46, XX	Herm. verus, Intersexuelles Genitale	Re.: Ovotestis u. Primärfollikel Li.: Testis	Gonade:	SRY neg.	Hermaphroditismus ohne nachweisbares SRY: autosomaler Defekt.
Queipo et al. 2002	46, XX	Herm. verus, Intersexuelles Genitale	Ovar und Ovotestis	Gonade: Leukozyten:	SRY; Ycen und Yph	Nachweis in testikulären und ovariellen Anteilen sowie in Leukozyten
Canto et al 2004	45,X0	Turner-Syndrom	k.a.	Leukozyten:	PABY, SRY, ZFY, Yc, Yph	10 von 107 Pat. (9.3%) positive für Y-Material

Tabelle 11-2: PCR-Untersuchungen an dysgenetischen Gonaden

Mutationen und Markerchromosomen

Alvarez-Nava et al. [1999] untersuchten eine Patientin mit 45,X0/X,i(Xq)-Karyotyp. Es wurden Stigmata des Turnersyndroms, virilisierte äußere Genitalien und die Bildung von unvollständig differenziertem testikulärem Gewebe beschrieben. Bei der Anwendung von acht verschiedenen Primern für das Y-Chromosom konnten weder in Lymphozyten, noch im Gonadenmaterial entsprechende Y-spezifische Anteile gefunden werden. Möglicherweise sind die testikulären Anteile auf Grund eines Defektes eines autosomalen Gens entstanden [Alvarez-Nava et al. 1999].

Hermaphroditismus und XX-Männer

Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass in 80% der XX-Männer Y-chromosomales Material zu finden ist [Fechner et al. 1993]. Auf der anderen Seite besitzen nur wenige Patienten mit echten Hermaphroditismus und 46,XX-Konstellation Y-chromosomale Sequenzen [Torres et al. 1996]. Die phänotypische Heterogenität innerhalb dieser Gruppe macht eine molekulargenetische Untersuchung bei Abwesenheit eines vollständigen Y-Chromosoms notwendig, um Regionen, wie z.B. das SRY-Gen nachzuweisen. In der Arbeit von Queipo et al. wurden 9 Patienten mit XX-Karyotyp und Hermaphroditismus untersucht. Für zwei Individuen konnte mit Hilfe der PCR die Anwesenheit zusätzlicher y-chromosomaler Sequenzen bestätigt werden [Queipo et al. 2002].

Gonadoblastom

Für die Bildung eines Gonadoblastoms wird die Anwesenheit Y-chromosomaler Sequenzen bei dysgenetischen Gonaden verantwortlich gemacht. Der für das Gonadoblastom maßgebliche Genort (GBY) wird in der perizentromeren Region auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms vermutet. Neben dem Nachweis des vollständigen Y-Chromosoms mit der PCR lassen sich weitere Regionen wie SRY [De Arce et al. 1992], ZFY [Page et al. 1994] oder DYZ3 [Kococa et al. 1994] auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms darstellen und die Möglichkeit für die Entstehung eines Gonadoblastoms abschätzen [Mendes et al. 1999]. Dies gilt z.B. bei Patienten mit einem Markerchromosom. Hier kann mit der PCR geprüft werden, ob dieser Marker Y-chromosomalen Ursprungs ist [Nagafuchi et al. 1992].

11.2.5 Zusammenfassung zum Vergleich mit anderen Methoden

Im Vergleich zur klassischen Zytogenetik, aber auch zur In Situ-Hybridisierung stellt die PCR hier eine wesentlich sensitivere Methode zum Nachweis niedrig frequenter Mosaikzellen mit einem Y-Chromosom bzw. Y-chromosomaler Markerchromosomen dar. Dabei können Zellen mit einem Y-Chromosom im Verhältnis von 1:100.000 zur gesamten Zellpopulation nachgewiesen werden. Die Spezifität der Methode beim Nachweis einzelner Gene, die für die Ausbildung eines Gonadoblastoms oder die Entwicklung von testikulärem Gewebe verantwortlich sind, ist besonders hoch [Mendes et al. 1999; Nazarenko et al. 1999; Osipova et al. 1998].

Eine morphologische Darstellung der gonosomalen Mosaikzellen ist hier jedoch nicht möglich. Ferner ist eine Quantifizierung der jeweiligen Zelllinie mit der PCR-Technik nicht möglich.

Dabei ist gerade die Quantifizierung und die Lokalisation der Y-Chromosom tragenden Zellen in den Gonaden von besonderer Bedeutung, denn die Variabilität des Phänotyps hängt von der Anwesenheit und Verteilung der Zellen mit einem Y-Chromosom ab.

Werden Metaphasekerne mit Hilfe der FISH-Technik ausgewertet, sind ebenfalls keinerlei umfassende Aussagen über die gewebespezifische Verteilung der Chromosomen in anderen Strukturen möglich.

Die Untersuchungen mittels PCR, FISH und ISH zeigen dessen ungeachtet, dass für die genaue Definition eines Mosaikzustandes neben den bewährten zytogenetischen Methoden andere molekulargenetische Untersuchungen an unterschiedlichen Gewebekomponenten von Bedeutung sind.

Mit der FISH-Technik sowie mit der PCR lassen sich strukturelle Veränderungen an Chromosomen darstellen und charakterisieren. Beim Nachweis einzelner Gene oder niedrig frequenter Mosaik konkurrieren diese beiden Verfahren miteinander – wobei eine genauere Quantifizierung mit FISH, jedoch ein sensitiverer Nachweis mit der PCR möglich ist.

Mit der FISH-Technik sind strukturelle Veränderungen der Chromosomen zu erkennen, mit der PCR lassen sich einzelne Gene und niedrig frequente Mosaik darstellen, und die herkömmliche ISH erlaubt die Quantifizierung und Lokalisation der Mosaik.

Aus den oben genannten Gründen geht hervor, dass von den meisten Autoren die Kombination verschiedener Methoden gefordert wird.

12 Gonadendysgenesien – Diskussion

12.1 Bedeutung der Mosaiksituation in gonadalem Gewebe

Das Verteilungsmuster der einzelnen Zellpopulationen wurde untersucht, um den Einfluss der Mosaiksituation auf die Ausprägung der jeweiligen Gonade zu klären.

Der Genotyp unterscheidet sich nicht nur zwischen verschiedenen Individuen, sondern auch innerhalb eines Individuums zwischen verschiedenen Gewebekomponenten. Bei Patienten mit Turner-Syndrom und 45,X-Karyotyp konnte ein Unterschied zwischen den Fibroblasten der Haut und den Gonaden nachgewiesen werden [Held et al 1992; Bisat et al. 1993]. Weiterhin wurden auch Unterschiede zwischen der rechten und linken Gonade berichtet [Hanson et al 2002]. Besonders hervorzuheben sind dabei Befunde, die eine zeitliche Veränderung der in Abhängigkeit vom Alter des Patienten darstellen.

Der Unterschied zwischen verschiedenen Gewebekomponenten ist auf die Anwesenheit von Markerchromosomen zurückzuführen. Diese strukturell veränderten Chromosomen weisen eine mitotische Instabilität auf und können so bei der Zellteilung verloren gehen [Held et al. 1992].

Wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, gehen zahlreiche Untersucher davon aus, dass die Zusammensetzung der Gonade von der Verteilung der Geschlechtschromosomen abhängt.

Neben der Diskussion von Arbeiten anderer Untersucher soll hier auf die Phänotyp-Karyotyp-Korrelation eingegangen werden. Dabei soll das gonadale Geschlecht mit der ermittelten Chromosomenverteilung verglichen werden.

12.1.1 Variabilität des Phänotyps

Bei Patienten mit 45,X0/46XY-Konstellation wird ein weites phänotypisches Spektrum beschrieben. Es finden sich weibliche Individuen mit Turner-Stigmata, männliche oder weibliche Patienten mit Pseudohermaphroditismus oder Hermaphroditismus sowie unauffällig männlich entwickelte Individuen. Diese unterschiedliche Ausprägung wird als Variabilität des Phänotyps bezeichnet [Telvi et. al. 1999; Reddy et al. 1998; Hsu 1994; Mendez et al. 1993]. Am häufigsten ist die 45,X0/46,XY-Konstellation im Zusammenhang mit der gemischten Gonadendysgenese beschrieben [Mendez et al. 1993; Chang et al. 1990; Ayuso et al. 1984].

Als Ursache für diese phänotypische Heterogenität kann die unterschiedliche quantitative Zusammensetzung und Verteilung der Mosaik angesehen werden [Hsu 1994; Linskens et al. 1992].

Wie in den folgenden Abschnitten gezeigt werden soll, ist die Variabilität des Phänotyps von der gewebespezifischen Verteilung der gonosomalen Mosaik in den Gonaden abhängig [Osipova et al. 1998; Mendez et al. 1993].

12.1.2 Nachweis der Mosaikkonstellationen in gonadalem Gewebe

Eine Reihe von Untersuchungen belegt, dass in verschiedenen Gewebekomponenten quantitative und qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Mosaik bestehen [Telvi et al. 1999; Quilter et al. 1998; Fernández et al. 1996; Ragg et al. 1995].

Telvi et al. [1999] untersuchten 27 Patienten mit 45,X0/46XY-Konstellation mit gemischter Gonadendysgenese und unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung. Neben dem Karyotyp aus kultivierten Lymphozyten wurden Fibroblasten aus Gonadenmaterial untersucht. Der Anteil an Zellen mit 45,X0 bzw. 46,XY-Konstellation in den Lymphozyten unterschied sich deutlich von der quantitativen Zusammensetzung in den Gonaden.

Quilter et al. [1998] fanden mit der FISH-Technik bei einer Patientin mit UTS in 6% der Lymphozyten Y-Material, während in der Gonade bis zu 26% der Zellen ein Y-Chromosom vorhanden war.

In der Arbeit von Ragg et al. [1995] wurden die Gonaden eines 2-jährigen Patienten mit einem 45X0/47XYY-Mosaik auf die Verteilung der Geschlechtschromosomen hin mit der FISH-Technik untersucht. Die rechte Gonade bestand aus unreifem testikulärem Gewebe, die linke Seite enthielt eine Streak-Gonade mit ovariellen Stroma. In der Streak-Gonade wurden „*fast ausschließlich*“ Zellen mit einem Y-Chromosom gefunden. Die Zellen im ovariellen Stroma enthielten zu 20% ein Y-Chromosom. Im testikulären Anteil zeigten die interstitiellen Zellen überwiegend eine 45,X0-Konstellation. Bei den Sertolizellen waren 40% mit einem Y-Chromosom zu finden [Ragg et al. 1995].

Bei vier Patienten mit einer reinen Gonadendysgenese konnten Röpke et al. in den Gonaden ebenfalls eine Mosaiksituation darstellen. Es wurden dabei neben den regulären männlichen und weiblichen Karyotypen ein gewisser Anteil einer Monosomie in der Gonade nachgewiesen. Die Autoren erklären anhand ihrer Befunde die Entwicklung der jeweiligen Gonadendysgenese [Röpke et al. 2004].

Die vorgestellten Analysen zeigen die Bedeutung des gonadalen Karyotyps auf. Zahlreiche Autoren fordern daher die Untersuchung von mindestens zwei Gewebekomponenten oder die Analyse der Gonaden zur Beurteilung der Mosaikkonstellation [Nazarenko et al. 1999; Costa et al. 1998; Novak et al. 1993; Held et al. 1992; Burns et al. 1997].

In den wenigsten Arbeiten werden jedoch differenzierte Angaben über die Zusammensetzung der Gonaden in Bezug auf die Mosaikkonstellation gemacht. Dabei findet man selten Ausführungen über die Zusammensetzung bestimmter Gewebekomponenten oder quantitative Angaben. Einige Untersuchungen werden anschließend besonders hervorgehoben und mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit verglichen.

12.1.3 Auswirkungen des gonadalen Karyotyps

Auch Reddy et al. beschreiben, dass eine uneinheitliche Verteilung und ein unterschiedlicher Anteil zweier Zelllinien in verschiedenen Gewebeanteilen eine

unterschiedliche phänotypische Ausprägung bewirken. In deren Untersuchung kam es bei Patienten mit 45,X/46,X,der,(Y) Karotyp zur weiblichen Ausprägung mit Turner-Stigmata bis zur männlichen Ausprägung mit gemischter Gonadendysgenese [Reddy et al. 1996 und 1998].

Die Ausbildung einer Streakgonade z.B. bei Patienten mit 45,X0/46,XY-Karyotyp wird durch die Anwesenheit einer 45,X0-Zelllinie hervorgerufen [Hsu 1994; Berkovitz et al. 1992]. Dagegen ist eine Virilisierung nicht vom Anteil einer 45,X0-Zelllinie abhängig. Hier ist die Darstellung einer Y-Chromosom tragenden Zelllinie von Bedeutung.

In Abhängigkeit von der prozentualen Verteilung existieren beim 45,X0/46,XY-Karyotyp verschiedene Ausprägungen der gemischten Gonadendysgenese [Hsu, L.Y.1994]. Bei einem größeren Anteil einer 45,X0-Zelllinie kommt es zur Ausbildung höhergradiger Störungen mit einem gemischten äußeren Genitale, Fehlbildungen der Gonaden und einem Nebeneinander von Müllerschen und Wolffschen Strukturen [Mendez et al. 1993]. Es resultiert eine innere und äußere Asymmetrie und eine Mischung von männlichen und weiblichen Merkmalen. Dabei stellt sich die Frage, ob eine Asymmetrie der Gonaden mit einem asymmetrischen Verteilungsmuster der Geschlechtschromosomen innerhalb der Gonade zusammenhängt.

Gewebespezifische Verteilung der X0-Zelllinie

Novak et al. untersuchten eine Patientin mit 45,X0/46,XX-Karyotyp. In Lymphozyten und im ovariellen Stroma wurde von den Autoren mit der FISH-Technik ein 45,X0/46;XX-Mosaik nachgewiesen und quantitativ ausgewertet. Im ovariellen Gewebe fanden sich 61% der Stromazellen mit X0 und 39% der Zellen mit XX-Konstellation.

Die Anwesenheit einer Zelllinie mit XX-Konstellation erklärt hier die Bildung von regulärem ovariellen Gewebe. Auf der anderen Seite ist die inadäquate Funktion der Gonade auf die X0-Zelllinie zurückzuführen.

Gewebespezifische Verteilung des Y-Chromosoms

Bei Anwesenheit eines intakten Y-Chromosoms kommt es nicht immer zur vollständigen Ausbildung der männlichen Strukturen. Kocova et al. untersuchten einen Patienten mit 45,X0-Karyotyp. Während in der linken Gonade (Hoden) eine 45,X0/46XXq⁻-Konstellation vorhanden war, ließen sich auf der rechten Seite (Streakgonade) lediglich Zellen mit 45,X0-Konstellation nachweisen. Weitere Analysen (FISH, PCR) ergaben, dass auf dem Xq⁻-Element Y-chromosomale Sequenzen, einschließlich des SRY-Gens, zu finden waren. Die Anwesenheit dieser Sequenzen erklärt die Bildung von testikulärem Gewebe innerhalb der untersuchten Gonade [Kocova et al. 1995].

Auch Osipova et al. [1998] beschreiben die Korrelation von äußeren Genitalien im Sinne einer Virilisierung und dem Vorhandensein von testikulärem Gewebe. Y-spezifische Sequenzen in einer Gonade mit testikulärem Gewebe konnten mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden, obwohl im peripheren Blut und in der kontralateralen Gonade

(ovarähnliches Stroma) kein Y-chromosomales Material zu finden war. Hier wird von den Autoren ein niedrig frequentes Mosaik mit einem Y-Chromosom in der Gonade vermutet. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Verteilung des Y-Chromosoms innerhalb der Gonaden bei Patienten mit Turner-Syndrom und X0/XY-Situation variiert [Udler et al. 2001].

Da sich ein Gonadoblastom bei Anwesenheit eines Y-Chromosoms entwickelt, ist es von besonderer Bedeutung, nachzuprüfen, inwieweit die routinemäßige Untersuchung von Lymphozyten mit der Situation in den jeweiligen Gonaden übereinstimmt.

Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, ist die Anwesenheit des Y-Chromosoms in der Gonade für die Bildung eines Gonadoblastoms verantwortlich. Der gonadale Karyotyp scheint das wichtigste Element für die Aufklärung des Risikos zur Bildung eines Gonadoblastoms zu sein. Dies wird auch in einer Studie von Sultana belegt: In Gonaden mit einem 45X0/46XY Mosaik entwickeln sich Tumor - Foki ausschließlich von Zellen die das Y-Chromosom tragen. [Bergendi et.al. 1997; Sultana et.al. 1995]

12.2 Gruppe III - Gemischte Gonadendysgenese und UTS

Bei den sechs Patienten mit gemischter Gonadendysgenese und Ullrich-Turner-Syndrom wurde eine weitgehend ähnliche phänotypische Ausprägung bezüglich der Gonaden sowie ein einheitlicher Karyotyp (46,XY/45,X0) beschrieben.

Die X0-Komponente konnte in dieser Gruppe in allen Gonaden nachgewiesen werden. Dieser Befund ergibt sich aus den hohen Anteilen an einfachen Signalen für das X-Chromosom und den niedrigeren Anteilen für das Y-Chromosom. Enthalten z.B. 72% der Zellen ein Signal für das X-Chromosom und nur 10% ein Signal für das Y-Chromosom, ist von einer 45,X0/46XY-Konstellation mit Überwiegen der X0-Komponente auszugehen.

Der Nachweis des Y-Chromosoms gelang in den männlichen wie auch in den weiblichen Gewebeannteilen dieser Gruppe. Zwischen den männlichen und weiblichen Gewebestrukturen konnte nur in zwei Fällen (g6 und g7) ein quantitativer Unterschied festgestellt werden. Bei den übrigen Fällen waren keine Abweichungen in der Chromosomenverteilung zu finden. Bei den Fall g10 war der Nachweis des Y-Chromosoms nicht möglich. Im folgenden sollen die Ergebnisse mit dem jeweiligen Phänotyp verglichen werden.

12.2.1 Phänotyp-Karyotyp-Korrelation der Gruppe III

g3: Turner-Syndrom, Trisomie 18; phänotypisch männlich, Alter 11 J., Streakgonade mit ovariellen und testikulären Anteilen.

Entsprechend des Ullrich-Turner-Syndroms mit 45,X0/46,XY-Karyotyp liegt hier ein Mosaik in der Gonade vor. Die XY-Komponente ist dabei schwach ausgeprägt. Das Übergewicht der X0-Zelllinie ist für die Störungen im Sinne des Ullrich-Turner-Syndroms sowie für den Defekt der Gonadenentwicklung verantwortlich. Allerdings wurden auch hier männliche Strukturen wie z.B. atrophischer Hoden, Nebenhoden und Samenleiter

beschrieben, die auf die Anwesenheit des Y-Chromosoms zurückzuführen sind. Äußere Zeichen der Virilisierung wurden bei der Patientin nicht beschrieben. Es liegt nur ein geringer Anteil an Zellen mit einem Y-Chromosom vor, was mit der phänotypischen Ausprägung übereinstimmt. Dabei besteht eine gleichmäßige quantitative Ausprägung in Bezug auf die verschiedenen Gewebekomponenten. Die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen lässt auf einen frühen Verlust des Y-Anteils schließen. Im Rahmen einer frühen klinischen Untersuchung wurde anhand einer Hautbiopsie zunächst eine 45,X0-Konstellation nachgewiesen. Im Weiteren ergab sich zu einem späteren Zeitpunkt die Diagnose einer 45,X0/46,XY +18 Situation anhand von Lymphozyten.

g5: Gemischte Gonadendysgenese, intersexuelles Genitale, Alter 1M, Hodengewebe, keine Ovaranteile.

Bei der gemischten Gonadendysgenese mit 45,X0/46,XY-Konstellation konnte der entsprechende Karyotyp auch in der Gonade festgestellt werden. Die Gonadendysgenese zeigt sich mit einer Bildung von hypoplastischem Hodengewebe. Ovarielles Gewebe war nicht nachzuweisen.

Insgesamt ist die XY-Komponente seltener vertreten als die X0-Konstellation. Phänotypisch zeigt sich bei der postnatal durchgeführten klinischen Untersuchung ein intersexuelles Genitale mit einer Klitorishypertrophie. Anzeichen eines Ullrich-Turner-Syndroms sind nicht beschrieben. Aufgrund der X0-Aberration liegt die beschriebene gonadale Störung vor. Anzeichen der Virilisierung gehen mit der Anwesenheit des Y-Chromosoms einher. Die Anteile einer Tube weisen auf die unvollständige Suppression von Derivaten des Müllerschen Gangsystems hin. In einigen Gewebeformationen wurde eine fokal unterschiedliche Gewebeverteilung der Chromosomen beobachtet. Dabei lässt sich das Y-Chromosom besonders gut in den epithelialen Strukturen nachweisen.

g6: Gemischte Gonadendysgenese, weiblicher Phänotyp, atrophische Streak Gonade, Gonadoblastom, Alter 6 J, keine ausdifferenzierten Ovar- oder Hodenanteile.

