

Aus dem
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

**Nachweis und Rolle der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2 (HILI)* und *PIWI-LIKE 4 (HIWI2)*
in ejakulierten Spermatozoen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lisa Sophie Müller
geboren am 22.11.1987 in Bayreuth

Gutachter/Gutachterin:

1. Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. A. Navarrete Santos
3. apl. Prof. Dr. rer. nat. H. Herlyn, Mainz

02.05.2017

19.01.2018

Referat

Ein potentieller Faktor männlicher Infertilität sind Mutationen sowie Alterationen in der Expression der Gene der Piwi-Subfamilie der Argonaute-Proteine (*PIWI-LIKE 1-4*). Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Selbsterneuerung von Keimbahn-Stammzellen, genauere molekulare Mechanismen sind bisher aber noch unzureichend beschrieben. Argonaute-Proteine bilden den essentiellen Teil des RNA-induced silencing complex (RISC), der die translationsreprimierende Wirkung von siRNA oder miRNA bei der RNA-Interferenz vermittelt. PIWI-Proteine binden aber eine andere Klasse von non-coding RNAs, die piRNA (piwi-interacting RNA), und ihre Expression ist keimbahnspezifisch. Im murinen System konnte gezeigt werden, dass der Knock-out von Miwi2 (dem murinen Homolog von *PIWI-LIKE 2*) zu einem sterilen Phänotyp führt. Ob Alterationen der Expression von Mitgliedern der *PIWI*-Familie auch beim Menschen mit einer Infertilität assoziiert sind, ist bislang noch unzureichend untersucht.

Die in dieser Studie verwendeten Proben stammen von 54 Patienten des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale), bei denen der Verdacht auf männliche Infertilität bestand, sowie von 43 freiwilligen Spendern. Zum einen wurden Spermioogramme erstellt, zum anderen erfolgte eine Kryokonservierung der Spermien für die Isolation von DNA, RNA und Proteinen. Mittels Trizol-Methode erfolgte die RNA-Isolierung, deren Konzentration anschließend mittels Photometrie bestimmt wurde. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels cDNA-Synthese und anschließender Real-Time-PCR.

In den 97 untersuchten Ejakulatproben konnte die Expression von *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA nachgewiesen werden. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression mit dem Vorliegen eines abnormalen Spermioogramms (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie oder Mischformen). Somit ist in unserer Studie die *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in ejakulierten Spermien nicht mit der Klassifizierung entsprechend der aktuellen WHO-Vorgaben assoziiert.

Müller, Lisa Sophie: Nachweis und Rolle der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2 (HILI)* und *PIWI-LIKE 4 (HIWI2)* in ejakulierten Spermatozoen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Infertilität..... | 1 |
| 1.1.1 | Definition und Prävalenz..... | 1 |
| 1.1.2 | Ursachen..... | 2 |
| 1.2 | Die Argonaute-Genfamilie..... | 6 |
| 1.2.1 | Die PIWI-Proteine..... | 7 |
| 1.3 | Funktionen der PIWI-Proteine..... | 8 |
| 1.3.1 | Überblick..... | 8 |
| 1.3.2 | Bildung und Aufrechterhaltung von Keimbahnstammzellen..... | 8 |
| 1.3.3 | Meiose..... | 9 |
| 1.3.4 | Spermatogenese..... | 9 |
| 1.3.5 | Oogenese..... | 12 |
| 1.3.6 | Somatische Funktion..... | 12 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit..... | 14 |
| 2 | Material..... | 15 |
| 2.1 | Ejakulatproben..... | 15 |
| 2.2 | Chemikalien und Kits..... | 15 |
| 2.3 | Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 16 |
| 2.4 | Puffer, Medien und Lösungen..... | 17 |
| 3 | Methoden..... | 18 |
| 3.1 | Studiendesign, Erstellung der Spermioogramme und Probenverwahrung..... | 18 |
| 3.2 | RNA-Isolation mittels Trizol-Methode..... | 18 |
| 3.3 | cDNA-Synthese..... | 19 |
| 3.4 | Quantitative Real-Time-PCR..... | 20 |
| 3.5 | Definition und Referenzwerte der Ejakulatparameter..... | 22 |
| 3.6 | Statistische Methoden..... | 22 |
| 4 | Ergebnisse..... | 23 |
| 4.1 | Zusammensetzung der Studienkohorte..... | 23 |

| | | |
|-------|--|------|
| 4.1.1 | Beschreibung der Normospermiogramme | 23 |
| 4.1.2 | Beschreibung der pathologischen Spermiogramme | 24 |
| 4.2 | Verteilung klinischer Parameter | 30 |
| 4.3 | Bivariate Korrelation nach Spearman-Rho..... | 32 |
| 4.4 | Chi-Square-Tests nach Pearson | 33 |
| 4.5 | ROC-Kurven..... | 47 |
| 4.5.1 | <i>PIWI-LIKE 2</i> | 47 |
| 4.5.2 | <i>PIWI-LIKE 4</i> | 48 |
| 5 | Diskussion | 49 |
| 5.1 | Assoziationen zwischen der <i>PIWI-LIKE 2</i> -mRNA- oder <i>PIWI-LIKE 4</i> -mRNA- Expression und klassischen Spermiogrammparametern | 49 |
| 5.2 | Assoziationen zwischen der <i>PIWI-LIKE 2</i> -mRNA- oder <i>PIWI-LIKE 4</i> -mRNA- Expression und Stammzellfaktoren | 50 |
| 5.3 | Rolle der <i>PIWI-LIKE 2</i> - und <i>PIWI-LIKE 4</i> -mRNA-Expression bei der humanen Spermatogenese und humaner Infertilität | 51 |
| 6 | Zusammenfassung | 57 |
| 7 | Literatur | 58 |
| 8 | Thesen..... | 64 |
| 9 | Anhang..... | VIII |
| 9.1 | Votum der Ethik-Kommission..... | VIII |
| 9.2 | Selbstständigkeitserklärung | X |
| 9.3 | Erklärung über frühere Promotionsgesuche | XI |
| 9.4 | Lebenslauf | XII |
| 9.5 | Danksagung | XIV |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|-------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µmol | Mikromol |
| Abb. | Abbildung |
| Act | Activator of Crem |
| Aub | Aubergine |
| AURCK | AURORA KINASE C |
| AZF | Azoospermiefaktor |
| BCL2 | B-Cell-Lymphoma-2 |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| ca. | circa |
| CD34+/- | CD-Antigen 34 positiv/negativ |
| cDNA | complementary DNA |
| CYP19A | Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 |
| dAgo1, 2, 3 | Drosophila Agonaute 1, 2, 3 |
| DAZ | Deleted in Azoospermia |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DFFRY | Drosophila Fat Facets-Related Y |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DPM1 | Dolichyl-phosphate-mannosyltransferase polypeptide 1 |
| dsRNA | double-stranded RNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |

| | |
|------------------|---|
| EPPIN | Epididymal Peptidase Inhibitor |
| ESR1, 2 | Estrogen receptor 1, 2 |
| et al. | et alii |
| FASLG | Fas-Ligand |
| g | Gramm |
| GnRH | Gonadotropin releasing hormone |
| GPR156 | G-Protein-coupled receptor 156 |
| GSTM1 | Glutathione S-transferase M1 |
| GSTT1 | Glutathione S-Transferase Theta 1 |
| GTC | Guanidinisothiocyant |
| H2BFWT | H2B Histone Family, Member W, Testis-Specific |
| H ₂ O | Wasser |
| H3K9 | Histon 3 Lysine 9 |
| <i>HERV-K</i> | Humanes endogenes Retrovirus K |
| HIST1H2AA | Histone cluster 1 H2aa |
| <i>HIWI</i> | Humanes Piwi |
| HSP1a | Hitzeschockprotein 1a |
| IL16 | Interleukin 16 |
| kb | Kilobasen |
| KI | Konfidenzintervall |
| KLK1 | Kallikrein 1 |
| M | Median |
| MDR1 | Multidrug resistance protein 1 |
| MEI1 | Meiosis Inhibitor 1 |
| mg | Milligramm |
| Mili | Murines Piwi-like-Protein 2 |
| Min. | Minute |

| | |
|---------|---|
| miRNA | microRNA |
| Miwi | Murines Piwi-like-Protein 1 |
| Miwi2 | Murines Piwi-like-Protein 4 |
| ml | Milliliter |
| MLH3 | MutL-homolog 3 |
| MuLV-RT | Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase |
| MPZ | Mitotic proliferation zone |
| mRNA | messenger RNA |
| MSH5 | MutS protein homolog 5 |
| MTHFR | Methylentetrahydrofolat-Reduktase |
| MTLA | Medizinisch-technische Labor-Assistentin |
| mU/l | Milli-Einheiten pro Liter |
| Mvh | Mouse vasa homolog |
| MW | Mittelwert |
| N/A | Not Available/Applicable |
| N, n | Anzahl |
| NANOG | Homöoboxprotein/Transkriptionsfaktor |
| NER | Nucleotide excision repair |
| ng | Nanogramm |
| OAT | Oligoasthenoteratozoospermie |
| Oct3/4 | Oktamerbindender Transkriptionsfaktor |
| OP | Operation |
| PACRG | Parkin coregulated gene protein |
| PARP-2 | Poly ADP Ribose Polymerase 2 |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| piRISC | piRNA-induced-silencing-complex |

| | |
|-----------------|---|
| piRNA | piwi-interacting RNA |
| Piwi | P-element induced wimpy testis |
| PR | Progressive Motilität |
| PRDM9 | PR domain containing 9 |
| PRG1, 2 | Piwi-related-Gene 1, 2 |
| PTGS | Posttranscriptional Gen Silencing |
| qPCR | quantitative PCR |
| RAB24 | RAS-associated protein 24 |
| <i>RBMY</i> | <i>RNA-BINDING-MOTIF-GENE</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| <i>S. pombe</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| SCO | Sertoli Cell Only Syndrome |
| SHBG | Sexualhormon-bindendes Globulin |
| siRNA | small interfering RNA |
| SMPD3 | Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SOHLH1 | Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1 |
| SPATA17 | Spermatogenesis associated 17 |
| SPSS | Statistical Package for the Social Sciences |
| ssRNA | single-stranded RNA |
| Su (var) 3-9 | Histonmethyltransferase |
| SYCP 3 | Synaptonemal complex protein 3 |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TDRD1, 2 | Tudor-domain containing protein 1, 2 |
| TGS | Transcriptional Gen Silencing |
| TNP1 | Spermatid nuclear transition protein 1 |

| | |
|-----------|---|
| Tris-HCL | Tris-Hydrogenchlorid |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TSSK 6, 2 | Testis-specific serine kinase 6, 2 |
| U/Min | Umdrehung pro Minute |
| UBR2 | E3 ubiquitin-protein-ligase |
| v. a. | vor allem |
| WHO | World Health Organization |
| z. B. | zum Beispiel |
| Zili | Zebrafish-Piwi-like |
| Ziwi | Zebrafish-Piwi |
| ZRA | Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie |

1 Einleitung

1.1 Infertilität

1.1.1 Definition und Prävalenz

Nach WHO-Definition versteht man unter Infertilität das Nichteintreten einer spontanen Schwangerschaft innerhalb eines Jahres bei einem sexuell aktiven Paar, das keine kontrazeptiven Methoden anwendet (Rowe 1993). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass der Geschlechtsverkehr zur Zeit des Eisprungs mindestens jeden zweiten Tag stattfinden sollte, um eine Konzeption zu ermöglichen, denn sowohl Samen- als auch Eizellen weisen eine begrenzte Überlebenszeit auf (Derouet 1999). Insgesamt bleiben Spermien in der Tuba uterina bis zu 4 Tage befruchtungsfähig (Welsch 2006).

Gnoth und Kollegen erweitern den zeitlichen Rahmen der Diagnose Infertilität auf eine 4 Jahre lang andauernde erfolglose Konzeption, da ein nicht geringer Anteil der Paare innerhalb dieses Zeitraumes ohne reproduktionsmedizinische Maßnahmen doch ein Kind zu zeugen vermag (Gnoth et al. 2004). Daraus ergibt sich, dass die Klassifizierung durch den Begriff Subfertilität erweitert werden sollte. Der Begriff Infertilität impliziert demnach lediglich eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer spontanen Schwangerschaft, wohingegen bei Vorliegen einer Subfertilität eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für eine spontane Konzeption besteht.

Von allen Paaren mit Kinderwunsch verbleiben nach Verstreichen von 6 Menstruationszyklen ca. 20 %, welche als zumindest moderat subfertil eingestuft werden. Bei einer moderaten Subfertilität tritt in den darauffolgenden 6 Menstruationszyklen eine spontane Konzeption ein (was bei ca. 10 % dieser Paare der Fall ist), die anderen 10 % dieser Paare gelten als erheblich subfertil bzw. infertil. Bei einer erheblichen Subfertilität bzw. Infertilität (keine spontane Konzeption innerhalb von 12 Menstruationszyklen) besteht eine ca. 50 %ige Wahrscheinlichkeit für das Eintreten einer spontanen Schwangerschaft innerhalb der darauffolgenden 3 Jahre. Es wird von einer definitiven Infertilität gesprochen, wenn innerhalb von 4 Jahren keine spontane Konzeption eingetreten ist, da nach diesem Zeitraum das Eintreten einer spontanen Schwangerschaft sehr wenig wahrscheinlich ist. Die Rate der ohne reproduktionsmedizinischen Maßnahmen definitiv infertilen Paare liegt bei ca. 5 % (Gnoth et al. 2004).

Weltweit sind ca. 15 % der Paare (geschätzt ca. 48,5 Millionen) von Infertilität betroffen (Sharlip et al. 2002). In 20 - 30 % der Fälle konnten ausschließlich männliche Ursachen für den

unerfüllten Kinderwunsch gefunden werden, in 50 % der Fälle liefern männliche Faktoren einen Beitrag zur Infertilität eines Paares. Dabei liegt die globale Prävalenz der männlichen Infertilität zwischen 2,5 % und 12 %, es sind weltweit ca. 30 Millionen Männer betroffen. In 20 - 70 % der weltweiten Fälle von ungewollter Kinderlosigkeit wurden männliche Faktoren als ursächlich bestimmt. Die höchste Infertilitätsrate wurde in Afrika und Zentral-/Osteuropa gefunden. Die Datenlage zur Prävalenz in Australien, Nordamerika sowie Zentral- und Osteuropa variiert mit 4,5 - 6 %, 9 % sowie 8 - 12 % (zusammengefasst durch Agarwal et al. 2015). Aufgrund der in unterschiedlicher Weise erhobenen sowie fehlenden Daten in vielen Ländern müssen diese Zahlen jedoch mit einer gewissen Skepsis betrachtet werden.

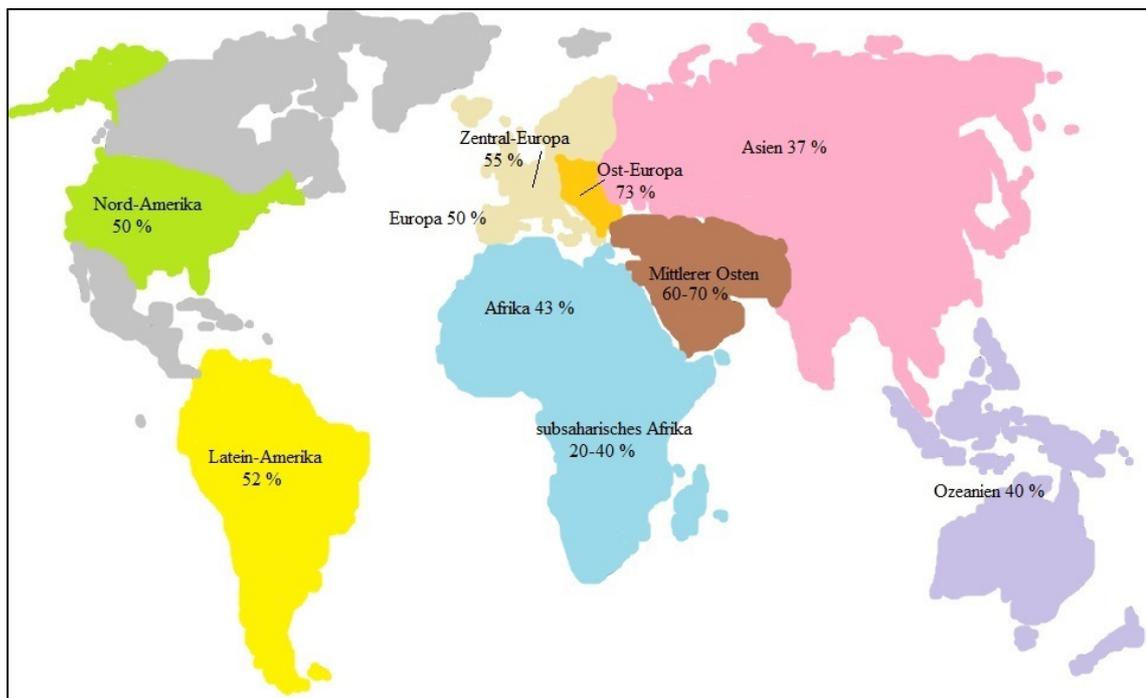


Abb. 1 Anteil der Fälle, bei denen der unerfüllte Kinderwunsch aus männlicher Infertilität resultiert (modifiziert nach Agarwal et al. 2015).

1.1.2 Ursachen

In ca. der Hälfte der Fälle von ungewollter Kinderlosigkeit findet sich die Ursache - zusammen mit auffälligen Spermogrammparametern - beim Mann. Ist die Fertilität sowohl beim Mann als auch bei der Frau eingeschränkt, so potenziert sich die Wahrscheinlichkeit für die Manifestation einer Infertilität, wobei die Fertilität eines Partners die eingeschränkte Fertilität des anderen kompensieren kann (Dunphy et al. 1990). Zu den Hauptursachen der männlichen Infertilität bzw. auffälliger Spermogrammparameter zählen beispielsweise Infektionen des Urogenitaltraktes, kongenitale oder erworbene urogenitale Fehlbildungen, maligne Tumoren, eine erhöhte Skrotaltemperatur, genetische Ursachen, endokrinologische Störungen und immunologische Faktoren (Swerdloff und Wang 2016).

Tab. 1 Ursachen männlicher Infertilität (nach Swerdloff und Wang 2016)

| Idiopathische männliche Infertilität (ca. 40 - 50 %) | |
|--|--|
| Primäre gonadale Funktionsstörung (ca. 30 - 40 %) | |
| Erworbene Störungen | Hyperthermie Hodentorsion, Kastration, andere Traumata Ionisierende Strahlung Virale Orchitis (Arbo-, Mumps-, Echovirus) Systemerkrankungen (Leberzirrhose, Vaskulitis, Tumore) Immunologische Störungen Granulomatöse Orchitis (TBC, Lepra) Substanz-Abusus (Marihuana, Alkohol, Medikamente) Umwelttoxine (Cadmium, Blei, Quecksilber) |
| Angeborene Störungen | Varikozele Klinefelter-Syndrom Deletionen des Y-Chromosoms bzw. der AZF-Region Myotone Dystrophie Kryptorchismus 5-Alpha-Reduktase-Mangel Syndrome mit Androgen-Insensitivität Anorchie |
| Spermientransportstörungen (ca. 10 - 20 %) | |
| Nebenhodendysfunktion | Infektion Substanz-Abusus |
| Störung des Vas deferens | Fehlende anatomische Anlage, Vasektomie Young's Syndrom Infektion |
| Ejakulationsstörung | Autonome Dysfunktion Vorzeitige Ejakulation Funktionsstörung des Rückenmarks |
| Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (ca. 1 - 2 %) | |
| Erworbene Störungen | Nach OP, nach Trauma, nach Radiatio GnRH-Agonisten/-Antagonisten, Opioide, Psychopharmaka Vaskulär bedingt (Aneurysma, Infarkt) Hypophysentumor, Hypothalamustumor Hormonell (erhöhtes Androgen, Estrogen, Cortisol, Prolaktin) |
| Angeborene Störungen | Hämochromatose Kallmann-Syndrom (kongenitale GnRH-Defizienz) Genetisch bedingte Multiorganerkrankungen (Laurence-Moon-Syndrom, Prader-Willi-Syndrom, familiäre cerebelläre Ataxie) |
| Systemische Erkrankungen | Mangelernährung, Adipositas TBC, Pilzinfektionen, Sarkoidose, Histiozytose |

Bei der idiopathischen männlichen Infertilität findet sich keine der zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Ursachen. Dies ist bei ca. 40 % der infertilen Männer der Fall. Bei Patienten mit idiopathischer männlicher Infertilität finden sich im Spermogramm meist eine Oligozoospermie, eine Asthenozoospermie und/oder eine Teratozoospermie. Häufig treten diese Pathologien zusammen auf, sodass man von einem OAT-Syndrom (Oligo-Asthenoteratozoospermie-Syndrom) spricht (EAU Guidelines 2014 Edition).

Kann ein Paar nach einer Schwangerschaft innerhalb eines Jahres kein weiteres Kind zeugen, so spricht man von sekundärer Infertilität. Bei ca. einem Drittel der Fälle liegen die Ursachen hierfür beim Mann. Derzeit wird weithin angenommen, dass die Ursachen für die primäre und sekundäre Infertilität ähnlich sind.

