

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

VERÄNDERUNGEN DER DNA-METHYLIERUNG BEI MÄNNLICHER INFERTILITÄT

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
CAROLIN FRIEMEL

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P.-M. Holterhus, Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2015
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17.12.2014

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Störungen der Zeugungsfähigkeit.....	1
1.2 Ursachen für männliche Infertilität und Sterilität	1
1.2.1 Anatomische Anomalien	1
1.2.2 Exogene Faktoren.....	2
1.2.3 Endokrine Faktoren	3
1.2.4 Genetische Ursachen	3
1.3 Diagnostik der männlichen Infertilität.....	4
1.3.1 Anamnese.....	4
1.3.2 Körperliche Untersuchung	4
1.3.3 Spermogramm.....	5
1.3.4 Hormonstatus.....	5
1.4 Epigenetik	6
1.4.1 DNA-Methylierung	6
1.4.2 DNA-Methylierungsmuster in Keim- und frühembryonalen Zellen.....	7
1.4.3 Vererbung epigenetischer Prägungen	8
1.4.4 Epigenetik in der Pathogenese von Erkrankungen	9
1.5 Epigenetische Veränderungen als Ursache für männliche Infertilität.....	10
1.6 Das Kandidatengen <i>HOXA5</i>	10
2 Ziele und Fragestellung.....	11
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Material	12
3.1.1 Probenmaterial	12
3.1.2 Klinische Daten.....	12
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	13
3.1.4 Reaktions-Kits.....	14
3.1.5 Mikroarray.....	14
3.1.6 Geräte.....	14
3.1.7 Software und Onlinedatenbanken	15

3.1.8	Primer.....	16
3.1.9	Puffer und Lösungen	16
3.2	Methoden.....	16
3.2.1	Vorbereitung des Probenmaterials.....	16
3.2.1.1	DNA-Extraktion aus EDTA Blut.....	16
3.2.1.2	DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop® ND-1000.....	17
3.2.1.3	Bisulfitkonversion.....	18
3.2.2	Genomweite Methylierungsanalyse	20
3.2.2.1	BeadChip Methylierungsarray	20
3.2.2.2	Datenauswertung und Qualitätsprüfung	22
3.2.2.3	Supervidierte Analyse der Arraydaten.....	22
3.2.2.4	Principal Component Analysis.....	23
3.2.2.5	Gene Ontology Analyse.....	23
3.2.3	Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung.....	23
3.2.3.1	Assaydesign.....	23
3.2.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	24
3.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation.....	26
3.2.3.4	Bisulfit-Pyrosequenzierung	26
3.2.3.5	Validierung und statistische Aufarbeitung.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Das Kandidatengen <i>HOXA5</i>	29
4.1.1	Bisulfit-Pyrosequenzierung	29
4.2	Methylierungsarray-Analyse.....	32
4.2.1	Qualitätsprüfung	32
4.2.1.1	Gene Call Rate: Detektierte CpGs	32
4.2.2	Supervidierte Analyse der Arraydaten.....	32
4.2.3	Principal Component Analysis.....	34
4.2.4	Gene Ontology Analyse	34
4.3	Die Kandidatengene <i>PIWIL1</i> und <i>PIWIL2</i>	36
4.3.1	Streudiagramme <i>PIWIL1</i> und <i>PIWIL2</i>	36
4.3.2	Array-Analyse von Patienten mit Hinweis auf sekundäre Sterilität	37
4.3.3	SNP-Analyse <i>PIWIL</i> -Gene	38
4.4	Die Kandidatengene <i>KAL1</i> , <i>SPAG11B</i> , <i>CST9L</i> , <i>SRD5A3</i> , <i>DNAJB13</i>	38

4.4.1	<i>KAL1</i>	39
4.4.2	<i>CST9L</i>	39
4.4.3	<i>SRD5A3</i>	39
4.4.4	<i>DNAJB13</i>	40
4.4.5	<i>SPAG11B</i>	40
4.5	Abgleich der Methylierungsanalyse mit klinischen Daten	42
5	Diskussion	43
5.1	Methodenvalidierung Pyrosequenzierung und BeadChip Array	43
5.2	Methylierungsstörungen als Ursache für männliche Infertilität	44
5.3	Methylierungsassoziierte Single Nucleotide Polymorphisms.....	45
5.4	Die Kandidatengene <i>PIWIL1</i> und <i>PIWIL2</i>	46
5.5	Die Kandidatengene <i>KAL1</i> , <i>SPAG11B</i> , <i>CST9L</i> , <i>SRD5A3</i> , <i>DNAJB13</i>	48
5.5.1	<i>KAL1</i>	48
5.5.2	<i>CST9L</i>	49
5.5.3	<i>SRD5A3</i>	50
5.5.4	<i>DNAJB13</i>	50
5.5.5	<i>SPAG11B</i>	50
5.6	Das Kandidatengen <i>HOXA5</i>	51
5.7	Einfluss klinischer Parameter auf DNA-Methylierung	51
5.8	Ausblick.....	52
6	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	VII
	Abbildungsverzeichnis	XIV
	Tabellenverzeichnis	XV
	Anhang	XVI
	Ehrenwörtliche Erklärung	XIX
	Danksagung	XX
	Curriculum Vitae	XXI