Bei diesem Fall wurde ein deutliches Übergewicht der XY-Komponente gefunden. Obwohl eine Streakgonade vorliegt, ist der Anteil der Zellen mit X0-Konstellation hier im Vergleich zu den anderen Fällen am geringsten. Der hohe Anteil an Y-Chromosomen ist **nicht** mit dem weiblich ausgebildeten Phänotyp und den fehlenden ausdifferenzierten Hodenanteilen vereinbar. Zeichen der Virilisierung waren hier nicht beschrieben.

Möglicherweise kann es auf Grund des Alters der Patientin (6 Jahre) zu einem Verlust der X0-Zelllinie gekommen sein. An einer Stelle wurde ovarähnliches Stroma gefunden. In dieser Region konnten weniger Y-Chromosomen nachgewiesen werden. Somit besteht eventuell ein Übergang zum Hermaphroditismus. Dabei ist auch bei den übrigen Fällen mit Hermaphroditismus ein Unterschied zwischen ovariellen und testikulären Strukturen in Bezug auf die Chromosomenverteilung gefunden worden. Daneben liegt ein

Gonadoblastom vor, dass auf die Anwesenheit der Y-Chromosomen zurückzuführen ist. Dem niedrigen X0-Gehalt entsprechend fehlen hier Anzeichen eines Ullrich-Turner-Syndroms.

g7: Gemischte Gonadendysgenese, männlicher Phänotyp mit Hypospadie und Leistenhoden, Alter 6M, Streakgonade mit ovariellen und testikulären Anteilen.

Die für die Dysgenese verantwortliche X0-Zelllinie konnte auch hier nachgewiesen werden. Dabei wurden in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen (31%) als im Hoden (53%) und im Endothel (75%) dargestellt werden. Der männliche Phänotyp stimmt mit dieser Chromosomenkonstellation überein. Dabei ist das Y-Chromosom für die Bildung von Nebenhoden, Samenleiter und der männlichen Ausprägung des Patienten verantwortlich.

Die weiblichen Anteile der Gonade enthalten dabei weniger Y-Material wie die männlichen, was mit den Fällen der Gruppe II vergleichbar ist. Analog zu dem Fall g6 liegt also auch hier ein Übergang zu einem echten Hermaphroditismus vor.

Zu den weiblichen Strukturen zählen hier die Anschnitte ovarähnlichen Stromas mit einigen Primärfollikeln sowie Tube. Es bestehen jedoch keine ausdifferenzierten Ovaranteile. Eine Eingruppierung als Hermaphroditismus verus konnte somit nicht erfolgen.

g9: Gonadendysgenese, XY-Translokation: 46,X, t(X;Y) Minderwuchs, Gonade mit atrophischem Hodengewebe, Ovar m. Follikelzysten und Gelbkörper.

Bei dem vorliegenden Fall wurde eine Konstellation beschrieben, wo der vollständige heterochromatische Bereich des langen Arms des Y-Chromosoms auf das X-Chromosom transloziert wurde. Bei der Überschichtung mit der Sonde DYZ 2 konnte eine Markierung mit einem Signal je Zellkern gefunden werden.

Zusätzlich wurden Präparate mit einer zentromerspezifischen Sonde (DYZ 3) angefertigt. Diese zeigt keine Reaktion mit den vorhandenen Y-chromosomalen Sequenzen. Dennoch muss in diesem Fall die genetische Information des SRY-Gens vorhanden gewesen sein, da sich histologisch Anteile von testikulärem Gewebe sowie Nebenhodenanteile und Samenleiter nachweisen ließen. Eine endgültige Aufklärung ist nur mit molekulargenetischen Methoden möglich. Der Minderwuchs ist auf die Veränderung (Bruch) im X-Chromosom zurückzuführen.

g10: Gemischte Gonadendysgenese, intersexuelles äußeres Genitale, Alter 8M, überwiegend atrophisches Hodengewebe.

Eine eindeutige Phänotyp-Karyotyp-Korrelation anhand der Ergebnisse der In Situ-Hybridisierung ist bei diesem Fall nicht möglich. Die untersuchte Gonade besteht überwiegend aus unreifem Hodengewebe. Außerdem wurden deutliche Zeichen der

Virilisierung sowie ein hyperplastischer Schwellkörper im Sinne einer Klitorishypertrophie beschrieben. Aus den weiteren Angaben geht hervor, dass in den Untersuchungen der Lymphozytenkulturen mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik 33% der Zellen eine XY-Konstellation zeigten.

Mit der ISH ließen sich jedoch nur Zellen mit **einem** X-Chromosom nachweisen. Da hier mit den verwendeten Sonden **kein Y-Chromosom** nachweisbar war, muss von einer strukturellen Veränderung, den Zielbereich der Sonde betreffend, ausgegangen werden. Als Untersuchungsmaterial stand reguläres Material als Resektat der Gonade zur Verfügung. Die parallel durchgeführten Kontrollen zeigten stets eine gute Reaktion auf das Y-Chromosom.

Da kein eindeutiger Nachweis von ovariellen Gewebe möglich war, besteht eine gemischte Gonadendysgenese.

g11: Gemischte Gonadendysgenese, intersexuelles äußeres Genitale, Alter 7T, Streakgonade mit atrophischem Hodengewebe

In dieser Gonade konnten ebenfalls X- und Y-Chromosomen in den verschiedenen Gewebeanteilen nachgewiesen werden. Die quantitative Ausprägung der einzelnen Zelllinien ist mit g5 vergleichbar, wobei auch hier ein Übergewicht der X0-Komponente vorliegt. UTS-Stigmata wurden hier jedoch nicht beschrieben. Phänotypisch liegt ein intersexuelles Genitale vor, welches mit der beschriebenen Situation korreliert.

Bedeutung der verschiedenen Zelllinien

Liegt eine lokale Konzentration oder eine gleichmäßig verteilte kleinere Population von 46,XY-Zellen vor, kommt es zur fokalen Bildung von testikulärem Gewebe. Ist dieses Gewebe in der Lage, ausreichend Testosteron zu produzieren, kann es hier zu einer Virilisierung kommen. Die Anwesenheit von testikulärem Gewebe als Produktionsort für Androgene ist letztendlich die Voraussetzung für die Bildung von männlichen externen Genitalien bzw. für die Virilisierung. Die Anwesenheit der Derivate des Wolffschen Ganges zeigt, dass in utero die Testosteronproduktion ausreichend gewesen sein muss, um dessen Differenzierung zu induzieren. Entsprechend war das Y-Chromosom in der Gonade nachzuweisen. Da auch Derivate des Müllerschen Ganges beobachtet wurden, kann eine Störung der Synthese der MIH ursächlich sein. Eine reduzierte oder fehlende Expression Y-chromosomaler Gene führt zur fehlenden oder gestörten Sekretion von MIH. Ovariellen Stroma in dysgenetischen Gonaden scheint nicht auf zwei X-Chromosomen angewiesen zu sein. Die fehlende Unterdrückung Müllerscher Strukturen durch das (verloren gegangene) Y-Chromosom lässt hier deren Differenzierung und die Bildung ovarähnlichen Gewebes zu.

12.2.2 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

<i>Quelle</i>	<i>Sonde / Methode</i>	<i>Karyotyp / Klinik</i>	<i>X-Chromosom</i>	<i>Y-Chromosom</i>	<i>Histologie</i>
Bergendi et al. 1997	FISH, PCR	45,X/46X, idic(Yq) UTS, wbl. Klitoris-Hypertrophie	Haut u. Gonade: deutliches Überwiegen der X0-Zelllinie	idic (Yq), keine quantitative Angaben	Streak-Gonaden, hodentubuliartige Formationen
Kocova et al. 1995	FISH, DYZ1, DYZ3, SRY	45,XO/46,XXp-Gem. Gonadendysgenese	Hoden: 84% X0; 12% XX Streak-Gonade: 100% X0	Hoden: 4% XY	li.: unreifes Hodengewebe, kaum Spermio-genese re.: Streak-Gonade, Anteile ovariellen Stromas
Novak et al. 1995	FISH, pBamX5	45,X0/46,XX	Ovar: X0 61% , XX 39% Oozyten: XX	-	reifes ovarielles Gewebe, einige Primärfollikel
Reddy et al. 1996	FISH, DXZ1, DYZ3	45,X/46XY gem.Gonadendysgenese	k.a.	Hoden (re.): 14 - 21% Ovar (li.): 7 - 9%	re. Gonade: Hoden, Sertoli- u. Leydig-Zellen li. Gonade: Streak-Gonade, ovarielles Gewebe
Reddy et al. 1996	s.o.	45,X0/46,XY unauff. Mnl.. Genitale, Hodenatrophie	k.a.	Hoden: 53% - 59%	atrophische Hodentubuli, sprl. Leydigzellen
Reddy et al. 1998	s.o.	45,X0/46,XY UTS, intersexuelles Genitale (2 Fälle)	k.a.	Ovar: 21% und 39% Leydigzellen: 47% und 54%	
Udler et al. 2001	FISH, DYZ3, DXZ1	45,X0/46,XY(Yp), UTS, äußere Genitalien regulär weiblich, Streakgonade.	k.a.	Tube: 4% Leydigzellen: 65,5% Nebenhoden 45%	Teilweise Nester mit Leydigzellen, keine ovariellen oder testikulären Strukturen.

Tabelle 12-1: Untersuchungen anderer Autoren an gonadalem Material

Bergendi et al. [1997] weisen innerhalb einer Streakgonade ein deutliches Übergewicht der X0-Zelllinie nach. Auch hier liegt, wie bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Fall (*g3*) ein Ullrich-Turner-Syndrom (UTS) vor. In der Gonade konnte ebenfalls y-chromosomales Material nachgewiesen werden, was die testikuläre Differenzierung erklärt. In dem Fall *g3* wurde ein Anteil von 5-10% für das Y-Chromosom gefunden.

Auch bei dem Fall *g5* wurde ein Überwiegen der X0-Zelllinie beschrieben. Hier sind im Gegensatz zu *g3* keine Turner-Stigmata dargestellt.

Udler et al. [2001] zeigen eine Zuordnung von männlichen Strukturen und der Häufigkeit des Y-Chromosoms auf. Bei einem Mädchen mit UTS lag eine 45,X/46,X,dicY(q11.2) – Konstellation vor. Bei der Reaktion mit der Sonde DYZ3 erhielten die Untersucher entsprechend der Struktur des Chromosoms ein Doppelsignal (Vorliegen von zwei Zentromerregionen) für das Y-Chromosom. Es zeigte sich eine geringere Ausprägung der y-tragenden Zelllinie in der Tube. Hingegen waren in den männlichen Gewebeanteilen deutlich höhere Anteile für das Y zu finden. Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Fall mit Turner-Syndrom besteht bei Udler et al. somit ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Strukturen in Bezug auf die Verteilung der Geschlechtschromosomen.

Auch Reddy und Mitarbeiter [1998] haben Mosaikkonstellationen in den Gonaden von Patienten mit 45,X0/46XY-Konstellation dargestellt. In diesen Arbeiten liegen ebenfalls quantitative Ergebnisse vor, die mit der Interphasen-Zytogenetik ermittelt wurden. Alle untersuchten Fälle zeigten eine Mosaikkonstellation in den Gonaden.

Ebenso wie bei den in dieser Arbeit untersuchten Fällen konnten auch Reddy et al. sowohl die X0, wie auch die XY-Komponente in männlichen, wie auch in weiblichen Gewebestrukturen nachweisen.

Bei den Fällen mit gemischter Gonadendysgenese wurde ein höherer Anteil an Y-Chromosomen in den testikulären Anteilen (21%, 14%) als im ovariellen Gewebe (9%) gefunden. Wie bei den Fällen g6 und g7 zeigen auch Reddy und Mitarbeiter in ihren Fällen somit einen höheren Anteil an Y-Chromosomen in den testikulären Strukturen als in den ovariellen Strukturen.

Die von Reddy et al. ermittelte prozentuale Verteilung ist mit den hier ermittelten Werten vergleichbar. In Hinsicht auf das UTS konnte Reddy et al. jedoch einen höheren Anteil an Y-Chromosomen nachweisen als bei dem in dieser Arbeit untersuchten Fall.

Osipova et al. [1998] beschreiben ebenfalls ein Fall, bei dem der positive Nachweis von SRY nicht mit den histologischen Befunden (bindegewebige Streak-Gonade) und dem äußeren Genitale (weiblich) korreliert (siehe g10). Es ist möglich, dass in diesem Fall die Ursache eine Mutation in einem weiteren Gen in der Determinierungskaskade liegt [McElreavey u. Fellous 1999; Osipova et al. 1998]. Auch von anderen Autoren wird die Bildung der Androgene in Abwesenheit Y-chromosomaler Sequenzen in der Gonade diskutiert. Lippe beschreibt die Produktion von Androgenen durch Vorläuferzellen des ovariellen Stromas bei Patienten mit Gonadendysgenese [Lippe 1991].

12.3 Gruppe I - Pseudohermaphroditismus maskulinus

In dieser Arbeit wurden zwei Fälle mit 46,XY-Chromosomensatz und atypischem Hodengewebe untersucht, die dem männlichen Pseudohermaphroditismus zuzuordnen sind:

Fall	Karyotyp	Alter	Geschlecht / äußeres Genitale	Gonade
g1	46, XY	1 M	Intersex., komplexes Fehlbildungssyndrom	Hypoplastischer Hoden, Leydigzellen, Nebenhoden, Samenleiter keine Spermiogenese, keine Ovaranteile
g8	46, XY	2 J	Mnl.	Atrophischer Hoden, Leydigzellen, Nebenhoden und Rete Testis, Samenleiter keine Spermiogenese, keine Ovaranteile

Tabelle 12-2 Patienten mit Pseudohermaphroditismus maskulinus

Bei den Fällen *g1* und *g8* (Gruppe I) ergab die Untersuchung der Geschlechtschromosomen einen regulären XY-Genotyp. In allen Gewebekomponenten konnte mit der ISH je ein Signal für das X-Chromosom und eines für das Y-Chromosom gefunden werden. Quantitativ entsprechen die Ergebnisse der einzelnen Gewebe jeweils denen der Kontrollgruppe. Ob eine geringgradige Monosomie, die unterhalb der Nachweisgrenze liegt, vorhanden ist, bleibt in diesem Fall offen.

12.3.1 Phänotyp-Karyotyp-Korrelation

Im **Fall g1** liegt ein komplexes Fehlbildungssyndrom (Smith-Lemi-Opitz-Syndrom) mit atrophischem Hoden und intersexuellem Genitale vor. Hier kann eine endokrine Funktionsstörung wie beim Pseudohermaphroditismus oder ein genetischer Defekt wie bei der reinen Gonadendysgenese vorliegen. Gegen eine reine Gonadendysgenese spricht das Fehlen einer Streakgonade und Müllerscher Strukturen. Zur Diagnose eines echten Hermaphroditismus gehören ovarielle Strukturen, die hier nicht nachweisbar waren. Die Abwesenheit Müllerscher Strukturen weist auf eine reguläre Sertolizell-Funktion während der Embryonalphase hin. Das Gleiche gilt für die Anwesenheit eines Samenleiters, des Nebenhodens und des Rete Testis. Eine unzureichende Funktion der Leydigzellen, eine Störung der Konversion von Testosteron zu Dihydrotestosteron oder dessen Reaktion am Rezeptor ist hier für die Bildung des intersexuellen Genitales verantwortlich.

Im **Fall g8** mit regulärem männlichen Genitale kann ebenfalls eine Form des Pseudohermaphroditismus oder letztendlich eine andere Ursache für eine Hodenatrophie (Maldescensus) vorliegen.

12.4 Gruppe II - Echter Hermaphroditismus

12.4.1 Genetische Heterogenität

Der echte Hermaphroditismus ist durch die gleichzeitige Anwesenheit von testikulärem und ovariellen Gewebe definiert. Der häufigste Genotyp ist mit etwa 60% eine 46,XX-Konstellation [Queipo et al. 2002]. Nur in wenigen Fällen mit 46,XX-Konstellation wird die gleichzeitige Anwesenheit von Y-chromosomalen Sequenzen (z.B. SRY) gefunden [Queipo et al. 2002; Fechner, 1994; Berkovitz et al. 1992]. Ist SRY nicht nachweisbar und besteht auch kein Y-chromosomales Mosaik, muss von einer Mutation eines autosomalen oder X-chromosomalen Gens ausgegangen werden, welche die Bildung von testikulären Strukturen erklärt [Torres et al 1996; Berkovitz et al. 1992]. Eine 46,XX-Konstellation mit nachweisbarem SRY-Gen wird auf eine Translokation zurückgeführt [Mc Elreavey et al 1992]. Diese unterschiedlichen Bedingungen bei Individuen mit echten Hermaphroditismus werden als genetische Heterogenität bezeichnet.

Ergebnisse anderer Autoren

In den Arbeiten von Linskens et al. [1992] und Queipo [2002] sowie von van Niekerk et al. [1981] werden Patienten mit den klinischen und histologischen Merkmalen eines echten Hermaphroditismus und einer 45,X0/46XY-Konstellation dargestellt. Die Inzidenz für einen echten Hermaphroditismus mit diesem Genotyp wird mit 3,5% der Fälle angegeben [Linskens et al. 1992; Niekerk et al. 1976].

<i>Quelle</i>	<i>Äußeres Genitale</i>	<i>Rechte Gonade</i>	<i>Linke Gonade</i>
Linskens et al. 1992	Hypospadie, Kryptorchidismus	Streak-Gonade, ovarielles Gewebe	Testis
	Hypospadie, Kryptorchidismus	Testis	Ovotestis
Van Niekerk et al. 1981	-	Ovar	Testis / Ovotestis
Berkovitz et al. 1982	wbl.	Ovotestis	Streakgonade
Queipo et al. 2002	mnl.; Hypospadie	Streakgonade	Ovotestis

Tabelle 12-3 Hermaphroditismus verus und 45,X0/46XY-Konstellation

Weiterhin werden Fälle mit echtem Hermaphroditismus und 46,XX/46,XY, 46,XY/47,XXY oder 46,XX/47,XXY Konstellation beschrieben. Auch bei diesen Situationen ist eine Ausprägung des Phänotyps wie bei den Fällen mit 45,X0/46XY-Konstellation zu beobachten. 12,8% der werden als 46,XX/46,XY und 5,6% als 46,XY/47,XXY-Karyotyp dargestellt [Linskens et al. 1992; Niekerk et al. 1976].

<i>Quelle</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>Äußeres Genitale</i>	<i>Rechte Gonade</i>	<i>Linke Gonade</i>
Queipo et al. 2002	46,XX	intersexuell	Ovar, Ovotestis	Ovar, Ovotestis
Torres et al. 1996	46,XX/46,XY	mnl.	Ovotestis, Tube,	Ovotestis, Tube,
Queipo et al. 2002	46,XX/46,XY	weiblich	Ovotestis	Ovar
Van Niekerk et al. 1981	46,XX/46,XY	-	Ovotestis	Ovar
Berkovitz et al. 1982	46,XX/46,XY	intersexuell	Ovar	Ovotestis
Torres et al. 1996	46,XX/47,XXY	mnl.	Ovotestis, Tube	Ovar, Tube
Van Niekerk et al. 1981	46,XX/47,XXY	-	Ovotestis	Hoden

Tabelle 12-4 Hermaphroditismus verus mit 46,XX/46,XY oder 46,XX/47,XXY Konstellation

12.4.2 Phänotyp-Karyotyp-Korrelation

In dieser Arbeit wurden folgende Fälle mit Hermaphroditismus und einem Mosaik der Geschlechtschromosomen untersucht:

Fall	Karyotyp	Äußeres Genitale	Rechte Gonade	Linke Gonade
g2	46,XX/46,XY	mnl., Gynäkomastie, Kryptorchismus	Ovotestis und Ovar Tube, NH, Samenleiter	Hoden
g12	46,XX/46,XY	mnl.	Ovotestis Tube, NH, Samenleiter	Ovar
g4	46,XY/47,XXY	mnl., Gynäkomastie	Hoden, Nebenhoden, wenig Ovar	Ovotestis Nebenhoden

Tabelle 12-5, Eigene Fälle mit Hermaphroditismus, NH: Nebenhoden

Bei **g2** wurden primär eine Gynäkomastie und ein Kryptorchismus diagnostiziert. Histologisch wurden links eine zwitterige Gonade mit atrophischem Hodengewebe und rechts ein Ovotestis gefunden.