Kontrovers wird die Bedeutung des männlichen Alters im Rahmen der Fruchtbarkeit diskutiert (Katib et al. 2014). Mit zunehmendem Alter nimmt die Qualität der Samenzellen ab, welche ausschlaggebend für das Maß der Fertilität ist (Levitas et al. 2007). Zusätzlich beeinflussen mit dem Alter einhergehende individuelle Risikofaktoren die Samenzell-Qualität. Hierzu zählen niedrige Testosteronlevel, anatomische Veränderungen im Bereich des Hodens, Dysregulationen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse sowie lokale auto-/parakrine Funktionsstörungen. Ebenso beeinflussen Umweltfaktoren, Lebensstil sowie akute und chronische Krankheiten (z. B. Diabetes mellitus, Benigne Prostatahyperplasie) die Spermatogenese (Katib et al. 2014).

Bislang wurden zahlreiche Gene und deren Bedeutung im Rahmen von männlicher Infertilität untersucht. Am besten charakterisiert sind die von Tiepolo und Zuffardi entdeckten Mikrodeletionen in der AZF-Region des langen Arms des Y-Chromosoms bei Männern mit Azoospermie (Tiepolo und Zuffardi 1976). Die AZF-Region (azoospermia-factor-Region) wird in drei Subregionen (AZFa, AZFb, AZFc) unterteilt, in denen bei Männern mit Azoospermie gehäuft Deletionen zu beobachten sind (Vogt et al. 1992). Das *DAZ*-Gen (Deleted in Azoospermia) aus der Region AZFc, welches für ein RNA bindendes Protein codiert, war 1995 das erste identifizierte und bislang bekannteste Gen, dessen Deletion in einer Azoospermie beim betroffenen Mann resultiert.

Neben der Gruppe der *PIWI*-Gene wurden im Rahmen der genetischen Ursachenforschung für männliche Infertilität zahlreiche andere Gene analysiert. Zu den sog. Azoospermia-Culprit-Gene-Groups (Miyamoto et al. 2012) zählt z. B. das *RBMY*-Gen (*RNA-BINDING-MOTIF-GENE*), lokalisiert in der AZFb Region, welches durch Mutation die Stammzellendifferenzierung nach der frühen Meiose zum Stoppen bringt. Es ist ausschließlich in Stammzellen des Hodens zu finden (Elliott et al. 1997).

Gene der Azoospermia-Culprit-Gene-Groups finden sich auch auf Autosomen. Das menschliche *SCYP3*-Gen (codiert für das DNA bindende Protein SYCP3 (Synaptonemal complex protein 3)) befindet sich auf Chromosom 12 und ist spezifisch für das Hodengewebe (Miyamoto et al. 2012). Diesbezüglich homomutante männliche Mäuse sind nicht in der Lage, sich zu reproduzieren, da es zu einem Stillstand der Meiose kommt und sowohl runde als auch verlängerte Spermatiden komplett fehlen. Zudem weisen diese Mäuse keine reifen Samenzellen und einen verkleinerten Hoden auf. Yuan und Miyamoto mit Kollegen untersuchten dieses Gen beim Menschen und konnten bei 2 von 19 Patienten mit Azoospermie und histologisch nachgewiesener Störung in der Meiose eine heterozygote Deletion nachweisen (Yuan et al. 2000; Miyamoto et al. 2012). Analog zu den Ergebnissen bei Mäusen konnten bei diesen Männern histologisch im Hodengewebe keine runden und elongierten Spermatiden sowie keine reifen Samenzellen gefunden werden. Ursache ist der Verlust der Proteinbindungskapazität des SYCP 3 (Miyamoto et al. 2003).

Eine weitere genetische Ursache für männliche Infertilität beim Menschen kann eine homozygote Mutation des *AURKC*-Gens (*AURORA KINASE C*-Gen) darstellen. Dieterich und Kollegen konnten bei infertilen Männern, welche großköpfige, polyploide und multiflagellare Spermatozoen aufwiesen, mittels Mikrosatelliten-Scan eine einzelne Nukleotid-Deletion im Exon 3 der *AURKC*-codierenden Region feststellen. Diese Deletion führt zu einem vorzeitigen Ende der Translation, sodass ein verändertes Protein mit fehlender Kinase-Domain resultiert (Dieterich et al. 2007).

Genetische Polymorphismen, auch wenn diese bezüglich des Einflussmechanismus auf die menschliche Spermatogenese noch nicht ausreichend untersucht sind, scheinen ebenfalls in Zusammenhang mit männlicher Infertilität zu stehen, da bei Männern mit Azoospermie häufiger genetische Polymorphismen nachgewiesen werden können.

Ferner konnten gewisse Umweltfaktoren in Zusammenhang mit auffälligen Spermioigrammparametern gebracht werden. Es konnten bei Arbeitern einer Insektizidfabrik gehäuft Azoospermien und Oligozoospermien nachgewiesen werden (Whorton et al. 1977). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine schlechtere Samenqualität bei Männern mit chronischem Alkoholabusus (Muthusami und Chinnaswamy 2005). Persönlichkeitseigenschaften wie Alexithymie oder die Neigung zu Psychosen konnte bei Männern mit Oligozoospermien im Vergleich zu Männern mit normalen Spermioigrammparametern häufiger beobachtet werden (Gennaro et al. 2003). Männer, welche einer höheren Luftverschmutzung ausgesetzt sind, weisen häufiger pathologische Spermioigrammparameter auf (Selevan et al. 2000).

Nichtsdestotrotz fehlen in ca. 30 % aller Fälle von männlicher Infertilität bzw. Subfertilität kausale Zusammenhänge zwischen einem pathologischen oder genetischen Auslöser und der

gestörten Spermatogenese. Daher besteht weiterhin ein großes Interesse daran, neue genetische Determinanten männlicher Infertilität bzw. Subfertilität zu identifizieren und funktional zu beschreiben. Interessante Kandidaten in diesem Zusammenhang sind die *PIWI*-Gene, eine Subfamilie aus der Klasse der Argonaute-Gene, die bereits im Tiermodell mit einer alterierten Spermatogenese in Verbindung gebracht werden konnten.

1.2 Die Argonaute-Genfamilie

Die Argonaute-Gene zählen neben den Dicer-Genen zu hoch konservierten Genen, die in verschiedenen Organismen eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz sowohl im Rahmen des Transcriptional Gen-Silencing als auch des Posttranscriptional Gen-Silencing und im Zusammenhang damit stehender Signalwege spielen (Carmell et al. 2002). Das Gen-Silencing umfasst unter anderem die epigenetischen Mechanismen der Histonmodifikation oder der DNA-Methylierung, die eine Hemmung der Transkription induzieren und somit eine verminderte Genexpression bewirken. Gen-Silencing-Mechanismen vor und während der Translation, wie z. B. die RNA-Interferenz und der Nonsense-mediated-mRNA-decay, bewirken einen Abbau der mRNA und verhindern somit die Entstehung entsprechender Proteine. Weiterhin nehmen die Argonaute-Gene Einfluss auf die Regulation der Entwicklung und der Selbsterneuerung von Stammzellen diverser Organismen wie *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces pombe*, Mäusen und Menschen (Carmell et al. 2002).

Entsprechend ihrer Sequenzen lassen sich die Argonaute-Gene in zwei Gruppen unterteilen: die Ago-Subfamilie, welche dem Protein Ago1 der Spezies *Arabidopsis thaliana* homolog ist und die *PIWI*-Subfamilie, die Homologien zu dem Protein Piwi aus *Drosophila melanogaster* aufweist (Carmell et al. 2002).

Bei den PIWI-Proteinen handelt es sich um hoch basische Proteine mit einer sogenannten Piwi-Domain, einem etwa 300 Aminosäuren langen Abschnitt in der C-terminalen Region, welche wiederum die sogenannte Piwi-Box enthält (Cerutti et al. 2000). Weiterhin weisen diese Proteine N-terminal eine PAZ-Domäne auf, ein Abschnitt aus 130 Aminosäuren (Cerutti et al. 2000). Die PAZ-Domäne ist essentiell für Protein-Interaktionen und hat eine große Bindungsaffinität zu ssRNAs (einzelsträngige RNAs) und dsRNAs (doppelsträngige RNAs), die jeweils einen einzelsträngigen 3'-Überhang aufweisen (Lingel und Sattler 2005).

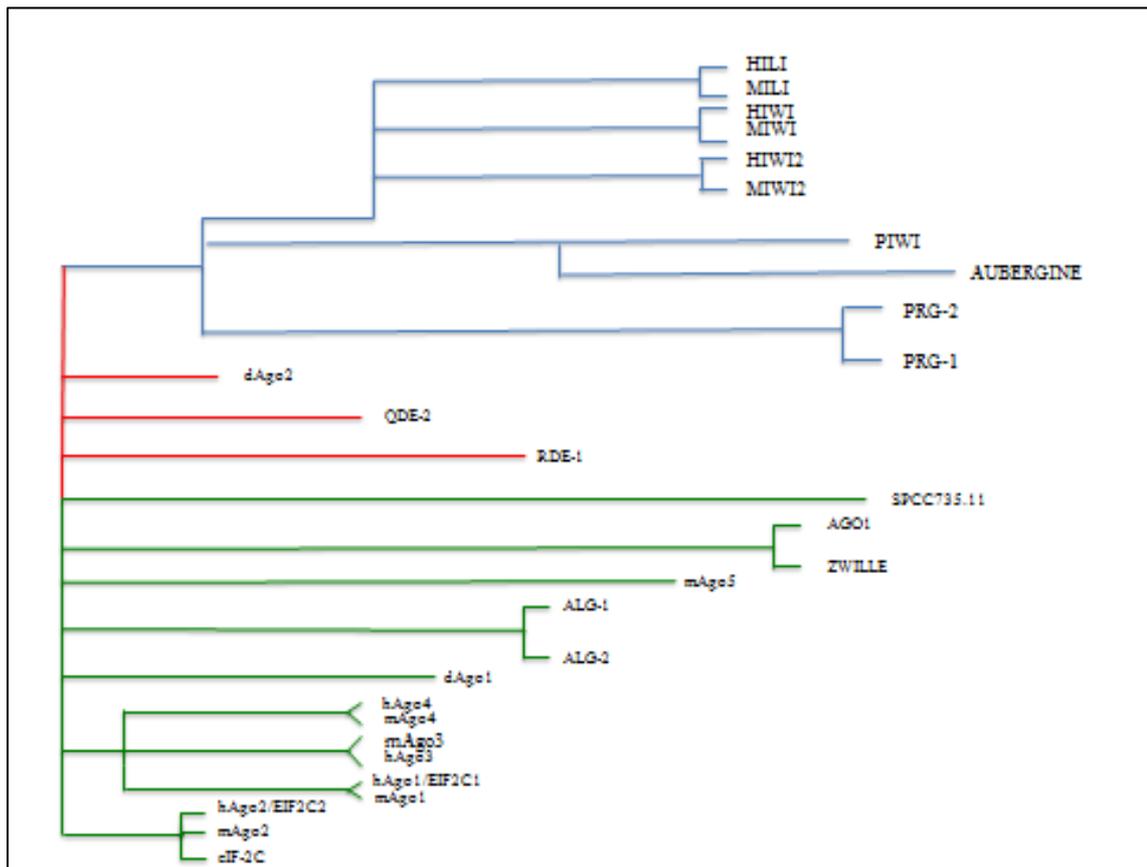


Abb. 2 Phylogenetischer Baum der Argonaute-Familie. Blau: Piwi-Subfamilie, Grün: Ago-Subfamilie, Rot: zu keiner Gruppe gehörig (modifiziert nach Carmell et al. 2002).

1.2.1 Die PIWI-Proteine

Die Argonaute-Subfamilie *Piwi* ist am besten an der Spezies *Drosophila melanogaster* untersucht. Neben den Argonaute-Proteinen Aub, dAgo1 und dAgo2 besitzt Piwi eine bedeutende Rolle bei Selbsterneuerungsmechanismen von Stammzellen sowie der Gametogenese (Carmell et al. 2002; Qiao et al. 2002). Piwi reguliert das Posttranscriptional Gen-Silencing (PTGS) sowie teilweise Prozesse des Transcriptional Gen-Silencing (TGS) (Pal-Bhadra et al. 2002).

HIWI steht für das menschliche Mitglied der PIWI-Protein-Familie: Human PIWI. *HIWI* wird auch als *PIWI-LIKE 1*, *HILI* als *PIWI-LIKE 2*, *HIWI3* als *PIWI-LIKE 3* und *HIWI2* als *PIWI-LIKE 4* bezeichnet.

1.3 Funktionen der PIWI-Proteine

1.3.1 Überblick

Während der Spermatogenese reifen in drei Stadien - Mitose, Meiose und postmeiotische Phase - durch komplexe Prozesse aus undifferenzierten Stammzellen hochspezialisierte Samenzellen heran (Bak et al. 2011). Voraussetzung für eine funktionierende Spermatogenese ist ein präzises, fein koordiniertes System, welches die Protein- und Genexpression genau reguliert (Eddy 2002). Dabei spielen small RNAs eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Genexpression: sie beeinflussen die Translation, die Transkription sowie die Stabilität der RNA (Plasterk 2006). Small interfering RNAs (siRNAs), micro RNAs (miRNAs) und Piwi-interacting RNAs (piRNAs) bilden die drei Hauptgruppen der small RNAs.

In Säugetieren stellt neben der DNA-Methylierung die RNA-Interferenz einen wichtigen Kontrollmechanismus für autonome Retrotransposone - mobile Elemente - dar (Watanabe et al. 2006; Li et al. 1992), welche zum großen Teil funktionslos, aber auch verantwortlich für Mutationen im Genom sein können (Slotkin und Martienssen 2007).

Die Piwi-Proteine, die in den Stammzellen zu finden sind, interagieren mit den piRNAs, nehmen Einfluss auf den Abbau von Ziel-mRNAs und somit auf die Expression von differenzierungsrelevanten Genen. Im Gegensatz zu miRNAs sind piRNAs hauptsächlich im Rahmen der Spermatogenese in pachytenen Spermatozyten und Spermatiden zu finden und essentiell für die Entwicklung der Keimbahnstammzellen hin zu differenzierten Keimzellen (Klattenhoff und Theurkauf 2008).

1.3.2 Bildung und Aufrechterhaltung von Keimbahnstammzellen

In unterschiedlichen Organismen konnte gezeigt werden, dass Piwi-Proteine sowohl in sehr frühen Entwicklungsstadien von Stammzellen als auch in späten Phasen der Spermatogenese exprimiert werden (Thomson und Lin 2009). Untersucht wurden die Mechanismen, durch welche Piwi-Proteine Einfluss auf die Bildung von Stammzellen in der frühen Embryogenese nehmen, erstmals an *Drosophila melanogaster* (Thomson und Lin 2009). Wie Megosh und Kollegen zeigen konnten wird die Bildung von Keimbahnstammzellen durch Piwi kontrolliert. Fehlen einem Embryo die maternalen Piwi-Proteine, nimmt die Keimbahnstammzellbildung eklatant ab (Megosh et al. 2006). Wurde die Menge von maternalen Piwi-Proteinen erhöht, folgte ein proportional verlaufender Anstieg der Keimbahnstammzellbildung. Ähnliches zeigte sich beim Piwi-Homolog Aubergine (Aub): Aub-negative befruchtete weibliche *Drosophila melanogaster* bekamen Embryos, bei denen keine Keimbahnstammzellen nachweisbar waren (Harris und Macdonald 2001).

Piwi-Proteine sind essentiell für die Erneuerung und Aufrechterhaltung von Stammzellen, wie Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* zeigen konnten. Piwi wird in somatischen Zellen und Keimbahnstammzellen sowohl bei weiblichen als auch männlichen *Drosophila melanogaster* exprimiert. Nach der Bildung von primordialen Keimbahnstammzellen ist das Protein im Zellkern lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stammzellteilung durch Piwi-Expression in der Keimbahnstammzelle getriggert wird. Die Funktionen der Piwi-Proteine wurden ausführlich an Loss-of-function-Mutanten untersucht. Piwi-Mutanten konnten keine regelhafte Aufrechterhaltung der Keimbahnstammzellen aufweisen (Cox et al. 1998).

1.3.3 Meiose

Bei Miwi2-mutierten Mäusen kommt es zu einem Stopp der Gametogenese im Leptotän-Stadium der Meiose, bei Mili-Null-Mäusen im Zygotän- oder frühen Pachytän-Stadium. Die veränderten Spermatogonien wiesen Defekte in DNA-Reparaturmechanismen auf, welche bedeutend für die exakte meiotische Rekombination sind. Es ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt, ob Piwi-Proteine selbst eine Rolle während der Meiose spielen oder ob die gestörte Gametogenese auf Piwi-mutierte Keimzellen zurückzuführen ist (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Carmell et al. 2007).

1.3.4 Spermatogenese

Unter Spermatogenese versteht man die Differenzierung der Urkeimzellen zu männlichen Keimzellen. In der dritten Woche der Embryogenese sind sie in der Wand des Dottersackes erkennbar und befinden sich ab der fünften Woche in der indifferenten Gonadenanlage.

Aus den Stammspermatogonien im Hoden bilden sich vor der Geburt und während der Pubertät Spermatogonien, welche sich durch mitotische Teilung vermehren. Dies wird als Spermatozytogenese bezeichnet und sichert eine zeitlebens bestehende Regeneration der Keimzellen. Erst nach der Pubertät erfolgt die Differenzierung der Spermatogonien zu Spermatozyten, Spermatischen und letztendlich zu Spermien (Spermatozoen). Bis zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Spermatogonien in einer Ruhephase. Die Entstehung eines Spermiums aus einer Spermatogonie dauert 64 Tage.

Man unterscheidet Typ A- und Typ B-Spermatogonien, wobei nur bei Spermatogonien vom Typ A eine Stammzellpopulation erhalten bleibt. Durch mitotische Teilung der Typ A-Spermatogonien bilden sich Zwischenstadien: A1 - A4 (Übergangsstadien von Typ A zu Typ B). Primäre Spermatozyten entwickeln sich aus der mitotischen Teilung von Typ B-Spermatogonien, welche aus der Teilung von A4-Spermatogonien hervorgehen (Sadler und Langman 2003).

Darauf folgen im Rahmen der Meiose zwei Reifeteilungen. Nach der ersten Reifeteilung, in der sich die homologen Chromosomen gepaart haben und Chromatidabschnitte ausgetauscht wurden, sind aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten entstanden, die jeweils 23 doppelfädige Chromosomen besitzen. Im Gegensatz zur ersten Reifeteilung geht der zweiten Reifeteilung keine DNA-Verdopplung voraus. Die zweite Reifeteilung wird auch als Reduktionsteilung beschrieben, da durch sie vier Spermatozoen mit jeweils 23 einzelnen Chromosomen (haploider Chromosomensatz) entstehen (Alberts und Nover 2005).

Die erste meiotische Teilung besteht aus mehreren Stadien. Sie beginnt mit der Prophase, welche sich in Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese gliedert. Sie kann sich über mehrere Tage hinziehen. Im Leptotänstadium beginnt die Kondensation der Chromosomen, während des Zygotän erfolgt die Paarung homologer Chromosomen mit Ausbildung des synaptonemalen Komplexes. Dieser reift im Pachytänstadium voll aus. Im Diplotän erfolgt die Trennung der homologen Chromosomen. Mit Beginn der Diakinese ist die DNA-Synthese vollendet, es beginnt die volle Kondensation und die Kernhülle löst sich auf. Der Prophase folgen analog zur Mitose Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (Welsch 2006).

Die Spermio-genese beschreibt die Reifung der Spermatozoen zu Spermien und dauert 24 Tage. Es kommt zur Kondensation des Kernchromatins und zur ringförmigen Anordnung der Mitochondrien um den Schwanzfaden. Das Akrosom, das sich als Kopfkappe über dem vorderen Zellkernpol bildet, entsteht aus einem vom Golgi-Apparat ausgehenden Lysosom. Durch diese Phase entsteht das typische Aussehen der Spermien mit Kopfteil, Mittelstück und Schwanz (Sadler und Langman 2003).

Die Piwi-Proteine von Säugern wurden funktionell zuerst an Miwi (Maus-Piwi) untersucht. Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Protein, das im mittleren Pachytän-Stadium bis zum Spermatozid-Stadium der ersten Reifeteilung von Keimzellen exprimiert wird (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Die Expression der Miwi-Proteine beschränkt sich weitgehend auf den Hoden (Deng und Lin 2002). Männliche Mäuse, bei denen Miwi ausgeschaltet wurde („Miwi-Knock-Out-Mäuse“), sind steril. Es konnte gezeigt werden, dass deren Spermio-genese im frühen Spermatozid-Stadium zum Stillstand kommt (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Miwi ist neben Mvh (Mouse vasa homolog) und Mgc1-1 (Mouse germ cell less-1) essentiell für die Spermio-genese, wohingegen sie für die Entstehung von primordialen Stammzellen sowie die weibliche Gametogenese entbehrlich sind (Deng und Lin 2002). Weiterhin scheint Crem (cAMP-responsive element modulator), ein in Interaktion mit Miwi für die Spermio-genese essentieller Transkriptionsfaktor, bedeutend für die Initiation der Spermio-genese zu sein: in Crem-mutierten Mäusen zeigte sich keine bzw. eine stark reduzierte Expression von Genen, welche normalerweise in postmeiotischen Zellen exprimiert werden. Crem sorgt für die

Umwandlung des runden Spermatids zur reifen Spermatozyte. Ein Komplex aus Miwi mit Act-mRNA (Activator of Crem-mRNA) und Crem-Zielgenen sorgen für die Stabilität der mRNA. Miwi und Crem beeinflussen ihre Expressionsmuster gegenseitig jedoch nicht (Thomson und Lin 2009).