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
ASM	Allele-specific methylation/Allel-spezifische Methylierung
ATP	Adenosintriphosphat
AZF	Azoospermiefaktor
bp	Basenpaare
CBAVD	Congenital bilateral absence of the vas deferens/Kongenitale bilaterale Aplasie des vas deferens
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CST9L	Cystatin-9-like
DAZ	Deleted in Azoospermia/Deletiert bei Azoospermie
DAZL	DAZ-like
DNA	Desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSD	Disorder of sexual development/Störung der Sexualentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GK	Genomische Kontrolle
HEP	Humanes Epigenomprojekt
HIWI	Humanes PIWI
HOXA5	Homeobox A5
HSP	Heatshockprotein/Hitzeschockprotein
ICF	Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome/ Immundefizienz-Zentromerinstabilität-faziale Dysmorphien-Syndrom
IU	international units/internationale Einheiten
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence/Kallmann-Syndrom 1 Sequenz
LH	Luteinisierendes Hormon
MBD	Methyl-CpG binding domain proteins/ Methyl-CpG bindende Proteine
MIWI	Murines PIWI
MK	Methylierte Kontrolle
mM	Millimolar
mSNP	methylierungsassoziierter SNP

OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
PIWI	P-element induced wimpy testis/P-Element induzierter verkümmertes Hoden
PIWIL	PIWI-like
PPi	Pyrophosphat
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
SD	Standard deviation/Standardabweichung
SNP	Single nucleotide polymorphism/Einzelnukleotid-Polymorphismus
SO ₄ ²⁻	Sulfat-Ion
SPAG11B	Sperm associated antigen 11B
SRD5A3	Steroid 5 alpha-Reduktase 3
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
Tm	Melting temperature/Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxyethyl)-aminomethan
TSARG6	Testis spermatogenesis apoptosis-related protein 6
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Störungen der Zeugungsfähigkeit

Laut Schätzungen der WHO sind in den westlichen Industrienationen etwa 15% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter unfruchtbar und bleiben ungewollt kinderlos (WHO 2000). In circa 40% bis 50% der Fälle liegt eine männliche Infertilität zugrunde, die jedoch bei über 30% der ratsuchenden Männer nicht ursächlich geklärt werden kann (WHO 2000, Esteves 2103). Rasante Fortschritte im Bereich reproduktionsassistierender Verfahren sind unter anderem ein Grund dafür, dass Störungen beim Mann als Ursache für einen unerfüllten Kinderwunsch häufig nicht zur Genüge abgeklärt werden (Gasser 2011). Voraussetzung für die Diagnosestellung einer Infertilität ist nach Definition der WHO regelmäßiger, ungeschützter Geschlechtsverkehr etwa 1- bis 2-mal pro Woche und Nichteintreten einer Schwangerschaft im Laufe eines Jahres (WHO 2000). Der Begriff der Subfertilität wird uneinheitlich verwendet und beschreibt im weitesten Sinne das erhaltene Vermögen zur Befruchtung bei reduzierter Zeugungsfähigkeit (Hirsh 2003, Habbema et al. 2004). Weiterhin werden primäre und sekundäre Sterilität unterschieden. Primäre Sterilität besteht, wenn es noch nie zur Zeugung eines Kindes gekommen ist. Von sekundärer Sterilität wird gesprochen, wenn zu einem früheren Zeitpunkt eine Schwangerschaft eingetreten ist, unabhängig davon, ob ein Kind ausgetragen wurde oder es zu einer Fehlgeburt gekommen ist (Stauber 2007).

1.2 Ursachen für männliche Infertilität und Sterilität

Die Ursachen für Fruchtbarkeitsstörungen beim männlichen Geschlecht sind vielfältig und nicht immer eindeutig zu identifizieren (Dada et al. 2012). Die häufigste Ursache für eine eingeschränkte Zeugungsfähigkeit ist eine reduzierte Spermienzahl (Oligozoospermie) bzw. das vollständige Fehlen von Spermien im Ejakulat (Azoospermie) - häufig in Kombination mit einer eingeschränkten Spermienqualität und -motilität (OAT-Syndrom) (Cavallini 2006, Hirsh 2003).

1.2.1 Anatomische Anomalien

Ursächlich für eine Oligo- oder Azoospermie und das Vorhandensein degenerativ veränderter Spermien können anatomische Anomalien, wie eine Varikozele, Spermatozele oder Lageanomalien des Hodens sein. Die in großen Studien ermittelte häufigste und gleichzeitig auch behandelbare Ursache für eine Infertilität ist die Varikozele (Miyaoaka und Esteves 2012). Dabei handelt es sich um eine Krampfaderbildung des von den Hodenvenen gebildeten Plexus pampiniformis, die in den meisten Fällen linksseitig auftritt (Schünke 2007). Der Nutzen einer Therapie im Hinblick auf erhöhte Spontanschwangerschaftsraten ist in Fachkreisen umstritten (Dohle et al. 2010). Hinweise auf einen

positiven Effekt liefert unter anderem eine Studie von Osmonov und Kollegen. Bei etwa der Hälfte der untersuchten Patienten mit Azoospermie konnten nach antegrader Sklerosierung wieder de-novo Spermatozoen im Nativ-Ejakulat nachgewiesen werden (Osmonov et al. 2006).