Im Ovar liegt ein niedrigerer Anteil der Zellen mit einem Y-Chromosom vor (21%), als in den übrigen Gewebeanteilen. In den testikulären Bereichen sind 34% positiv für das Y-Chromosom. Dieser Anteil scheint ausreichend für die Entwicklung der testikulären Strukturen zu sein. Die XX-Komponente (43%) ist hier für die Bildung eines funktionstüchtigen Ovars verantwortlich.

g12: Hier besteht ebenfalls phänotypisch eine männliche Ausprägung. In den ovariellen Anteilen der Gonade waren keine Y-Chromosomen nachzuweisen (dabei 72% mit zwei X-Chromosomen). In den übrigen Gewebekomponenten konnte dagegen ein Überwiegen der XY-Komponente festgestellt werden (69% - 84% 1 Signal für das Y-Chromosom).

Die phänotypische Ausprägung ist bei diesem Fall auf den hohen Gehalt der Zellen mit einem Y-Chromosom zurückzuführen. Histologisch wurden überwiegend testikuläre Strukturen beschrieben. Auf der anderen Seite ist der Nachweis eines frischen Gelbkörpers nach einer stattgefundenen Ovulation ein Zeichen für eine intakte ovarielle Funktion. Auch hier existiert neben einer XY- eine XX-Zelllinie, die für die ovarielle Funktion verantwortlich ist.

Für den Fall **g4** ist primär eine Gynäkomastie bei ansonsten äußerlich männlichem Phänotyp beschrieben. Die Gonade enthält überwiegend ovarielle Anteile und einen frischen Gelbkörper sowie geringe Anteile von Hodengewebe. Es wurde in allen Komponenten eine XXY- und eine XY-Zelllinie gefunden. In den Hodentubuli des Ovotestis (rechts) waren 54% und im ovariellen Stroma 57% der Zellen mit zwei Signalen für das X-Chromosom zu finden. Auf der linken Seite war in den Hodentubuli ein Gehalt von 67% und im ovariellen Stroma von 63% für zwei X-Chromosomen zu finden. Die ubiquitäre Anwesenheit des Y-Chromosoms ist hier als Ursache des Gonadoblastoms anzusehen.

Die Anwesenheit y-chromosomaler Sequenzen bei den Fällen g2, g12 und g4 stimmt mit deren männlichen (äußeren) Ausprägung überein. Dabei ist bei den Fällen g2 und g12 eine Differenz in der Zusammensetzung zwischen ovariellen und testikulären Strukturen zu finden. Die Zusammensetzung der Gonaden korreliert hier jeweils mit der phänotypischen Ausprägung in Bezug auf die Histologie. In den testikulären Anteilen ist dabei jeweils ein größerer Gehalt an Y-Chromosomen vorhanden, als in den ovariellen Strukturen.

12.4.3 Vergleich mit anderen Autoren

Auch McLaren beschreibt die Bedeutung der quantitativen Verteilung der Geschlechtschromosomen in den Gonaden in Bezug auf den Hermaphroditismus.

Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von testikulärem und ovariellen Gewebe mit einer 46,XX/46,XY-Konstellation oder einer 46,XX/47,XXY-Konstellation ist die Bildung des testikulären Anteils auf die Verteilung des Y-Chromosoms zurückzuführen [McLaren 1991]. Dagegen ist die Bildung des ovariellen Gewebes durch einen gewissen Anteil an Zellen mit XX-Gonosomenbestand und die Inaktivität des Y-Chromosoms zu erklären [Berkovitz et al. 1982]. Eine Untersuchung von Mosaiken mit XY und XX Zellen zeigte, dass ein gewisser Mindestanteil an Zellen mit XY-Konstellation in der Genitalleiste vorliegen muss, damit es zur Bildung von testikulärem Gewebe kommen kann [McLaren 1991]. McLaren, der Untersuchungen an Mäusen durchführte, beschreibt die Bildung eines Ovotestis bei einem Gehalt von 20%-25% an XY-Zellen bei einer ansonsten regulären XX-Konstellation [McLaren 1991 und Torres et al. 1996].

In den Arbeiten von Berkovitz et al. 1992 und McElreavey et al. 1992 wurden lediglich Leukozyten untersucht. Die Anwesenheit eines gewebespezifischen Mosaiks, insbesondere in den Gonaden, ist dabei also nicht auszuschließen.

Von Queipo et al. wurde ebenfalls das Vorliegen eines gonadalen Mosaikes (bestehend aus SRY oder anderen Y-chromosomalen Sequenzen) als Ursache für einen Hermaphroditismus beschrieben. Von den Untersuchern wurde anhand der FISH-Technik in 14% der Zellen im testikulären Gewebe ein Signal mit Hilfe einer gegen SRY gerichteten Sonde gefunden. In den übrigen Gewebekomponenten lag dagegen eine XX-Situation vor. Mit der von Queipo et al. angewendeten Methode konnte jedoch keine Zuordnung der Signale zu spezifischen Zelltypen hergestellt werden [Queipo et al. 2002]. Dennoch können unsere Befunde mit der von Queipo et al. beschriebenen Situation verglichen werden. Auch dort kam in einem Fall das Y-Chromosom nur im testikulären Gewebe vor.

In der Tabelle sind noch einmal die Ergebnisse aus dieser Arbeit von Patienten mit echtem Hermaphroditismus zum Vergleich mit der Arbeit von Queipo et al. angegeben:

<i>Quelle / Fall</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>testikuläres Gewebe (Sonde)</i>		<i>andere Gewebe</i>	<i>Gonade / Histologie</i>
		<i>1 Signal</i>	<i>2 Signale</i>		
Queipo et al.	46,XX	14 % (SRY)	k.a.	KEINE	Ovotestis, Ovar
Fall g2	46,XX/XY	34% (DYZ2)	1% (DYZ2)	21% - 60%	Ovotestis, Ovar
Fall g12	46,XX/XY	75% (DYZ2)	2% (DYZ2)	69% - 84%	Ovotestis, Testis
Fall g4	46,XY/47, XXY	69% (DYZ2)	2% (DYZ2)	50% - 65 %	Ovar, Testis

Tabelle 12-6: Vergleich mit den Ergebnissen aus Queipo et al. 2002. k.a.: keine Angaben

Queipo et al. vermuten, dass der geringe Anteil (14%) an Zellen mit SRY nicht für die vollständige Entwicklung von testikulärem Gewebe ausreicht, und es somit zur Bildung des Ovotestis gekommen ist. Auf der anderen Seite ist die Anwesenheit von y-chromosomalen Sequenzen (SRY) nicht zwingend für eine testikuläre Determinierung. Dabei sei insbesondere auf das Vorhandensein des Y-Chromosoms in den ovariellen Anteilen hingewiesen. Eine ovarielle Entwicklung bei Anwesenheit y-chromosomaler Sequenzen kann neben strukturellen Veränderungen (Mutationen, Deletionen) auch auf das Vorliegen von inaktiven Genen (Allele) hinweisen.

12.5 Vergleich der Ergebnisse von Gruppe II und III

Bezüglich der Verteilung der Chromosomen wurden unterschiedliche Zusammensetzungen bei den verschiedenen Syndromen mit Gonadendysgenese festgestellt:

- Bei der GEMISCHTEN GONADENDYSGENESIE besteht eine gleichmäßige Verteilung zwischen männlichen (TESTIS) und weiblichen (OVAR) Geweben.
- Bei den Fällen mit HERMAPHRODITISMUS werden in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen gefunden als in den übrigen Gewebekomponenten

Bei den Fällen mit echtem Hermaphroditismus wird somit ein Unterschied zu denen mit gemischter Gonadendysgenese deutlich: Hier sind in den ovariellen Anteilen weniger Y-Chromosomen zu finden als in den übrigen Gewebekomponenten. Die Gonaden lassen sich hier also durch die unterschiedliche Chromosomenverteilung von denen mit gemischter Gonadendysgenese abgrenzen. Bei der gemischten Gonadendysgenese besteht dagegen eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen zwischen männlichen (Testis) und weiblichen (Ovar) Strukturen.

Ausnahmen bilden die Fälle g6 und g7. Hier findet sich die geringste Ausprägung für das Y-Chromosom ebenfalls in den ovarähnlichen Anteilen. Bei diesen Fällen kann somit ein Übergang in einen Hermaphroditismus angenommen werden. Es wurden jedoch bei den Fällen g6 und g7 keine ausdifferenzierten Hoden- und Ovaranteile gefunden, was wiederum gegen das Vorliegen eines Hermaphroditismus spricht. Von einigen Autoren [Berkovitz et al. 1991] wird die Mosaikverteilung innerhalb der Gonaden zur Erklärung der asymmetrischen Struktur auch bei der gemischten Gonadendysgenese herangezogen. Es zeigte sich jedoch bei den Fällen in dieser Arbeit ein einheitliches Verteilungsmuster für

X0- bzw. XY-Zellen sowohl im testikulären wie auch in den ovarähnlichen Anteilen mit einer ähnlichen quantitativen Ausprägung der Zelllinien. Die Angaben von Berkovitz et al. stehen somit im Gegensatz zu den oben beschriebenen Konstellationen bei der gemischten Gonadendysgenese. Zum einen können methodische Fehler bei der quantitativen Erfassung der einzelnen Zellpopulationen nicht ausgeschlossen werden, zum anderen sind auch zeitliche Veränderungen in der Zusammensetzung der Mosaik [Held et al. 1992] zu beachten. Weiterhin ist die Frage nach der Aktivität der jeweiligen Gene und nach der strukturellen Zusammensetzung der hier nachgewiesenen Y-Chromosomen offen. Auf der anderen Seite ist bei den hier untersuchten Fällen eine echte Ausdifferenzierung von ovariellen Strukturen bei der gemischten Gonadendysgenese nicht gefunden worden. Diese Situation stimmt mit der fehlenden Anwesenheit einer XX-Zelllinie und dem vorhandenen Y-Chromosom überein. Die Beurteilung einzelner Gewebekomponenten kann nur als Ergänzung zu anderen Untersuchungsmethoden, und in Zusammenhang zur klinischen und histopathologischen Beurteilung herangezogen werden.

12.6 Keimzellen in dysgenetischen Gonaden

Zellen der Spermatogenese

Ergebnisse an Zellen der Spermatogenese konnten in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. In herkömmlichen Übersichtsfärbungen (HE) lassen sich die verschiedenen Zellen der Spermatogenese lediglich durch die Lage ihrer Zellkerne in den Hodentubuli unterscheiden. Eine Beurteilung der Form anhand von Zytoplasmastrukturen ist, insbesondere in Präparaten der In Situ-Hybridisierung nicht möglich. Dazu kommt, dass in den meisten hier untersuchten Fällen keine oder nur eine stark eingeschränkte Spermatogenese zu finden ist. Die Hybridisierung und Auswertung der Signale an reifen Spermien ist auf Grund des starken Kondensationszustandes des Kernmaterials nicht möglich. Auch Estop et al. beschreiben, dass die FISH-Untersuchung der Geschlechtschromosomen nur an dekondensierten Kernen der Spermatozyten möglich ist.

Fall	Karyotyp	Gruppe	Gonade/äußeres Genitale	Keimzellen
g2	46,XX/46,XY	Hermaphroditismus	re.: atrophische Hodentubuli, Ovargewebe li.: atrophischer Hoden	keine Spermiogenese, Primär und Sekundärfollikel
g4	46,XY/47,XXY	Hermaphroditismus	re.: Ovar li.: Ovar, atrophisches Hodengewebe	keine Spermiogenese, Primärfollikel
g7	45,X0/46,XY	Gem. Gonadendysgenese	Undifferenzierte gemischte Gonade mit Hodentubulus - artigen Formationen, zellreiches spindelzelliges ovarähnliches Stroma.	Einzelne Spermatogonien.
g9	46X,t(X:Y)	Gonadendysgenese bei Translokation	Ovar, überwiegend unreifes Hodengewebe	keine Spermiogenese, Primär und Sekundärfollikel
g11	45,X0/46,XY	Gem. Gonadendysgenese	re.: atrophischer Hoden li.: Streak-Gonade	keine Spermiogenese, vereinzelt Primärfollikel
g12	46,XX/46,XY	Hermaphroditismus	Dysgenetische atrophische Gonade mit Hoden und Ovaranteilen	keine Spermiogenese, Primär und Sekundärfollikel

Tabelle 12-7: Keimzellen, Fälle mit Gonadendysgenese

Ergebnisse anderer Untersucher an Zellen der Spermatogenese

In der vorliegenden Literatur konnten nur wenige Angaben über die Zusammensetzung der Gonosomen in Keimzellen von Patienten mit 45,X0/46,XY oder 46,XX/46,XY Karyotyp gefunden werden.

Dagegen gibt es zahlreiche Untersuchungen an Spermatozyten bei Patienten mit Klinefelter-Syndrom. Die Daten zeigen, dass Keimzellen von Patienten mit einem 47,XXY Karyotyp in der Lage sind, die Meiose zu durchlaufen und reguläre haploide Spermien zu produzieren. Frühere Untersuchungen gingen davon aus, dass nur bei Patienten mit Mosaikkonstellationen (46,XY/47,XXY) eine vollständige Spermatogenese möglich war. Neben den Spermien mit einem regulären Chromosomensatz wurde eine erhöhte Inzidenz für hyperhaploide Spermien (24,XY) gefunden. In der Arbeit von Chevret et al. [1996] wurden dabei auch Keimzellen (Spermatozyten) mit einem 46,XX und einer 46,YY-Konstellation beschrieben (Patienten mit 46,XY/47XXY-Karyotyp). Hier wird von einem fehlenden Auseinanderweichen der Chromosomen während der Meiose II ausgegangen [Foresta et al. 1999; Estop et al. 1998; Guttenbach et al. 1997; Chevret et al. 1996].

Zellen der Oogenese

In dieser Arbeit wurden in drei Fällen intakte Keimzellen des Ovars gefunden, bei denen die Geschlechtschromosomen angefärbt werden konnten. Eine quantitative Auswertung ist bei der Untersuchung der Keimzellen nicht sinnvoll, da jeweils nur wenige Zellen Signale enthalten. Der Durchmesser einer Keimzelle eines Primärfollikels mit 20-50µm und der eines Sekundärfollikels mit 120-200µm führt bei einer Schnittdicke von 6µm häufig zum Verlust der Zellkerne.

Versuche mit deutlich dickeren Schnitten konnten auch unter Optimierung der Proteolyse keine befriedigenden Ergebnisse liefern. Bei einer Schnittdicke von mehr als 15µm ist eine ISH an Paraffinschnitten mit der hier durchgeführten Methode nicht möglich. In den Primär- und Sekundärfollikeln der Fälle *g2*, *g7* und *g9* konnten die Geschlechtschromosomen mit der In Situ-Hybridisierung angefärbt werden.

Fall	Karyotyp	Gruppe	Gonade/äußeres Genitale	Keimzellen
<i>g2</i>	46,XX/46,XY	Hermaphroditismus	re.: Ovar, Hoden li. Hoden	Oozyten: XX, X, Y
<i>g7</i>	45,X0/46,XY	Gem. Gonadendysgenese	Ovaranteile, atrophischer Hoden, Steakgonade	Oozyten: XX, X, YY, Y
<i>g9</i>	46X,t,(X:Y)	Gonadendysgenese bei Translokation	Ovar, überwiegend unreifes Hodengewebe, intersex. Genitale	Oozyten: X, Y

Tabelle 12-8: In Situ-Hybridisierung an Oozyten

Bei *g2* (Karyotyp 46,XX/46,XY) fanden sich in den Oozyten der Primärfollikel ein oder zwei Signale für das X-Chromosom sowie andere Keimzellen mit einem Signal für das Y-Chromosom. In *g7* waren in den Keimzellen ebenfalls ein oder zwei Signale für das X-Chromosom, sowie Zellen mit ein oder zwei Signalen für das Y-Chromosom zu finden. Bei dem Fall *g9* fanden sich Keimzellen mit einem Signal für das X- oder für das Y-Chromosom.

Ovarielle Keimzellreifung und Chromosomenkonstellation

Die Keimzellreifung und Proliferation findet im weiblichen Organismus bereits während der Fetalperiode statt, und endet mit dem Zeitpunkt der Geburt. Ein Teil der Oogonien differenziert zu Oozyten, die am Ende des zweiten Monats der Fetalperiode in die Prophase der Meiose I (Reduktionsteilung) eintreten. Die meiotische Teilung wird jedoch nicht abgeschlossen. Die diploiden Oozyten treten in ein Ruhestadium, das Dictyotän ein, in dem sie bis kurz vor ihrer Ovulation verbleiben. Es entsteht eine Oozyte mit einem haploiden Chromosomensatz. Dieser Schritt findet kurz vor der Ovulation im Tertiärfollikel statt [Motulsky 1996]. Dem diploiden Chromosomensatz dieser Keimzellen entsprechend, konnten in den Primär- und Sekundärfollikeln hier zwei Signale für das X-Chromosom dargestellt werden.

Vergleich mit anderen Autoren

In der Arbeit von Novak et al. [1995] ergab die Untersuchung an Paraffinschnitten des Ovars bei zwei intakten Keimzellen jeweils eine XX-Konstellation. Die Anwesenheit der beiden X-Chromosomen hier entspricht ebenfalls dem regulären Chromosomensatz dieser Zellen. Bei der hier beschriebenen Patientin bestand eine 45,X0/46XX-Konstellation. Im ovariellen Stroma zeigte die Interphasen-Zytogenetik 34% der Zellen mit zwei Signalen für das X-Chromosom. Die Untersucher gehen allerdings von einer vollständigen XX-Situation in den Keimzellen aus, da sie auch in der Mundschleimhaut nur XX-Zellen fanden. Diese beiden Gewebe seien endodermalen Ursprungs und haben laut Novak et al. deshalb den gleichen Karyotyp. Verglichen mit meinen Ergebnissen kann diese Ansicht hier nicht bestätigt werden, da die von mir untersuchten Gewebe alle die jeweilige Mosaiksituation vorwiesen.

12.7 Keimzelltumore bei Gonadendysgenese

In der vorliegenden Arbeit wurden bei zwei Patienten neben der Gonadendysgenese Anteile eines Keimzelltumors gefunden.

Fall	Karyotyp	Gruppe	Tumor
g4	46,XY/47,XXY	Hermaphroditismus verus	<ul style="list-style-type: none"> • gonadoblastoide Dysplasie • Seminom (Cis) • reifes Teratom • Gonadoblastom
g6	45,X0/46,XY	Gemischte Gonadendysgenese	<ul style="list-style-type: none"> • Gonadoblastom

Tabelle 12-9 Keimzelltumoren bei dysgenetischen Gonaden

Bei einem Patienten mit 46,XY/47,XXY-Konstellation und Hermaphroditismus wurde eine gonadoblastoide Dysplasie sowie Anteile eines reifen Teratoms und ein Seminom (CiS) festgestellt.

Insgesamt besteht bei Patienten mit Hermaphroditismus eine niedrigere Inzidenz für eine gonadale Neoplasie als bei den anderen Störungen der Geschlechtsdifferenzierung. Am häufigsten werden hier ein Gonadoblastom oder ein Dysgerminom genannt [Verp et al. 1987]. Eine Kombination eines echten Hermaphroditismus mit einem reifen Teratom wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

In den Seminom-Zellen (Fall *g4*) wurde ein Zugewinn an Y-Chromosomen festgestellt. Hier zeigen 22% der Zellen zwei Y-Chromosomen; die Zellen des Teratoms verhalten sich wie die übrigen Gewebeanteile. Gonadobalstoide Strukturen konnten in den mir zur Verfügung stehenden Präparaten nicht dargestellt werden.

Bei der gemischten Gonadendysgenese wird insbesondere auf die erhöhte Inzidenz für das Gonadoblastom und das Dysgerminom hingewiesen. Die Häufigkeit für diese Tumoren wird hier mit 15% - 20% der untersuchten Fälle angegeben [Verp et al. 1987].

Gonadoblastom – Vergleich mit anderen Autoren

In den Arbeiten von Iezzoni et al. [1997] und Sultana [1995] wurde in Gonadoblastomherden ein höherer Anteil an Zellen **mit einem** Y-Chromosom beobachtet als in den übrigen Zellen der untersuchten Gonaden.