Kuramochi-Miyagawa und Kollegen erzeugten mittels homologer Rekombination männliche Mili-Null-Mäuse und untersuchten in diesem Modell detailliert die Spermatogenese. Das Mili-Gen gehört neben Miwi zu den Maus-Homologen von *PIWI*. Obwohl die Piwi-Proteine bei *Drosophila melanogaster* ausgiebig untersucht wurden, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Homologen in Säugern funktionell identische Aufgaben in der Keimbahn haben, da sich die Entwicklungs- und Differenzierungsmechanismen von *Drosophila melanogaster*-Stammzellen auf molekularer Ebene deutlich unterscheiden (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Es wurde das Proteinexpressionsmuster in heterozygoten Mutanten (Mili +/-), homozygoten Mutanten (Mili -/-) sowie Wild-Typen (Mili +/+) miteinander verglichen. Ausschließlich in den Hoden der homozygoten Mutanten wurde keine Mili-Protein-Expression nachgewiesen. Mili(-/-)-Mäuse wiesen keine Spermien im Nebenhoden auf und sind steril. Die histologischen Analysen der Hoden ausgewachsener Mili(-/-)-Mäuse ergaben ein völliges Fehlen von postmeiotischen Stammzellen. Im Hoden von Mili(+/-)-Mäusen jedoch konnten alle Zelltypen bis zum Spermatid-Stadium nachgewiesen werden. Die Entwicklung sowie die Anzahl von primordialen Keimzellen, in denen die Expression von Mili nachgewiesen werden konnte, zeigten sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mili(+/-)-Mäusen keine Unterschiede zu den Wildtyp-Tieren. Der Stillstand der Spermatogenese bei Mili(-/-)-Mäusen stellt sich vermutlich im Zygotän-Stadium oder dem frühen Pachytän-Stadium ein. Es konnte keine Genexpression solcher Gene nachgewiesen werden, die normalerweise in pachytänen Spermatozyten und in späteren Stadien befindlichen Zellen zu finden sind (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004).

Mvh (Mouse vasa homolog), ein ebenfalls bedeutender Faktor in der post-transkriptionellen Regulation während früher Spermatozyten-Stadien, wird von Mili und Miwi gebunden, sodass davon ausgegangen wird, dass diese Proteine funktionell synergistisch wirken (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass die Spermatogenese von Mvh-genveränderten Mäusen einen Stillstand in ähnlichen Stadien wie bei den Mili-Mutanten zeigt (Tanaka et al. 2000). Die Mvh-Expression erfolgt sehr wahrscheinlich unabhängig von Mili, da es in Mili(-/-)-Hoden nachgewiesen werden konnte (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004).

Die Mili-Protein-Expression erfolgt in früheren Spermatogenese-Stadien, wohingegen Miwi (überlappend mit Mili) in späteren Stadien exprimiert wird. Mili konnte bis zum Pachytän der Spermatogenese, Miwi ab dem mittleren Pachytänstadium bis zum Auftreten elongierter Spermatisden nachgewiesen werden. Entsprechend der jeweiligen Expressionsmuster erfolgt die

Stagnation der Spermatogenese in Miwi(-/-)-Hoden und Mili(-/-)-Hoden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004).

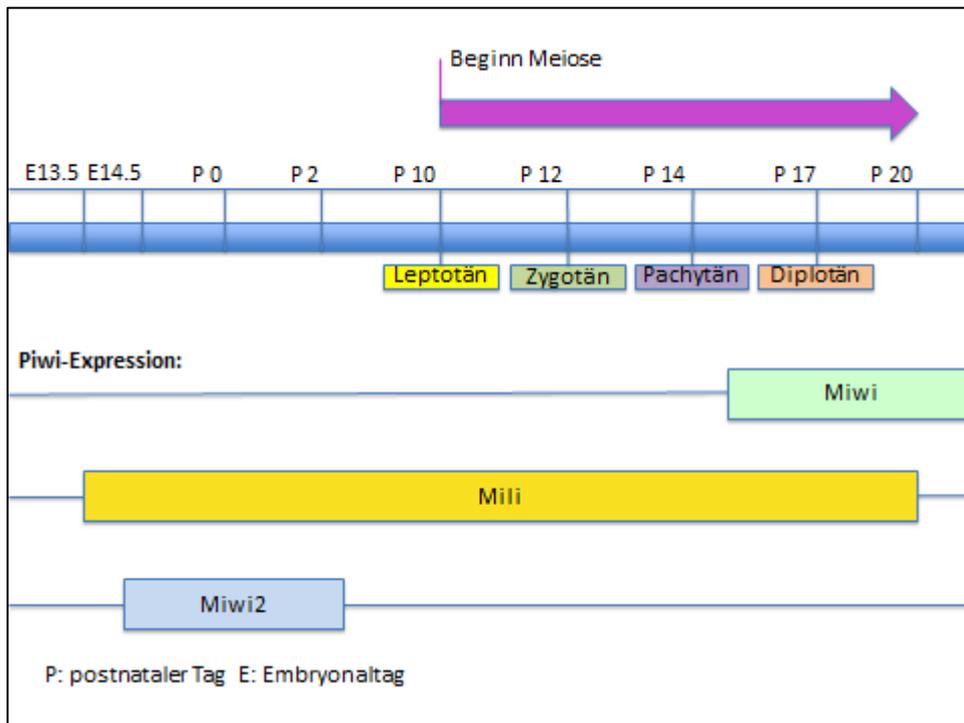


Abb. 3 Rolle der Piwi-like-Proteine bei der Spermatogenese von Säugern (modifiziert nach Bak et al. 2011).

1.3.5 Oogenese

Während die Piwi-Proteine bei der weiblichen Gametogenese von Nicht-Säugern eine Rolle spielen, konnte bisher kein Einfluss derselben während der Oogenese von Säugern festgestellt werden (Thomson und Lin 2009). Weibliche Mili(-/-)-Mäuse sind fertil und zeigen keine strukturellen Veränderungen der Ovarien (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Die Funktion der Piwi-Proteine im Rahmen der Oogenese konnte an *Drosophila melanogaster* und Zebrafisch gezeigt werden. Piwi-Mutationen führten zu sterilen weiblichen *Drosophila melanogaster* durch einen Verlust von Stammzellen und veränderten Oogenese-Stadien (Lin und Spradling 1997), wobei Veränderungen des Aubergine-Gens nachgewiesen werden konnten (Schupbach und Wieschaus 1991). Aufgrund der Aubergine-Proteinexpression in Stammzellen wird angenommen, dass Defekte im Ago3-Gen zu einer gestörten Oogenese führen. Auch Zili- und Ziwi-Mutationen führen zu einer gestörten Oogenese mit folgender Sterilität (Thomson und Lin 2009).

1.3.6 Somatische Funktion

Beim Menschen konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte und außerhalb der Keimbahn auftretende Expression der HIWI-Proteine mit einer erhöhten Karzinomrate einhergeht (Qiao et

al. 2002). Assoziationen mit einer erhöhten *PIWI*-Expression finden sich bei Seminomen, beim Magenkarzinom und beispielsweise beim Adenokarzinom des Pankreas. Dies zeigt, dass die *PIWI*-Proteine nicht nur bei der Entstehung von Keimzelltumoren relevant sind, sondern auch bei Tumoren mesenchymalen oder epithelialen Ursprungs (Qiao et al. 2002). Eine Unterdrückung der *PIWI*-Expression im Tumorgewebe in Zellkulturen verhinderte deren weiteres Wachstum (Liu et al. 2006).

Bei *Drosophila melanogaster* sind Embryonen von Piwi-mutierten weiblichen Fliegen nicht lebensfähig, sodass Piwi für die frühe Embryogenese essentiell ist (Megosh et al. 2006). In gleicher Weise ist das Aubergine-Gen von Bedeutung, dessen Knock-out zu Embryonen mit fehlenden Stammzellen und Bauchdefekten führt (Harris und Macdonald 2001). Weiterhin haben Piwi-Proteine epigenetische Regulationsfunktionen: in Larven und ausgewachsenen *Drosophila melanogaster* binden sie an Chromosomen somatischer Zellen (Pal-Bhadra et al. 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Projekt verfolgte das Ziel, neue Faktoren für Störungen der Spermatogenese auf molekularer und zellulärer Ebene zu identifizieren. Etwa 10 - 15 % der männlichen Bevölkerung sind von Infertilität betroffen. Interessante Kandidaten für potentiell Spermatogenese-alterierende Gene sind die Mitglieder der humanen *PIWI*-Subfamilie der Argonaute-Proteine (*PIWI-LIKE 1 - 4*). Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Selbsterneuerung von Keimbahn-Stammzellen, genauere molekulare Mechanismen sind aber noch nicht geklärt.

Da Argonaute-Proteine sowie assoziierte Proteine bereits im Tiermodell als Kausalfaktoren männlicher Infertilität bzw. eingeschränkter Fertilität identifiziert worden sind, erscheint es sinnvoll, Daten über die humanen Vertreter der Argonaute-Proteine (*PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4*) in Hinblick auf die Samenqualität in Zusammenhang mit der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* zu erheben.

In unserer Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* in humanen ejakulierten Spermatozoen zu messen und geklärt werden, ob die *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in insgesamt 97 Ejakulatproben mit dem Auftreten pathologischer Spermogrammparameter wie einer verminderten Spermienkonzentration, einer herabgesetzten progressiven Motilität, einer geringeren Vitalität, einer auffälligen Konsistenz oder Farbe sowie Morphologie korreliert. Weiterhin sollte die *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in Korrelation zur Expression der Transkriptionsfaktoren NANOG und OCT3/4 sowie *HERV-K* gesetzt werden, da das Expressionsmuster dieser Transkriptionsfaktoren im Rahmen von Spermiogenesestörungen verändert sein kann. Wir wollten analysieren, ob eine signifikante Korrelation der *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression zur Expression der genannten Transkriptionsfaktoren besteht und ob möglicherweise ein Zusammenhang dieser beiden Faktoren mit auffälligen Spermogrammparametern besteht.

Zusammengefasst sollte in diesem Projekt untersucht werden, ob

1. ein Nachweis der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* in humanen ejakulierten Spermatozoen möglich ist
2. die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* statistisch signifikante Korrelationen zu den klassischen Spermienparametern wie Spermienkonzentration, Spermienmotilität und Spermienmorphologie aufweist und somit zur Klassifizierung der Ergebnisse von Ejakulatanalysen nach aktuellen WHO-Leitlinien.

2 Material

2.1 Ejakulatproben

Sowohl pathologische als auch unauffällige Ejakulatproben stammen von Patienten des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie (ZRA) des Universitätsklinikums Halle (Saale), welche bei Verdacht auf Infertilität in Behandlung bei Herrn Prof. Dr. Hermann M. Behre sind bzw. waren. Die Einschlusskriterien umfassten ein Alter von 18 - 80 Jahren sowie die Verdachtsdiagnose männliche Infertilität. Weitere Ejakulatproben stammen von freiwilligen Spendern, vorwiegend von Studierenden der MLU Halle. Weitere Einschlusskriterien lagen für beide Kollektive nicht vor.

Für die Untersuchungen lag ein gültiges Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Halle vor. Alle Männer aus der Kinderwunschsprechstunde des ZRA und alle freiwilligen Spender wurden aufgeklärt und haben eine Einwilligungserklärung unterschrieben.

Es wurden insgesamt 97 Ejakulatproben gewonnen und analysiert, davon waren 54 Proben von Patienten des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale), bei denen ein Verdacht auf männliche Infertilität vorlag, sowie 43 Proben von freiwilligen Spendern. 46 Männer wiesen ein Normospermiogramm auf, 51 Männer ein Spermiogramm mit pathologischen Parametern.

2.2 Chemikalien und Kits

Chemikalien:

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| Aceton | Fluka (Neu-Ulm) |
| Agarose | Serva (Heidelberg) |
| Borsäure | Roth (Karlsruhe) |
| DEPC-H ₂ O | Invitrogen (Karlsruhe) |
| dATP, dCTP, dGTP, dTTP | Promega (Heidelberg) |
| DNA-Standard (100 bp-Leiter) | Invitrogen (Eggenstein) |
| EDTA | Roth (Karlsruhe) |
| Essigsäure | Merck (Darmstadt) |
| Ethanol (96 %) | Merck (Darmstadt) |

| | |
|-------------------|------------------------|
| Ethidiumbromid | Serva (Heidelberg) |
| Isopropanol | Roth (Karlsruhe) |
| Natrium-Acetat | Serva (Heidelberg) |
| 2-Mercaptoethanol | Merck (Darmstadt) |
| Random Primer | Invitrogen (Karlsruhe) |

Kits und Enzyme:

| | |
|---|---------------------------------------|
| BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| DNase, RNase-free (1500 Kunitz-Units) | Qiagen (Hilden) |
| HotStartTaq DNA Polymerase | Qiagen (Hilden) |
| QuantiTect Sybr Green PCR Kit | Qiagen (Hilden) |
| RNAeasy Mini Kit | Qiagen (Hilden) |
| RNasin Ribonuclease Inhibitor | Promega (Heidelberg) |
| Reverse Transkriptase | Invitrogen (Karlsruhe) |

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------------|----------------------------|
| Bechergläser | Merck (Darmstadt) |
| BioDocAnalyze (Gelauswertung) | Biometra (Göttingen) |
| Einweg-Handschuhe | Merck (Darmstadt) |
| Elektrophorese-Gerät | BioPlex (Freiburg) |
| Laminarbox | Heraeus (Hanau) |
| Magnetrührer | IKA-Labortechnik (Staufen) |
| Magnetrührstäbchen | Merck (Darmstadt) |
| Messzylinder | Merck (Darmstadt) |
| Mettler AM 100 (Analysewaage) | Mettler (Giessen) |
| Mikropipetten | Eppendorf (Hamburg) |
| Parafilm | Merck (Darmstadt) |
| pH-Meter CG 840 | Schott (Hofsheim) |

| | |
|--|----------------------------|
| „Pipetboy“ (automatische Pipette) | Bioscience (Fernwald) |
| Pipetten | Nunc (Wiesbaden-Biebrich) |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf (Hamburg) |
| Rotorgene 2000 (real-time-cycler) | LTF (Wasserburg) |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf (Hamburg) |
| Trio-Thermoblock TB1 | Biometra (Göttingen) |
| Ultraspec III (UV/VIS Spektrophotometer) | Pharmacia (Freiburg) |
| Universal-30 RF (Zentrifuge) | Hettich (Tuttlingen) |
| Vortex-Schüttler VF2 | IKA-Labortechnik (Staufen) |

2.4 Puffer, Medien und Lösungen

Agarosegel-Elektrophorese:

TBE (10 x) (pH 8, 0):

108 g Tris-HCl

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA

mit destilliertem H₂O auf ein Volumen von 1 l auffüllen

10 x DNA-Auftragspuffer (Xylencyanol; läuft in gleicher Höhe wie etwa 700 bp):

1,8 g Ficoll 400

25 mg Xylencyanol

mit destilliertem H₂O auf 10 ml auffüllen

10 x DNA-Auftragspuffer (Bromphenolblau; läuft in gleicher Höhe wie etwa 200 bp):

20 % Ficoll 400

0,05 M EDTA

0,25 % Bromphenolblau

5,7 % Eisessig

3 Methoden

3.1 Studiendesign, Erstellung der Spermioogramme und Probenverwahrung

Es handelt sich um eine prospektive wissenschaftliche Studie, bei der männliche Patienten aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie eingeschlossen wurden, die aufgrund der Verdachtsdiagnose männliche Infertilität untersucht und behandelt wurden, sowie freiwillige Spender mit hauptsächlich unbekanntem Fertilitätsstatus. Das Mindestalter betrug 18 Jahre, eine unterschriebene Einverständniserklärung lag vor.

Die Spermioogramme wurden von Frau Constanze Kloß, MTLA im Labor des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie an der Uniklinik Halle - entsprechend der Richtlinien und Referenzwerte des WHO Laborhandbuches zur Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates, 5. Auflage (2010) - erstellt. Es wurden ausschließlich Ejakulatproben nach Einhaltung einer Mindest-Karenzzeit von 5 Tagen verwendet.

Das Ejakulat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4000 U/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, während die entstandenen Pellets in den Reaktionsgefäßen verblieben. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung bei -80 °C.

3.2 RNA-Isolation mittels Trizol-Methode

Die RNA-Isolation mittels Trizol-Methode ist auch unter dem Namen Single-Step-Methode bzw. Methode nach Chomczynski und Sacchi 1987 bekannt. Das in Trizol enthaltene Guanidinisothiocyanat (GTC) bewirkt die Denaturierung und die Inaktivierung der RNAsen. Durch Phenol können sich DNA und Proteine lösen. Die Phasentrennung wird durch die Zugabe von Chloroform und Zentrifugieren erreicht. Die wässrige Oberphase enthält die RNA, welche mittels Isopropanol präzipitiert wird.

Das durch Zentrifugation entstandene Pellet wurde unter dem Abzug in 700 µl Trizol gelöst und anschließend 10 Sekunden lang gevortext. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (etwa 21 °C) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform unter dem Abzug. Durch kräftiges Schütteln der Tubes per Hand für 2 Minuten erfolgte eine Trübung der Probe als Zeichen des Ausfallens der Proteine. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation (12.000 U/Minute) bei 4 °C. Die wässrige Oberphase wurde mit der Pipette abgenommen (ein Volumen von ca. 500 µl) und in ein neues 2 ml Tube überführt.

Es wurde dabei besonders darauf geachtet, dass die Proteinphase nicht verletzt wurde, um eine Verunreinigung der RNA in der wässrigen Phase zu vermeiden.

Der Oberphase wurden 10 μ l DNase und 60 μ l RDD-Puffer zugefügt. Die Mischung erfolgte durch Invertieren. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 500 μ l Isopropanol (96 % Ethanol) zugegeben und die Probe für 20 Sekunden gevortext.

Nach einer Lagerung der Probe bei -20 °C für mindestens 12 Stunden erfolgte eine Zentrifugation (12.000 U/Minute) bei 4 °C.

Der erste Waschschrift erfolgte nach Dekantieren des Überstandes durch Zugabe von 1000 μ l eisgekühltem 96 % Ethanol. Danach wurde eine weitere Zentrifugation mit 12000 U/Minute bei 4 °C vorgenommen. Mit 700 μ l eisgekühltem 70 % Ethanol wurde die Probe ein zweites Mal gewaschen und anschließend wiederum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Hierfür wurden noch vorhandene Tropfen abpipettiert und die Reaktionsgefäße geöffnet auf den Kopf gestellt.

Die Lösung der Pellets erfolgte durch Zugabe von 20 μ l RNase-freiem Wasser (DEPC-behandeltes Wasser für die Molekularbiologie) und anschließendem Vortexen.

Die Messung der Konzentration erfolgte mit dem Photometer (OD260-Messung).

Ein OD von 1 entsprach 40 ng/ μ l RNA. Zusätzlich wurde der A_{260}/A_{280} -Wert (R-Wert) bestimmt und dokumentiert, um phenolische Verunreinigungen der RNA-Präparation detektieren zu können. Idealerweise lag der R-Wert zwischen 1,6 und 2,0.

3.3 cDNA-Synthese

Als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-Time-PCR zur Bestimmung der *PIWI*-Gen-mRNA-Expression bzw. zur Quantifizierung der Genexpression wurde die stabilere cDNA benötigt. Zur Herstellung der complementary DNA wurde die Gesamt-RNA verwendet, die zusammen mit den Primern erhitzt wurde um deren Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Damit die Primer hybridisieren konnten, musste der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reversen Transkriptase, des Puffers, der Nucleotide und der RNase-Inhibitoren.

Es wurden Hexamer-Primer mit zufälligen Sequenzen verwendet (Random Primer), um lange mRNAs nachweisen zu können. Random Hexamers hybridisieren an zufällig ausgewählten mRNA-Strukturen, sodass alle RNA-Bereiche in der cDNA vertreten sind (tRNA, mRNA, non-coding RNA).

Die Reverse Transkriptase MuLV-RT (Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNase-H-Aktivität. Ihr Arbeitsoptimum befindet sich bei 37 °C. Da die MMLV-RT eine eher schwächere RNase-Aktivität aufweist (im Vergleich zu anderen Reversen Transkriptasen), entstehen längere cDNA-Transkripte, da die mRNAs länger stabil bleiben.

Zunächst erfolgte die Herstellung des Pre-Annealing-Mix. Nach der Messung der RNA-Konzentration wurde das Volumen x ermittelt, welches 2 µg RNA enthielt. Dieses Volumen x wurde zu 1 µl Random Primer und y µl Wasser ($x + y = 10$ µl) pipettiert, sodass man 11 µl Pre-Annealing-Mix erhielt. Die RNA wurde vorher nochmal gemischt bzw. gevortext. Lag das RNA-Volumen über 10 µl, so wurden 10 µl RNA pipettiert.