Die Spermatozele ist eine Retentionszyste im Parenchym des Nebenhodens, die spermienhaltige Flüssigkeit enthält und durch Abflusshindernisse in diesem Bereich ebenfalls zu einer Unfruchtbarkeit führen kann (Gasser 2011). Lageanomalien des Hodens (Kryptorchismus) treten bei 2% bis 4% aller reifen Neugeborenen auf (Barthold und Gonzalez 2003). Unbehandelt führen sie vor allem bei beidseitigem Auftreten in bis zu 89% zu einer Azoospermie (Hadziselimovic 2002). Außerdem treten Ejakulationsstörungen in Verbindung mit unerfülltem Kinderwunsch bei Fehlbildungen des äußeren Genitales auf (Dohle et al. 2010).

1.2.2 Exogene Faktoren

Funktionelle Einschränkungen in Form einer erektilen Dysfunktion sind im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und neurologischen Erkrankungen bekannt (Wagner und Saenz de Tejada 1998). Die erektile Dysfunktion wird unter anderem aber auch als unerwünschte Arzneimittelwirkung beobachtet, z.B. nach Einnahme von Blutdrucksenkern (Dohle et al. 2010). Studien zeigen jedoch, dass es sich hierbei wahrscheinlich nicht um pharmakologische, sondern eher psychologische Faktoren durch die Erwartungsangst der Patienten handelt (Silvestri et al. 2003). Die Einschränkung der Zeugungsfähigkeit wird ferner als Nebenwirkung von radiologischen Therapien, wie zum Beispiel der Bestrahlung im Rahmen von Krebserkrankungen, beobachtet (Dohle et al. 2010).

Eine reduzierte Fertilität tritt auch als Folge von Entzündungen der männlichen Geschlechtsorgane, wie Prostatitis und Epididymitis auf. Es handelt sich meist um virale Infektion (Hof et al. 2009 a). So gilt trotz hoher Impfraten auch die Orchitis mit Hodenatrophie weiterhin als gefürchtete Komplikation einer Mumpsinfektion (Parotitis epidemica). Trotz Normalisierung der Spermienanzahl, -morphologie und -motilität nach der Infektion sind etwa 13% der Betroffenen subfertil (Davis et al. 2010). Bakterielle Infektionen sind seltener. Das Keimpektrum umfasst dabei unter anderen Chlamydien, Gonokokken und E.coli (Hof et al. 2009 a).

Auch bestimmte Lebensgewohnheiten, wie übermäßiger Nikotin- und Alkoholkonsum, Stress sowie Exposition gegenüber verschiedenen Chemikalien, wirken sich negativ auf die Fertilität aus (Miyamoto et al. 2012). Die Vergleichbarkeit der Daten bezüglich dieser Fragestellungen ist jedoch vor allem dadurch erschwert, dass die meisten Studien auf Fragebögen zurückgreifen und auf diese Weise keine sicher objektivierbaren Daten erfasst werden (Miyamoto et al. 2012).

1.2.3 Endokrine Faktoren

Ein fein abgestimmtes Zusammenspiel hormoneller Faktoren ist für die Reifung und Differenzierung männlicher Keimzellen unerlässlich (De Kretser 1979). Laborchemisch fassbare Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, zum Beispiel als Folge von Tumoren, werden allerdings nur selten beobachtet (De Kretser 1979, Hirsh 2003).

1.2.4 Genetische Ursachen

Dohle et al. untersuchten im Jahre 2002 Patienten mit bislang ungeklärter Infertilität. In ihrem Kollektiv konnte bei einem Drittel der Patienten eine genetische Aberrationen gefunden werden (Dohle et al. 2002). So können numerische Chromosomenaberrationen, vor allem die Geschlechtschromosomen betreffend, zu einer Fertilitätsstörung führen. Das Klinefelter-Syndrom (Karyotyp 47, XXY) gehört zu den häufigsten Aneuploidien beim Mann (Visser und Repping 2010). Mit einer Prävalenz von 3% bei unfruchtbaren Männern und 10%-15% bei Patienten mit einer Azoospermie stellt es die häufigste bekannte genetische Ursache der männlichen Infertilität dar (Yatsenko et al. 2010). Mit Beginn der Pubertät kommt es bei diesen Patienten zur Apoptose von Spermatogonien, die zu einem hypergonadotropen Hypogonadismus mit erhöhten FSH- und LH-Werten und niedrigen Testosteronspiegeln führt (Paduch et al. 2009). Moderne Methoden der Spermengewinnung mittels Hodenbiopsie (TESE) erlauben es diesen Patienten jedoch inzwischen, im Rahmen reproduktionsassistierender Verfahren Nachkommen zu zeugen (Paduch et al. 2009).