<i>Quelle</i>	<i>Karyotyp</i>	<i>Gonadoblastom</i>		<i>Stromazellen</i>	
		<i>1 Signal</i>	<i>2 Signale</i>	<i>1 Signal</i>	<i>2 Signale</i>
Sultana et al.	45,X0/46,XY	79% (Y)	-	19% (Y)	-
Iezzoni et al.	45,X0/46,XY	82% (Y)	-	24% (Y)	-
eigene	45,X0/46,XY	29% (X)	59% (X)	68% - 81% (X)	0% - 3% (X)
Ergebnisse		75% (Y)	18% (Y)	60% - 89 % (Y)	0% - 1% (Y)

Tabelle 12-10

In dieser Arbeit wurde bei einem Patienten (*g6*) mit gemischter Gonadendysgenese (45,X0/46,XY) und Anteilen eines Gonadoblastoms die Anwesenheit des Y-Chromosoms in allen Gewebekomponenten und in den Tumorzellen dargestellt. In der Gonade waren zwischen 57% und 89% daneben in den Tumoranteilen 75% der Zellen mit einem Signal für das Y-Chromosom zu finden. Darüber hinaus zeigten 18% der Zellen zwei Signale für das Y-Chromosom. Der Nachweis des X-Chromosoms erbrachte in 29% der Tumorzellen und in 68% - 81% der übrigen Gewebekomponenten ein Signal. Des Weiteren wurde eine Hyperploidie in 59% mit zwei X-Chromosomen Tumorzellen nachgewiesen.

Auf die Beziehung zwischen Y-Chromosomem und der Bildung einer gonadoblastoiden Dysplasie wurde bereits eingegangen. Auch in den hier untersuchten Fällen konnte ein deutlich größerer Gehalt an y-chromosomalem Material in den Zellen des Goandoblastoms festgestellt werden. Die vorliegende Hyperploidie scheint letztlich Folge der Tumortransformation zu sein, während spezifische Gene für die Entwicklung des Gonadoblastoms verantwortlich sind [De Arce et al. 1992].

13 Keimzelltumoren - Diskussion

Eine Reihe von pädiatrischen Keimzelltumoren (KZT) verschiedener histologischer Subtypen wurde mittels der In Situ-Hybridisierung untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Geschlechtschromosomen an Paraffinmaterial in 36 Gewebeproben von 21 Patienten dargestellt. Analog zu der Untersuchung der Gonadendysgenesien wurden auch hier die Chromosomen in den unterschiedlichen Gewebekomponenten dargestellt und deren Verteilung quantitativ erfasst. Es wurden Keimzelltumoren des Hodens, des Ovars und sakrokokzygeale Tumoren untersucht. Histologisch wurden die untersuchten Tumoren wie folgt klassifiziert: Zehn reife, differenzierte Teratome (TD), sechs unreife (immature) Teratome (IT), vier gemischte Keimzelltumoren (gKZT) und ein embryonales Karzinom (EC).

Da Keimzellneoplasien eine Differenzierungskapazität, die von unreifen embryonalem Gewebe bis hin zu organähnlichen Strukturen (reife Teratome) reicht, aufweisen, stellt sich die Frage, ob den jeweiligen Differenzierungsstadien genetische Muster zuzuordnen sind. Dies ist speziell bei kombinierten (gemischten) KZT von Interesse, da hier innerhalb eines Tumors undifferenzierte, maligne als auch reife, ausdifferenzierte Areale anzutreffen sind.

13.1 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

13.1.1 Reife Teratome

In den reifen Teratomen konnten mit den von uns verwendeten DNA-Sonden keinerlei genetische Veränderungen nachgewiesen werden. Die untersuchten Tumoren zeigten jeweils eine, dem Geschlecht des Patienten entsprechende, Konstellation der X- und Y-Chromosomen.

In den Tumoren männlicher Patienten konnte in den unterschiedlichen Gewebekomponenten zwischen 65% und 78% der Zellen ein Signal für das X-Chromosom und 65% und 77% für das Y-Chromosom gefunden werden. Doppelmarkierungen (bis zu 7% für Y) wurden auf die Überlappung von Zellkernen zurückgeführt und nicht als Disomie gewertet. Dies betrifft vor allem die epithelialen Gewebe, im Kontrollgewebe vor allem Samenleiter und Rete Testis und bei den Tumorfällen, die eng aneinander liegenden Zellen in den Drüsenformationen der Teratome.

Bei den weiblichen Tumoren (Steißbein und Ovar) fanden sich in 60% bis 81% der Zellen zwei Signale für das X-Chromosom. Drei Signale (Überlappungen) wurden in maximal 3% der Kerne gefunden.

Die schwächste Signalausbeute fand sich in Tumoranteilen bestehend aus glatter Muskulatur in einem Steißbeinteratom. Dabei finden sich in 14% der Zellen keine und in 24% der Zellen nur ein Signal.

Im Kontrollgewebe anderer Untersucher wurden vergleichbare Ergebnisse gefunden. Hier ist als Beispiel die Signalausbeute von Jenderny et al. 1995 an 5µm dicken Schnitten dargestellt:

<i>Gewebe</i>	<i>0 Signale</i>	<i>1 Signal</i>	<i>2 Signale</i>	<i>3 Signale</i>
gonadales Stroma	4-13%	35-43%	49-58%	0-1%

Tabelle 13-1 Kontrollen [Jenderny et al. 1995]

Auch andere Untersucher konnten mit der In Situ-Hybridisierung keine Veränderungen an Teratomen pädiatrischer Patienten nachweisen [Stock et al. 1994 und 1995].

In früheren Untersuchungen wurde diskutiert, dass sich Teratome auch durch die Parthenogenese, also durch Fusion zweier haploider Keimzellen entwickeln können. Hier würde in weiblichen Individuen stets ein XX-Karyotyp und bei männlichen Individuen z.T. eine XX oder eine XY-Konstellation vorliegen. Solche Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gefunden. Tatsächlich lässt sich an diesem kleinen Kollektiv keine Aussage festmachen, jedoch konnte gezeigt werden, dass mit der Interphasezytogenetik eine solche Situation nachzuweisen wäre.

13.1.2 Unreife Teratome

Bei der Untersuchung der unreifen Teratome in dieser Arbeit fanden sich (**th1**, partiell unreifes Teratom des Hodens, Grad II) in den unreifen Neuroglia-Zellen 16% der Kerne mit zwei Signalen für das X- und 14% mit zwei Signalen für das Y-Chromosom. In einem weiteren Fall (**ts2**, Steißbeinteratom, mnl.; Grad I) enthielten 41% zwei Signale für X und 34% zwei Signale für das Y-Chromosom. In beiden Fällen zeigt sich ein Zugewinn der Geschlechtschromosomen. Die reifen Gewebeanteile zeigten eine unveränderte Chromosomenkonstellation. In den übrigen unreifen Teratomen (**to1**, **th4**, **ts4** und **ts5**) konnten keine Abweichungen festgestellt werden.

Stock et al. [1994/95] fanden bei den unreifen Teratomen einen regulären Chromosomensatz, wobei eine Subpopulation mit tetraploiden Karyotyp angegeben wird. Dies ist mit den hier beschriebenen Veränderungen vergleichbar. Leider stellen die Untersucher hier keine Beziehung zu den histologischen Komponenten her, so dass unklar ist, ob hier nur die unreifen Gewebekomponenten betroffen sind. Dennoch konnten, mit zunehmendem Grad der Unreife, zytogenetische Veränderungen an diesen Tumoren gezeigt werden. Quantitative Aussagen wurden in den Arbeiten von Stock und Mitarbeitern nicht gemacht.

13.1.3 Gemischte Keimzelltumoren

Bei Vorliegen eines Teratoms, kombiniert mit einem EC und/oder YST, konnte in allen malignen Komponenten eine numerische Aberration gefunden werden.

In **th5** (EC und TD) des Hodens konnte in den Tumorzellen, die dem EC-Anteil zugeordnet waren, in 37% zwei und in 25% drei Signale für das X-Chromosom gefunden werden. Die Anteile des unreifen Teratoms waren nicht verändert.

Th 6, (EC, YST und IT) des Hodens: Hier wurde in allen Tumorkomponenten ein Zugewinn der Geschlechtschromosomen beobachtet. Im Plattenepithel der IT-Komponente waren 74% der Zellen mit zwei Signalen für das X-Chromosom finden. Die EC-Komponente enthielt in 61% der Kerne zwei und in 12% drei Signale für das X-Chromosom. Im YST-Anteil betrug der Wert für X 59% (2 Sign.) und 11% (3 Sign.). Darüber hinaus zeigte sich ein Zugewinn des Y-Chromosoms im Dottersacktumor und in den Zellen des embryonalen Karzinoms. (YST: 27% 2 Sign. und 13 % 3 Sign.) sowie (EC: 15% 2 Sign. und 10 % 3 Sign.).

Der gemischte Keimzelltumor des Ovars **to4** (TD, IT, EC, YST) zeigte ebenfalls in dem Dottersack- wie auch in dem EC-Bestandteil einen Zugewinn für das X-Chromosom. Hier enthielten auch die Anteile des reifen und des unreifen Teratoms einen Zugewinn des X-Chromosoms. Auch in den Dottersackanteilen und in den Zellen des embryonalen Karzinoms des Steißbeintumors **ts3** (weiblich) war eine entsprechende Zunahme bezüglich des X-Chromosoms festzustellen. Eine Teratomkomponente war hier nicht vorhanden. Zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse werden hier die Zahlen von Jenderny und Mitarbeitern aufgelistet.

<i>X-Chromosom:</i>	<i>0 Sign.</i>	<i>1 Sign.</i>	<i>2 Sign.</i>	<i>3 Sign.</i>
gonadaler Dottersacktumor (weiblich)	-	-	63%	22%
extragonadale Dottersacktumoren (weiblich)	-	-	46 - 59%	10 - 26%

Tabelle 13-2 Jenderny et al. 1995 und 1996

Die Signaldichte ist mit den in dieser Arbeit gefundenen Werten vergleichbar. Auch hier wurde ein Zugewinn des X-Chromosoms beschrieben. Ein geringerer Prozentsatz an Kernen mit der maximalen Chromosomenzahl wird von Jenderny et al. auf einen schnittbedingten Artefakt im Sinne eines Verlustes der Chromosomen zurückgeführt. Dennoch ist eine Subpopulation mit Kernen, die nicht tetraploid, sondern oder nur diploid oder triploid sind, nicht auszuschließen. Leider sind in der Literatur kaum Angaben über die quantitative Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellpopulationen zu finden.

Im Unterschied zu Stock et al. konnte bei den gKZT in dieser Arbeit neben den Aberrationen in den malignen Anteilen auch in den histologisch reifen Tumorkomponenten ein Zugewinn der Geschlechtschromosomen festgestellt werden. Dabei handelt es sich um einen Hodentumor eines Patienten mit 17 Jahren (th6) und einen ovariellen Tumor einer 13jährigen Patientin (to4). Stock et al. beschreiben numerische Veränderungen in gemischten KZT jeweils nur in den malignen Tumoranteilen. Es wurden zwischen zwei und vier Signalen im YST und EC beschrieben.

Im Sinne der holistischen Keimzelltheorie geht man davon aus, dass sich die maligne Komponente aus den Zellen des Teratoms entwickelt. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass die genomischen Veränderungen dann mit der histologischen Transformation

einhergehen. Auch in dieser Arbeit wurden in den malignen Tumoranteilen Aneuploidien gefunden, die diese Hypothese unterstützen.

Bezüglich der hier gefundenen Ergebnisse an Teratom-Anteilen muss auf die Ergebnisse an reifen Teratomen Erwachsener hingewiesen werden. Dort sind ebenfalls Zugewinne der Geschlechtschromosomen bekannt. Die beiden hier untersuchten gemischten Keimzelltumoren mit einer Aneuploidie im Teratomanteil wurden in einem Alter von 14 bzw. 17 Jahren gefunden. Ob sich hier altersbedingt eine Veränderung in den reifen Teratomanteilen zeigt, oder ob die Ergebnisse von Stock et al. hinsichtlich der reifen Komponenten unvollständig sind, bleibt offen. Allerdings wird den reifen Teratomen Erwachsener durchaus ein malignes Potential zugerechnet.

13.1.4 Embryonales Karzinom

Bei dem malignen Keimzelltumor des Hodens (**th8**) lag ebenfalls ein embryonales Karzinom vor. Es wurde ein Zugewinn des X-Chromosoms (25% mit 2 Sign.) und (21% mit 3 Sign.) sowie ein Zugewinn des Y-Chromosoms (22% mit 2 Sign.) ermittelt. Dieser Befund ist mit den EC-Komponenten der gemischten Keimzelltumoren vergleichbar.

Stock et al. ermittelten mit Hilfe der ISH ein Zugewinn der Chromosomen 1, 8, 10 und 12. Bezüglich der Geschlechtschromosomen wurden bei der weiblichen Patientin zwei bzw. vier Signale für das X-Chromosom gefunden. Männliche Patienten und somit Befunde über Y-Chromosomen wurden hier nicht untersucht. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die hier besprochenen Befunde von anderen Untersuchern:

<i>Quelle</i>	<i>Tumor</i>	<i>Methode</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Befund</i>
Jenderny, J. 1995	YST, gonadal	ISH (Paraffin), Cytometrie	7 Pat.	+1, +12, +8, +17, +X: DXZ1, (wbl.): 2 Sign.: 63% 3 Sign.: 22%
Jenderny, J. 1996	YST, extragonadal	ISH (Paraffin), Cytometrie	12 Pat.	+1, +12, +8, +17, +X: DXZ1, (wbl.): 2 Sign.: 59 bzw. 46% 3 Sign.: 10 bzw. 26% 4 Sign.: -- / 14%
Stock, C. 1994	TD, IT, EC, YST, gKZT, SE	FISH, Flow Cytometrie	13 Pat.	in Stock 1995
Stock, C. 1995	TD, IT, EC, YST, DGE, gKZT, SE	FISH, Flow Cytometrie	24 Pat.	TD: keine Veränderungen IT: Tetraploidisierung DGE: +8, +10, +12, XXX SE: +8, +10, +12, XXX EC: +8, +10, +12, XXX/XXXX YST: +8, +10, +12, XX/XXX gKZT: in malignen Anteilen wie oben

Tabelle 13-3: Interphase-Ergebnisse an päd. Keimzelltumoren

Zusammenfassung zum Vergleich mit anderen Untersuchern

Bei den untersuchten Fällen stellt der Zugewinn des X-Chromosoms in den malignen Keimzelltumoren die häufigste Veränderung dar. Hier wurden vor allem Zellen mit zwei oder mit drei Signalen in den malignen Tumorkomponenten gefunden (7 Fälle). Der Zugewinn des Y-Chromosoms wurde in vier Fällen beobachtet. In einem embryonalen

Karzinom des Ovars konnten in 20% der Tumorzellen ebenfalls Signale für das Y-Chromosom gefunden werden.

Bei den Untersuchungen mit der In Situ-Hybridisierung anderer Autoren konnten ähnliche Ergebnisse beschrieben werden wie in dieser Arbeit. Dennoch stellen Stock [1994/95] und Jenderny [1995/96] ihre Ergebnisse nicht in Bezug zu den einzelnen Zellpopulationen bzw. zur Histologie der Tumoren. Gerade hier könnte ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Tumorkomponente und der genetischen Zusammensetzung der einzelnen Zelllinien liegen. Denn schließlich stellt sich die Frage, ob die beobachteten Veränderungen Folge oder Ursache der neoplastischen Veränderung sind. Im Gegensatz zu Stock et al. wird bei den in dieser Arbeit untersuchten Fällen mit gKZT auch in den reifen Tumoranteilen (2Fälle) ein Zugewinn des X-Chromosoms gefunden.

13.2 Weitere genetische Befunde an Keimzelltumoren

An pädiatrischen Keimzelltumoren konnten verschiedene numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, bis auf wenige Ausnahmen, keine Korrelation zwischen der Histologie, der Tumorlokalisation, des Alters und der jeweiligen Abweichung. Die meisten zytogenetischen Untersuchungen beschäftigen sich mit strukturellen eher als mit numerischen Aberrationen.

Viele Autoren haben die Neoplasien an isolierten Kernen aus Paraffinmaterial oder durch kultivierte Zellen untersucht (siehe Tabelle). Dabei lassen sich die jeweiligen Karyotypen zwar mit den Ergebnissen aus der ISH vergleichen doch ist bei diesen Methoden keine Korrelation zu den einzelnen Subpopulationen auf histologischer Ebene möglich.

<i>Quelle</i>	<i>Tumor</i>	<i>Material</i>	<i>Zahl der Fälle</i>	<i>Befund</i>
Atkin, 1992	TD	Zyto.	37 Pat.	XXY bis XXXY, diploid bis hyperploid
Blough et al. 1998a	EC (Hoden)	FISH, Paraffin	14 Pat. Erwachsene	+ 12p
Blough et al. 1998b	gKZT	FISH, Paraffin	4 Pat. Erwachsene	i(12p) und andere Strukturelle Aberrationen.
Emmerich et al. 1989	EC, (Hoden)	ISH, Paraffin, Zellsuspension	3 Pat	+ 12
Korn et al. 1996	EC, SE, YST, TD, IT	CGH	11 Pat.	+8, +12, +21, +X, i (12p) Keine Veränderung an TD
Ohama et al. 1985	IT, (Ovar)	Zellkultur, Zyto.	6 Pat. (10-38 J) Erwachsene	48,XX, +14, +21, 47,XX, +20, 47,XXX Drei weitere IT: 46,XX
Oosterhuis et al. 1997	TD, (Ovar) YST	Übersichtsartikel	Erwachsene	+7, +8, +12, +15, +21 +X (Dermiodzyste) +1, +3, +8, +1, +12, +14, +X (YST)
Suijkerbuijk et al. 1992	EC	FISH, Zellkultur	12 Pat. Erwachsene	i(12p)
Surti et al. 1990	TD, IT, (Ovar)	Zellkultur, Zyto.	104 Pat. (9-75 Jahre)	TD: 47,XXX TD: +15, +18, +X IT: 49,XX, +8, +12, +22 (3 Jahre) IT: 79, XXXX (16 Jahre)
Yu et al. 1995	TD, IT, (ZNS)	FISH	4 Pat. (2-25 J.)	TD (mnl): XX / Y IT (mnl.): 2-4X / 1-2 Y
Schneider et al. 2001	TD, IT, EC, YST, DYS, gKZT	CGH	51 Pat.	TD, IT: keine Veränderung EC, YST, DYS, gKZT: +1q, +20q, -1p, -4q, -6q bis auf wenige Ausnahmen kein i(12p)

Tabelle 13-4: weitere zytogenetische Befunde an Keimzelltumoren

Reife Teratome

Reife Teratome pädiatrischer Patienten weisen in aller Regel einen regulären Karyotyp auf. Auch Korn et al. fanden in reifen Teratomen bei Kindern genetisch unveränderte diploide Tumorzellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den neuen Untersuchungen dieser Tumoren durch CGH und mit den Interphase-Ergebnissen überein [Schneider et al. 2001; Riopel et al. 1998; Jenderny et al. 1995; Stock et al. 1994].

Bei Tumoren Erwachsener werden nur selten Veränderungen beschrieben: Ohama und Surti fanden bei Teratomen Erwachsener einige trisome bzw. triploide Karyotypen. Surti konnte bei der Untersuchung von 104 Patienten in 7 Fällen eine Veränderung des Karyotyps feststellen. Hier zeigte sich ein Zugewinn einiger Autosomen (siehe Tabelle). Oosterhuis et al. [1997] beschreiben bei reifen Teratomen vorwiegend einen diploiden Karyotyp. Einige Dermoidzysten des Ovars zeigten jedoch eine tetraploide Konstellation. Hier ist ein Zugewinn der Chromosomen 7, 8, 12, 15, 21 und X beschrieben [Oosterhuis et al. 1997]. Atkin und Baker [1992] fanden bei Teratomen Erwachsener ebenfalls teilweise diploide und teilweise hyperploide („nahezu tetraploide“) Chromosomensätze [Atkin u. Baker 1991/92]. Auch hier wird ein Zugewinn des X-Chromosoms in Teratomen beobachtet. Bezüglich des Y-Chromosoms liegen nur wenige Ergebnisse vor. Im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren im Erwachsenenalter konnten Atkin und Baker bei testikulären Teratomen keinen Verlust des Y-Chromosoms feststellen.

Genomische Veränderungen an reifen Teratomen treten im Kindesalter nicht auf und sind im Adoleszenten- und Erwachsenenalter nur selten zu finden.