Der Pre-Annealing-Mix wurde für 5 Minuten bei 65 °C im Cycler inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Während des ersten Schrittes im Cycler konnte der Mastermix (Reaktionsansatz) hergestellt werden. Pro Tube wurden 4 µl Puffer (5 x), 2 µl dNTPs, 2 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Reverse Transkriptase zu einem Reaktionsansatz von insgesamt 9 µl pipettiert. Aufgrund der Pipettier-Ungenauigkeiten wurde empfohlen, etwas mehr Master-Mix als errechnet herzustellen.

Der Master-Mix wurde zum Pre-Annealing-Mix pipettiert (9 µl pro Mastermix pro Tube) und die Tubes anschließend an zentrifugiert.

Die weiteren Schritte im Cycler-Programm gestalteten sich wie folgt: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 75 °C.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Echt-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zu Quantifizierung von Nukleinsäuren. Mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) gelingt es, eine PCR-Reaktion zu verfolgen und unvermeidliche Artefakte von korrekten Produkten zu unterscheiden. Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich mit Licht bestimmter Wellenlänge anregen und emittieren wiederum Licht mit einem bestimmten Spektrum. Für jeden Farbstoff ist das Absorptions- und Emissionsspektrum charakteristisch. Werden zwei Fluorochrome räumlich nahe beieinander platziert, kann durch Anregung des ersten Fluorchroms die Energie direkt auf das zweite Fluorochrom übertragen werden (das Anregungsspektrum des zweiten Farbstoffes muss dem Emissionsspektrum des ersten entsprechen), welches Licht seines charakteristischen Spektrums emittiert. Daraus lässt sich auf die räumliche Entfernung der beiden Fluorochrome schließen, je nachdem, ob die Lichtstärke des ersten Fluorchroms oder des zweiten registriert

wird. Misst man die Emission des ersten Fluorchroms, so wird dieses als Reporter bezeichnet und das zweite als Quencher.

Beim Taq-Man-Prinzip (Livak et al. 1995) befinden sich Reporter und Quencher auf demselben Oligonukleotid. Bei intaktem Oligonukleotid ist die Lichtemission des ersten Fluorchroms gering. Da die Polymerase den Reporter jedoch freisetzt, steigt die Lichtstärke - entsprechend der Zunahme der DNA-Synthese - an.

Zur Quantifizierung wird die Kinetik der PCR-Reaktion herangezogen und nicht die absolute Menge an PCR-Produkt. Zu Beginn findet weitgehend eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt, welche über einen linearen Verlauf letztendlich zum Stillstand kommt. Die Orientierung erfolgt an der Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal noch deutlich vom Hintergrund abhebt (Cycle Threshold, Threshold Cycle).

Für die quantitative real-time-PCR wurde ein Reaktionsansatz auf Eis erstellt. Zur Reaktionslösung, bestehend aus 9,1 µl H₂O, 1,5 µl 10x Puffer, 1,2 µl MgCl₂, 1 µl TaqMan-Primer für *PIWI-LIKE 2* oder *PIWI-LIKE4*, 1,0 µl dNTPs (2,5 mM) sowie 0,2 µl HotStart Taq-Polymerase, wurden je 1 µl der entsprechenden cDNA zugegeben und gut gemischt. Die Reaktion im real-time-Cycler (MyIQ, Biorad) verlief wie folgt: 1. 10 Minuten bei 95 °C, 2. 30 Sekunden bei 95 °C und 3. 1 Minute bei 60 °C mit folgendem Fluoreszenzdetektionsschritt, wobei Schritt 2-3 40 x wiederholt wurde. Die Rohdaten wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen 2001) ausgewertet, wobei die mRNA-Expression von HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) als Referenz diente.

Für die weiteren statistischen Berechnungen wurde ebenfalls die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 1* und *PIWI-LIKE 3* sowie von OCT3/4, NANOG und *HERV-K* verwendet. Diese wurden aus den in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Proben durch Fr. Dr. Carina Mösinger (*PIWI-LIKE 1* und *PIWI-LIKE 3*) bzw. Fr. Dipl.-Biochem. Maria Giebler bestimmt und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

3.5 Definition und Referenzwerte der Ejakulatparameter

Tab. 2 Definition und untere Grenzen der Referenzwerte der Ejakulatparameter (World Health Organization 2010). Referenz-Grenzwert: untere 5 %-Perzentile (95 %-KI)

| | |
|-------------------------------------|--|
| Aspermie | Keine Samenflüssigkeit (keine/retrograde Ejakulation) Volumenreferenzwert: 1,5 ml (1,4 - 1,7 ml) |
| Asthenozoospermie | Progressiv-motile Spermien (PR) < 32 % (31 – 34 %) |
| Asthenoteratozoospermie | Progressiv-motile Spermien (PR) < 32 % (31 – 34 %) und morphologisch normale Spermien < 4 % (3 – 4 %) |
| Azoospermie | Keine Spermien im Ejakulat |
| Kryptozoospermie | Keine Spermien im Ejakulat (nur im zentrifugierten Pellet) |
| Hämospermie | Nachweis von Erythrozyten im Ejakulat |
| Leukospermie | Nachweis von Leukozyten im Ejakulat > 1,0 x 10 ⁶ /ml |
| Nekrozoospermie | Geringer Prozentsatz von lebenden Spermien und hoher Prozentsatz von immotilen Spermien im Ejakulat |
| Normozoospermie | Spermienkonzentration ≥ 15 x 10 ⁶ /ml (12 – 16 x 10 ⁶ /ml) und progressiv-motile Spermien (PR) ≥ 32 % (31 – 34 %) und morphologisch normale Spermien ≥ 4 % (3 – 4 %) |
| Oligoasthenozoospermie | Spermienkonzentration < 15 x 10 ⁶ /ml (12 – 16 x 10 ⁶ /ml) und progressiv-motile Spermien (PR) < 32 % (31 – 34 %) |
| Oligoasthenoteratozoospermie | Spermienkonzentration < 15 x 10 ⁶ /ml (12 – 16 x 10 ⁶ /ml) und progressiv-motile Spermien (PR) < 32 % (31 – 34 %) und morphologisch normale Spermien < 4 % (3 – 4 %) |
| Oligoteratozoospermie | Spermienkonzentration < 15 x 10 ⁶ /ml (12 – 16 x 10 ⁶ /ml) und morphologisch normale Spermien < 4 % (3 – 4 %) |
| Oligozoospermie | Spermienkonzentration < 15 x 10 ⁶ /ml (12 – 16 x 10 ⁶ /ml) |
| Teratozoospermie | Morphologisch normale Spermien < 4 % (3 – 4 %) |

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Analyse der Daten erfolgte mittels T-Tests, bivariater Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho und Chi-Quadrat-Tests. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammensetzung der Studienkohorte

Die gesamte Studienkohorte besteht aus 97 Ejakulatproben, 43 Proben stammen von freiwilligen Spendern, 54 Proben stammen von Männern aus der Kinderwunschsprechstunde des ZRA der Universitätsklinik Halle (Saale). 46 Proben weisen ein normwertiges Spermogramm auf und werden mit Normozoospermie beschrieben, 51 Ejakulatproben zeigen auffällige Spermogrammparameter und bilden das Kollektiv „pathologische Spermogramme“.

Unter den 43 Ejakulatproben der freiwilligen Spender gibt es lediglich eine Probe mit auffälligem Spermogramm im Sinne einer Oligozoospermie.

4.1.1 Beschreibung der Normospermogramme

46 Ejakulatproben weisen entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation ein normwertiges Spermogramm auf mit einer Konzentration von Spermien im Ejakulat $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$, einem Anteil von progressiv-motilen Spermien $\geq 32 \%$ sowie einem Anteil an morphologisch normalen Spermien von $\geq 4 \%$ (World Health Organization 2010). Die Anzahl der normwertigen Spermogramme entspricht einem Anteil von 47,4 % der Gesamtkohorte.

Das mittlere Alter beträgt 28,5 Jahre, der Median liegt bei 28 Jahren. Das Ejakulatvolumen beträgt im Mittel 3,9 ml, der Median 4 ml. Der mittlere pH-Wert ist 8,2, der Median ergibt 8,3. Der Mittelwert für die Spermienkonzentration lautet $91,1 \times 10^6/\text{ml}$, der Medianwert $68,7 \times 10^6/\text{ml}$. 19,4 % der Spermien weisen im Mittel eine normale Morphologie auf, der Median der morphologischen Normalformen ergibt 19 %. Die mittlere progressive Motilität ist 52,5 %, die mediane progressive Motilität liegt bei 50 %.

Bei 31 von 46 Proben mit Angaben zur Karenzzeit ergibt der Mittelwert 5 Tage und gleicht dem Median. Informationen über die Vitalität erhielten wir von 27 Ejakulatproben, welche im Mittel bei 78,7 % liegt. Der Median der Vitalität beträgt 83 %. Der mittlere pH-Wert liegt bei 8,2, der pH-Median bei 8,3.

Tab. 3 Männer mit Normospermiogramm; N = 46 (47,4 % der Gesamtkohorte)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 46 | 28 | 28,5 |
| Karenzzeit (Tage) | 31 | 5 | 5 |
| Vitalität (%) | 27 | 83 | 78,7 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 46 | 4 | 3,9 |
| pH-Wert | 46 | 8,3 | 8,2 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | 46 | 68,7 | 91,1 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 46 | 19 | 19,4 |
| Progressive Motilität (%) | 46 | 50 | 52,5 |

4.1.2 Beschreibung der pathologischen Spermiogramme

Die Unterteilung der pathologischen Spermiogramme erfolgt in Azoospermie, Oligozoospermie, Oligoasthenozoospermie, Oligoteratozoospermie, Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom), Kryptozoospermie, Asthenozoospermie und Asthenoteratozoospermie.

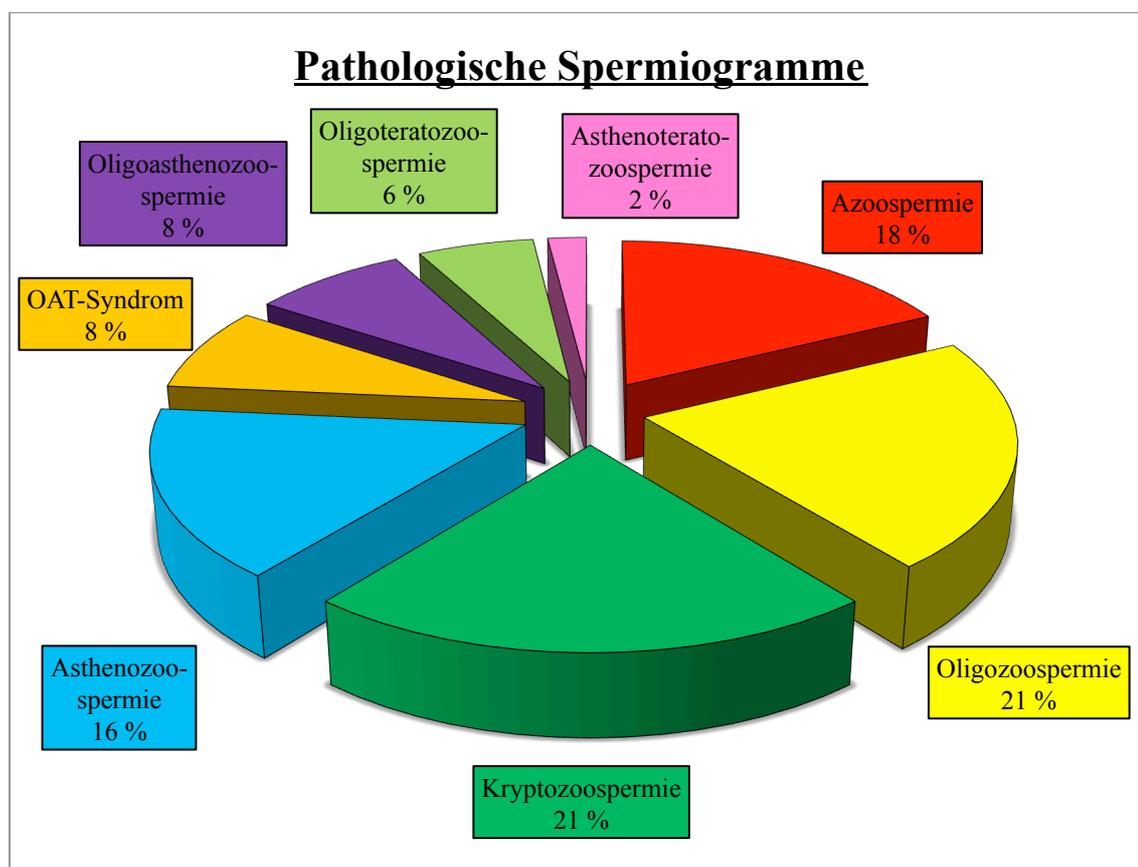


Abb. 4 Aufteilung der pathologischen Spermiogramme nach aktueller WHO-Klassifikation

Eine Azoospermie liegt bei 9 Proben der Kohorte vor, was einem prozentualen Anteil an der Gesamtkohorte von 9,3 % und an der Kohorte der pathologischen Spermioogramme von 17,6 % entspricht. Daten zur Spermienmorphologie und Spermienkonzentration, zur Vitalität sowie zur progressiven Motilität erübrigen sich bei der Diagnose Azoospermie. Im Mittel sind die Männer mit dieser Diagnose 34,7 Jahre alt, der Medianwert beträgt 33 Jahre. Die mittlere Karenzzeit beträgt 3,4 Tage, die mediane Karenzzeit 3,5 Tage. Der Mittelwert des pH-Wertes liegt bei 7,9, der Medianwert bei 8,3. Daten bezüglich des Ejakulatvolumens liegen bei 7 Proben vor. Hier beträgt der Mittelwert 1,4 ml, der Medianwert 0,8 ml.

Tab. 4 Männer mit Azoospermie; N = 9 (9,3 % der Gesamtkohorte; 17,6 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 9 | 33 | 34,7 |
| Karenzzeit (Tage) | 8 | 3,5 | 3,4 |
| Vitalität (%) | - | - | - |
| Ejakulatvolumen (ml) | 7 | 0,8 | 1,4 |
| pH-Wert | 8 | 8,3 | 7,9 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | - | - | - |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | - | - | - |
| Progressive Motilität (%) | - | - | - |

Insgesamt 11 Proben erfüllen die Kriterien für eine Oligozoospermie und entsprechen somit 11,3 % der Gesamtkohorte sowie 21,6 % der pathologischen Spermioogramme. Darunter befinden sich 4 Proben mit Oligoasthenozoospermie, 3 Proben mit Oligoteratozoospermie und 4 Proben mit Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom).

Das mittlere Alter der Männer beträgt 30 Jahre, das mediane Alter 29 Jahre. Bei 7 der 11 Proben liegen Daten zur Vitalität und Karenzzeit vor: der Mittelwert für die Karenzzeit beträgt 3,9 Tage, der Medianwert 4 Tage. Der Mittelwert für die Vitalität findet sich bei 79,3 %, der Medianwert bei 80 %. Das mittlere Ejakulatvolumen liegt bei 4,2 ml, das mediane Volumen bei 4 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel bei 8,2, im Median bei 8,3. Bei einer der 11 Proben konnten keine Daten zum pH-Wert erhoben werden. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel $10,7 \times 10^6/\text{ml}$, im Median $9,3 \times 10^6/\text{ml}$. Der Mittelwert für die normale Spermienmorphologie ist 11 %, der Medianwert 8 %. Die mittlere progressive Motilität findet sich bei 42 %, die mediane progressive Motilität bei 40 %.

Tab. 5 Männer mit Oligozoospermie N = 11 (11,3 % der Gesamtkohorte; 21,6 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 11 | 29 | 30 |
| Karenzzeit (Tage) | 7 | 4 | 3,9 |
| Vitalität (%) | 7 | 80 | 79,3 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 11 | 4 | 4,2 |
| pH-Wert | 10 | 8,3 | 8,2 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | 11 | 9,3 | 10,7 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 11 | 8 | 11 |
| Progressive Motilität (%) | 11 | 40 | 42 |

Eine Oligoasthenozoospermie liegt bei 4 der 11 Oligozoospermien vor, was einen Anteil von 4,1 % an der Gesamtkohorte und einen Anteil von 7,8 % der Nicht-Normozoospermien ausmacht.

Das mittlere sowie das mediane Alter der Männer betragen 28 Jahre. Bei einer der vier Proben ist die Karenzzeit bekannt: der Mittelwert für die Karenzzeit beträgt ebenso wie der Medianwert 4 Tage. Der Mittelwert für die Vitalität gleicht dem Medianwert und findet sich bei 62,5 %. Diese Werte werden jedoch nur aus 2 der 4 Proben ermittelt. Das mittlere und mediane Ejakulatvolumen liegt bei 2,2 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel bei 8,2, im Median bei 8,3. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel $9,4 \times 10^6/\text{ml}$, im Median $7,6 \times 10^6/\text{ml}$. Der Mittelwert für die normale Spermienmorphologie ist 13 %, der Medianwert 10 %. Die mittlere progressive Motilität findet sich bei 23 %, die mediane progressive Motilität bei 28 %.

Tab. 6 Männer mit Oligoasthenozoospermie; N = 4 (4,1 % der Gesamtkohorte; 7,8 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 4 | 28 | 28 |
| Karenzzeit (Tage) | 1 | 4 | 4 |
| Vitalität (%) | 2 | 62,5 | 62,5 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 4 | 2,2 | 2,2 |
| pH-Wert | 4 | 8,3 | 8,2 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | 4 | 7,6 | 9,4 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 4 | 10 | 13 |
| Progressive Motilität (%) | 4 | 28 | 23 |

Die Kriterien für eine Oligoteratozoospermie erfüllen 3 Proben der Gesamtkohorte (entsprechend 3,1 %). Sie machen 5,9 % der pathologischen Spermioogramme aus.

Das mittlere sowie das mediane Alter der Männer betragen 31 Jahre. Der Mittelwert für die Karenzzeit beträgt 3,3 Tage, der Medianwert 4 Tage. Der Mittelwert für die Vitalität findet sich bei 53,7 %, der Medianwert bei 60 %. Das mittlere Ejakulatvolumen liegt bei 3,2 ml, das mediane Volumen bei 3,5 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel bei 8,2, im Median bei 8,3. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel $9,6 \times 10^6/\text{ml}$, im Median $8,6 \times 10^6/\text{ml}$. Sowohl der Mittelwert als auch der Medianwert für die normale Spermienmorphologie liegen bei 3 %. Die mittlere und mediane progressive Motilität finden sich bei 40 %.

Tab. 7 Männer mit Oligoteratozoospermie N = 3 (3,1 % der Gesamtkohorte; 5,9 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 3 | 31 | 31 |
| Karenzzeit (Tage) | 3 | 4 | 3,3 |
| Vitalität (%) | 3 | 60 | 53,7 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 3 | 3,5 | 3,2 |
| pH-Wert | 3 | 8,3 | 8,2 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | 3 | 8,6 | 9,6 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 3 | 3 | 3 |
| Progressive Motilität (%) | 3 | 40 | 40 |

Die Kriterien für eine Oligoasthenoteratozoospermie erfüllen 4 Proben der Gesamtkohorte (entsprechend 4,1 %). Sie machen 7,8 % der auffälligen Spermioogramme aus.

Das mittlere sowie das mediane Alter der Männer betragen 36 Jahre. Der Mittelwert für die Karenzzeit beträgt 4,7 Tage, der Medianwert 4 Tage, wobei der Wert für eine Probe nicht zu erheben war. Bei 2 Proben liegen Werte zur Vitalität vor: Sowohl der Mittelwert als auch der Medianwert für die Vitalität betragen 45,5 %. Für 3 der 4 Proben ergab das mittlere Ejakulatvolumen 4,4 ml, das mediane Volumen 3,7 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel und im Median bei 8,3. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel $9,3 \times 10^6/\text{ml}$, im Median $7,6 \times 10^6/\text{ml}$. Sowohl der Mittelwert als auch der Medianwert für die normale Spermienmorphologie liegen bei 2 %. Die mittlere progressive Motilität findet sich bei 28 %, die mediane progressive Motilität bei 30 %.

Tab. 8 Männer mit Oligoastheneratozoospermie; N = 4, (4,1 % der Gesamtkohorte; 7,8 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|---|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 4 | 36 | 36 |
| Karenzzeit (Tage) | 3 | 4 | 4,7 |
| Vitalität (%) | 2 | 45,5 | 45,5 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 3 | 3,7 | 4,4 |
| pH-Wert | 4 | 8,3 | 8,3 |
| Spermienkonzentration ($10^6/ml$) | 4 | 7,6 | 9,3 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 4 | 2 | 2 |
| Progressive Motilität (%) | 4 | 30 | 28 |

Eine Kryptozoospermie liegt bei 11 Proben der Gesamtkohorte (entsprechend 11,3 %) vor. Sie machen 21,6 % der auffälligen Spermioogramme aus.