Deletionen der AZF-Region (Azoospermiefaktor-Region) auf dem langen Arm des Y-Chromosoms (Yq11) lassen sich bei etwa 15% aller Fälle von Azoospermie oder schwerer Oligozoospermie nachweisen (Pryor et al. 1997). Verlust von Genmaterial in den kritischen Regionen *AZF_a*, *AZF_b* oder *AZF_c* führen zur Ausprägung verschiedener Phänotypen, die mit eingeschränkter Zeugungsfähigkeit einhergehen (Hamada et al. 2013).

Überdies können bei infertilen Patienten im Vergleich zu gesunden Männern häufiger zytogenetische Aberrationen, wie reziproke und Robertsonische Translokationen, nachgewiesen werden (Lee et al. 2011).

Eine Azoospermie kann ebenfalls durch einen angeborenen Verschluss der ableitenden Samenwege (CBAVD) verursacht werden (Dohle et al. 2010). Bei etwa 65% der Patienten mit diesem Krankheitsbild können verschiedene Mutationen im *CFTR*-Gen detektiert werden, ohne dass sie Symptome einer klassischen zystischen Fibrose zeigen (Wang et al. 2002). Am häufigsten kommt es zu einer Deletion eines Basentriplets in Position 508 im Exon 10, welches für Phenylalanin codiert ($\Delta F508$). Weiterhin ist der Anteil an Patienten mit einem 5T-Allel, einer Längenvariante des Gens, bei CBAVD im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöht (De Braekeleer et al. 1996).

1.3 Diagnostik der männlichen Infertilität

1.3.1 Anamnese

Vor dem Hintergrund der differentialdiagnostisch in Erwägung zu ziehenden Erkrankungen kann ein ausführliches Anamnesegespräch mit dem Betroffenen erste Hinweise auf die Ursache eines unerfüllten Kinderwunsches geben (Kamel 2010). Im Hinblick auf unterschiedliche Therapiestrategien, die Planung einer invasiven Diagnostik sowie die Einleitung reproduktionsassistierender Verfahren sind sowohl Einzel- als auch gemeinsame Gespräche mit der Partnerin notwendig (Tournaye und Cohlen 2012). Als Leitfaden für das Gespräch kann ein standardisierter Fragebogen hilfreich sein (Dohle et al. 2010). Teil des Gespräches sollte eine detaillierte Sexualanamnese, einschließlich der Frage nach Libido und Potenz, sein. Zu erfassen sind weiterhin Dauer der Unfruchtbarkeit sowie Frequenz und Zeitpunkt des Geschlechtsverkehrs bezogen auf den weiblichen Zyklus (Hamada et al. 2012). Auch bereits erfolgte ärztlich assistierte Reproduktionsversuche und deren Verlauf sollten thematisiert werden. Zu erfragen sind vom Patienten eingenommene Medikamente und Grunderkrankungen, Allergien, Voroperationen, Kinderkrankheiten, Störungen der Genitalentwicklung, urologische Erkrankungen sowie Störungen des Riechvermögens (Hirsh 2003). Von Interesse ist weiterhin eine ausführliche Familienanamnese über drei Generationen in Bezug auf genetisch bedingte Erkrankungen, Fehlgeburten, Verwandte mit eingeschränkter mentaler und/oder körperlicher Entwicklung, Verwandte mit einer auffälligen Pubertätsentwicklung oder einem unerfüllten Kinderwunsch (Kamel 2010). Außerdem sollten die Lebensgewohnheiten des Paares dokumentiert werden. In diesem Rahmen sollten die Ratsuchenden darüber informiert werden, dass sich Übergewicht ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$), Stress, Nikotinabusus, Alkoholgenuss und Kaffeekonsum sowie Umweltbelastungen negativ auf die Fertilität auswirken können (Tournaye und Cohlen 2012).

1.3.2 Körperliche Untersuchung

Die gründliche körperliche Untersuchung sollte sich vor allem auf die Evaluation des äußeren männlichen Genitales konzentrieren. Dabei ist auf Lage, Größe und Konsistenz von Hoden und Nebenhoden zu achten sowie auf Pathologien in Form einer Variko- oder Spermatozele und Entzündungen (Hamada et al. 2012, Hirsh 2003). Der Penis ist auf Deformationen, Hypospadie und Phimosen zu untersuchen. Vor allem bei Männern ab 40 ist eine Untersuchung der Prostata obligat (Gasser 2011). Weiterhin sollte das Augenmerk auf den sekundären Geschlechtsmerkmalen, dem allgemeinen Körperbau und der Behaarung liegen. Auffällige Befunde erfordern gegebenenfalls weitere Diagnostik (Nieschlag 2000).