Unreife Teratome

Im Gegensatz zu den reifen Teratomen lassen sich bei den undifferenzierten Teratomen pädiatrischer Patienten häufiger numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen feststellen [Oosterhuis et al. 1997; Yu et al. 1995; Surti et al. 1990; Ohama et al. 1985]. Ohama beschreiben ein Zugewinn der Chromosomen 14, 20, 21 und X. Allerdings werden hier auch drei weitere Fälle unreifer Teratome mit regulären Karyotypen dargestellt. Daneben werden von Oosterhuis auch strukturelle Aberrationen beschrieben. Von Surti wird ein Fall (wbl.; 3 Jahre, IT des Ovars) mit einer 49,XX, +8, +12, +22 Konstellation geschildert. Auch Yu et al. weisen den Zugewinn der Geschlechtschromosomen an pädiatrischen KZT nach. Schneider und Mitarbeiter fanden an 10 Fällen mit unreifen Teratomen nur in einem Fall eine genomische Veränderung [Schneider et al. 2001].

Insgesamt zeigen diese Arbeiten einen Zugewinn der Geschlechtschromosomen in unreifen Teratomen. Diese Ergebnisse sind anhand kultivierter oder isolierter Zellen mit konventionellen zytogenetischen Methoden oder der FISH-Technik gefunden worden. Ein direkter Vergleich mit den Interphaseergebnissen ist daher nicht möglich. Stock et al. fanden eine Tetraploidisierung unreifer Teratome, konnten jedoch keine Zugewinne oder Verluste für einzelne Chromosomen mit der ISH nachweisen.

Dottersacktumoren (YST) und gemischte Keimzelltumoren (gKZT)

Die numerischen Aberrationen der YST betreffen die Chromosomen 1,3,8,10,12 und 14 sowie das X-Chromosom [Oosterhuis et al. 1997; Stock et. al. 1994 u. 1995; Jenderny et al. 1995 u. 1996]. Auch hier wird ein Zugewinn der jeweiligen Chromosomen beschrieben. Daneben ist hier ein Verlust des Y-Chromosoms zu nennen. Die Chromosomenkonstitution dieser Tumoren kann diploid, tetraploid oder aneuploid sein. Des weiteren werden an Dottersacktumoren die Deletion des Chromosoms 1 (1 del p36.3) [Jenderny et al. 1995 und 1996] und selten das Isochromosom i12p beschrieben. Weitere Aberrationen werden als -1p, +1q, -6q, und +20 angegeben [Schneider et al. 2001].

Embryonales Karzinom (EC)

Die wesentlichen Veränderungen dieser Neoplasie wurden bereits in Zusammenhang mit den Interphaseergebnissen besprochen. Auch hier ist die Anwesenheit der Deletion del1p36.3 bekannt [Stock et al. 1994]. Bei den Untersuchungen mit der CGH wurden identische Angaben wie bei den Dottersacktumoren gemacht.

Strukturelle Aberrationen

Nur in wenigen Fällen wurde an päd. KZT ein Isochromosom i(12p) gefunden [Schneider et al. 2001, Göbel et al. 2000]. Diese Aberration kann an Tuomren Erwachsener in bis zu 80% in nahezu allen Lokalisationen gefunden werden, stellt jedoch bei Kindern eine Ausnahme dar [Blough et al. 1998a und b; Korn et al. 1996; Looijenga et al. 1993; Suijkerbuijk et al. 1992].

Die häufigste strukturelle Aberration ist jedoch eine Deletion des Chromosoms 1: (1del p36.3) [Stock et al. 1995; Jenderny et al. 1995 und 1996]. Daneben wurden Verluste am Chromosom 1, 4, 6, und 13 sowie Zugewinne an 1q und 20 dargestellt [Schneider et al. 2001; Riopel et. al. 1998]

Die Deletion des Chromosoms 1(p36.3,del) wurde überwiegend in den fortgeschrittenen Tumorstadien gefunden und scheint im Zusammenhang mit der Progression dieser Tumoren zu stehen. Stock und Jenderny konnten diese Veränderung in verschiedenen Tumoren und in den malignen Tumorkomponenten gemischter KZT nachweisen. Diese Arbeiten zeigen die 1p36.3 Deletion im Dysgerminom, Dottersacktumor, embryonalen Karzinom, Seminom und Chorionkarzinom. In reifen und unreifen Teratomen wurde diese Aberration bisher nicht nachgewiesen. Der häufige Nachweis von 1p36.3 - Deletionen weist darauf hin, das diese Veränderung eine Rolle bei der Pathogenese von pädiatrischen Keimzelltumoren hat. Auch Schneider et al. vermuten potentielle Onkogene sowie Tumorsuppressorgene an 1p36 oder 6q.

Zusammenfassung – genetische Befunde an Keimzelltumoren

Bei der Untersuchung von Keimzelltumoren beschreiben die meisten Autoren strukturelle Veränderungen der Chromosomen. Interphase-Ergebnisse über numerische Aberrationen der verschiedenen Tumoren sind selten. Bisher geben nur Stock und Mitarbeiter [1994 und 1995], in ihren Arbeiten mit der In Situ-Hybridisierung Befunde über die

Chromosomenkonstellation in gemischten Keimzelltumoren an. Dennoch wurde auch hier keine Differenzierung zwischen den einzelnen Subpopulationen der jeweiligen Tumortypen unternommen. Dabei wird die Veränderung an unreifen Teratomen zwar beschrieben, es existieren jedoch keine Angaben, ob sich diese auch in den reifen Gewebeanteilen oder nur in einer bestimmten Zellpopulation (z.B. nur in den unreifen neurotubulären Formationen) zeigen.

Jenderny [1995/96] und Stock [1994/95] kombinieren ihre ISH-Untersuchungen mit (DNA)-zytometrischen Analysen. Dabei vergleichen sie den DNA-Gehalt mit dem jeweiligen ISH-Ergebnis. Neben dem Zugewinn einzelner Chromosomen wird dabei deutlich, dass es sich bei den meisten Veränderungen um triploide oder tetraploide Chromosomensätze der Tumorzellen handelt. In Bezug auf strukturelle Veränderungen werden die Aberrationen der Chromosomen 1 (Deletion 1p36), 6 und 12 (Isochromosom 12p) am häufigsten genannt.

Die Zahlen der bislang genetisch untersuchten Keimzelltumoren bei Kindern sind im Vergleich zu den KZT Erwachsener gering. Neben konventionellen zytogenetischen Verfahren kommen die FISH-Technik, die konventionelle ISH und die komperative genomische Hybridisierung (CGH) zum Einsatz.

Mit der CGH kann keine Korrelation zum histologischen Aufbau und somit zu unterschiedlich differenzierten Zellpopulationen hergestellt werden. Interessanterweise wurde in einer der größten Untersuchungen [Bussey et al. 1999] an pädiatrischen Keimzelltumoren an reinen und gemischten YST-Komponenten in den meisten Fällen (13 von 20) keine karyotypische Aberration gefunden. Im Gegensatz dazu zeigten Jenderny et al. in ihrer Studie zu Dottersacktumoren verschiedene numerische Abweichungen des Karyotyps. Offensichtlich scheinen bei Bussey Kulturartefakte oder die geringe Sensitivität konventioneller zytogenetischer Methoden dafür verantwortlich zu sein.

Die in der Literatur beschriebenen genomischen Veränderungen sowie die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. In pädiatrischen Keimzelltumoren werden keine konstanten Veränderungen dargestellt, die als diagnostische Marker verwendet werden können. Die häufigsten Veränderungen können auch in anderen Neoplasien (z.B. im Neuroblastom oder im Nephroblastom) gefunden werden [Schneider et al. 2001].
2. Teratome zeigen bei Neugeborenen und Kindern ein reguläres genomisches Profil.
3. An gonadalen und extragonadalen Tumoren werden die gleichen genomischen Veränderungen beschrieben. Dieser Befund deutet auf einen einheitlichen Ursprung für gonadale und extragonadale KZT hin.
4. Es besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen pädiatrischen KZT und den KZT Erwachsener. Das Isochromosom 12p wurde bei Kindern bisher nur sehr selten gefunden.

Keimzelltumoren und Gonadendysgenesien

Darüber hinaus ist bekannt, dass bei Patienten mit Klinefelter-Syndrom ein erhöhtes Risiko zur Bildung extragonadaler (mediastinaler) Keimzelltumoren besteht [Czauderna et. al. 1998]. Hier wird vermutet, dass die genetische Konstitution (47,XXY-Konstellation) zur Tumorentwicklung prädisponiert. Welche Bedeutung die Gene auf dem X-Chromosom zur Tumorgenese (bei Klinefelter-Patienten) haben, ist bisher unklar. Der Aspekt, dass Patienten mit Gonadendysgenese ebenfalls ein erhöhtes Risiko zur Bildung einer Keimzelleoplasie haben, wurde bereits diskutiert. Die Rolle der Y-chromosomalen DNA bei der Tumorgenese wurde beschrieben. Wie bei den Klinefelter-Fällen finden sich auch bei der Gonadendysgenese nur bei einem Teil der Patienten Keimzelleoplasien. Der endgültige Zusammenhang zwischen Tumorgenese und Aberration der Geschlechtschromosomen ist hier nicht vollständig geklärt. Die Vielzahl der autosomalen und struktureller Veränderungen konnten auch mit aktuellen, molekulargenetischen Techniken (CGH) gefunden werden. Diese Aberrationen scheinen eher für die Keimzelltumorgenese verantwortlich zu sein, als die der Geschlechtschromosomen und stehen derzeit im Mittelpunkt der Diskussion.

IV. Zusammenfassung

Das Thema dieser Arbeit war die Etablierung der Interphasen-Zytogenetik an Paraffinschnitten von männlichen und weiblichen Gonaden zur Darstellung der Geschlechtschromosomen.

Wegen der Gefahr der malignen Entartung wird bei Patienten mit dysgenetischen Gonaden eine Gonadektomie durchgeführt. Die Diagnose des Krankheitsbildes kann erst anhand der Kombination aus zytogenetischem Befund, klinischer Ausprägung und des histologischen Aufbaus der Gonaden gestellt werden. Es wurden Patienten mit Pseudohermaphroditismus, mit echtem Hermaphroditismus und Fälle mit UTS sowie mit gem. Gonadendysgenese untersucht, wobei Übergänge zwischen den verschiedenen Syndromen bestehen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mittels der In Situ-Hybridisierung, numerische Aberrationen am Gonadenmaterial sichtbar zu machen. Als Untersuchungsmaterial standen in Paraffin eingebettete Routinepräparate dysgenetischer Gonaden zur Verfügung. Dabei sollte untersucht werden, ob anhand des Verteilungsmusters der Chromosomen Unterschiede zwischen den verschiedenen Syndromen erkennbar sind. Da gerade die Entwicklung und die Funktion der Gonaden einen wesentlichen Einfluss auf den Phänotyp haben, scheint der gonadale Karyotyp hier von besonderer Bedeutung zu sein. Die vorliegende Arbeit soll somit klären, ob die ISH ein zusätzliches Instrument zur Untersuchung dieser Syndrome darstellt.

Weiterhin wurde das Chromosomenmaterial in männlichen und weiblichen Keimdrüsen gesunder Individuen sowie in gonadalen und extragonadalen Keimzelltumoren dargestellt. Da die Keimzelltumoren eine breite Differenzierungskapazität besitzen stellt sich die Frage, ob den unterschiedlichen Komponenten verschiedene genetische Muster zuzuordnen sind.

METHODE

Das Probandenkollektiv umfasste 12 Patienten mit Gonadendysgenese und 21 Patienten mit einem Keimzelltumor. Die Kontrollgruppe umfasste 5 männliche und 4 weibliche Probanden sowie männliches und weibliches Nierengewebe von Probanden, bei denen kein Verdacht auf eine chromosomale Aberration bestand. Hybridisiert wurde mit den spezifischen DNA-Sonden gegen das X- und das Y-Chromosom. Bei der Durchführung erfolgte zunächst die proteolytische Vorbehandlung der Schnitte mit Zitronensäure-Puffer, Thiozyanat und Pepsin, um die Penetration der Sonde zu ermöglichen. In der Regel war es erforderlich, die Andauzeiten für jeden einzelnen Fall individuell zu bestimmen. Anschließend wurden die Schnitte mit der zu untersuchenden Sonde über Nacht inkubiert. Die Detektion der Sonden erforderte ein Antikörpersystem und DAB-Färbung.

ERGEBNISSE – GONADENDYSGENESIEN

Es zeigte sich, dass mit der Methode die Geschlechtsbestimmung des untersuchten Individuums möglich war. In der Kontrollgruppe entsprachen die dargestellten Chromosomen jeweils dem Geschlecht des untersuchten Probanden. Im Gegensatz zu den sonst zur Anwendung kommenden Verfahren, war es möglich, die Veränderungen in definierten Gewebestrukturen nachzuweisen. Unterschiede im Genotyp sowie Mosaiksituationen einzelner Zellpopulationen konnten direkt am Gewebeschnitt aufgedeckt werden.

In den Fällen mit Gonadendysgenese wurden die uns als zytogenetische Analyse bekannten Karyotypen mit der hier angewendeten Methode bestätigt. Obwohl histologisch eindeutig weiblich differenzierte Anteile in den Gonaden vorlagen, waren auch in diesen Strukturen Y-Chromosomen nachzuweisen. Besonders hervorzuheben ist die Anwesenheit des Y-Chromosoms in Keimzellen weiblicher Probanden.

Es konnte somit festgestellt werden, dass (1) die humangenetischen Befunde mit unseren Ergebnissen übereinstimmen, (2) die jeweiligen Chromosomen sowohl in den männlichen, wie auch in den weiblichen Gewebekomponenten vorkommen und (3) das vorhandene Mosaik in allen untersuchten Geweben nachzuweisen war.

Bezüglich der Verteilung wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Syndromen festgestellt: Bei der gemischten Gonadendysgenese bzw. beim Ullrich-Turner-Syndrom zeigte sich eine einheitliche Verteilung während in der Gruppe mit Hermaphroditismus dagegen weniger Y-Chromosomen im Ovar als in den testikulären Strukturen zu finden waren.

ERGEBNISSE - TUMORE

Bei der Untersuchung der Tumore zeigte sich dass der dargestellte Chromosomensatz in allen untersuchten Fällen dem Geschlecht des Trägers entspricht, wobei an reifen Teratomen keine Veränderungen festzustellen waren. Dagegen wiesen die malignen Tumoranteile deutliche Aneuploidien auf. Bei den gemischten Tumoren waren die reifen Anteile ebenso wie die unreifen Gewebeanteile betroffen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Untersuchung der Gonadendysgenesen zeigt, dass für die genaue Definition eines Mosaikzustandes die Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden notwendig ist.

Bei der Untersuchung waren Unterschiede zwischen den verschiedenen Syndromen zu erkennen. Dennoch ist eine allgemein gültige Aussage anhand des kleinen Kollektivs nicht möglich. Ob hier stets ein Unterschied in der Verteilung der Chromosomen vorliegt, kann nur bei der Untersuchung eines weitaus größeren Fallzahl beurteilt werden. Aus dem Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Hermaphroditismus und der gemischten Gonadendysgenese folgt jedoch, dass die Diagnose in Fällen mit „Übergängen“ zwischen diesen Krankheitsbildern durch die In Situ-Hybridisierung erweitert werden könnte. Dennoch lassen die mit der In Situ-Hybridisierung gewonnen Ergebnisse Rückschlüsse zu:

- (1) Der Anteil an Sertolizellen, die (bei einer Mosaiksituation) ein Y-Chromosom tragen, kann bei histologisch sonst unauffällig Hoden etwas über dessen Funktion aussagen.
- (2) Durch eine Probebiopsie bei unklarem Chromosomenbefund kann die Y-Zelllinie direkt in der Gonade nachgewiesen, und somit die Indikation zur Gonadektomie gestellt werden.
- (3) Eine Beurteilung der Phänotyp-Karyotyp-Korrelation bei Patienten mit Gonosomenmosiken ist aufgrund der großen klinischen Variabilität schwierig. Nach vorausgegangener Gonadektomie kann die In Situ-Hybridisierung Auskunft über die Verteilung der Chromosomen in der Gonade geben. So kann deren Funktion und deren Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung näher beurteilt werden.

V. Anhang

a) Abkürzungen

AK	Antikörper
AMH	Anti-Müller-Hormon
Aqua dest. / bidest	Aqua destillata / bidestillata
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CGH	komparative genomische Hybridisierung
Cis	Carzinoma in situ
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
EC	embryonales Karzinom
FISH	Fluoreszenz In Situ-Hybridisierung
g	Gonadendysgenese
gKZT	gemischter Keimzelltumor
h	Kontrollgruppe testikuläres Gewebe
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
idic (Yp)	isodizentrisches Y-Chromosom, kurzer Arm
idic (Yq)	isodizentrisches Y-Chromosom, langer Arm
ISH	In Situ-Hybridisierung
IT	unreifes Teratom
k. A.	keine Angaben
kbp	Kilobasenpaar
KZT	Keimzelltumor
MGD	(mixed) gemischte Gonadendysgenese
min.	Minuten
MW	Molekulargewicht
NaSCN	Natriumthiozyanat
o	Kontrollgruppe ovarielles Gewebe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
s.o.	siehe oben
SB	Southern Blotting
sec.	Sekunden
SSC	Sodiumchloridesodiumcitrat
TD	reifes Teratom
th	Tumoren des Hodens
to	Tumoren des Ovars
ts	Steißbeintumoren
UTS	Ullrich-Turner-Syndrom
YST	Dottersacktumor
Zyto.	Zytogenetik

b) Chemikalien und Lösungen

- BSA, Bovines Albumin, Sigma
- Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_2 \times H_2O$), p.a., Merk
- DAB, Metal-Enhanced Substrat-Kit, Pierce
- Dextransulfat, p.a., Aldrich
- Formamid, p.a., Merk
- Goat-Anti-Maus IgG, biotinyliert, Dianova
- H_2O_2 , p.a. Merk
- HCL - 1M, p.a., Merk
- Maus-Anti-Digoxigenin Antikörper, Boehringer
- Natriumthiozyanat ($NaSCN$), p.a., Merk
- Normalserum Goat, Dako
- Pepsin, Sigma
- Peroxidase - konjugiertes Streptavidin, Dianova
- Lachssperma - DNA, 1ml, Sigma
- Sonde DXZ1, digoxigeniert; Sonde gegen d. X-Chromosom, Oncor Apligene
- Sonde DYZ3, digoxigeniert; Sonde gegen d. Y-Chromosom, Oncor Apligene
- Sonde DYZ2 (pHY 2.1), digoxigeniert, Sonde gegen d.Y-Chromosom, Boehringer
- Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, Merk
- Natriumchlorid ($NaCl$), p.a., Merk
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), p.a., Merk
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), p.a., Merk
- Objektträger: SuperFrost®Plus Fa. Menzel-Gläser

Die verwendeten Puffer-Lösungen wurden jeweils als Stammlösungen hergestellt und autoklaviert. Zum Gebrauch wurden die Lösungen verdünnt und der pH-Wert eingestellt.