Das mittlere Alter der Männer liegt bei 35 Jahren, das mediane Alter bei 33 Jahren. Der Mittelwert für die Karenzzeit beträgt 4,6 Tage, der Medianwert 3 Tage, wobei nur Daten zu 10 Proben erhoben werden konnten. Die mittlere Vitalität bei 8 der 11 Proben beträgt 45 %, die mediane Vitalität 42,5 %. Das mittlere Ejakulatvolumen liegt bei 2,6 ml, das mediane Volumen bei 2,5 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel und im Median bei 8,3. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel und im Median $0,3 \times 10^6/ml$. Der Mittelwert für die normale Spermienmorphologie liegt bei 5,5 %, der Medianwert bei 4,5 %. Die mittlere progressive Motilität findet sich bei 25,8 %, die mediane progressive Motilität bei 30 %.

Tab. 9 Männer mit Kryptozoospermie; N = 11 (11,3 % der Gesamtkohorte; 21,6 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|---|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 11 | 33 | 35 |
| Karenzzeit (Tage) | 10 | 3 | 4,6 |
| Vitalität (%) | 8 | 42,5 | 45 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 11 | 2,5 | 2,6 |
| pH-Wert | 11 | 8,3 | 8,3 |
| Spermienkonzentration ($10^6/ml$) | 11 | 0,3 | 0,3 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 6 | 4,5 | 5,5 |
| Progressive Motilität (%) | 11 | 30 | 25,8 |

Die Kriterien für eine Asthenozoospermie erfüllen 8 Proben der Gesamtkohorte (entsprechend 8,2 %). Sie machen 15,7 % der pathologischen Spermioogramme aus.

Das mittlere Alter der Männer beträgt 33 Jahre, das mediane Alter 32 Jahre. Der Mittelwert für die Karenzzeit liegt bei 4,3 Tagen, der Medianwert bei 4 Tagen. Zu 3 der 8 Proben liegen Daten zur Vitalität vor: die mittlere Vitalität beträgt 76 %, die mediane Vitalität 79 %. Das mittlere Ejakulatvolumen liegt bei 3,2 ml, das mediane Volumen bei 3 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel und im Median bei 8,3. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel $79,9 \times 10^6/\text{ml}$, im Median $85,5 \times 10^6/\text{ml}$. Sowohl der Mittelwert als auch der Medianwert für die Spermienmorphologie liegen bei 9 %. Die mittlere progressive Motilität findet sich bei 23 %, die mediane progressive Motilität bei 28 %.

Tab. 10 Männer mit Asthenozoospermie; N = 8 (8,2 % der Gesamtkohorte; 15,7 % der pathologischen Spermiogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|--|--------|--------|------------|
| Alter der Männer (Jahre) | 8 | 32 | 33 |
| Karenzzeit (Tage) | 8 | 4 | 4,3 |
| Vitalität (%) | 3 | 79 | 76 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 8 | 3 | 3,2 |
| pH-Wert | 8 | 8,3 | 8,3 |
| Spermienkonzentration ($10^6/\text{ml}$) | 8 | 85,5 | 79,9 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 8 | 9 | 9 |
| Progressive Motilität (%) | 8 | 28 | 23 |

Das Kriterium für eine Asthenoteratozoospermie wird von einer Probe der Gesamtkohorte (entsprechend 1 %) erfüllt. Der prozentuale Anteil an den pathologischen Spermiogrammen beträgt 2 %.

Es handelt sich um eine Probe, bei der sich Mittelwert und Median stets gleichen. Das mittlere und mediane Alter des Mannes beträgt 37 Jahre. Daten zur Karenzzeit liegen nicht vor. Der Mittelwert der Vitalität beträgt ebenso wie der Medianwert 79 %. Das mittlere und das mediane Ejakulatvolumen gleichen sich mit 4,8 ml. Der pH-Wert findet sich im Mittel und im Median bei 8,1. Die Spermienkonzentration beträgt im Mittel sowie im Median $32,4 \times 10^6/\text{ml}$. Sowohl der Mittelwert als auch der Medianwert für die Spermienmorphologie liegt bei 2 %. Die mittlere und die mediane progressive Motilität liegen bei 31 %.

Tab. 11 Männer mit Asthenoteratozoospermie; N = 1 (1 % d. Gesamtkohorte; 2 % der pathologischen Spermioogramme)

| Parameter | Anzahl | Median | Mittelwert |
|---|--------|--------|------------|
| Alter des Mannes (Jahre) | 1 | 37 | 37 |
| Karenzzeit (Tage) | - | - | - |
| Vitalität (%) | 1 | 79 | 79 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 1 | 4,8 | 4,8 |
| pH-Wert | 1 | 8,1 | 8,1 |
| Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml) | 1 | 32,4 | 32,4 |
| Spermienmorphologie (normale Formen, %) | 1 | 2 | 2 |
| Progressive Motilität (%) | 1 | 31 | 31 |

4.2 Verteilung klinischer Parameter

Als Cut-Off für die Einteilung der mRNA-Expressionswerte in niedrig und hoch wurde der Median verwendet (1: hohe Expression, 0: niedrige Expression). Die *PIWI-LIKE*-mRNA-Expression wurde mittels qPCR gemessen.

In den 46 Proben mit Normospermogramm liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 2,83 (Median: 0,00023; Range: 0-58,78), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 101,66 (Median: 0; Range: 0-1000).

In den 51 Proben mit auffälligen Spermioogrammparametern liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 9,28 (Median: 0; Range: 0-444,99), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 81,69 (Median: 0; Range: 0-965,94).

In 9 Proben mit Azoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 0,00 (Median: 0; Range: 0-0,00), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 58,33 (Median: 0; Range: 0-447,51).

In 11 Proben mit Kryptozoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 0,05 (Median: 0; Range: 0-0,54), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 58,74 (Median: 0; Range: 0-646,18).

In 11 Proben mit Oligozoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 0,1 (Median: 0,00063; Range: 0-0,82), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 124,22 (Median: 0; Range: 0-965,94).

In 4 Proben mit Oligoasthenozoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 0,00042 (Median: 0; Range: 0-0,0017), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 0 (Median: 0; Range: 0).

In 3 Proben mit Oligoteratozoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 0,00089 (Median: 0; Range: 0-0,000012), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 0 (Median: 0; Range: 0).

In 4 Proben mit Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom) liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 111,65 (Median: 0,81; Range: 0-444,99), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 0 (Median: 0; Range: 0).

In 8 Proben mit Asthenozoospermie liegt die mittlere *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression bei 3,1 (Median: 0,02; Range: 0-23,29), die *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression liegt im Mittel bei 203,57 (Median: 0, Range: 0-790,04).

In der Probe mit Asthenoteratozoospermie konnte keine mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* oder *PIWI-LIKE 4* nachgewiesen werden.

Tab. 12 *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression in Assoziation zu demografischen und klinischen Parametern; MW: Mittelwert, M: Median, N:Anzahl

| Parameter | mRNA | | | mRNA | | | p-Wert |
|---|-----------------|------|----|---------------------|------|----|--------|
| | Hohe Expression | | | Niedrige Expression | | | |
| | MW | M | N | MW | M | N | |
| Alter bei Probenabgabe (Jahre) | 31,7 | 31 | 54 | 29,7 | 29 | 43 | 0,1 |
| Karenzzeit (Tage) | 4,5 | 4 | 41 | 4,4 | 4 | 30 | 0,78 |
| Progressive Motilität (%) | 35,4 | 40 | 53 | 42,4 | 45 | 43 | 0,1 |
| Nicht-progressive Motilität (%) | 13,9 | 17 | 53 | 15,9 | 17 | 43 | 0,2 |
| Immotilität (%) | 34,7 | 36 | 53 | 35,4 | 33 | 43 | 0,86 |
| Vitalität (%) | 58,5 | 76,5 | 30 | 72,9 | 80 | 27 | 0,06 |
| Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml) | 43,1 | 17,8 | 54 | 64,2 | 47,3 | 43 | 0,09 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 2,9 | 3 | 52 | 4,1 | 4,4 | 42 | 0,0009 |
| pH-Wert | 8,2 | 8,3 | 52 | 8,2 | 8,3 | 43 | 0,74 |
| Morphologie (normale Formen, %) | 13,2 | 10 | 41 | 14,7 | 13 | 39 | 0,5 |

Tab. 13 *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in Assoziation zu demografischen und klinischen Parametern; MW: Mittelwert, M: Median, N:Anzahl

| Parameter | mRNA | | | mRNA | | | p-Wert |
|---|-----------------|------|----|---------------------|------|----|--------|
| | Hohe Expression | | | Niedrige Expression | | | |
| | MW | M | N | MW | M | N | |
| Alter bei Probenabgabe (Jahre) | 30,4 | 30 | 81 | 32,9 | 31 | 16 | 0,21 |
| Karenzzeit (Tage) | 4,5 | 4 | 57 | 4,2 | 4 | 14 | 0,56 |
| Progressive Motilität (%) | 38,4 | 40 | 80 | 39,6 | 43 | 16 | 0,82 |
| Nicht-progressive Motilität (%) | 14,5 | 17 | 80 | 15,9 | 20 | 16 | 0,53 |
| Immotilität (%) | 35,7 | 36,5 | 80 | 32 | 31,5 | 16 | 0,47 |
| Vitalität (%) | 65,5 | 79 | 50 | 64,3 | 80 | 7 | 0,94 |
| Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml) | 50,8 | 32,4 | 81 | 60,8 | 59,4 | 16 | 0,5 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 3,4 | 3,5 | 79 | 3,9 | 4 | 15 | 0,4 |
| pH-Wert | 8,2 | 8,3 | 79 | 8,2 | 8,3 | 16 | 0,46 |
| Morphologie (normale Formen, %) | 13,6 | 11 | 67 | 15,7 | 19 | 13 | 0,42 |

4.3 Bivariate Korrelation nach Spearman-Rho

In bivariaten Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho zeigte sich, dass die Expression von *PIWI-LIKE 2*-mRNA signifikant mit der Spermienkonzentration ($p = 0,005$), dem Ejakulatvolumen ($p = 0,003$) sowie der *PIWI-LIKE 1*-mRNA Expression ($p < 0,001$) korreliert.

Bei der *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression ergibt sich eine schwache, aber signifikante Korrelation bezüglich der Parameter Mittelstückdefekte ($p = 0,041$) und *PIWI-LIKE 3*-mRNA-Expression ($p = 0,04$).

Tab. 14 Bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho *PIWI-LIKE 2*

| Parameter | Korrelation | Signifikanz p | Anzahl N |
|---|-------------|---------------|----------|
| Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml) | 0,285 | 0,005 | 97 |
| <i>PIWI-LIKE 1</i> -mRNA | 0,546 | < 0,001 | 97 |
| Ejakulatvolumen (ml) | 0,302 | 0,003 | 94 |

Tab. 15 Bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho *PIWI-LIKE 4*

| Parameter | Korrelation | Signifikanz p | Anzahl N |
|--------------------------|-------------|---------------|----------|
| <i>PIWI-LIKE 3</i> -mRNA | 0,209 | 0,04 | 97 |
| Mittelstückdefekt | - 0,302 | 0,041 | 46 |

4.4 Chi-Square-Tests nach Pearson

Um herauszufinden, ob eine hohe bzw. niedrige *PIWI-LIKE 2*- bzw. *PIWI-LIKE 4*-Expression mit bestimmten Spermogrammparametern zufällig oder signifikant korreliert, führten wir Chi-Square-Tests durch.

Auffälligkeiten bezüglich der Ejakulat-Farbe bzw. eine unauffällige Ejakulat-Farbe korrelieren nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,056, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,12) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,373, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1,000).

Tab. 16 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Farbe

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Farbe unauffällig (Anzahl) | 43 | 41 |
| <i>Farbe unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>44,9</i> | <i>39,1</i> |
| Farbe auffällig (Anzahl) | 4 | 0 |
| <i>Farbe auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>2,1</i> | <i>1,9</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,056 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,12 | |

Tab. 17 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Farbe

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Farbe unauffällig (Anzahl) | 70 | 14 |
| <i>Farbe unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>70,6</i> | <i>13,4</i> |
| Farbe auffällig (Anzahl) | 4 | 0 |
| <i>Farbe auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>3,4</i> | <i>0,6</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,373 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1,000 | |

Auffälligkeiten bezüglich der Konsistenz des Ejakulates bzw. eine normale Konsistenz des Ejakulates korrelieren nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,501, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,613) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,899, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1).

Tab. 18 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Konsistenz

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| Konsistenz unauffällig (Anzahl) | 35 | 33 |
| <i>Konsistenz unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>36,3</i> | <i>31,7</i> |
| Konsistenz auffällig (Anzahl) | 12 | 8 |
| <i>Konsistenz auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>10,7</i> | <i>9,3</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,501 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,613 | |

Tab. 19 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Konsistenz

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| Konsistenz unauffällig (Anzahl) | 57 | 11 |
| <i>Konsistenz unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>57,2</i> | <i>10,8</i> |
| Konsistenz auffällig (Anzahl) | 17 | 3 |
| <i>Konsistenz auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>16,8</i> | <i>3,2</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,899 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1 | |

Die Klassifizierung der Spermioogramme nach den aktuellen Kriterien der WHO korreliert nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,34) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,596).

Tab. 20 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Diagnose; N/A: not available/applicable

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|----------------------------|------------------------|
| Normozoospermie (Anzahl) | 23 | 27 |
| <i>Normozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>26,7</i> | <i>23,3</i> |
| Azoospermie (Anzahl) | 8 | 2 |
| <i>Azoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>5,3</i> | <i>4,7</i> |
| Oligozoospermie (Anzahl) | 7 | 3 |
| <i>Oligozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>5,3</i> | <i>4,7</i> |
| Asthenozoospermie (Anzahl) | 5 | 5 |
| <i>Asthenozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>5,3</i> | <i>4,7</i> |
| OAT-Syndrom (Anzahl) | 2 | 3 |
| <i>OAT-Syndrom (erwartete Anzahl)</i> | <i>2,7</i> | <i>2,3</i> |
| Oligoasthenozoospermie (Anzahl) | 2 | 1 |
| <i>Oligoasthenozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>1,6</i> | <i>1,4</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,34 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | N/A | |

Tab. 21 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Diagnose; N/A: not available/applicable

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|----------------------------|------------------------|
| Normozoospermie (Anzahl) | 41 | 9 |
| <i>Normozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>42</i> | <i>8</i> |
| Azoospermie (Anzahl) | 9 | 1 |
| <i>Azoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>8,4</i> | <i>1,6</i> |
| Oligozoospermie (Anzahl) | 9 | 1 |
| <i>Oligozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>8,4</i> | <i>1,6</i> |
| Asthenozoospermie (Anzahl) | 7 | 3 |
| <i>Asthenozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>8,4</i> | <i>1,6</i> |
| OAT-Syndrom (Anzahl) | 5 | 0 |
| <i>OAT-Syndrom (erwartete Anzahl)</i> | <i>4,2</i> | <i>0,8</i> |
| Oligoasthenozoospermie (Anzahl) | 3 | 0 |
| <i>Oligoasthenozoospermie (erwartete Anzahl)</i> | <i>2,5</i> | <i>0,5</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,596 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | N/A | |

Die *HERV-K*-Expression im Ejakulat korreliert nicht signifikant mit der *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,303, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,44) und der *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,319, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,508).

Tab. 22 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/*HERV-K*-Expression

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| <i>HERV-K</i> -Expression niedrig (Anzahl) | 11 | 20 |
| <i>HERV-K</i> -Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 13 | 18 |
| <i>HERV-K</i> -Expression hoch (Anzahl) | 15 | 16 |
| <i>HERV-K</i> -Expression hoch (erwartete Anzahl) | 13 | 18 |
| Gesamt (Anzahl) | 26 | 36 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,303 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,44 | |

Tab. 23 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/*HERV-K*-Expression

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| <i>HERV-K</i> -Expression niedrig (Anzahl) | 27 | 4 |
| <i>HERV-K</i> -Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 25,5 | 5,5 |
| <i>HERV-K</i> -Expression hoch (Anzahl) | 24 | 7 |
| <i>HERV-K</i> -Expression hoch (erwartete Anzahl) | 25,5 | 5,5 |
| Gesamt (Anzahl) | 51 | 11 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,319 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,508 | |

Ebenso verhält es sich mit der *NANOG*-Expression im Ejakulat: Sie korreliert nicht signifikant mit der *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,659, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,801) und der *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,917, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1.)

Tab. 24 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/NANOG-Expression

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| NANOG-Expression niedrig (Anzahl) | 14 | 20 |
| NANOG-Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 14,9 | 19,1 |
| NANOG-Expression hoch (Anzahl) | 14 | 16 |
| NANOG-Expression hoch (erwartete Anzahl) | 13,1 | 16,9 |
| Gesamt (Anzahl) | 28 | 36 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,659 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,801 | |

Tab. 25 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/NANOG-Expression

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| NANOG -Expression niedrig (Anzahl) | 28 | 6 |
| NANOG-Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 28,2 | 5,8 |
| NANOG -Expression hoch (Anzahl) | 25 | 5 |
| NANOG -Expression hoch (erwartete Anzahl) | 24,8 | 5,2 |
| Gesamt (Anzahl) | 53 | 11 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,917 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1 | |

Die OCT3/4-Expression im Ejakulat korreliert nicht signifikant mit der *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,956, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1) und der *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,117, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,193).

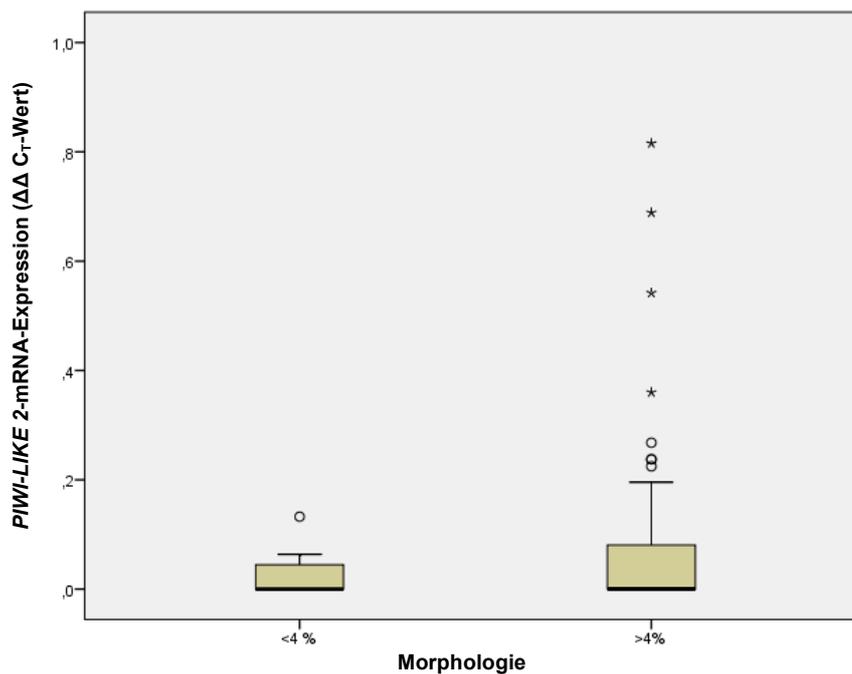
Tab. 26 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA/OCT3/4-Expression

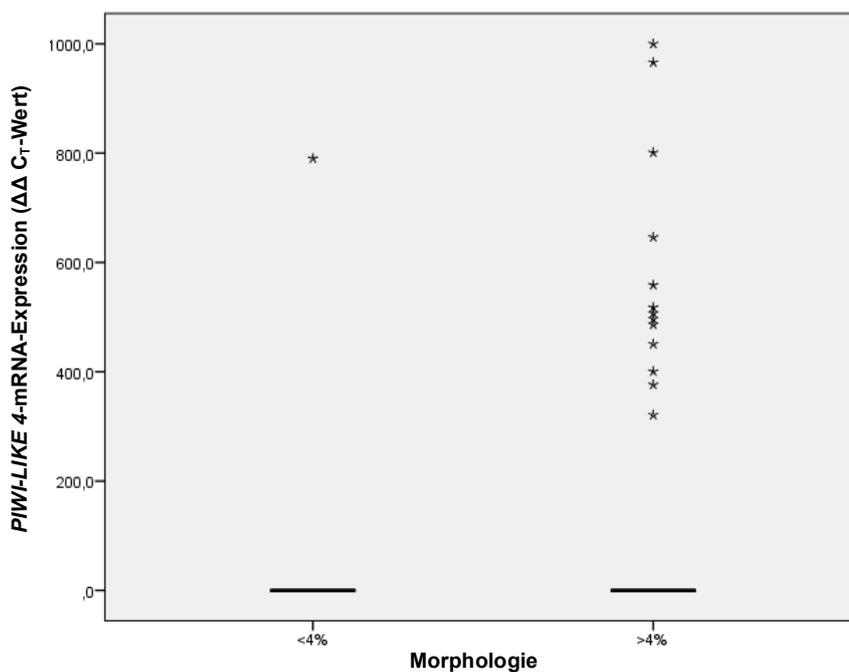
| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| OCT3/4-Expression niedrig (Anzahl) | 14 | 17 |
| OCT3/4-Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 13,9 | 17,1 |
| OCT3/4-Expression hoch (Anzahl) | 12 | 15 |
| OCT3/4-Expression hoch (erwartete Anzahl) | 12,1 | 14,9 |
| Gesamt (Anzahl) | 26 | 32 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,956 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1 | |

Tab. 27 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/OCT3/4-Expression

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| OCT3/4-Expression niedrig (Anzahl) | 27 | 4 |
| OCT3/4-Expression niedrig (erwartete Anzahl) | 24,6 | 6,4 |
| OCT3/4-Expression hoch (Anzahl) | 19 | 8 |
| OCT3/4-Expression hoch (erwartete Anzahl) | 21,4 | 5,6 |
| Gesamt (Anzahl) | 46 | 12 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,117 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,193 | |

Auffälligkeiten in der Morphologie der Spermien bzw. eine normale Spermienmorphologie korrelieren nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,091, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,127) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,129, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,179).