1.3.3 Spermogramm

Die Ejakulatuntersuchung ist fester Bestandteil der Infertilitätsdiagnostik. Sie erfolgt standardisiert nach Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO 2010). Das normale Ejakulat sollte eine Spermienkonzentration von 15 Millionen pro Milliliter bei einer Ejakulatmenge von mindestens 1,5 Millilitern aufweisen. Über 58% der Spermien sollten vital sein und der pH-Wert über 7,2 liegen (WHO 2010). Erfasst werden außerdem Daten zu Motilität und Morphologie. In Bezug auf die Spermienbeweglichkeit wird zwischen progressiver, nicht-progressiver und Immotilität unterschieden. Der untere Grenzbereich liegt bei 32% für den Anteil progressiver Spermien und bei 40% der gesamtbeweglichen Spermien (WHO 2010). Gefordert wird weiterhin, dass über 4% der Spermien morphologisch normal geformt sind (WHO 2010). Ejakulatuntersuchungen sind trotz Standardisierung durch eine Vielzahl von Fehlerquellen in der Gewinnung und Aufarbeitung (intraindividuelle Schwankungen, Materialgewinnung und -lagerung usw.) störanfällig (WHO 2010, Visser und Repping 2010). Ferner erlaubt die routinemäßig durchgeführte Ejakulatuntersuchung keine ausreichenden Rückschlüsse auf die Funktion der Spermien in vivo. Häufig zeigen Männer mit idiopathischer Infertilität normwertige Spermigrammbefunde (Hamada et al. 2012).

1.3.4 Hormonstatus

Die hormonelle Basisdiagnostik des infertilen Mannes sollte mindestens die Bestimmung von FSH, LH und Testosteron im Serum umfassen (Gasser 2011). Morgendliche basale Testosteronwerte unter 3 ng/ml (Norm 3,5-8,6 ng/ml) sind als pathologisch zu werten. Wenn gleichzeitig hohe LH-Spiegel (Norm 2-10 IU/l) vorliegen, so weist dies auf eine testikuläre Ursache für einen Hypogonadismus (Hypergonadotroper Hypogonadismus) hin (Nieschlag 2000). Niedrige LH-Werte finden sich demgegenüber bei zentralen Pathologien (Hypogonadotroper Hypogonadismus). Hohe LH-Werte in Zusammenhang mit hohen Testosteronwerten finden sich z.B. bei Androgenrezeptordefekten (Foresta et al. 2008). Bei der Interpretation dieser beiden Laborparameter ist jedoch zu beachten, dass sie starken tageszeitlichen Schwankungen unterliegen und unter anderem durch die Einnahme von Antimykotika, körperlicher Arbeit oder Erkrankungen des Kreislaufsystems beeinflusst werden (Nieschlag 2000). Der FSH-Wert (Norm 1-7 IU/l) unterliegt geringen Schwankungen und hat, vor allem im Zusammenhang mit den in der körperlichen Untersuchung erhobenen Befunden, hohe Aussagekraft (De Kretser 1979). Niedrige FSH-Werte bei kleinen, weichen Hoden sind hinweisend für eine Hypophyseninsuffizienz. Hohe FSH-Werte sollten in diesem Fall an ein Klinefelter-Syndrom denken lassen (Foresta et al. 2008). Hohe FSH-Spiegel können auch Hinweis auf einen Verschluss der ableitenden Harnwege, das Vorliegen eines Kryptorchismus oder einer Varikozele sein. Sollte die hormonelle Basisdiagnostik zu auffälligen Werten geführt haben, schließen sich im Rahmen der

weiterführenden Diagnostik Stimulationstests zur Abklärung der Funktion der beteiligten regulatorischen Zentren an (Nieschlag 2000).

1.4 Epigenetik

Conrad Hal Waddington beschrieb Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals den Begriff der Epigenetik und revolutionierte mit seiner Forschung das Verständnis für menschliche Biologie (Waddington 1953). Epigenetische Prozesse beschreiben Modifikationen des Chromatins, die sich auf die Genexpression auswirken, ohne dabei die zugrundeliegende Basenabfolge der DNA zu verändern (Goldberg et al. 2007). Zu bekannten Mechanismen gehören u.a. die Methylierung von DNA, die RNA-assoziierte Stilllegung von Genen und repetitiven DNA-Elementen und die Modifikationen von Histonproteinen, die für die Verpackung der DNA verantwortlich sind (Goldberg et al. 2007). Auf diese Weise wird die Genaktivität in einzelnen Geweben reguliert (Jones und Takai 2001). Auch für den reibungslosen Ablauf der Entstehung und Entwicklung eines Organismus ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Gene zu festgelegten Zeitpunkten unerlässlich (Jaenisch und Bird 2003). Weiterhin wird epigenetischen Modifikationen eine Schutzfunktion durch Inaktivierung molekularer Parasiten zugeschrieben. So wird unter anderem durch DNA-Methylierung die Integration fremder DNA in das Genom verhindert, aber auch bereits integrierte retrovirale Sequenzen inhibiert (Yoder et al. 1997). Ferner handelt es sich bei der X-Inaktivierung und parentaler Expression von Allelen bei der elterlichen Prägung (Imprinting) um epigenetische Phänomene (Bartolomei und Ferguson-Smith 2011, Bernstein 2007).