• **Citronensäure - Lösung 10x** **pH 6,0**

Citronensäure - Monohydrat; 100mM = 21,014g / 1l (Stammlösung)

Gebrauchslösung (10mM/l) für Mikrowelle 1:10 verdünnt

• **PBS - Puffer 10x** **pH 7,4**

(für 1 Liter Stammlösung:)

Na₂HPO₄ 14,76 g / l

KH₂PO₄ 4,3 g / l

NaCl 87,66 g / l

Gebrauchslösung 1x PBS

• **SSC - Puffer 20x** **pH 7,0**

für 1 Liter Stammlösung:

NaCl 175,32g / l

Tri-Na-Citrat-dihydrat 88,23g / l

Gebrauchslösung: 2x SSC

• **Hybridisierungsgemisch (200 µl)**

Deionisiertes Formamid 130 µl

Dextransulfat (50% ige Lösung) 40 µl

SSC-Puffer (Stammlösung) 20 µl

Heringssperma-DNA 10 µl

Das Hybridisierungsgemisch wurde autoklaviert, aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt.

c) Quantitative Ergebnisse

Fall: g1		Pseudohermaphroditismus maskulinus				Karyotyp: 46, XO			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 8'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 12'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	8%	88%	4%	0%	13%	83%	4%	0%	
Nebenhoden	9%	83%	8%	0%	33%	60%	8%	0%	
Interstitialium	25%	74%	1%	0%	23%	76%	1%	0%	
Endothel	27%	73%	0%	0%	24%	76%	0%	0%	
Glatte Muskulatur	35%	65%	0%	0%	33%	67%	0%	0%	

Fall: g2		Hermaphroditismus verus				Karyotyp: 46, XX / XY			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 4' + 8'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli, rechts	17%	26%	56%	1%	65%	34%	1%	0%	
Hodentubuli, links	13%	24%	62%	1%	78%	22%	1%	0%	
Tube	18%	61%	18%	2%	38%	60%	2%	0%	
Nebenhoden	20%	25%	54%	1%	57%	41%	2%	0%	
Endothel	23%	29%	48%	0%	54%	46%	0%	0%	
Ovarähnliches Stroma	19%	38%	43%	0%	78%	21%	1%	0%	

Fall: g3		Turner-Syndrom				Karyotyp: 45, XO / 46, XY +18			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 10'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Keimdrüsenstroma	21%	76%	3%	0%	95%	5%	0%	0%	
Interstitialium	18%	74%	8%	0%	92%	8%	0%	0%	
Endothel	20%	72%	8%	0%	90%	10%	0%	0%	
Glatte Muskulatur	27%	70%	4%	0%	90%	10%	0%	0%	

Fall: g4 rechte Gonade		Hermaphroditismus verus				Karyotyp: 46, XY / 47, XXY			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
ovarielles Stroma	18%	24%	57%	1%	35%	63%	2%	0%	
Hodentubuli, (Ovotestis)	13%	29%	54%	3%	19%	79%	2%	0%	
Leydig-Zellen	22%	26%	51%	0%	32%	65%	2%	0%	
Endothel	18%	23%	59%	0%	27%	70%	3%	0%	
Seminom-Zellen	13%	24%	58%	5%	14%	60%	22%	5%	

Fall: g4 linke Gonade		Hermaphroditismus verus				Karyotyp: 46, XY / 47, XXY			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
ovarielles Stroma	13%	24%	63%	0%	30%	68%	3%	0%	
Hodentubuli, (Sertolizellen)	4%	23%	72%	2%	29%	69%	2%	0%	
Leydig-Zellen	17%	26%	56%	1%	22%	76%	2%	0%	
Nebenhoden (Epithel)	7%	20%	71%	2%	39%	59%	2%	0%	
Endothel	12%	18%	70%	0%	38%	61%	2%	0%	

Fall: g5		Gemischte Gonadendysgenese				Karyotyp: 45, XO / 46, XY			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 9'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	15%	82%	3%	0%	72%	27%	1%	0%	
Nebenhoden	10%	85%	5%	0%	85%	12%	4%	0%	
Leydigzellen	31%	63%	6%	0%	88%	11%	1%	0%	
Tube (Epithel)	9%	86%	5%	0%	96%	4%	0%	0%	
Samenleiter (Epithel)	8%	86%	6%	0%	88%	10%	2%	0%	
Schwellkörper	18%	80%	2%	0%	14%	85%	1%	0%	
Endothel	27%	70%	3%	0%	64%	36%	0%	0%	

Fall: g6		Gemischte Gonadendysgenese				Karyotyp: 45, XO / 46, XY			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Ovarähnliches Stroma	22%	74%	5%	0%	48%	47%	4%	0%	
Nebenhoden / Epithel	16%	81%	2%	0%	31%	68%	1%	0%	
Tube / Epithel	17%	80%	3%	0%	11%	89%	1%	0%	
Endothel	23%	77%	0%	0%	26%	74%	0%	0%	
glatte Muskulatur	32%	68%	0%	0%	28%	72%	0%	0%	
Gonadoblastom	12%	29%	59%	0%	11%	70%	18%	0%	

Fall: g7		Gemischte Goandendysgenese				Karyotyp: 45, X0 / 46, XY			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 2' + 4'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 4', 6', 8'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	18%	78%	4%	0%	47%	53%	0%	0%	
Nebenhoden (Epithel)	22%	75%	3%	0%	50%	50%	0%	0%	
ovarähnliches Stroma	24%	74%	3%	0%	69%	31%	0%	0%	
Tube / Samenleiter (Epithel)	23%	75%	2%	0%	49%	51%	0%	0%	
Endothel	28%	69%	3%	0%	25%	75%	0%	0%	
Keimzellen	20%	67%	13%	0%	90%	10%	0%	0%	
Bindegewebe	21%	78%	1%	0%	*	*	*	*	

Fall: g8		Pseudohermaphroditismus maskulinus				Karyotyp: 46, XY			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 12'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 12'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	12%	87%	2%	0%	12%	86%	2%	0%	
Endothel	15%	85%	0%	0%	23%	75%	2%	0%	
Leydigzellen	27%	73%	0%	0%	29%	69%	2%	0%	

Fall: g9		*gilt nur für die Verwendung der Sonde DYZ 2 (Böhringer)				Gonadendysgenese mit XY - Translokation				Karyotyp: 46, X, t(X;Y)			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 8' + 12'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 8' + 12'						
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.					
Hodengewebe	8%	13%	79%	0%	14%	85%	1%	0%					
Endothel	11%	13%	76%	0%	11%	86%	3%	0%					
Gefäßmuskulatur	7%	22%	71%	0%	25%	74%	2%	0%					
Bindegewebe	15%	15%	70%	0%	17%	81%	1%	0%					
Tube (Epithel)	9%	14%	77%	0%	28%	72%	1%	0%					
Follikel Epithel / Zyst. Follikel	8%	14%	78%	0%	17%	82%	1%	0%					
ovarielles Stroma	18%	10%	72%	0%	17%	80%	3%	0%					

Fall: g10		Gemischte Gonadendysgenese				Karyotyp: 45, X0 / 46, XY			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 6'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 6' + 8'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	16%	82%	3%	0%					
Leydigzellen	22%	74%	4%	0%	Kein sicherer Nachweis des Y-Chromosoms möglich				
ovarähnlicher Bereich	13%	80%	7%	0%					
Deckzellbelag	27%	71%	2%	0%					
Endothel	14%	84%	2%	0%					

Fall: g11		Gemischte Gonadendysgenese				Karyotyp: 45, X0 / 46, XY			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 6'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 4'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	32%	64%	4%	0%	68%	32%	0%	0%	
Leydig-Zellen	31%	58%	12%	0%	75%	25%	0%	0%	
Nebenhoden	32%	68%	0%	0%	75%	25%	0%	0%	
Endothel	22%	78%	0%	0%	74%	26%	0%	0%	

Fall: g12		Hermaphroditismus verus				Karyotyp: 46, XX / XY			
Diagnose:	X-Chromosom		Pepsinzeit 4'		Y-Chromosom		Pepsinzeit 4'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	13%	25%	57%	4%	23%	75%	2%	0%	
Leydigzellen	15%	24%	58%	3%	15%	84%	2%	0%	
Nebenhoden	25%	28%	47%	0%	14%	84%	2%	0%	
Endothel	21%	26%	51%	2%	12%	87%	1%	0%	
glatte Muskulatur	28%	25%	47%	0%	19%	79%	2%	0%	
Samenleiter (Epithel)	16%	25%	56%	3%	17%	78%	4%	0%	
Tube (Epithel)	14%	31%	55%	0%	18%	69%	3%	0%	

Tumoren des Ovars

Fall:	to1			
Diagnose:	Unreifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 8'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Epitheliale Strukturen	9%	5%	84%	2%
unreife Gliazellen	18%	7%	74%	1%
Knorpel	16%	12%	71%	1%
Drüsenzellen	11%	17%	69%	2%
Endothel	21%	3%	76%	0%
glatte Muskulatur	16%	15%	69%	0%

Fall:	to7			
Diagnose:	Reifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
ovarielles Stroma	9%	23%	68%	0%
Talgdrüsen	10%	20%	70%	0%
Verhorntes Plattenepithel	13%	20%	66%	0%
gliöses Gewebe	11%	14%	75%	0%
Endothel	11%	17%	72%	0%
glatte Muskulatur	13%	18%	70%	0%

Fall:	to3			
Diagnose:	Reifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 5' + 10'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Ovariell. Stroma	11%	5%	82%	2%
regul. Follikel. Epithel	20%	7%	72%	1%
Hautanhangsgebilde	17%	12%	71%	1%
Knorpel	13%	16%	69%	2%
Epitheliale Strukturen	16%	3%	80%	0%
Endothel	13%	15%	72%	0%

Fall:	to8			
Diagnose:	Reifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 4' + 6'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
unverhorntes Plattenepithel	6%	17%	78%	0%
respiratorisches Epithel	12%	16%	72%	0%
Bindegewebe	5%	18%	77%	0%
glöses Gewebe	12%	16%	72%	0%
Knorpel	12%	16%	72%	0%

Fall:	to4			
Diagnose:	Gemischter Keimzelltumor			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 4' + 6'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Tumorzellen	17%	20%	29%	34%
Plattenepithel	21%	21%	26%	32%
Gliazellen	16%	18%	28%	38%
Endothel	25%	73%	2%	0%
glatte Muskulatur	35%	61%	4%	0%
Tumorzellen	72%	20%	8%	0%

Fall:	to5			
Diagnose:	Reifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 6'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Verh. Plattenepithel	12%	19%	69%	0%
Talgdrüsen	16%	23%	61%	0%
Papillär ang. einschichtiges Ep	10%	19%	71%	0%
intestinales Epithel	10%	20%	70%	0%
Bindegewebe	15%	18%	67%	0%
glatte Muskulatur	18%	12%	69%	0%
Endothel	12%	16%	72%	0%

Fall:	to6			
Diagnose:	Reifes Teratom			
	X-Chromosom		Pepsinzeit 4' + 8'	
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
ovarielles Stroma	15%	20%	64%	1%
Follikel. Epithel	11%	19%	70%	0%
Plattenepithel	10%	17%	62%	11%
plexusartiges Epithel	10%	15%	70%	5%
schleimbildendes Epithel	15%	19%	66%	0%
Endothel	16%	14%	69%	0%

Quantitative Auswertung – sakrokokzygeale Tumoren

Fall:	ts1			
Diagnose:	Reifes Teratom, weiblich			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 4'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Plattenepithel	10%	11%	79%	0%
Respiratorisches E.	13%	15%	72%	0%
intestinales E.	12%	7%	81%	0%
Knorpel	6%	15%	79%	0%
gliöse Strukturen	14%	10%	76%	0%
Endothel	11%	14%	75%	0%
Glatte Muskulatur	11%	15%	74%	0%

Fall:	ts3			
Diagnose:	Embryonales Karzinom, wbl.			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 15'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Tumorzellen, EC	12%	15%	60%	14%
Endothel	18%	15%	67%	0%
glatte Muskulatur	15%	15%	69%	0%
Tumorzellen, YST	16%	26%	52%	6%

Fall:	ts4			
Diagnose:	Unreifes Teratom, wbl.			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 4'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
unreife Gliöse Anteile	17%	20%	63%	0%
reife Gliazellen	18%	17%	65%	0%
Epithelbildungen	18%	18%	61%	2%
Endothel	14%	12%	64%	1%

Fall:	ts5			
Diagnose:	Unreifes Teratom, wbl.			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 12'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
unreife gliöse Anteile	17%	21%	63%	0%
reife Gliazellen	16%	24%	60%	0%
reife Epitheliale Strukturen	13%	27%	60%	0%
Endothel	15%	19%	65%	0%

Fall:	ts 6			
Diagnose:	Reifes Teratom, wbl			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 9' + 12'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Hautanhangsgebilde	15%	17%	66%	2%
gliöse Strukturen	12%	15%	71%	2%
Fett, Bindegewebe	11%	16%	72%	1%
Endothel	14%	22%	63%	2%
Glatte Muskulatur	12%	17%	71%	0%
quergestreifte Muskulatur	14%	24%	60%	2%
Epitheliale Strukturen	9%	17%	74%	0%

Fall:	ts 8			
Diagnose:	Reifes Teratom, wbl.			
	X-Chromosom	Pepsinzeit 6'		
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Epithel	13%	15%	72%	0%
Gliazellen	13%	17%	71%	0%
Endothel	15%	19%	66%	0%
Glatte Muskulatur	15%	17%	68%	0%

Quantitative Auswertung – Tumoren des Hodens

Fall:		th1							
Diagnose:		Teratom mit reifen und unreifen Anteilen							
	X-Chromosom				Y-Chromosom				
	Pepsinzeit 8'				Pepsinzeit 8'				
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	23%	74%	2%	0%	13%	71%	4%	0%	
Plattenepithel	31%	64%	4%	0%	40%	53%	6%	0%	
unreife Neuroglia	25%	59%	16%	0%	26%	60%	14%	0%	
reife gliöse Anteile	24%	73%	2%	0%	29%	68%	2%	0%	
Endothel	26%	73%	1%	0%	26%	72%	3%	0%	
Glatte Muskulatur	24%	74%	2%	0%	29%	71%	0%	0%	
Leydigzellen	#NV	#NV	#NV	#NV	41%	59%	0%	0%	

Fall:		th2							
Diagnose:		Partiell unreifes Teratom des Hodens							
	X-Chromosom				Y-Chromosom				
	Pepsinzeit 9' + 11'				Pepsinzeit 9' + 11'				
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	31%	65%	3%	0%	21%	73%	5%	0%	
Leydigzellen	32%	62%	5%	0%	34%	62%	3%	0%	
unreife Tumoranteile	13%	84%	3%	0%	22%	76%	2%	0%	
reife Gliazellen	13%	86%	1%	0%	23%	77%	0%	0%	
Endothel	23%	75%	2%	0%	27%	71%	2%	0%	
glatte Muskulatur	23%	75%	2%	0%	34%	62%	3%	0%	
Nebenhoden (Epithel)	41%	56%	3%	0%	25%	72%	3%	0%	

Fall:		th3							
Diagnose:		Reifes Teratom							
	X-Chromosom				Y-Chromosom				
	Pepsinzeit 4'				Pepsinzeit 3'				
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	12%	82%	6%	0%	18%	81%	1%	0%	
Leydigzellen	30%	68%	2%	0%	27%	71%	2%	0%	
Plattenepithel	25%	74%	2%	0%	27%	71%	1%	0%	
Endothel	28%	72%	0%	0%	21%	76%	3%	0%	
glatte Muskulatur	26%	74%	0%	0%	28%	69%	3%	0%	

Fall:		th4							
Diagnose:		Reifes Teratom							
	X-Chromosom				Y-Chromosom				
	Pepsinzeit 3'				Pepsinzeit 4'				
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	25%	74%	1%	0%	26%	72%	2%	0%	
Leydigzellen	38%	62%	0%	0%	37%	63%	0%	0%	
Plattenepithel	22%	76%	2%	0%	18%	44%	38%	0%	
Drüsenanteile	25%	75%	0%	0%	20%	74%	6%	0%	
Endothel	27%	71%	2%	0%	23%	73%	5%	0%	
Knorpelgewebe	30%	68%	2%	0%	28%	70%	2%	0%	
Samenleiter (Epithel)	38%	60%	2%	0%	36%	64%	0%	0%	

Fall:		th5							
Diagnose:		Gemischter Keimzelltumor, EC, MIT							
	X-Chromosom				Y-Chromosom				
	Pepsinzeit 4' + 6'				Pepsinzeit 4'				
	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	
Hodentubuli	16%	67%	15%	2%	17%	81%	2%	0%	
Reifes Teratom	34%	64%	2%	0%	23%	73%	5%	0%	
Tumorzellen (EC)	9%	29%	37%	25%	15%	82%	3%	0%	
Endothel	31%	67%	2%	0%	21%	77%	2%	0%	
glatte Muskulatur	27%	71%	2%	0%	24%	75%	2%	0%	

Fall: <i>th6</i>									
Diagnose: <i>Gemischter Keimzelltumor</i>		X-Chromosom Pepsinzeit 6'				Y-Chromosom Pepsinzeit 4' + 6'			
		0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Sertolizellen		13%	79%	8%	0%	13%	76%	11%	0%
Nebenhoden (Epithel)		7%	88%	5%	0%	18%	78%	4%	0%
Plattenepithel (Teratom)		8%	18%	74%	0%	22%	76%	3%	0%
embryonales Karzinom		9%	18%	61%	12%	19%	56%	15%	10%
Dottersacktumor		11%	19%	59%	11%	13%	47%	27%	13%
Endothel		31%	66%	3%	0%	31%	66%	3%	0%
glatte Muskulatur		34%	65%	1%	0%	27%	73%	0%	0%

Fall: <i>th8</i>									
Diagnose: <i>Embryonales Karzinom</i>		X-Chromosom Pepsinzeit 4'				Y-Chromosom Pepsinzeit 4'			
		0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Hodenanteile		15%	81%	4%	0%	17%	81%	2%	0%
Tumorzellen		11%	43%	25%	21%	14%	70%	22%	0%
Endothel		20%	76%	4%	0%	28%	72%	0%	0%
glatte Muskulatur		30%	70%	0%	0%	14%	86%	0%	0%

Fall: <i>th9</i>									
Diagnose: <i>Intraduktales Seminom</i>		X-Chromosom Pepsinzeit 4'				Y-Chromosom Pepsinzeit 4'			
		0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.	0 Sign.	1 Sign.	2 Sign.	3 Sign.
Seminomzellen		9%	51%	40%	0%	16%	74%	11%	0%
Nebenhoden		17%	80%	3%	0%	29%	71%	0%	0%
Samenleiter (Epithel)		14%	77%	9%	0%	22%	78%	0%	0%
Endothel		29%	71%	0%	0%	29%	68%	3%	0%
glatte Muskulatur		27%	69%	4%	0%	21%	79%	0%	0%

d) Literaturverzeichnis

- ALEXANDER, D.S.; SOUDEK, D.; LARAYA, P.: *Unstable dicentric iso (Yq) chromosome in a pseudohermaphrodite*. In: *Am J Med Genet*, 1. Jg. (1978), S. 265-69.
- ALVAREZ-NAVA-F; MARTINEZ-MC; GONZALEZ-S; SOTO-M; BORJAS-L; ROJAS-A: *FISH and PCR analysis of the presence of Y-chromosome sequences in a patient with Xq-isochromosome and testicular tissue*. In: *Clin Genet*, 55. Jg. (1999), S. 356-61.
- ANASTASI, J.: *Interphase cytogenetic analysis in the diagnosis and study of neoplastic disorders*. In: *Am J Clin Pathol*, 95. Jg. (1991), H. Suppl.1, S. 22-28.
- ARNOLDUS, E.P.J.; DREEF, E.J.; NOORDMEER, I.; VERHEGGEN, M.; THIERRY, R.F.; PETERS, A.; CORNELISSE, C.; VAN DER PLOEG, M.; RAAP, A.K.: *Feasibility of in situ hybridisation with chromosome specific DNA probes in paraffin embedded tissue*. In: *J Clin Pathol*, 44. Jg. (1991), S. 900-904.
- ATKIN, N.B.; BAKER, M.C.: *X-Chromatin, sex chromosomes and ploidy in 37 germ cell tumors of the testis*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 59. Jg. (1992), S. 54-56.
- AYUSO, M.C.; RAMOS, M.C.; BELLO, M.C.; JIMENEZ, A.; SANCHEZ, A.; HERRERA, L.J.: *Cytogenetic and clinical findings in ten 45 X/46 XY patients*. In: *Clin Genet*, 25. Jg. (1984), S. 336-40.
- BERGENDI, E.; PLOCHL, E.; VLASAK, I.; RITTINGER, O.; MUSS, W.: *A Turner-like phenotype in a girl with an isodicentric fluorescent Y chromosome mosaicism*. In: *Klin Padiatr*, 209. Jg. (1997), H. 3, S. 133-6.
- BERKOVITZ, G.D.; ROCK, J.A.; URBAN, M.D.; MIGEON, C.J.: *True hermaphroditism*. In: *John Hopkins Med J*, 151. Jg. (1982), S. 290-297.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, P.Y.; ZACUR, H.W.; ROCK, J.A.; SNYDER, H.M.; MIGEON, C.J.; PERLMAN, E.J.: *Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: Its relevance to the understanding of sex differentiation*. In: *Medicine*, 70. Jg. (1991), S. 375-383.
- BERKOVITZ, G.D.; FECHNER, P.Y.; MARCANTONIO, S.M.; BLAND, G.; STETTEN, G.; GOODFELLOW, N.P.; SMITH, K.D.; MIGEON, C.J.: *The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism*. In: *Hum Genet*, 88. Jg. (1992), S. 411-16.
- BISAT, T.; MAY, K.; LITWER, S.; BROECKER, B.: *Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia*. In: *Clin Genet*, 44. Jg. (1993), S. 142-5.
- BLOUGH, R.I.; HEEREMA, A.; ALBERS, P.; FOSTER, S.: *Fluorescence in situ hybridization on nuclei from paraffin-embedded tissue in low stage pure embryonal carcinoma of the testis*. In: *J Urology*, 159. Jg. (1998), S. 240-244.
- BLOUGH, R.I.; HEEREMA, A.; ULBRIGHT, T.M.; SMOLAREK, T.A.; ROTH, I.; EINHORN, L.: *Interphase chromosome painting of paraffin embedded tissue in the differential diagnosis of possible germ cell tumors*. In: *Mod Pathol*, 11. Jg. (1998), S. 634-641.
- BOUCEKKINE, C.; TOUBANC, J.E.; ABBAS, N.; CHAABOUNI, S.: *Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients*. In: *Clin Endocrinol*, 40. Jg. (1994), S. 733-742.
- BREMER, G.L.; LAND, J.A.; TIEBOSCH, A.; VAN DER PUTTEN, H.W.: *Five different histological subtypes of germ cell malignancies in an XY female. Case Report* In: *Gynecol Oncol*, 50. Jg. (1993), S. 247-248.
- BURNS, J.L.; HALL, J.G.; POWERS, E.; CALLIS, J.B.; HOEHN, H.: *No evidence for chromosomal mosaicism in multiple tissues of 10 patients with 45, XO Turner syndrome*. In: *Clin Genet*, 15. Jg. (1975), S. 22-8.
- CANTO, P.; KOFMAN-ALFARO, S.; JIMENEZ, AL.; SODERLUND, D.; BARRON, C.; REYES E.; MENDEZ, JP.; ZENTENO, JC.: *Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences*. In: *CANCER-GENET-CYTOGENET*, 150. Jg. (2004), S. 70-72.
- CHAN, V.T.W.; HERRINGTON, C.S.; MCGEE, O.D.: *Basic background of molecular biology* Aus: Polak, J.M.; McGee, J.O'D. (Hrsg.): *In Situ Hybridization. Principles and Practice*. Oxford, New York, Tokyo (Oxford University Press) 1990. S. 8-14.
- CHANG, H.J.; CLARK, R.D.; BACHMAN, H.: *The phenotype 45,X/46,XY mosaicism. An analysis of 92 prenatally diagnosed cases*. In: *Am J Hum Genet*, 46. Jg. (1990), S. 156-167.