Abb. 5 Box-Plot *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Morphologie

Abb. 6 Box-Plot *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/MorphologieTab. 28 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Morphologie

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Morphologie unauffällig (Anzahl) | 14 | 6 |
| <i>Morphologie unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>10,7</i> | <i>9,3</i> |
| Morphologie auffällig (Anzahl) | 33 | 35 |
| <i>Morphologie auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>36,3</i> | <i>31,7</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,091 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,127 | |

Tab. 29 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Morphologie

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Morphologie unauffällig (Anzahl) | 19 | 1 |
| <i>Morphologie unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>16,8</i> | <i>3,2</i> |
| Morphologie auffällig (Anzahl) | 55 | 13 |
| <i>Morphologie auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>57,2</i> | <i>10,8</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,129 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,175 | |

Eine normale oder verminderte progressive Motilität der Spermien korreliert nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,89, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1,000) oder einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,662, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1,000).

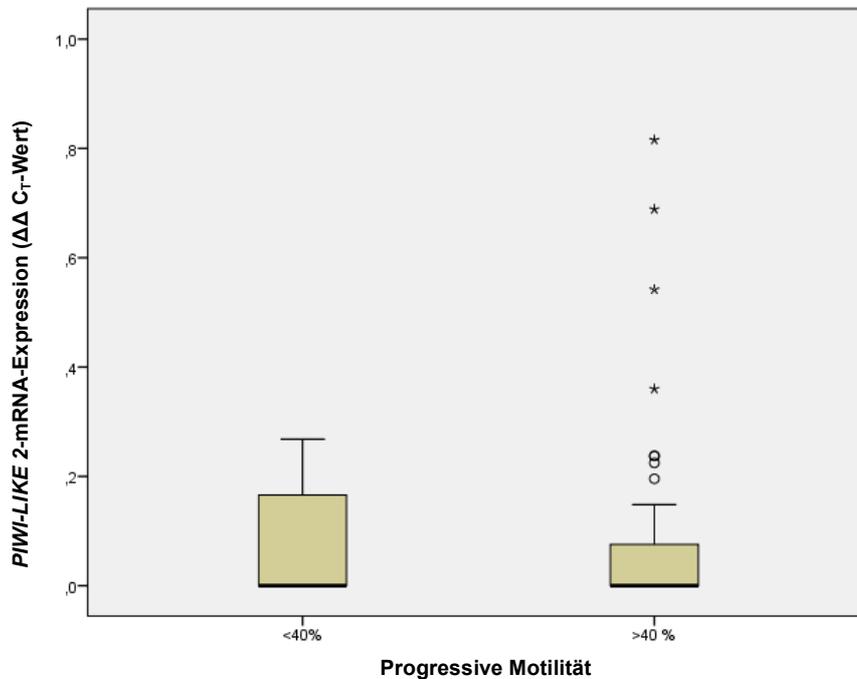


Abb. 7 Box-Plot *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/progressive Motilität

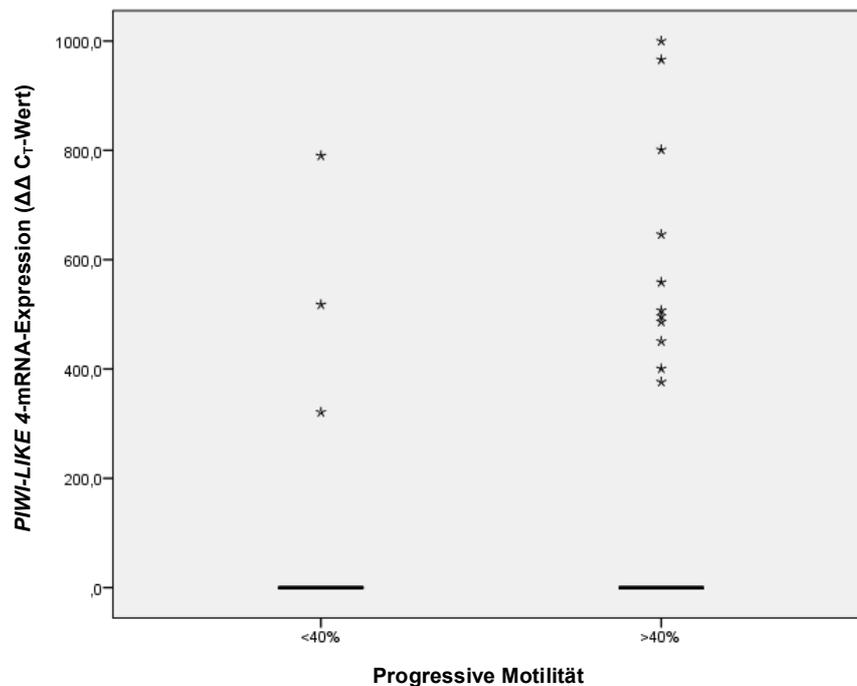


Abb. 8 Box-Plot *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Progressive Motilität

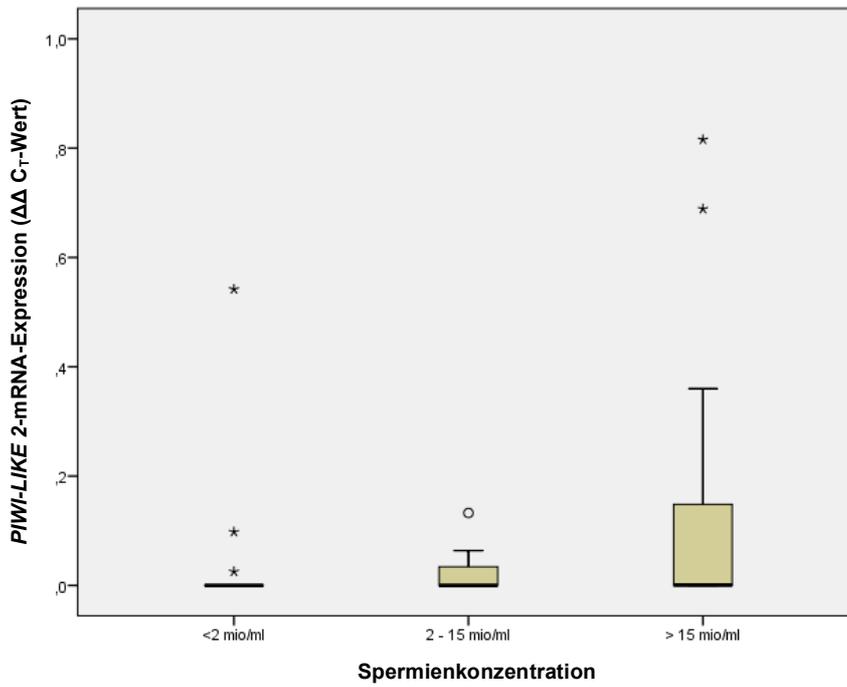
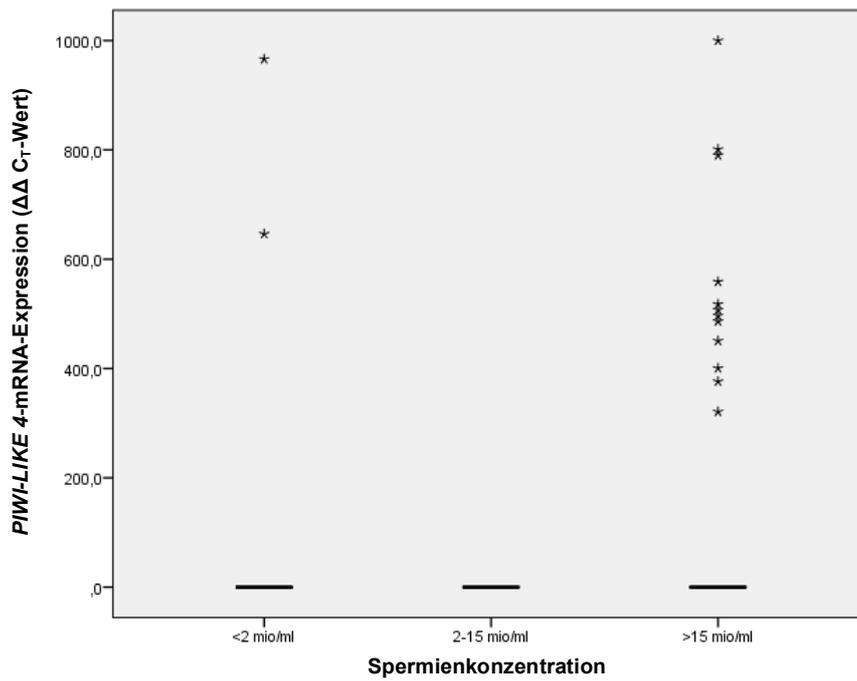
Tab. 30 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/progressive Motilität (PR)

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| PR unauffällig (Anzahl) | 12 | 11 |
| <i>PR unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>12,3</i> | <i>10,7</i> |
| PR auffällig (Anzahl) | 35 | 30 |
| <i>PR auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>34,7</i> | <i>30,3</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,89 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1,000 | |

Tab. 31 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/progressive Motilität (PR)

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| PR unauffällig (Anzahl) | 20 | 3 |
| <i>PR unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>19,3</i> | <i>3,7</i> |
| PR auffällig (Anzahl) | 54 | 11 |
| <i>PR auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>54,7</i> | <i>10,3</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,662 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1,000 | |

Es besteht keine signifikante Korrelation der Spermienkonzentration im Ejakulat mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,056) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,224).

Abb. 9 Box-Plot *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/SpermienkonzentrationAbb. 10 Box-Plot *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Spermienkonzentration

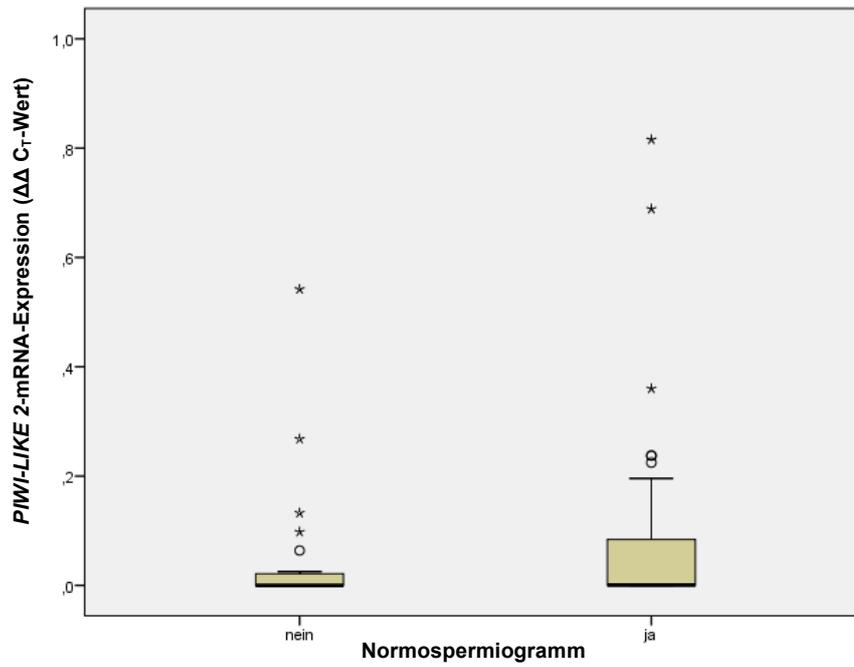
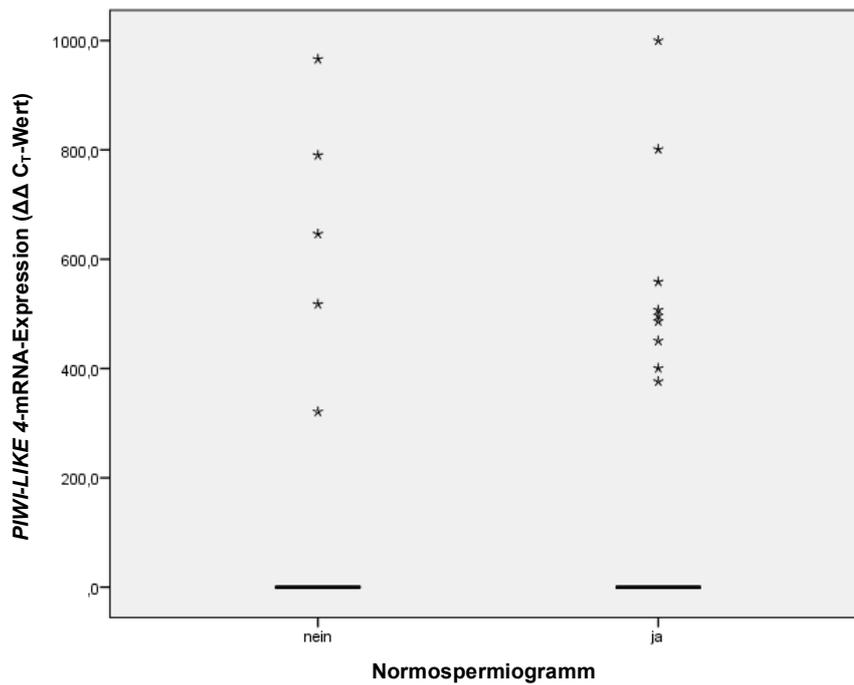
Tab. 32 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Spermienkonzentration

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| Anzahl $< 2,5 \times 10^6$ (Anzahl) | 12 | 3 |
| <i>Anzahl $< 2,5 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 8 | 7 |
| Anzahl $2,5-40 \times 10^6$ (Anzahl) | 7 | 5 |
| <i>Anzahl $2,5-40 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 6,4 | 5,6 |
| Anzahl $> 40 \times 10^6$ (Anzahl) | 28 | 33 |
| <i>Anzahl $> 40 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 32,6 | 28,4 |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,056 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | N/A | |

Tab. 33 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Spermienkonzentration

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|--|---------------------|-----------------|
| Anzahl $< 2,5 \times 10^6$ (Anzahl) | 13 | 2 |
| <i>Anzahl $< 2,5 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 12,6 | 2,4 |
| Anzahl $2,5-40 \times 10^6$ (Anzahl) | 12 | 0 |
| <i>Anzahl $2,5-40 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 10,1 | 1,9 |
| Anzahl $> 40 \times 10^6$ (Anzahl) | 49 | 12 |
| <i>Anzahl $> 40 \times 10^6$ (erwartete Anzahl)</i> | 51,3 | 9,7 |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,224 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | N/A | |

Das Auftreten eines Normospermiogrammes bzw. eines pathologischen Spermiogrammes nach aktueller WHO-Definition korreliert nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,073, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,088) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,48, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,566).

Abb. 11 Box-Plot *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/NormospermiogrammAbb. 12 Box-Plot *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Normospermiogramm

Tab. 34 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Normospermiogramm

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Normospermiogramm (Anzahl) | 25 | 14 |
| <i>Normospermiogramm (erwartete Anzahl)</i> | <i>20,8</i> | <i>18,2</i> |
| Nicht Normospermiogramm (Anzahl) | 22 | 27 |
| <i>Nicht Normospermiogramm (erwartete Anzahl)</i> | <i>26,2</i> | <i>22,8</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,073 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,088 | |

Tab. 35 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Normospermiogramm

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Normospermiogramm (Anzahl) | 34 | 5 |
| <i>Normospermiogramm (erwartete Anzahl)</i> | <i>32,8</i> | <i>6,2</i> |
| Nicht Normospermiogramm (Anzahl) | 40 | 9 |
| <i>Nicht Normospermiogramm (erwartete Anzahl)</i> | <i>41,2</i> | <i>7,8</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,48 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,566 | |

Das Volumen des Ejakulates korreliert nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,4, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,494) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,585, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,631).

Tab. 36 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Volumen

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Volumen unauffällig (Anzahl) | 6 | 3 |
| <i>Volumen unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>4,8</i> | <i>4,2</i> |
| Volumen auffällig (Anzahl) | 41 | 38 |
| <i>Volumen auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>42,2</i> | <i>36,8</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 41 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,4 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,494 | |

Tab. 37 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Volumen

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Volumen unauffällig (Anzahl) | 7 | 2 |
| <i>Volumen unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>7,6</i> | <i>1,4</i> |
| Volumen auffällig (Anzahl) | 67 | 12 |
| <i>Volumen auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>66,4</i> | <i>12,6</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 74 | 14 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,585 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,631 | |

Die Vitalität der Spermien korreliert nicht signifikant mit einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,181, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 0,293) sowie einer hohen oder niedrigen *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression (p-Wert des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson = 0,884, p-Wert des exakten Tests nach Fisher = 1).

Tab. 38 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 2*-mRNA-Expression/Vitalität

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Vitalität unauffällig (Anzahl) | 7 | 3 |
| <i>Vitalität unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>5,1</i> | <i>4,9</i> |
| Vitalität auffällig (Anzahl) | 20 | 23 |
| <i>Vitalität auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>21,9</i> | <i>21,1</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 27 | 26 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,181 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 0,293 | |

Tab. 39 Chi-Square-Test *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression/Vitalität

| Kreuztabelle | Niedrige Expression | Hohe Expression |
|---|---------------------|-----------------|
| Vitalität unauffällig (Anzahl) | 9 | 1 |
| <i>Vitalität unauffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>8,9</i> | <i>1,1</i> |
| Vitalität auffällig (Anzahl) | 38 | 5 |
| <i>Vitalität auffällig (erwartete Anzahl)</i> | <i>38,1</i> | <i>4,9</i> |
| Gesamt (Anzahl) | 47 | 6 |
| Signifikanz p (Chi-Quadrat nach Pearson) | 0,884 | |
| Signifikanz p (Exakter Test nach Fisher) | 1 | |

4.5 ROC-Kurven

Ob sich die *PIWI-LIKE 2*- bzw. die *PIWI-LIKE 4*-Expression als Marker zur Unterscheidung zwischen normwertigen und pathologischen Spermogrammen eignet, soll mit Hilfe der ROC-Analysen untersucht werden. Sie stellen visuell die Abhängigkeit der Effizienz mit der Fehlerrate der Parameter dar. Ein verwertbarer Marker zeichnet sich durch möglichst wenig falsch positive sowie möglichst wenige falsch negative Werte aus. Dies ist der Fall, wenn die Fläche unter der Kurve $>0,8$ und der Signifikanzwert $p < 0,05$ ist.

4.5.1 *PIWI-LIKE 2*

Die Fläche unter der ROC-Kurve für *PIWI-LIKE 2* ergibt 0,549, der Wert für die asymptotische Signifikanz liegt bei 0,410 (Asymptotisches 95 % KI: 0,433-0,664; Standardfehler 0,059). Damit wird deutlich, dass die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* kein geeigneter Marker für die Klassifizierung der Ergebnisse der Ejakulatanalyse nach WHO ist.

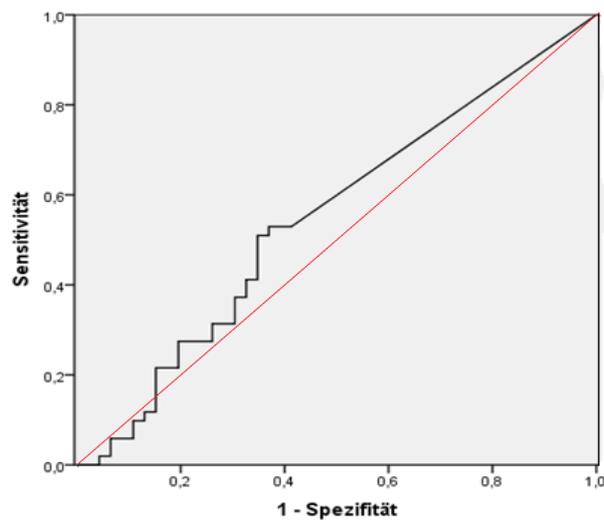


Abb. 13 Darstellung der Aussagekraft der *PIWI-LIKE 2*-Expression als Marker zur Unterscheidung normwertiger und pathologischer Spermogramme mittels ROC-Kurve

4.5.2 *PIWI-LIKE 4*

Die Fläche unter der ROC-Kurve für *PIWI-LIKE 4* ergibt 0,513, der Wert für die asymptotische Signifikanz liegt bei 0,828 (Asymptotisches 95 % KI: 0,397-0,628; Standardfehler 0,059). Damit wird deutlich, dass die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 4* kein geeigneter Marker für die Klassifizierung der Ergebnisse der Ejakulatanalyse nach WHO ist.