Grundsätzlich stellen epigenetische Mechanismen die Möglichkeit für die Zelle bzw. den Organismus dar, sich mittels spezifischer Modifikationen an sich ändernde Situationen anzupassen und entsprechende Informationen an nachfolgende Generationen weiter zu geben (Jablonka 2013).

1.4.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist der am besten untersuchte Mechanismus der DNA-Modifikation. Bereits 1975 postulierten Holliday und Pugh, dass die Aktivität von Genen über die Methylierung von DNA-Basen reguliert wird (Holliday und Pugh 1975). DNA-Methyltransferasen (DNMT) vermitteln die Verknüpfung von Methylgruppen an das 5-C-Atom von Cytosinbasen. Diese Cytosine befinden sich zu 80% als CG-Dinukleotide vor allem in repetitiven DNA-Elementen, in 5'- untranslatierten Regionen und im ersten Exon von Genen (Jaenisch und Bird 2003, Bird 2002). Nach dem klassischen Model wird davon ausgegangen, dass Methylierung in CpG-Dinukleotiden zumindest im Bereich des Transkriptionsstarts mit einer herabgesetzten Genexpression assoziiert ist (Eden und Cedar 1994).

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, über die die Stilllegung eines Genes vermittelt wird. Die CpG-Methylierung scheint direkten Einfluss auf die Verpackung des Chromatins und somit

die Transkription von Genen zu haben. Dieser Effekt wird vermutlich über sogenannte Methyl-CpG binding domain proteins (MBD) vermittelt, die selektiv an methylierte CpG-Dinukleotide binden (Jaenisch und Bird 2003). Außerdem interferiert die DNA-Methylierung mit der Bindung einiger Transkriptionsfaktoren (Bernstein 2007).

Bestimmte Bereiche des Genoms weisen eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden auf und werden als CpG-Islands bezeichnet (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Diese DNA-Sequenzen erstrecken sich über durchschnittlich 1000 Basenpaare (bp). Etwa 70% der menschlichen Gene enthalten in ihren regulatorischen Promotorregionen CpG-Inseln (Bird 2002). Gegenüber den normalerweise hochmethylierten CpG-Dinukleotiden im Genom sind CpG-Inseln in der Regel nicht methyliert (Deaton und Bird 2011).

1.4.2 DNA-Methylierungsmuster in Keim- und frühembryonalen Zellen

Die Methylierung in somatischen Zellen eines Organismus ist in der Regel stabil. In Keim- und frühembryonalen Zellen kommt es jedoch im Laufe der Entwicklung zur Löschung und Reprogrammierung der Methylierungsmuster (Monk et al. 1987).

Das Genom reifer Oozyten beziehungsweise Spermatozoen ist hochmethyliert. Nach Verschmelzung von Ei- und Samenzelle im Rahmen der Befruchtung wird jedoch über aktive und passive Mechanismen zuerst das paternale Genom, dann das maternale Genom demethyliert und somit bestehende Methylierungsmuster gelöscht (Reik et al. 2001). Die Methylierung in vielen Genen, die dem Imprinting unterliegen, und in einigen repetitiven Elementen bleibt dabei erhalten. Eine Remethylierung findet zum Zeitpunkt der Implantation des Embryos im Blastozystenstadium statt (Bird 2002). Die Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b vermitteln im Zuge der weiteren Reifung und Differenzierung der Geschlechtszellen des Feten eine de-novo-Methylierung (Jaenisch und Bird 2003). In somatischen Zellen wird ein gewebespezifisches Methylierungsmuster etabliert. Weitere Methyltransferasen (Maintenance-Transferasen, DNMT1) sorgen dafür, dass die etablierten Muster bei der Zellteilung erhalten bleiben (Bestor und Goll 2005). Die Veränderung der DNA-Methylierung im Zuge der Entwicklung wird in Abbildung 1 illustriert.

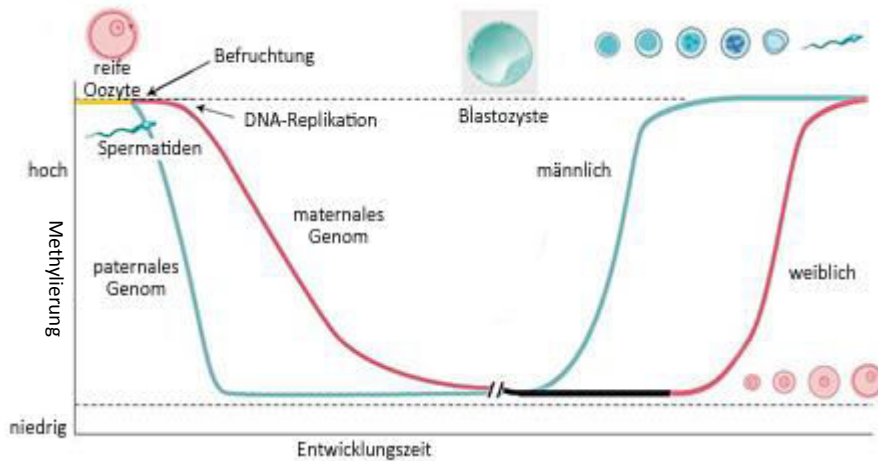


Abbildung 1: DNA-Methylierung in der Keimzellentwicklung

Modifiziert nach Reik et al. (Reik et al. 2001). Die Abbildung zeigt den Methylierungsgrad maternaler und paternaler DNA vom Zeitpunkt der Befruchtung bis zur geschlechtsspezifischen Entwicklung des Organismus. Nach Verschmelzen von Ei- und Samenzelle kommt es zur Löschung der Methylierungsmuster. Eine Remethylierung findet zum Zeitpunkt der Implantation des Embryos im Blastozystenstadium statt.