- CHEVRET, E.; ROUSSEAU, S.; MONTEIL, M.; USSON, Y.; COZZI, J.; PELLETIER, R.; SELE, B.: *Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46,XY/47,XXY male*. In: *Hum Genet*, 97. Jg. (1996), S. 171-175.
- COOKE, H.; SCHMIDTKE, J.; GOSDEN, R.: *Characterisation of a human chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates*. In: *Chromosoma*, 87. Jg. (1982), S. 491-502.
- COPELLI, S.; CASTINEYRA, G.; LEVALLE, O.; ASZPIS, S.; TARGOVNIK, H.: *PCR analysis of Y-chromosome sequences in a 45,X male patient and review of literature*. In: *Arch Androl*, 44. Jg. (2000), S. 137-145.
- CORTEZ, D.; THORUP, J.; FRISCH, M.; JACOBSEN, G.; BECK, L.: *Examination of intratubular germ cell neoplasia at operation for undescended testis in boys*. In: *J Urology*, 151. Jg. (1994), S. 722-5.
- COSTA, T.; LAMBERT, M.; TESHIMA, I.; RAY, P.N.; RICHER, CL.; DALLAIRE, L.: *Monozygotic twins with 45X/46XY mosaicism. Discordant for phenotypic sex*. In: *Am J Med Genet*, 75. Jg. (1998), S. 40-4.
- CREMERS A.F.M.; JANSEN IN DE WAL, N.; WIEGANT, J.: *Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy*. In: *Histochemistry*, 86. Jg. (1987), S. 609-615.
- CZAUDERNA, P.; STOBA, C.; WYSOCKA, B.; ILISZKO, M.: *Association of Klinefelter's syndrome and abdominal teratoma: case report*. In: *J Paediatr Surg*, 33. Jg. (1998), S. 774-5.
- DEARCE, M.A.; COSTIGAN, C.; GOSDEN, J.R.; LAWLER, M.; HUMPHRIES, P.: *Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadoblastoma in Y-bearing mosaicism Turner's syndrome*. In: *Clin Genet*, 41. Jg. (1992), S. 28-32.
- DEHNER, L.P.: *Gonadal and extragonadal germ cell neoplasms - teratomas in childhood*. Aus: Finegold, J. M.; (Hrsg.): *Pathology of Neoplasia in Childrens and Adolescents*. Philadelphia (W.B. Saunders) 1997. (Reihe: Major Problems in Pathology; Vol. 18) S. 282-312.
- DHINGRA, K.; SAHIN, A.; SUPAK, J.; KIM, Y.S.; HORTOBAGYI, G.; HITTELMAN, W.N.: *Chromosome in situ hybridization on formalin-fixed tissue using non-isotopic, non-fluorescent probes: technical considerations*. In: *Breast Cancer Res Tr*, 23. Jg. (1992), S. 201-10.
- DIEBOLD, J.; SIEGERT, S.; BARETTON, G.B.; SUCHY, B.; MEIER, W.; HAAS, C.J., LÖHRS, U.: *Interphase cytogenetic analysis of mucinous ovarian neoplasms*. In: *Lab Invest*, 76. Jg. (1997), S. 661-70.
- DALLENBACH-HELLWEG, G.; DIETEL, M.: *Weibliches Genitale* Aus: Remmele, W. (Hrsg.): *Pathologie; Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, Tumoren des Kindesalters. 2. Neubearb. Aufl.* Berlin, Heidelberg, New York (Springer-Verlag) 1997. S. 4-130.
- DISTECHE, C.M.; SAAL, H.; FRIEDMAN, C.; SYBERT, V.; THULINE, H.: *Quantitative analysis of sex-chromosome mosaicism with X-Y DNA probes*. In: *Am J Hum Genet*, 38. Jg. (1986), S. 751-8.
- EDBERG, C.S.: *Principles of Nucleic Acid Hybridisation and Comparison with Monoclonal Antibody Technology for the Diagnosis of Infectious Diseases*. In: *Yale Jor Bio Med*, 58. Jg. (1985), S. 425-442.
- EIBEN, B.; HANSEN, S.; GOEBEL, R.; HAMMANS, W.: *Tissue-specific 45X0/47XY, +13 mosaicism in an 18-year-old woman. Case report* In: *Hum Genet*, 82. Jg. (1989), S. 391-392.
- EMMERICH, P.; JAUCH, A.; HOFMANN, M.C.; CREMER, T.; WALT, H.: *Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells*. In: *Lab Invest*, 61. Jg. (1989), S. 235-242.
- ESTOP, R.; MUNNE, S.; CIEPLY, K.; VANDERMARK, K.; LAMB, A.; FISCH, H.: *Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis*. In: *Hum Reprod*, 13. Jg. (1998), S. 124-7.
- FECHNER, P.Y.; MARCANTONIO, S.M.; JASWANEY, V.; STETTEN, G.; GOODFELLOW, P.N.; MIGEON, C.J.; SMITH, K.D.; BERKOVITZ, G.D.: *The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46, XX maleness*. In: *J Clin Endocrinol Metab*, 76. Jg. (1993), S. 690-5.
- FECHNER, P.Y.; ROSENBERG, C.; STETTEN, G.; CARGILE, C.B.; PEARSON, P.L.: *Nonrandom inactivation of the Y-bearing X chromosome in a 46,XX individual: evidence for the etiology of 46,XX true hermaphroditism*. In: *Cytogenet Cell Genet*, 66. Jg. (1994), S. 22-26.
- FERNANDEZ, R.; MENDEZ, J.P.; PASARO, E.: *Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism* In: *Hum Genet*, 98. Jg. (1996), S. 29-35.

- FERNANDEZ, R.; GARCIA-DOVAL, S.; COSTOYA, S.; PASARO, E.: *Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with turner syndrome: A study of 'hidden' mosaicism*. In: *Clin Genet* 58. Jg (2000), S 201-208.
- FORESTA, C.; GALEAZZI, C.; BETTELLA, A.; MARIN, P.; ROSSATO, M; GAROLLA, A.; FERLIN, A.: *Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome*. In: *J Clin Endocrinol Metab*, 84. Jg. (1999), S. 3807-10.
- FUJIMOTO, A.; BOELTER, W.D.; SPARKES, R.S.; LIN, M.S.; BATTERBY, K.: *Monozygotic twins of discordant sex both with 45,X/46,X,idic(Y) mosaicism*. In: *Am J Med Genet*, 41. Jg. (1991), S. 239-45.
- GÖBEL, U.; SCHNEIDER, D.T.; CALAMINUS, G.; HAAS, R.J.; SCHMIDT, P.; HARMS, D.: *Germ-cell tumors in childhood and adolescence. A Review* In: *Ann Oncol*, 11. Jg. (2000), S. 263-71.
- GUBBAY, J.; COLLIGNON, J., KOOPMAN, P.; CAPEL, B.; MUNSTERBERG, A.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, N.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*. In: *Nature*, 346. Jg. (1990), S. 245-50.
- GUIDOZZI, F.; BALL, J.; SPRUDLE, A.: *Pure gonadal dysgenesis. Swyer-Syndrome. A review*. In: *Obst Gynecol Surv*, 49. Jg. (1994), S. 138-146.
- GUTTENBACH, M.; MICHELMANN, H.W.; HINNEY, B.; ENGEL, W.; SCHMIDT, M.: *Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis*. In: *Hum Genet*, 99. Jg. (1997), S. 474-477.
- HANSON, L; BRYMAN, I; BARRENAS, M-L; JANSON, P-O; WAHLSTROM, J; ALBERTSSON-WIKLAND-K; HANSON-C.: *Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome*. In: *Hereditas*. 2001; 134(2): S. 153-159.
- HANSON-L; BRYMAN-I; JANSON-PO; JAKOBSEN-A-M; HANSON-C; *Fluorescence in situ hybridisation analysis and ovarian histology of women with Turner syndrome with Y-chromosomal material* In: *Hereditas*, Jg. 137(1): 2002; S. 1-6
- HARMS, D.; SCHMIDT, D.: *Solide Tumoren des Kindes- und Adoleszentenalters*. Aus: Remmele, W. (Hrsg.): *Pathologie; Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, Tumoren des Kindesalters. 2. Neubearb. Aufl.* Berlin, Heidelberg, New York (Springer-Verlag) 1997. S. 502-549.
- HART, I.: *Tumors of the fetus and newborn Philadelphia* (W.B. Saunders) 1997. (Reihe: Major Problems in Pathology. 35) 371 Seiten.
- HASLE, H; JACOBSEN, B.B.; ANDERSEN, K.: *Mediastinal germ cell tumours associated with Klinefelter's syndrome. A report of case and review of the literature*. In: *Europ J Pediatr*, 151. Jg. (1992), S. 735-9.
- HELD, K.R.; KERBER, S.; KAMINSKY, E.; SINGH, s.; GOETZ, P.; SEEMANOVA, E.; GOEDDE, H.W.: *Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?* In: *Hum Genet*, 88. Jg. (1992), S. 288-94.
- HENKE, R.P.; KRÜGER, E.; HÜBNER, D.: *Frequency and distribution of numerical chromosomal aberrations in prostatic cancer*. In: *Hum Pathol*, 25. Jg. (1993a), S. 476-484.
- HENKE, R.P.; KRÜGER, E.; AYAN, N.; HÜBNER, D.; HAMMERER, P.: *Numerical chromosomal aberrations prostate cancer: correlation with morphology and cell kinetics*. In: *Virchows Archiv A*, 422. Jg. (1993b), S. 61-63.
- HENKE, R.P.: *Persönliche Mitteilung im November 1997. Universitätsklinik Eppendorf; Institut für Pathologie*.
- HENKE, R.P.; AYAN, N.: *Enhancement of hybridization efficiency in interphase cytogenetics on paraffin-embedded tissue sections by microwave treatment*. In: *Ann Cell Pathol*, 6. Jg. (1994), S. 319-25.
- HERRINGTON, C.S.; FLANNERY, D.M.J.; MCGEE, O.D.: *Single and simultaneous nucleic acid detection*. Aus: Polak, J.M.; McGee, J.O'D. (Hrsg.): *In Situ Hybridization. Principles and Practice*. Oxford, New York, Tokyo (Oxford University Press) 1990. S. 187-217.
- HERRINGTON, C.S.; BURNS, J.; GRAHAM, A.K.; BHATT, B.: *Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes II: simultaneous differential detection of human and papilloma virus DNA*. In: *J Clin Pathol*, 42. Jg. (1989), S. 601-6.
- HÖFLER, H.: *Principles of in situ Hybridization* Aus: Polak, J.M.; McGee, J.O'D. (Hrsg.): *In Situ Hybridization. Principles and Practice*. (Oxford University Press) 1990. S. 15-29. (265 Seiten)

- HOPMAN, A.H.N.; RAMAEKERS, F.C.S.; VOOIJS, G.P.: *Interphase Cytogenetics on solid tumors*. Aus: Polak, J.M.; McGee, J.O'D. (Hrsg.): *In Situ Hybridization. Principles and Practice*. Oxford, New York, Tokyo (Oxford University Press) 1990. S. 165-186.
- HOPMAN, A.H.N.; RAMAEKERS, F.C.S.; RAAP, A.K.; BECK, J.; DEVILEE, P.; VAN DER PLOEG, M.; VOOIJS, G.P.: *In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors*. In: *Histochemistry*, 89. Jg. (1988), S. 307-316.
- HOPMAN, A.H.N.; HOOREN, E. von; KAA, C.H.A. van der; VOOIJS, P.; RAMAEKERS, F.C.S.: *Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridisation in paraffin sections of routinely bladder cancers*. In: *Mod Pathol*, 4. Jg. (1991), S. 503-514.
- HSU, L.Y.: *Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases*. In: *Am J Med Genet*, 53. Jg. (1994), S. 108-40.
- HUGES, I.A.; COLEMAN, N.; AHMED, S.F.; NG, K.-L.; CHENG, A.; LIM, H.N.; HAWKINS, J.R.: *Sexual dimorphism in the neonatal gonad*. In: *Acta Paediatr Suppl*, 88. Jg. (1999), S. 23-30.
- IEZZONI, J.C.; VON KAP-HERR, C.; GOLDEN, W.L.; GAFFEY, M.J.: *Gonadoblastomas in 45,X/46,XY mosaicism. Analysis of Y-Chromosome distribution by FISH*. In: *Am J Clin Pathol*, 108. Jg. (1997), S. 197-201.
- JENDERNY, J.; KÖSTER, E.; MEYER, A.; BORCHERS, O.; GROTE, W.; HARMS, D.; JÄNIG, U.: *Detection of chromosome aberrations in paraffin sections of seven gonadal yolk sac tumors of childhood*. In: *Hum Genet*, 96. Jg. (1995), S. 644-650.
- JENDERNY, J.; KÖSTER, E.; BORCHERS, O.; MEYER, A.; GROTE, W.; HARMS, D.; JÄNIG, U.: *Interphase cytogenetics on paraffin sections of paediatric extragonadal yolk sac tumors*. In: *Virchows Archiv A*, 428. Jg. (1996), S. 53-7.
- JENDERNY, J.; SCHMIDT, W.; HELD, K.R.: *Presence of the AZF region in a female with an idic(Y)(q11)*. In: *Clin Genet*, 54. Jg. (1998), S. 341-344.
- KNUTZTON, J.; AARSKOG, D.: *45,X/46,XY mosaicism. A clinical report and review of ten cases*. In: *Europ J Pediatr*, 146. Jg. (1987), S. 266-71.
- KOCOVA, M.; SIEGEL, S.F.; WENGER, S.L.; LEE, P.A.; TRUCCO, M.: *Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA*. In: *Lancet*, 342. Jg. (1993), S. 140-3.
- KOCOVA, M.; SIEGEL, S.F.; NALWESNICK, M.; TRUCCO, M.: *Detection of the Y-chromosome sequences in gonadal tissue of patients with turners syndrome. Letter* In: *N Engl J Med*, 334. Jg. (1994), S. 682.
- KOCOVA, M.; FELDMAN, S.; WENGER, S.; LEE, P.A.; NALESINK, M.; TRUCCO, M.: *Detection of Y-chromosome sequences in a 45,X/46,XXq-Patient by southern blot analysis of PCR - amplified DNA and FISH*. In: *Am J Med Genet*, 55. Jg. (1995), S. 483-488.
- KOO, C.H.; REIFEL, J.; KOGUT, N.; COVE, K.; RAPPAPORT, H.: *True histiocytic malignancy associated with a malignant teratoma in a patient with 46XY gonadal dysgenesis. Case Report* In: *Am J Surg Pathol*, 16. Jg. (1992), S. 175-183.
- KOOPMAN, P.: *SRY and SOX 9 : Mammalian testis-determining genes*. In: *Cell Mol Life Sci*, 55. Jg. (1999), S. 839-856.
- KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BANDGE, R.: *Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY*. In: *Nature*, 351. Jg. (1991), S. 117-121.
- KORN, W.M.; WEGHUIS, D.; SUIJKERBUIJK, R.F.; SCHMIDT, U.; OTTO, T.; MANOIR, S.; VAN KESSEL, A.; HARSTRICK, A.; SEEBER, S.; BECHER, R.: *Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by CGH*. In: *Genes, Chromosomes and Cancer*, 17. Jg. (1996), S. 78-87.
- KREGE, S.; HAUFFA, B.; RÜBBEN, H.: *Leitlinien zur Diagnostik und Therapie bei Störungen der sexuellen Differenzierung*. In: *Urologe A*, 39. Jg. (2000), S. 71-77.
- KROB, G.; BRAUN, A.; KUHNLE, U.: *True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings chromosomes and gonadal histology. A review* In: *Europ J Pediatr*, 153. Jg. (1994), S. 2-10.
- KUCHERIA, K.; MOHAPATRA, I.; TANEJA, N.; GUPTA, D.K.; AMMINI, A.: *Genetic heterogeneity in true hermaphrodites. A report of two cases* In: *J Reprod Med*, 39. Jg. (1994), S. 550-2.
- KUMAR, N.A.; CHANDAK, A.; RAJASEKHAR, N.; REDDY, N.; SINGH, L.: *Fetus in Fetu: A Case Report with molecular analysis*. In: *J Paediatr Surg*, 34. Jg. (1999), S. 641-4.

- KUSZ, K.; KOTECKI, M.; WOJDA, A.: *Incomplete masculinization of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive x chromosome*. In: *J Med Genet*, 36. Jg. (1999), S. 452-56.
- LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.P.; LEITCH, I.J.: *In situ-Hybridisierung. Aus dem Englischen übersetzt von Beate Bettenhausen* Heidelberg, Berlin, Oxford (Spektrum Akademischer Verlag) 1994.
- LINSKENS, R.K.; ODINK, R.J.; VAN DER LINDEN, J.C.; EKKELKAMP, S.; DELEMARE-VAN DER WAAL, H.A.: *True hermaphroditism in 45,X/46,XY mosaicism*. In: *Horm Res*, 37. Jg. (1992), S. 241-4.
- LIPPE, B.: *Turner Syndrome* In: *Endocrinol Metabol Clin North Amer*, 20. Jg. (1991), S. 121-152.
- LOOIJENGA, L.H.J.; GILLIS, A.; VAN PUTTEN, W.; OOSTERHUIS, J.W.: *In situ numeric analysis of centromeric regions of chromosomes 1, 12, 15 of seminomas, nonseminomatous germ cell tumors and carcinoma in situ of human testis*. In: *Lab Invest*, 68. Jg. (1993), S. 211-219.
- MCELREAVEY, K.; RAPPAPORT, H.; VILAIN, E.; ANNAS, N.; RICHAUD, F.; LORTAT, S.; BERGER, R.; LECONAIT, M.; BOUCEKKINE, C.; KUCHERIA, K.: *A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY*. In: *Hum Genet*, 90. Jg. (1992), S. 121-5.
- MCLAREN, A.: *What makes a man a man ?* In: *Nature*, 346. Jg. (1990), S. 216-7.
- MCLAREN, A.: *Sex determination in mammals*. In: *Oxf Rev Reprod Biol*, 13. Jg. (1991), S. 1-33.
- MENDES, J.R.T.; STRUFALDI, M.W.; DELCELO, R.; MOISES, R.: *Y-chromosome identification by PCR and gonadal histopathology in Turner's syndrome without overt Y-mosaicism*. In: *Clin Endocrinol*, 50. Jg. (1999), S. 19-26.
- MENDEZ, J.P.; KOFMAN-ALFARO, S.; MUTCHINICK, O.: *Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic and histopathol. findings in 16 patients*. In: *Am J Med Genet*, 46. Jg. (1993), S. 263-7.
- MOORE, K. L.: *Grundlagen der medizinischen Embryologie, 2. Aufl. Übersetzt von Jobst Sievers* Stuttgart (Enke) 1996; 195 Seiten.
- MOTULSKY, A.G.; VOGEL, F.: *Human Genetics Problems and Approaches, Third Edition* Berlin, Heidelberg, New York (Springer) 1996.
- MURKEN, J.; CLEVE, H.: *Humangenetik 5. neu überarbeitete Auflage* Stuttgart (Enke) 1994. (Reihe: Enke Reihe zur AO, Ä); 178 Seiten.
- NAGAFUCHI, S.; SEKI, S.; NAKAHORI, Y.: *PCR detection of structurally abnormal y chromosomes*. In: *Jpn J Hum Genet*, 37. Jg. (1992), S. 187-193.
- NAZARENKO, S.A.; TIMOSHEVSKY, V.; SUKHANOVA, N.N.: *High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients*. In: *Clin Genet*, 56. Jg. (1999), S. 59-65.
- NOVAK, A.Z.; KOKAL, G.K.; POPOVIC, V.P.; LUDOWSKI, M.L.; JURUKOWSKI, V.A.: *Interphase cytogenetics on paraffin embedded sections of ovary for detection of genomic constitution in a patient with Turner Syndrome and chromosomal mosaicism* In: *Hum Genet*, 95. Jg. (1995), S. 293-298.
- OHAMA, K.; NOMURA, K.; OKAMOTO, E.: *Origin of mature teratoma of the ovary*. In: *Am J Obstet Gynecol*, 152. Jg. (1985), S. 896-900.
- OOSTERHUIS, J.W.; LOOIJENGA, L.H.J.; VAN ECHTEN, J.; DE JONG, B.: *Chroosomal constitution and developmental potential of human germ cell tumors and teratomas*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 95. Jg. (1997), S. 96-102.
- OSIPOVA, G.R.; KARMANOV, M.E.; KOZLOVA, S.I.; EVGRAFOV, O.V.: *PCR detection of y-specific sequences in patients with Ullrich Turner Syndrome*. In: *Am J Med Genet*, 76. Jg. (1998), S. 283-7.
- PAGE, D.C.: *Y-chromosomal sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma* In: *Lancet*, 343. Jg. (1994), S. 240.
- PARKER, K.L.; SCHEDL, A.; SCHIMMER, B.P.: *Gene interactions in gonadal development*. In: *Annu Rev Physiol*, 61. Jg. (1999), S. 417-33.
- PERLMAN, E.J.: *Germ cell tumors* Aus: Stocker, J.T.; Askin, F.B.; (Hrsg.): *Pathology of Solid Tumors in Children* London, Weinheim, New York, u.a. (Chapman & Hall Medical) 1998. S. 213-234.
- PERLMAN, E.J.; HAWKINS, E.P.: *Germ Cell Tumors* Aus: Parham, D.M.; (Hrsg.): *Pediatric Neoplasia. Morphology and Biology* Philadelphia (Lippincott-Raven Publishers) 1996. S. 297-310.