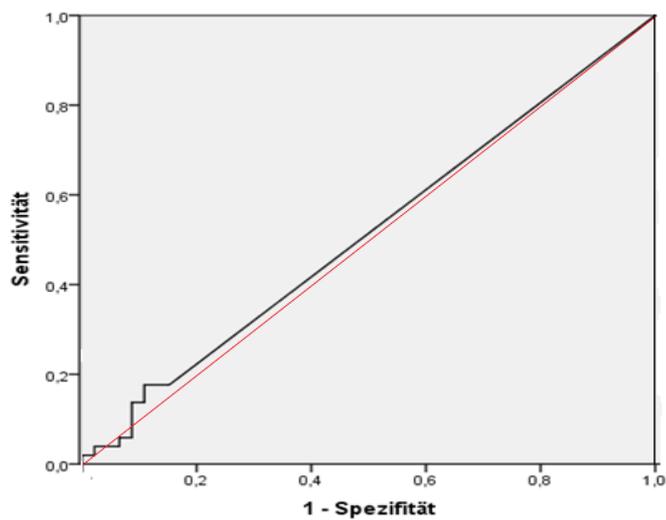


Abb. 14 Darstellung der Aussagekraft der *PIWI-LIKE 4*-Expression als Marker zur Unterscheidung normwertiger und pathologischer Spermioogramme mittels ROC-Kurve

5 Diskussion

5.1 Assoziationen zwischen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- oder *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression und klassischen Spermogrammparametern

Ziel der Arbeit war es, die Mitglieder der *PIWI*-Genfamilie *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* als mögliche Faktoren für Störungen der Spermatogenese auf molekularer Ebene zu analysieren.

Aus Untersuchungen bei Mäusen geht hervor, dass *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* (Miwi als murines Homolog von *HILI*) über eine translationsreprimierende Wirkung auf die Fertilität Einfluss nehmen. Der Knockout von Miwi2 führt zu einem sterilen Phänotyp (Shoji et al. 2009). Im murinen System nimmt die unterschiedliche Expression von Piwi-like 2 und Piwi-like 4 vor allem Einfluss auf die Spermienreifung, insbesondere über Mechanismen des epigenetischen Imprintings. Vergleichbare molekulare Veränderungen bei männlicher Infertilität des Menschen sind noch nicht ausreichend untersucht. Inwiefern Alterationen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in ejakulierten Spermatozoen in Zusammenhang mit auffälligen Befunden entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation stehen, sollte durch diese Arbeit untersucht werden. Dazu wurde das mRNA-Expressionsmuster der *PIWI*-Gene *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* in menschlichen Ejakulatproben mit nach aktueller WHO-Klassifikation auffälligen Untersuchungsergebnissen mit den Expressionsmustern aus Ejakulatproben mit unauffälligen Befunden verglichen. Es stellte sich heraus, dass keine signifikante Korrelation zwischen der Expressionsstärke der *PIWI-LIKE 2*-mRNA und *PIWI-LIKE 4*-mRNA und der aktuellen Klassifizierung der Ergebnisse der Ejakulatuntersuchungen nach WHO besteht. Die Chi-Square-Analysen zeigen, dass normale bzw. auffällige Spermogrammparameter zufällig mit einer erhöhten bzw. erniedrigten *PIWI-LIKE 2*-mRNA- bzw. *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression zusammenhängen. Die mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* kann somit nicht als Marker zur Klassifizierung der Ergebnisse von Ejakulatanalysen nach WHO herangezogen werden, bietet jedoch – auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse am Tiermodell - ein interessantes Potential für weitere Untersuchungen hinsichtlich möglicher genetischer Faktoren für Spermatogenesestörungen beim Menschen. Der Einfluss der *PIWI*-Gene auf die Regulationsmechanismen der Spermatogenese wurde durch zahlreiche Studien (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004; Deng und Lin 2002; Bak et al. 2011; Thomson und Lin 2009), insbesondere an Mäusen und *Drosophila melanogaster*, analysiert und ist unumstritten.

Die Einschlusskriterien für unser Kollektiv waren ein Alter von 18 - 80 Jahren sowie die Verdachtsdiagnose männliche Infertilität, aufgrund derer die Männer Patienten in der Kinderwunschprechstunde des Universitätsklinikums Halle (Saale) waren. Auffällige SpermioGrammparameter entsprechend der WHO-Richtlinien alleine bedingen jedoch nicht zwingend eine Infertilität. Wie die Praxis zeigt, kann es auch bei von der Norm abweichenden SpermioGrammparametern - in Abhängigkeit vom Schweregrad - zu spontanen Schwangerschaften kommen. Männer mit einer herabgesetzten Samenqualität sind jedoch häufiger von unerfülltem Kinderwunsch betroffen. Es erfolgte kein Follow-Up bezüglich der Zeugungsfähigkeit der Männer. Inwiefern Faktoren der jeweiligen Partnerinnen mit zum unerfüllten Kinderwunsch beitrugen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

5.2 Assoziationen zwischen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- oder *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression und Stammzellfaktoren

Zusätzlich zur Untersuchung der Korrelation klassischer SpermioGrammparameter nach WHO mit der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression bestimmten wir die mRNA-Expression von *OCT3/4* und *NANOG* in Korrelation zur mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4*. *OCT3/4* (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor) gehört ebenso wie *NANOG* zu Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Aufrechterhaltung und die Funktion embryonaler Stammzellen sind. Beim Erwachsenen findet sich die Genexpression von *OCT3/4* ausschließlich in Zellen der Keimbahn (Schöler 2004). Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine adäquate *Oct3/4*-Expression essentiell für die Lebensfähigkeit von Mausklonen ist. In frühen Embryonalstadien bewirkt ein *Oct3/4*-Gen-Knockout die Zelldifferenzierung totipotenter Zellen, wohingegen es in späteren Phasen zu einer erhöhten Apoptoserate der Urkeimzellen kommt (Schöler et al. 1990). Unter diesen Aspekten stellt *OCT3/4* ebenso wie *NANOG* einen wichtigen Faktor bei Mechanismen zum Erhalt der Stammzellfunktion dar. Unsere Analyse erbrachte keine signifikante Korrelation zwischen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression und der *OCT3/4*-Expression in ejakulierten humanen Spermien.

Das Homöoboxprotein *NANOG* stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der an den Selbsterneuerungsmechanismen von Stammzellen beteiligt ist, indem es im Rahmen der Transkription die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA bewirkt (Chambers et al. 2003). *NANOG* findet sich in embryonalen Stammzellen und ist mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen. Eine *NANOG*-Überexpression bewirkt das Fortbestehen der Pluripotenz (Darr et al. 2006), wohingegen eine fehlende Expression zur Zelldifferenzierung führt (Zaehres et al. 2005). Somit war auch die Messung der

Expression von *NANOG* in Korrelation zur *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression für unsere Fragestellung interessant. Wie bei *OCT3/4* ergaben unsere Untersuchungen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Expressionsrate von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* und *NANOG* in ejakulierten humanen Spermien.

Bei *HERV-K* handelt es sich um eine Klasse humaner endogener Retroviren. Endogene Retroviren befinden sich in großer Zahl im menschlichen Genom und unterliegen regelmäßigen Mutationen. Ihre Expression findet sich hauptsächlich in der Keimbahn, in embryonalen Geweben sowie in Tumorgeweben (Paces et al. 2002). Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass bei Störungen der Spermatogenese mit resultierender Infertilität eine mRNA-Expression von *HERV-K* nachgewiesen werden konnte (Prudhomme et al. 2005). Somit untersuchten wir auch die Korrelation der *HERV-K*-Expression zur *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression, wobei keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden konnte.

Die genannten Studien zu *OCT3/4*, *HERV-K* und *NANOG* bezeugen unumstritten deren Funktion für die Aufrechterhaltung der Stammzellen. Einen Zusammenhang der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression mit der mRNA-Expression dieser Faktoren konnten wir mit unseren Analysen nicht bestätigen.

5.3 Rolle der *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression bei der humanen Spermatogenese und humaner Infertilität

Die Funktionen der *PIWI-LIKE*-Gene gelten als hochkonserviert (Cox et al. 1998) und sind bisher am besten an Keimbahnzellen sowie somatischen Stammzellen im Tiermodell untersucht. Studien zu deren Rolle im menschlichen Organismus sind rar. PIWI-Proteine spielen eine zentrale Rolle beim Erhalt, der Selbsterneuerung sowie der Differenzierung von Keimbahn- und Stammzellen und somit auch bei der Gametogenese (Carmell et al. 2002). Ihre Expression beschränkt sich normalerweise auf Stammzellen und Keimbahnzellen (Sharma et al. 2001), kann jedoch auch bei einigen Tumorarten wie Pankreaskarzinomen, Seminomen oder Magenkarzinomen nachgewiesen werden (Qiao et al. 2002; Liu et al. 2006; Grochola et al. 2008). Im Rahmen epigenetischer Mechanismen regulieren sie unter anderem die Genexpression und wirken modifizierend auf translationaler sowie posttranskriptionaler Ebene (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004).

Unsere Analysen erbrachten keine signifikante Korrelation der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in ejakulierten humanen Spermatozoen mit der aktuellen Klassifizierung von Ejakulatanalysen nach WHO-Richtlinien.

Die Bedeutung der *PIWI*-Gene im Rahmen der Mechanismen der Spermatogenese konnte durch Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Zebrafischen sowie Mäusen gezeigt werden. Die Piwi-Homologen des Zebrafisches stellen Ziwi (Zebrafish-Piwi) und Zili (Zebrafish-Piwi-like) dar. Während der Mitose und der frühen Meiosestadien der Keimbahnzellen ist die Expressionsrate von Zebrafisch-Piwi am höchsten, wohingegen eine Expression von Zebrafisch-Piwi-like in Primordialzellen 3 und 21 Tage nach der Befruchtung sowie in männlichen Keimzellen während der Meiose und Mitose nachgewiesen werden konnte. In Ziwi- und Zili-Mutanten kommt es zu einem Verlust von Keimzellen jeglicher Entwicklungsstadien durch eine erhöhte Apoptoserate, möglicherweise als Folge eines gestörten Transposon-Silencing. Sowohl männliche als auch weibliche Piwi-mutante Zebrafische sind steril (Houwing et al. 2008). In der Keimbahn männlicher und weiblicher *Drosophila melanogaster* konnten fünf Piwi-Proteine identifiziert werden: dAgo1 (Argonaute 1), dAgo2 (Argonaute 2), dAgo 3 (Argonaute 3), Piwi und Aub (Aubergine) (Carmell et al. 2002). Cox und Kollegen wiesen deren zentrale Rolle in den Mechanismen der Selbsterneuerung und Teilung von Stammzellen der Keimbahn nach. Piwi-mutierte *Drosophila melanogaster* weisen ein geringeres Repertoire an Keimbahnstammzellen und eine verminderte Anzahl an Samenzellen in den Gonaden auf, was zu einer eingeschränkten Fertilität führt (Cox et al. 1998). *Drosophila melanogaster*-Larven mit Piwi-Mutation zeigen normale Zahlen der Keimbahnzellen, wohingegen in ausgewachsenen Fliegen ein deutlicher Mangel von Keimbahnzellen nachzuweisen ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Piwi zu einer erhöhten Anzahl sowie einer gesteigerten Teilungsrate von Stammzellen führt (Cox et al. 2000). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass unter anderem *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* eine essentielle Rolle beim Erhalt und der Teilung von Stammzellen der Keimbahn spielen. Die Piwi-Homologen in *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm aus der Gruppe der Rhabditiden, stellen Prg-1 und Prg-2 (Piwi-related gene) dar. Auch bei Prg-1 und Prg-2 handelt es sich um hochkonservierte Proteine, deren Gen-Knock-Out zu sterilen Fadenwürmern aufgrund von Defekten der Spermatogenese führt. Prg-1 wird in den perinukleären Granula von männlichen Stammzellen exprimiert (Wang und Reinke 2008). Wie Cox und Kollegen zeigen konnten, sind auch bei *Caenorhabditis elegans* die Piwi-like-Gene essentiell für die Selbsterneuerungsmechanismen der Keimbahnzellen (Cox et al. 1998). Mittels einer spezifischen antisense RNA-Injektion (anti-prg-1-RNA) in die Keimbahn von *Caenorhabditis elegans* konnte ein „Loss-of-function-Effect“ von Prg über mehrere Generationen generiert werden, welcher der Untersuchung der Funktionen von Prg-1 und Prg-2 diente. Die F-1-Nachkommen dieser Würmer wurden als „prg-RNAi-Würmer“ bezeichnet. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe konnten bei den „prg-RNAi-Würmern“ mehrere Defekte innerhalb der Keimbahn nachgewiesen werden. Es bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich der Fertilität ($p < 0,0001$). Eine massive Einschränkung der Spermienproduktion

bewirkte, dass „prg-RNAi-Würmer“ signifikant weniger Nachkommen hatten als die *Caenorhabditis elegans* der Kontrollgruppe (Cox et al. 1998). Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine eingeschränkte Genaktivität von Prg - dem Piwi-Homolog in *Caenorhabditis elegans* - zu einer eingeschränkten Fertilität führt. Mili (Piwi-like-protein-2), Miwi (Piwi-like-protein-1) und Miwi 2 (Piwi-like-protein-4) repräsentieren die Piwi-Homologen bei Mäusen (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Das murine Piwi-like-protein-4 (Miwi2) wird während der Spermiogenese nur in den Gonozytenstadien 18 Tage post coitum bis zu den Spermatogonienstadien 3 Tage post partum exprimiert (Carmell et al. 2007). Die Miwi-Expression konnte im Entwicklungsstadium von Spermatozyten zu elongierten Spermatiden nachgewiesen werden, wohingegen Mili während der Reifung von Spermatogonien zu runden Spermatiden exprimiert wird (Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). In Mili-mutanten Mäusen kommt es zu einem Stillstand der Spermiogenese im mittleren Pachytän-Stadium, während die Spermiogenese in einem früheren Stadium, in dem die Reifung von runden Spermatiden zu reifen Spermien erfolgt, durch eine Mutation von Miwi zum Erliegen kommt (Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa et al. 2004). Zudem zeigen männliche Mili- und Miwi2-mutante Tiere im Alter von 3 Monaten und 6 Monaten einen kompletten Verlust von Keimbahnzellen (Carmell et al. 2007). Somit liefert auch das Mausmodell eindeutige Hinweise auf die essentielle Rolle von Piwi-like 2 und Piwi-like 4 beim Erhalt der Keimbahnstammzellen und damit der männlichen Gametogenese.

Heyn und Kollegen untersuchten die DNA-Methylierungsmuster von *PIWI-LIKE 1* und *PIWI-LIKE 2* sowie *TDRD1* und *TDRD9* mittels der Human Methylation27 Bead Chip Technology bei infertilen Männern mit gestörter Spermiogenese und konnten zeigen, dass der epigenetische Mechanismus DNA-Methylierung, welcher eine zentrale Rolle bei der Bestimmung des Ausmaßes der Genexpression sowie deren Zeitpunkt spielt, auch für eine intakte Spermatogenese von Bedeutung ist (Heyn et al. 2012). Entgegen des genetischen Codes verkörpert der epigenetische Code einen dynamischen Prozess, welcher von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich ist und phänotypisch zusammen mit Umweltfaktoren modifizierend wirkt. In männlichen Stammzellen bewirken veränderte epigenetische Mechanismen Änderungen im paternalen Imprinting, im Bereich des postmeiotischen Gensilencing sowie im Silencing von Transposons. Veränderungen in den Expressionsmustern von DNA-Methyltransferasen beeinflussten im Maus-Modell in Keimbahnstammzellen die Spermienproduktion (Yaman und Grandjean 2006). Störungen in der Interaktion von Piwi-2 und piwi-interacting-RNA führen zu Fehlern in Reifungsprozessen der Spermatogenese, welche im Mausmodell zu Infertilität führen (Heyn et al. 2012). Es konnte mittels Sequenzierung der Promotorbereiche gezeigt werden, dass signifikant unterschiedliche DNA-Methylierungsmuster von *PIWI-LIKE 1* und *PIWI-LIKE 2* sowie *TDRD1* und *TDRD9* in Proben von Männern mit

intakter Spermatogenese, Proben von Männern mit Defekten der Spermatogenese sowie Proben von Männern mit Sertoli-Zell-Syndrom (SCO: komplettes Fehlen von Stammzellen im Bereich der testikulären Tubuli) vorliegen. Dabei wiesen die Promotorregionen beider Gene aus Proben mit unauffälliger Spermiogenese keine bzw. nur eine minimale Methylierung auf. Eine signifikante Erhöhung der Methylierung fiel v. a. bei den Proben mit Reifungsstörungen auf dem Level der runden Spermatiden auf. Eine Hypermethylierung aller 4 Gene wurde in den Proben der Patienten mit Sertoli-Zell-Syndrom festgestellt, was die Annahme bestätigt, dass ein Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad der untersuchten Gene und der stammzellspezifischen Expression besteht. Der Methylierungsgrad von *PIWI-LIKE 2* und *TDRD1* ist also höher bei Männern mit Störung der Spermiogenese. TDRD's (Tudor-domain-containing-proteins) zählen zu den "Piwi-interacting proteins". Über das N-terminale Ende der PIWI-Proteine, welches RG/RA-repetitive Sequenzen enthält, erfolgt die Bindung an die sogenannten Tudor-Domains. Unterschiedliche Methylierungsmuster dieser RG/RA-Sequenzen führen zur Bindung unterschiedlicher TUDOR-Proteine und somit zu verschiedenen funktionellen Mechanismen (Vagin et al. 2009). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tdrd1 in Interaktion mit Mili, Miwi und Miwi2 eine zentrale Rolle bei der Spermiogenese spielt (Chen et al. 2009). Bei Tdrd1-Mutationen kommt es zu einer fehlerhaften Lokalisation von Miwi2 innerhalb der Zelle ohne das Expressionslevel zu beeinflussen (Vagin et al. 2009). Dies führt zu der Annahme, dass Tdrd1 spezifisch für Miwi2 essentiell für dessen korrekte Platzierung innerhalb der zellulären Strukturen zuständig ist. Tdrd9 bildet ebenso wie Tdrd1 Komplexe mit Miwi2 während der Meiose der Spermiogenese. Eine „Loss-of-function-Mutation“ von Tdrd9 bewirkt einen Stillstand der Spermatogonien-Reifung (Shoji et al. 2009). Die Regulation der DNA-Methylierung erfolgt unter anderem über Piwi-piRNA-Komplexe im Rahmen des „Transposon-Silencing“ von Stammzellen und der Regulation von repetitiven Elementen. Die Studie von Heyn et al. ist eine der wenigen, welche die Methylierungsmuster Spermatogenese-relevanter Gene bisher untersuchte. Die Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass eine verstärkte Methylierung über eine verminderte Genexpression stammzellspezifischer Gene wie *PIWI-LIKE 2* eine Ursache für pathologische Spermogramme darstellt.

Die Analysen von Heyn und Kollegen, die ergaben, dass bei Störungen der Spermatogenese eine verstärkte Methylierung von *PIWI-LIKE 2* zu einer geringeren Genexpression desselben führt und somit zu Einschränkungen der Fertilität, steht im Widerspruch zu den Ergebnissen unserer Arbeit. Entsprechend der Resultate von Heyn et al. wäre eine geringere Expressionsrate von *PIWI-LIKE 2* in den Proben mit nach aktueller WHO-Klassifikation auffälligen Ejakulatuntersuchungen zu erwarten, was jedoch durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise lässt sich dies durch die Größe und/oder die Heterogenität des

Patientenkollektives erklären, wodurch weitere Einflussgrößen nicht ausreichend berücksichtigt werden konnten. Welche Faktoren - neben dem Methylierungsgrad - die Genexpression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* beeinflussen könnten, bleibt Potential für weitere Untersuchungen. Eine Analyse des Methylierungsgrades von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* neben der Erhebung einer Ejakulatanalyse nach aktueller WHO-Klassifikation und ggf. der *PIWI-LIKE*-mRNA-Expression könnte in Hinblick auf die Ursachenforschung zur männlichen Infertilität weitere interessante Daten liefern.

Gu und Kollegen nahmen an, dass Polymorphismen von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* Risikofaktoren für Störungen der Spermatogenese darstellen und untersuchten 252 infertile Männer mit idiopathischer nicht-obstruktiver Azoospermie sowie 238 infertile Männer mit idiopathischer Oligozoospermie aus Ost-China (Gu et al. 2010). 468 Männer bildeten die Kontrollgruppe. Es konnte gezeigt werden, dass ein SNP (Single nucleotide polymorphism) in der 3' nichttranslatierten Region von Hiwi2 (*PIWI-LIKE 4*) signifikant mit einem erhöhten Risiko für eine Oligozoospermie korreliert. Es wird vermutet, dass dieser Polymorphismus Einfluss auf die mRNA-Stabilität nimmt und zu einer veränderten Bindungsaktivität zu micro-RNAs führt, was letztendlich eine verminderte Genexpression durch Unterdrückung der Translation nach sich zieht. Ein signifikant verringertes Risiko für eine Oligozoospermie ergab eine Haplotypen-Analyse von Hiwi2 (H2 Haplotyp Hiwi2 mit SNP in der 3'UTR (rs508485) und ein nicht-synonymer SNP (rs11020845)). Diese Studie zeigte auch, dass Polymorphismen der *PIWI*-Gene häufiger mit dem Auftreten von Oligozoospermien assoziiert sind, nicht jedoch mit dem Auftreten von Azoospermien. Entsprechend der Ergebnisse von Gu et al. ist somit davon auszugehen, dass Polymorphismen des *PIWI-LIKE 4*-Gens ein erhöhtes Auftreten von Oligozoospermien bedingen können und somit Einfluss auf die männliche Fertilität nehmen können.