1.4.3 Vererbung epigenetischer Prägungen

Vor allem Tierexperimente konnten zeigen, dass epigenetische Modifikationen erblich sind und dass das Einwirken von bestimmten Umweltfaktoren Einfluss auf das epigenetische Muster der Nachkommen hat (Jablonka et al. 1998). Bedeutende Erkenntnisse konnten zum Beispiel anhand von Fütterungsversuchen gewonnen werden. So beeinflusst die Ernährung männlicher Mäuse die Genexpression bei Nachkommen (Carone et al. 2010). Das Methylierungsmuster in Leberzellen der Nachkommen von Mäusen, die mit einer proteinreduzierten Kost gefüttert wurden, unterscheidet sich signifikant von dem der Jungtiere, deren Väter normale Kost erhielten. Die betroffenen Gene sind vor allem am Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt (Carone et al. 2010). Neben der Ernährung scheint auch endokrinen Faktoren eine entscheidende Bedeutung zuzukommen. So zeigten mindestens 3 Generationen männlicher Nachkommen von weiblichen Mäusen, die während der Schwangerschaft antiandrogenen Substanzen ausgesetzt waren, eine reduzierte Spermienanzahl- und -motilität (Anway et al. 2005, Anway und Skinner 2006). In den Spermien dieser Mäuse konnten aberrante Methylierungsmuster im Vergleich zu Kontrolltieren identifiziert werden. Die Exposition erfolgte zum Zeitpunkt der Geschlechtsentwicklung der Feten (Anway et al. 2005, Anway und Skinner 2006).

Eltern scheinen im Rahmen der perinatalen Programmierung Informationen über die Umwelt, in der sie leben, an ihre Nachkommen weiterzugeben. Ein Beispiel dafür liefert der Hungerwinter 1944/45

in den Niederlanden. 1944 betrug die tägliche Energiezufuhr bei weiten Teilen der Bevölkerung weniger als 1000 kcal/Tag. Nach der niederländischen Befreiung im Mai 1945 wurde die Versorgung der Einwohner mit Nahrung wieder sichergestellt (Lumey et al. 2007). Säuglinge, die zum Zeitpunkt des Hungerwinters gezeugt wurden, hatten in der Regel ein normales Geburtsgewicht, entwickelten im Laufe ihres Lebens jedoch signifikant häufiger Übergewicht und kardiovaskuläre Erkrankungen (Lumey et al. 2007). Einen Hinweis darauf, dass es bei diesen Individuen durch die reduzierte Kalorienzufuhr zu einer Veränderung epigenetischer Marker gekommen sein kann, lieferte eine Studie aus dem Jahr 2008. Im Vergleich zu ihren gleichgeschlechtlichen Geschwistern zeigten im Hungerwinter gezeugte Menschen veränderte Methylierungswerte im Gen *IGF2* (Heijmans et al. 2008).

1.4.4 Epigenetik in der Pathogenese von Erkrankungen

Epigenetische Fehlregulationen werden inzwischen mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Vor allem in der Pathogenese maligner Neubildungen wird der aberranten DNA-Methylierung eine große Bedeutung zugesprochen (Ting et al. 2006). So soll die selektive Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, DNA-Reparaturgenen und Genen, die den Zellzyklus kontrollieren, eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung spielen (Shames et al. 2007). Dem gegenüber steht die globale Hypomethylierung des Genoms, die ebenfalls in Krebszellen beobachtet wird. Mögliche Folgen sind die Überexpression von Onkogenen und genomische Instabilität (Shames et al. 2007).

Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung epigenetischer Phänomene an der Pathogenese von Erkrankungen stellt das ICF-Syndrom (Immunodeficiency - centromeric instability - facial anomalies syndrome) dar. Ursächlich sind Mutationen im Gen, welches für die Methyltransferase DNMT3b kodiert (Okano et al. 1999). DNMT3b ist ein essentielles Enzym für die Etablierung von DNA-Methylierungsmustern in der Embryonalentwicklung (Egger et al. 2004).