- QUEIPO, G.; ZENTENO, JC; PENA, R; KOFMAN-ALFARO, S.: *Molecular analysis in true hermaphroditism: Demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequence in 46,XX cases* In: *Human-Genetics*. 2002; Jg 111(3), S. 278-283
- QUILTER, C.R.; TAYLOR, K.; CONWAY, G.S.; NATHWANI, N.; DELANTHANTY, J.D.: *Cytogenetic and molecular investigations of Y-c hromosome sequences and their rule in Turner's syndrome*. In: *Ann Hum Genet*, 62. Jg. (1998), S. 99-106.
- RAFF, R.; SCHUBERT, R.; SCHWANITZ, G.; VAN-DER-VEN, K.; SCHWEIKERT, H.U.; BRUHL, P.: *Maldescensus testis und Hypospadie bei Aberrationen der Geschlechtschromosomen*. In: *Klin Padiatr*, 210. Jg. (1998), S. 400-6.
- RAGG, S.; HÄRLE, M.; SCHERTHAN, H.: *Analysis of sex chromosome distribution in the gonadal tissue of a 45,X/47,XXY mosaicism by FISH*. In: *Mod Pathol*, 3. Jg. (1995), S. 295-298.
- RAMAEKERS, F.C.S.; HOPMAN, A.H.N.; VOUIJS, P.: *Advances in the detection of ploidy differences in cancer by in situ hybridization* In: *Ann Cell Pathol*, 4. Jg. (1992), S. 337-344.
- RAMANI, P.; YEUNG, C.; M. HABEEBU: *testicular intratubular germ cell neoplasia in children and adolescents with intersex*. In: *Am J Surg Pathol*, 17. Jg. (1993), S. 1124-33.
- REDDY, K.S.; SULCOVA, V.; HO, C.K.; CONNER, E.D.; KHURANA, A.: *An infant with a mosaic karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads*. In: *Am J Med Genet*, 66. Jg. (1996), S. 441-444.
- REDDY, K.S.; SULCOVA, V.: *Pathogenesis of 45, X/46, XY gonadal mosaicism*. In: *Cytogenet Cell Genet*, 82. Jg. (1998), S. 52-57.
- RIOPEL, M.; SPELLERBERG, A.; GRIFFIN, C.A.; PERLMAN, E.J.: *Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by CGH*. In: *Cancer Res*, 58. Jg. (1998), S. 3105-10.
- RÖPKE, A.; PELZ, AF.; VOLLETH, M.; SCHLÖBER, HW.; WIEACKER, P.: *Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes* In: *Am J Obstet Gynecol*, 190. Jg (2004), Heft 3, S. 1059-1062.
- RODRIGUEZ, J.; MELAMED, J.; REUTER, V.; CHAGANTI, R.S.K.: *Chromosome 12 abnormalities in malignant ovarian germ cell tumors*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 82. Jg. (1995), S. 62-66.
- SAENGER, P.: *Turner Syndrome* In: *N Engl J Med*, 335. Jg. (1996), S. 1749-54.
- SAUTER, G.; MOCH, H.; WAGNER, U.; NOVOTNA, H.; GASSER, T.C.; MATTERELLI, G.; MIHATSCH, M.; WALDMAN, F.M.: *Y Chromosome loss detected by FISH in bladder cancer*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 82. Jg. (1995), S. 163-9.
- SCHILLER, P.I.; PUCHTA, U.; OGILVIE, A.J.L.: *In-situ-PCR und PCR-in-situ-Hybridisierung am Paraffingewebe. Neue diagnostische Möglichkeiten* In: *Pathologe*, 19. Jg. (1998), S. 313-317.
- SCHNEIDER, D.T.; SCHUSTER, A.E.; CALAMINUS, G.; HARMS, D.; GÖBEL, U.; PERLMAN, E.J.: *Genetic analysis germ cell tumors with comperative genomic hybridisation*. In: *Klin Padiatr*, 213. Jg. (2001), S. 201-11.
- SERAJ, I.M.; CHASE, D.R.; CHASE, L.; KING, A.; JACOKES, A.: *Malignant teratoma arising in a dysgenetic gonad: A case report*. In: *Gynecol Oncol*, 50. Jg. (1993), S. 254-258.
- SHIN, J.H.; YOON, C.H.; CHO, K.S.; LIM, S.D.; KIM, E.; KIM, K.: *Fetus-in-fetu in the scrotal sac of newborn infant: imaging, surgical and pathological findings*. In: *Eur Radiol*, 9. Jg. (1999), S. 945-7.
- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.L.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUF, A.M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW; P.N.: *A Gene from the sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*. In: *Nature*, 346. Jg. (1990), S. 240-244.
- SINNECKER, G.H.G.: *Praktisches Vorgehen bei Intersexualität*. In: *Monatsschr Kinderheilkd*, 142. Jg. (1994), S. 623-642.
- STÄDLER, F.; HELPAP, B: *Männliches Genitale Aus: (Hrsg.): Pathologie, Bd.5, Männliches Genitale, Niere, Ableitende Harmwege, 2. Neubearb. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York (Springer-Verlag) 1997. S. 1-93.*

- STOCK, C.; AMBROS, I.M.; LION, T.; HAAS, O.A.; ZOUBEK, A.; GADNER, H.; AMBROS, F.P.: *Detection of numerical and structural chromosome abnormalities in pediatric germ cell tumors by means of interphase cytogenetics*. In: *Genes, Chromosomes and Cancer*, 11. Jg. (1994), S. 40-50.
- STOCK, C.; AMBROS, I.M.; STREHL, S.; ZOUBEK, A.; FINK, F.M.; GADNER, H.; AMBROS, F.P.: *Cytogenetic aspects of pediatric germ cell tumors*. In: *Klin Padiatr*, 207. Jg. (1995), S. 235-41.
- SUIJKERBUIJK, R.F.; LOOIJENGA, L.; DE JONG, B.; OOSTERHUIS, J.W.; CAISSMAN, J.J.; GREUTS VAN KESSEL, A.: *Verification of isochromosome 12p and identification of other chromosome 12 aberrations in gonadal and extragonadal human germ cell tumors by bicolor FISH*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 63. Jg. (1992), S. 8-16.
- SULTANA, R.; MYERSON, D.; DISTECHE, C.M.: *In situ hybridization analysis of the Y chromosome in Gonadoblastoma*. In: *Genes, Chromosomes and Cancer*, 13. Jg. (1995), S. 257-262.
- SURTI, U.; HOFFNER, L.; CHAKRAVARTI, A.; FERRELL, R.E.: *Genetics and Biology of Human Ovarian teratomas. Cytogenetic Analysis and Mechanism of Origin*. In: *Am J Hum Genet*, 47. Jg. (1990), S. 635-43.
- TELVI, L.; LEBBAR, A.; DEL-PINO, O.; BARBET, J.P.; CHAUSSAIN, J.L.: *45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases*. In: *Pediatrics*, 104. Jg. (1999), S. 304-8.
- TORRES, L.; LOPEZ, M.; MENDEZ, J.P.; CANTO, P.; ALFARO, G.; G.; ERICKSON, R.P.; KOFMAN-ALFARO, S.: *Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes*. In: *Am J Med Genet*, 63. Jg. (1996), S. 348-355.
- UEHARA, S.; FUNATO, T.; YAEGASHI, N.; SUZUKI, H.; SATO, J.; SASAKI, T.; YAJIMA, A.: *SRY Mutation and tumor formation on the Gonads of XY pure gonadal dysgenesis patients*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 113. Jg. (1999), S. 78-84.
- UDLER-Y; KAUSCHANSKY-A; YESHAYA-J; FREEDMAN-J; BARKAI-U; TOBAR-A; OKON-E; HALPERN-GJ; SHOHAT-M; LEGUM-C.: *Phenotypic expression of tissue mosaicism in a 45,X/46,X,dicY(q11.2) female*. In: *Am J Med Genet*, 102. Jg. (2001), S. 318-323.
- VAN DEKKEN, H.; PIZZOLO, G.; KELSEN, D.P.; MELAMED, M.R.: *Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridisation with a set of chromosome-specific DNA probes*. In: *Cancer*, 66. Jg. (1990), S. 491-497.
- VAN DEKKEN, H.; KERSTENS H.M.; TERSTEEG, T.A.; VERHOFSTAD, J.; VOOJIS, G.P.: *Histological preservation after in situ hybridization to archival solid tumor sections allow discrimination of cells bearing numerical chromosome changes*. In: *J Pathol*, 168. Jg. (1992), S. 317-324.
- VAN DEKKEN, H.; BOSMAN, R.; KERSTENS, H.M.; VOOJIS, G.; VERHOFSTADT, J.: *Identification of numerical chromosome aberrations in archival tumors by in situ hybridization to routine paraffin sections*. In: *J Pathol*, 171. Jg. (1993), S. 161-171.
- VAN NIEKERK, W.A.; RETIEF, A.E.: *The gonads of human true hermaphrodites*. In: *Hum Genet*, 58. Jg. (1981), S. 117-122.
- VERP, M.S.; SIMPSON, J.L.: *Abnormal sexual differentiation and neoplasia*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 25. Jg. (1987), S. 191-218.
- WALKER, A.M.; WALKER, J.L.; ADAMS, S.; SHI, E.; MCGLYNN, M.; VERGE, C.F.: *True hermaphroditism*. In: *J Paediatr Child Health*, 36. Jg. (2000), S. 69-73.
- WAYE, J.S.; JOHN, S.; WILLARD, H.F.: *Chromosome specific alpha-satellite DNA nucleotide sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X-chromosome*. In: *Nucl Acids Res*, 13. Jg. (1985), S. 2731-2743.
- WYSOCKA, B.; DENIS, A.; LIMON, J.; IZYKA, J.; JASSEM, J.; STOBA, C.: *Klinefelter's Syndrome and neoplasia. Presentation of three new cases*. In: *Cancer Genet Cytogenet*, 92. Jg. (1996), S. 85-6.
- YU, I.T.; GRIFFIN, C.A.; PHILLIPS, P.C.; STRAUSS, L.C.; PERLMAN, E.J.: *Numerical sex chromosomal abnormalities in pineal teratomas by cytogenetic analysis and FISH*. In: *Lab Invest*, 72. Jg. (1995), S. 419-23.

e) **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 13-1: Zwei-Stufen-Modell der Geschlechtsdeterminierung.....	8
Abbildung 7-1: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms im testikulären Gewebe.....	37
Abbildung 7-2: Signalverteilung des X-Chromosoms im ovariellen Gewebe.....	38
Abbildung 7-3: Normaler Chromosomenbefund für das Y-Chromosom, Alter 5 Jahre, 100x.....	39
Abbildung 7-4: Regelrechtes Ovar, Doppelmarkierung für X im ovariellen Stroma, Alter 12 Jahre, 100x.....	39
Abbildung 8-1: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 1.....	40
Abbildung 8-3: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 12.....	42
Abbildung 8-4: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 4, rechte Gonade.....	43
Abbildung 8-5: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 4, linke Gonade.....	43
Abbildung 8-6: Übersicht Ovotestis: Gonade bestehend aus unreifen Hodentubuli, Übergang in Ovargewebe, Primär- und Sekundärfollikeln, Fall g2, HE 25x.....	44
Abbildung 8-7: XX-Konstellation, Hermaphroditismus, Fall g 2, Genotyp XX/XY, Alter 4 Jahre, 100x.....	45
Abbildung 8-8: XX-Konstellation, Hermaphroditismus verus; Fall g 12, Genotyp XX/XY, Alter 15 Jahre, 100x.....	45
Abbildung 8-09: Ovotestis mit atrophischen Hodentubuli, Fall g2, XX/XY-Konstellation HE 50x.....	46
Abbildung 8-10: Doppelmarkierung für X-Chromosom in Keimzellen, Fall g2, XX/XY-Genotyp 100x.....	46
Abbildung 8-11: Links: Einfache Markierung für das Y-Chromosom im Tubenepithel; Rechts: Einfache Markierung für das Y-Chromosom im Ovotestis; beide Fall g 2, XX/XY-Genotyp, 100x.....	47
Abbildung 8-12: Einfache Markierung für das Y-Chromosom in Primärfollikeln und im ovariellen Stroma, Fall g 2, XX/XY-Situation, 100x.....	47
Abbildung 8-23: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 3.....	48
Abbildung 8-14: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 5.....	49
Abbildung 8-15: Oberflächenepithel eines klinisch als Klitorishypertrophie bezeichneten Schwellkörpergewebes, Fall g 5, X0/XY-Genotyp, 100x.....	50
Abbildung 8-16: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 6.....	51
Abbildung 8-17: Gonadoblastomherde dysgenetischer Gonade m. X0/XY-Genotyp; Fall g6, Alter 6 Jahre, HE 25x.....	52
Abbildung 8-18: XX-Situation in Zellkernen des Gonadoblastoms, Fall g6, X0/XY-Genotyp, 100x.....	52
Abbildung 8-19: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 7.....	53
Abbildung 8-0: Signalverteilung des X-Chromosoms in g 10.....	54
Abbildung 8-21: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in g 9.....	55
Abbildung 9-1: Reifes Teratom des Ovars; Fall to3, Alter 6 Jahre, HE 25x.....	58
Abbildung 9-2: Reifes Teratom des Hodens, mit verhorntem Plattenepithel ausgekleidete Zysten, randlich altersentsprechende Hodentubuli; Fall th3, Alter 7 Jahre, HE 25x.....	58
Abbildung 9-3: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms reifen Teratomen des Hodens.....	59
Abbildung 9-4: Signalverteilung des X-Chromosoms in reifen Teratomen des Ovars.....	59
Abbildung 9-5: Reifes Teratom des Hodens, einfache Markierung für das Y-Chromosom im Plattenepithel der Tumorkomponente; Fall th 4, Alter 7 Jahre, 100x.....	60
Abbildung 9-6: Reifes Teratom des Ovars, Doppelmarkierung für das X-Chromosom in Tumoranteilen; Fall to 3, Alter 6 Jahre, 100x.....	60
Abbildung 9-7: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 1.....	61
Abbildung 9-8: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in ts 2.....	62
Abbildung 9-9: LINKS: Doppelmarkierung für das Y-Chromosom in den unfeifen neuroglösen Anteilen, RECHTS: unreife neuroglöse Anteile eines Steißbeinteratoms; beide Fall ts 2HE, 50x.....	63

Abbildung 9-10: Partiiell unreifes Teratom des Steißbeins; Fall ts 2, mnl., Alter 1 Tag, HE 25x.....	63
Abbildung 9-11: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 5.....	64
Abbildung 9-12: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 6.....	64
Abbildung 9-13: Signalverteilung des X-Chromosoms in to 4.....	65
Abbildung 9-14: Maligner, gemischter Keimzelltumor, Fall th 5, Alter 17 Jahre, HE 25x.....	66
Abbildung 9-15: LINKS: Ein, zwei und drei Signale für das X-Chromosom in Zellkernen des EC-Anteils, th 5, 100x; RECHTS: Doppelmarkierung für das Y-Chromosom im YST-Anteil, Fall th 6, 100x.....	66
Abbildung 9-16: LINKS: Gemischter Keimzelltumor des Ovars, unreife Gliazellen; RECHTS: Anteile des embryonalen Carcinoms; beide Fall to 4, Alter 13 Jahre, HE 50x.....	67
Abbildung 9-17: Signale für das X-Chromosom in unreifen Gliazellen, Fall to 4, 100x.....	67
Abbildung 9-18: Signalverteilung des X-Chromosoms in ts 3.....	68
Abbildung 9-19: Signalverteilung des X- und des Y-Chromosoms in th 8.....	68
Abbildung 9-20: Embryonales Carzinom (EC) des Hodens; Fall th 8, Alter 19 Jahre, HE 50x.....	69
Abbildung 9-21: Doppelmarkierung für das Y-Chromosom in Zellen des EC-Anteils; Fall th 8, Alter 19 Jahre, 100x.....	69

Lebenslauf

Angaben zur Person

Andreas Marker
Am Felde 10
27367 Ahausen
geboren am 19. Februar 1968 in Kamen,
verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

08.1974 bis 06.1978 Grundschule, Bergkamen
08.1978 bis 06.1984 Realschule, Bergkamen
08.1990 bis 06.1993 Abitur am Westfalen-Kolleg Dortmund

Berufsausbildung

08.1984 bis 01.1988 Chemielaborant, Schering AG Bergkamen

Berufstätigkeit

01.1988 bis 07.1988
04.1990 bis 07.1990 Chemielaborant, Schering AG Bergkamen

Zivildienst

08.1988 bis 03.1990 Evangelisches Krankenhaus Unna

Studium

10.1993 bis 10.1995 Vorklinisches Studium, Ruhr-Universität Bochum
10.1995 bis 09.1999 Klinisches Studium, Universität Hamburg
09.1999 bis 03.2001 Praktisches Jahr, Universität Hamburg
05.2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studienbegleitende Tätigkeiten

09.1993 bis 10.1995 Studentische Hilfskraft, operative Intensivstation
St. Johannes-Hospital Dortmund
01.1996 bis 11.1996 Chirurgie AK St.Georg
12.1996 bis 08.2001 operative Intensivstation Marienkrankenhaus Hamburg

Tätigkeit als Arzt

seit 09.2001 Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme
Abteilung für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin

Ahausen im Juni 2005.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Schäfer danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Betreuung, die Hilfestellung und zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Sandra Schmidt und Frau Michaela Härtling danke ich für die Erstellung der Schnittpräparate und die wertvollen Tipps zur Durchführung der Analysen.

Frau Silvia Schnöger und Frau Nebahat Gyrses danke ich für die Einarbeitung in die Technik der In Situ-Hybridisierung.

Ebenso sei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit gedankt.

Herrn Dr. I. Akkurt (Altonaer Kinderkrankenhaus) und Herrn Prof. Dr. med. R.P. Willig (UKE, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin) danke ich für die Überlassung der klinischen Patientendaten.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern Bernhard und Rosel Marker, meiner Schwester Roswitha Marker und bei meiner Frau Mareile Marker. Sie haben mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir meinen Weg ermöglicht

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....