Inwieweit solche SNP die Expression der *PIWI-LIKE 2*-mRNA und *PIWI-LIKE 4*-mRNA beeinflussen können, ist aus den von Gu und Kollegen erhobenen Daten nicht zu entnehmen. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die Proteinexpression auch durch Polymorphismen verändert werden kann. Da wir lediglich die mRNA-Expression in Zusammenhang mit klinischen Spermioigrammparametern nach WHO-Klassifikation untersuchten und keine Sequenzierung der Gene *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* durchführten, lässt sich durch unsere Arbeit keine Aussage bezüglich eines Zusammenhangs von SNP des *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-Gens mit der entsprechenden mRNA-Expression treffen.

Piwi-interacting RNAs (piRNAs) - kleine, nicht codierende RNAs mit einer Länge von durchschnittlich 24 - 32 Nukleotiden - binden unter anderem spezifisch an *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* und wirken im Rahmen des PIWI-piRNA-Pathway beim Transposon-Silencing und epigenetischen Mechanismen durch Einflussnahme auf die Stammzellfunktion (Girard et al.

2006). *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* sowie entsprechende piRNAs finden sich in hoher Konzentration in Zellen der Keimbahn. Eine Störung des PIWI-piRNA-Pathway aufgrund von Mutationen führt zu eingeschränkter Fertilität (Carmell et al. 2007). Eine verminderte Genaktivität der PIWI-Proteine führt zu einem massiven Anstieg der mRNA-Expression in Transposons, was die Bedeutung von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* sowie entsprechender piRNAs im Rahmen des Transposon-Silencing verdeutlicht. Über den sogenannten piRISC (piRNA-induced-silencing-complex) erfolgt die Unterdrückung von Transposons - mobilen Genelementen, welche die Integrität des Genoms gefährden (Siomi et al. 2011).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Heyn und Kollegen (Heyn et al. 2012) konnten auch Sienski und Kollegen (Sienski et al. 2012) die Rolle von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* in Methylierungs- und Gensilencingmechanismen aufzeigen. Ein Verlust dieser PIWI-Proteine führt zu einem Anstieg der RNA-Polymerase-II-Bindung und der freiwerdenden Transkripte sowie zu einer Abnahme des hemmend wirkenden Methylierungsgrades bei *H3K9* (Histon 3 Lysine 9). Es wird angenommen, dass in den Bereichen des Euchromatins PIWI-piRNA-Komplexe ihre Zielstrukturen über lange, nicht-codierende RNA-Stränge binden und in Bereichen des Heterochromatins in erster Linie über einen direkten piRNA-DNA-Bindungsmechanismus (Huang et al. 2013). Somit können *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* modulierend Einfluss auf die Funktion bestimmter epigenetischer Faktoren nehmen wie z. B. Su(var)3-9 (eine Histon-Methyltransferase) und HP1a (Hitze-Schock-Protein-1a) (Pal-Bhadra et al. 2004).

Unsere Arbeit erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in ejakulierten humanen Spermatozoen mit der aktuellen Klassifizierung der Ergebnisse der Ejakulatuntersuchungen nach WHO. Da noch nicht alle Männer aus dem Kollektiv Kinder gezeugt haben, ist eine Aussage über die Fertilität im Gesamtkollektiv noch nicht möglich. Zudem handelt es sich für diese Fragestellung um ein zu kleines oder zu inhomogenes Kollektiv (unterschiedliche Altersstruktur, unterschiedliche Diagnosen wie Oligozoospermie, Asthenozoospermie etc.). Ausführlichere Untersuchungen bezüglich des Methylierungsstatus sowie der single-nucleotid-Polymorphismen von *PIWI-LIKE 2* bzw. *PIWI-LIKE 4* und deren Auswirkungen auf die Mechanismen der Spermatogenese und die humane Fertilität stellen mit Sicherheit weitere, vielversprechende Forschungsthemen dar.

6 Zusammenfassung

PIWI-Gene gelten als hochkonserviert, es handelt sich hierbei um Gene mit einer großen Ähnlichkeit bezüglich Struktur und Funktion in unterschiedlichen Spezies. Es besteht ein sehr hoher Erhaltungsgrad dieser Gene im Verlauf der Evolution, was deren große Bedeutung im Rahmen des Fortbestehens einer Spezies verdeutlicht. Wie zahlreiche Untersuchungen zeigen konnten, sind die Funktionen der *PIWI*-Gene im Bereich des Erhalts und der Selbsterneuerung von Stammzellen, bei epigenetischen Mechanismen sowie im Rahmen des Transposonsilencing unumstritten. Der Großteil der Studien wurde an *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und Mäusen durchgeführt, wohingegen Untersuchungen zu den Funktionen der humanen *PIWI*-Gene kaum vorliegen. Somit bleibt die Rolle der *PIWI*-Gene beim Menschen und insbesondere der Zusammenhang zur entsprechenden Klassifizierung von Ejakulatbefunden nach WHO noch weitgehend unerforscht und wird sicherlich Ziel zukünftiger Forschungsprojekte sein. Wir führten Messungen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in ejakulierten humanen Spermatozoen von insgesamt 97 Männern mittels qPCR durch. 46 Männer wiesen ein Normospermiogramm auf, 51 Männer hatten ein pathologisches Spermiogramm. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der *PIWI-LIKE 2*-mRNA- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression und der aktuellen Klassifizierung der Ejakulatanalysen nach WHO gibt. Ejakulatproben mit auffälliger Klassifizierung nach WHO und Ejakulatproben mit unauffälliger Klassifizierung nach WHO unterscheiden sich nicht signifikant in der *PIWI-LIKE 2*- sowie der *PIWI-LIKE 4*-Expression. Die mRNA-Expression kann somit nicht als aussagekräftiger Marker zur Klassifizierung der Ergebnisse von Ejakulatanalysen nach WHO herangezogen werden. Diese Erkenntnis schließt jedoch keineswegs aus, dass sowohl *PIWI-LIKE 2* als auch *PIWI-LIKE 4* Einfluss auf die Spermatogenese nehmen. Es bietet sich daher an, die Analyse an einer größeren und gegebenenfalls homogeneren Studienkohorte zu wiederholen, bei denen auch eine Einbeziehung von Fertilitätsdaten möglich ist. Weiterhin bietet sowohl die Analyse des Methylierungsstatus als auch die Analyse von single-nucleotid-Polymorphismen Potential für weitere Untersuchungen von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* bezüglich deren Bedeutung im Rahmen von humanen Spermiogenesestörungen.

7 Literatur

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR (2015) A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 13:37.

Alberts B, Nover L (2005) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim. S. 706-S. 711.

Bak CW, Yoon T, Choi Y (2011) Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. *Clin Exp Reprod Med* 38:61–67.

Carmell MA, Girard A, van de Kant, Henk J G, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij, Dirk G, Hannon GJ (2007) MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12:503–514.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*. 16:2733–2742.

Cerutti L, Mian N, Bateman A (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25:481–482.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643–655.

Chen C, Jin J, James DA, Adams-Cioaba MA, Park JG, Guo Y, Tenaglia E, Xu C, Gish G, Min J, Pawson T (2009) Mouse Piwi interactome identifies binding mechanism of Tdrkh Tudor domain to arginine methylated Miwi. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20336–20341.

Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* 12:3715–3727.

Cox DN, Chao A, Lin H (2000) piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 127:503–514.

Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N (2006) Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133:1193–1201.

- Deng W, Lin H (2002) miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2:819–830.
- Derouet H (1999) Abklärung und Therapie bei unerfülltem Kinderwunsch. *Urologe A* 38:380–387.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, Perrin J, Martinez D, Sele B, Jouk P, Ohlmann T, Rousseaux S, Lunardi J, Ray PF (2007) Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 39:661–665.
- Dunphy BC, Li TC, Macleod IC, Barratt CL, Lenton EA, Cooke ID (1990) The interaction of parameters of male and female fertility in couples with previously unexplained infertility. *Fertil Steril* 54:824–827.
- EAU Guidelines 2014 Edition.
http://uroweb.org/fileadmin/guidelines/Guidelines_2014_5_June_2014.pdf. abgerufen 05.06.2014.
- Eddy EM (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57:103–128.
- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H (1997) Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3848–3853.
- Gennaro L de, Balistreri S, Lenzi A, Lombardo F, Ferrara M, Gandini L (2003) Psychosocial factors discriminate oligozoospermic from normozoospermic men. *Fertil Steril* 79 Suppl 3:1571–1576.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442:199–202.
- Gnoth et al. (2004) Zur Definition und Prävalenz von Subfertilität und Infertilität. *Reprod Med Endocrinol* 1 (4):272-278.
- Grochola LF, Greither T, Taubert H, Moller P, Knippschild U, Udelnow A, Henne-Bruns D, Wurl P (2008) The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer* 99:1083–1088.
- Gu A, Ji G, Shi X, Long Y, Xia Y, Song L, Wang S, Wang X (2010) Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod* 25:2955–2961.

- Harris AN, Macdonald PM (2001) Aubergine encodes a *Drosophila* polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. *Development* 128:2823–2832.
- Heyn H, Ferreira HJ, Bassas L, Bonache S, Sayols S, Sandoval J, Esteller M, Larriba S (2012) Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PloS one* 7:e47892.
- Houwing S, Berezikov E, Ketting RF (2008) Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J* 27:2702–2711.
- Huang XA, Yin H, Sweeney S, Raha D, Snyder M, Lin H (2013) A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Dev Cell* 24:502–516.
- Katib AA, Al-Hawsawi K, Motair W, Bawa AM (2014) Secondary infertility and the aging male, overview. *Cent European J Urol* 67:184–188.
- Klattenhoff C, Theurkauf W (2008) Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 135:3–9.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T (2004) Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131:839–849.
- Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G (2007) Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia* 39:45–50.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915–926.
- Lin H, Spradling AC (1997) A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124:2463–2476.
- Lingel A, Sattler M (2005) Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol* 15:107–115.
- Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C (2006) Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 118:1922–1929.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357–362.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402–408.
- Megosh HB, Cox DN, Campbell C, Lin H (2006) The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol* 16:1884–1894.
- Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ (2003) Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362:1714–1719.
- Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K (2012) Male infertility and its causes in human. *Adv Urol* 2012:384520.
- Muthusami KR, Chinnaswamy P (2005) Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 84:919–924.
- Paces J, Pavlicek A, Paces V (2002) HERVd: database of human endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* 30:205–206.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA (2002) RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* 9:315–327.
- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Chikka MR, Bhadra U, Birchler JA, Elgin, Sarah C R (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303:669–672.
- Plasterk (2006) Micro RNAs in animal development. *Cell* 124:877–881.
- Prudhomme S, Bonnaud B, Mallet F (2005) Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet Genome Res* 110:353–364.
- Qiao D, Zeeman A, Deng W, Looijenga, Leendert H J, Lin H (2002) Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21:3988–3999.
- Rowe (1993) WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Sadler TW, Langman J (2003) *Medizinische Embryologie; Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. 10. Aufl. Thieme, Stuttgart. S. 17-S. 20, S.18.
- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435–439.

Schöler HR (2004) Genexpression und Funktion der Gene in der Keimbahn der Maus. <https://www.mpg.de/857298/forschungsSchwerpunkt>. abgerufen 04.03.2017.

Schupbach T, Wieschaus E (1991) Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics* 129:1119–1136.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudova Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD (2000) Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect* 108:887–894.

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R (2002) Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 77:873–882.

Sharma AK, Nelson MC, Brandt JE, Wessman M, Mahmud N, Weller KP, Hoffman R (2001) Human CD34(+) stem cells express the *hiwi* gene, a human homologue of the *Drosophila* gene *piwi*. *Blood* 97:426–434.

Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y, Kondoh G, Okawa K, Chujo T, Suzuki T, Hata K, Martin SL, Noce T, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sasaki H, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S (2009) The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell* 17:775–787.

Sienski G, Donertas D, Brennecke J (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* 151:964–980.

Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:246–258.

Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272–285.

Swerdloff und Wang (2016) Causes of male infertility. https://www.uptodate.com/contents/causes-of-male-infertility?source=search_result&search=male%20infertility&selectedTitle. abgerufen 05.01.2017.

Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T (2000) The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14:841–853.

Thomson T, Lin H (2009) The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:355–376.

- Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genet* 34:119–124.
- Vagin VV, Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Aravin AA (2009) Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev* 23:1749–1762.
- Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A (1992) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Human Genet* 89:491–496.
- Wang G, Reinke V (2008) A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol* 18:861–867.
- Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* 20:1732–1743.
- Welsch U (2006) Sobotta Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München [u.a.]. S. 80, S. 521.
- Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH (1977) Infertility in male pesticide workers. *Lancet* 2:1259–1261.
- World Health Organization (2010) WHO Laboratory manual for the examination and processing of human sperm. 5th edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 190-192.
- Yaman R, Grandjean V (2006) Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis. *Mol Reprod Dev* 73:390–397.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5:73–83.
- Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ (2005) High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem cells* 23:299–305.

8 Thesen

1. *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* sind - neben *PIWI-LIKE 1* und *PIWI-LIKE 3* – die Vertreter der PIWI-Subfamilie aus der Gruppe der Argonaute-Proteine beim Menschen. Bei der Maus ist die Deletion der entsprechenden Homologen mit männlicher Sterilität assoziiert. Die *PIWI-LIKE*-Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Selbsterneuerung von Keimbahnstammzellen, der genaue molekulare Mechanismus ist noch nicht geklärt.

2. In unserer Arbeit gelang der Nachweis der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* in humanen ejakulierten Spermatozoen mittels quantitativer real-time-PCR.

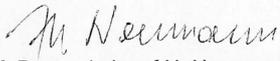
3. Die Expression der *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA in insgesamt 97 Ejakulatproben korreliert nicht signifikant mit dem Auftreten pathologischer Spermiogrammparameter nach WHO-Klassifikation wie einer herabgesetzten progressiven Motilität, einer geringeren Vitalität, einer auffälligen Konsistenz, Farbe oder Morphologie.

4. Weiterhin wurde die *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression in insgesamt 97 Ejakulatproben in Korrelation zur Expression der Transkriptionsfaktoren NANOG und OCT3/4 sowie *HERV-K* gesetzt. Es zeigte sich in unserer Arbeit keine signifikante Korrelation der *PIWI-LIKE 2*- und *PIWI-LIKE 4*-mRNA-Expression zur Expression der genannten Transkriptionsfaktoren.

5. *PIWI-LIKE*-Gene sind bereits im Tiermodell als Kausalfaktoren männlicher Infertilität bzw. eingeschränkter Fertilität identifiziert worden. Die von uns erhobenen Daten über zwei humane Vertreter der *PIWI*-Gene (*PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4*) in Hinblick auf die Samenqualität lassen keinen Zusammenhang der mRNA-Expression von *PIWI-LIKE 2* und *PIWI-LIKE 4* mit der Klassifizierung pathologischer Spermiogramme (Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie und Mischformen) nach WHO 2010 erkennen.

9 Anhang

9.1 Votum der Ethik-Kommission

| | | |
|--|-------------------|---|
|  | | MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG |
| EINGEGANGEN 22. April 2010 | | Medizinische Fakultät Ethik-Kommission |
| Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale) | | |
| Herrn Prof. Dr. H. M. Behre Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie Klinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Ernst-Grube-Straße 40 06097 Halle | | |
| Ihre Zeichen | Ihr Schreiben vom | Unsere Zeichen |
| | | hm-bü |
| | | Datum |
| | | 19.04.2010 |
| Analyse der molekularen Faktoren männlicher Unfruchtbarkeit in Blut, Samen und Hodengewebsproben | | Postanschrift: 06097 Halle (Saale) |
| Sehr geehrter Herr Professor Behre, die Ethik-Kommission hat Ihren Antrag vom 12.04.2010 zur oben genannten Studie am 14.04.2010 in Ihrem Beisein beraten. | | Hausanschrift: Magdeburger Straße 8 06112 Halle (Saale) |
| Sie hatten folgende Unterlagen eingereicht: | | Geschäftsstelle: Tel 0345 557-4476 Fax 0345 557-4477 E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de Internet: www.medizin.uni-halle.de/ |
| <ul style="list-style-type: none"> - Antrag vom 09.04.2010 mit Darstellung des Forschungsvorhabens, - Patienteninformation Version 1.0 vom 09.04.2010, - Einwilligungserklärung Version 1.0 vom 09.04.2010. | | Bankverbindung: Deutsche Bundesbank, Filiale Magdeburg Konto: 80001530 BLZ: 81000000 |
| Die Ethik-Kommission hat keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie. | | IBAN: DE3781000000080001530 BIC: MARKDEF1810 |
| Mit freundlichen Grüßen | | Steuernummer: 111/144/02550 (Finanzamt Halle-Nord) |
|  | | |
| Prof. Dr. med. Josef N. Neumann Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission | | |

Analyse der molekularen Faktoren männlicher Unfruchtbarkeit, Seite 2

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP-Richtlinien.

Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Vorhabens unabhängig vom Beratungsergebnis bei den durchführenden Ärzten und Wissenschaftlern verbleibt.

An der Votierung des oben genannten Forschungsvorhabens waren folgende Mitglieder der Ethik-Kommission beteiligt:

- Prof. Dr. med. Wolfgang Ballhausen, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I
- PD Dr. med. Karin Jordan, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
- Dr. rer. nat. Christine Lautenschläger, Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik
- Prof. Dr. med. Josef N. Neumann, Institut für Geschichte und Ethik der Medizin
- Dr. theol. Christian Senkel, Theologische Fakultät
- Prof. Dr. med. Christian Strauss, Universitätsklinik und Poliklinik für Neurochirurgie

9.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ulm, den 20.04.2017

Lisa Müller

9.3 Erklärung über frühere Promotionsgesuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ulm, den 20.04.2017

Lisa Müller

9.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|--------------------|
| Name | Lisa Sophie Müller |
| Geburtsdatum | 22.11.1987 |
| Geburtsort | Bayreuth |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulbildung

| | |
|-------------------|---|
| 09/1994 – 07/1998 | Grundschule (Pavillonschule Bayreuth) |
| 09/1998 – 07/2007 | Gymnasium Christian Ernestinum Bayreuth, Abitur |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 09/2007 – 01/2008 | Studium der Humanmedizin Universität Pécs, Ungarn |
| 01/2008 – 04/2014 | Studium der Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle |
| 09/2009 | 1. Staatsexamen |
| 04/2014 | 2. Staatsexamen |

Pflegepraktika

| | |
|-------------------|--|
| 07/2007 | Klinik für Unfallchirurgie (Klinikum Bayreuth) |
| 03/2008 | Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Klinikum Bayreuth) |
| 07/2008 – 08/2008 | Klinik für Schädel-Hirn-Verletzte (Hohe Warte Bayreuth) |

Famulaturen

| | |
|-------------------|--|
| 08/2010 – 09/2010 | Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie (Bezirkskrankenhaus Bayreuth) |
| 02/2011 – 04/2011 | Department of Paediatrics (Chris Hani Baragwanath Hospital Soweto/Johannesburg, Southafrica, University of Witwatersrand Medical School) |
| 08/2011 – 09/2011 | Klinik für Urologie (Universitätsspital Zürich, Schweiz) |
| 09/2011 | Praxis für Dermatologie, Allergologie und Psychotherapie (Dr. med. Matthias Suckow, Bayreuth) |

Praktisches Jahr

| | |
|-------------------|---|
| 02/2013 – 06/2013 | Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Universitätsklinik Halle/Saale |
| 06/2013 – 09/2013 | Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie Kantonsspital Luzern, Schweiz |
| 09/2013 – 12/2013 | Klinik für Innere Medizin I, Notaufnahme Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle/Saale |

Fachärztliche Weiterbildung

| | |
|-------------------|---|
| 11/2014 – 10/2015 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin (Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle/Saale) |
| Seit 01/2016 | MVZ Humangenetik Ulm |

Wissenschaftliche Tätigkeit

| | |
|-------------------|---|
| 10/2010 – 04/2017 | Dissertation: Nachweis und Rolle der mRNA-Expression von <i>PIWI-LIKE 2 (HILI)</i> und <i>PIWI-LIKE 4 (HIWI2)</i> in ejakulierten Spermatozoen Doktorvater: Prof. Dr. med. H. M. Behre |
|-------------------|---|

9.5 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre und Dr. rer. nat. Thomas Greither für die Überlassung dieses herausfordernden Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Besonders möchte ich Dr. rer. nat. Thomas Greither für die Einführung in die experimentellen Arbeitstechniken der Molekularbiologie, seine ausdauernde Unterstützung und Beratung beim Verfassen meiner Dissertation sowie die erste Begutachtung danken. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit, insbesondere Frau Constanze Kloss für die Anfertigung der Spermioogramme. Herzlichen Dank allen Patienten aus der Kinderwunschsprechstunde des Universitätsklinikums Halle (Saale) und den freiwilligen Spendern für die Bereitstellung der Ejakulatproben zur Durchführung dieser Studie. Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht hat und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.