Darüber hinaus wird fehlerhafte DNA-Methylierung auch bei Störungen des Imprinting beobachtet. Imprinting (elterliche Prägung) beschreibt die unterschiedliche Expression eines Gens je nachdem, ob es mütterlicher oder väterlicher Herkunft ist (Reik und Walter 2001). Klinische Beispiele für Imprintingstörungen stellen z.B. das Angelman- und das Prader-Willi-Syndrom dar. Eine fehlerhafte Methylierung kann dazu führen, dass gleichzeitig sowohl das väterlich als auch das mütterlich vererbte Allel exprimiert werden oder es zur Stilllegung des normalerweise aktiven Allels kommt (Bartolomei und Ferguson-Smith 2011).

1.5 Epigenetische Veränderungen als Ursache für männliche Infertilität

Bisherige Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass fehlerhafte DNA-Methylierung auch an der Pathogenese der männlichen Infertilität beteiligt ist (Minocherhomji et al. 2010). Die Etablierung eines keimzellspezifischen epigenetischen Musters erfordert die komplette Löschung und Reprogrammierung der Methylierung im Laufe der Entwicklung (Reik et al. 2001). Die unvollständige Demethylierung, beziehungsweise die fehlerhafte de-novo Methylierung, könnten zu epigenetischen Alterationen führen und somit die Fertilität beeinflussen (Houshdaran et al. 2007). Untersuchungen an Sperma infertiler Männer zeigten, dass die dem Imprinting unterliegenden Gene *H19* und *IGF2* im Vergleich zu fertilen Männern differentiell methyliert sind (Boissonnas et al. 2010, Marques et al. 2008). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte abweichende Methylierungsmuster für *DAZL* - einem direkt an der Spermiogenese beteiligten Gen - im Sperma unfruchtbarer Männer zeigen (Navarro-Costa et al. 2010). Mit Hilfe einer genomweiten Untersuchung der Methylierungsmuster infertiler Männer könnten diese Ergebnisse bestätigt und mögliche epigenetische Ursachen für eine ungewollte Kinderlosigkeit identifiziert werden.

1.6 Das Kandidatengen *HOXA5*

Im Rahmen einer Vorgängerstudie am Institut für Humangenetik des UKSH Campus Kiel und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden Methylierungsmuster bei Patienten mit einer Androgenrezeptormutation untersucht. Eine der mitgeführten Kontrollen zeigte auffällige Methylierungsmuster für 14 CpG-Positionen in der Promotorregion des Genes *HOXA5*. Im Vergleich zu anderen Kontrollen zeigte sie für alle untersuchten Loci eine Hypermethylierung. Bei dieser Kontrollperson handelte es sich um einen männlichen, infertilen Probanden (Bens et al. 2011). In nachfolgenden Untersuchungen konnte auch bei dieser Person eine Androgenrezeptormutation detektiert werden. Die Ergebnisse der Studien liefern Hinweise darauf, dass Methylierungsveränderungen im Gen *HOXA5* auch für weitere bislang ungeklärte Fälle männlicher Infertilität verantwortlich oder ein Marker sein könnten.

2 Ziele und Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Frage nachgegangen werden, ob sich bei Männern mit bisher ungeklärter Infertilität ein von fertilen Männern abweichendes DNA-Methylierungsmuster im peripheren Blut nachweisen lässt. Diese Information könnte auf die zugrundeliegende Pathogenese der Infertilität hinweisen. Dazu sollen bei Männern, die zur Abklärung genetischer Ursachen einer Infertilität im Institut für Humangenetik untersucht wurden, die DNA-Methylierungsmuster mittels DNA-Methylierungsarrays analysiert werden. Weiterhin soll die DNA-Methylierung für 14 CpG-Dinukleotide im Gen *HOXA5* mit den bereits vorhandenen Ergebnissen der DNA-Methylierung bei Individuen mit einer Androgenrezeptor-Mutation im Rahmen einer Pyrosequenzierung verglichen werden. Dieses ist mit der Beantwortung folgender Fragestellungen verbunden:

1. Zeigen sich in einer genomweiten Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array® in peripherem Blut differentiell methylierte CpG-Dinukleotide bei infertilen im Vergleich zu fertilen Männern?
2. Lassen sich auf diese Weise Kandidatengene identifizieren, für die sich ein funktioneller Zusammenhang zu männlicher Infertilität herstellen lässt?
3. Korreliert eine aberrante DNA-Methylierung in bestimmten CpG-Loci bei infertilen Männern mit den erhobenen klinischen Parametern?
4. Lassen sich die Ergebnisse der Vorgängerstudie zur Methylierung des Genes *HOXA5* an Patienten mit bislang ungeklärter Infertilität reproduzieren?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Es wurden DNA-Proben aus peripherem Blut von 33 infertilen Patienten untersucht, die im Zeitraum von Januar 2007 bis April 2011 am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr.med. R. Siebert) zur Abklärung genetischer Ursachen einer männlichen Infertilität humangenetisch beraten oder diagnostisch untersucht worden sind. Als Kontrollpersonen dienten 10 fertile Männer, deren DNA ebenfalls aus Blutlymphozyten extrahiert wurde. Ein Teil der Patienten wurde prospektiv rekrutiert im Rahmen der von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität positiv begutachteten „Studie zur Bedeutung von epigenetischen Veränderungen bei multifaktoriellen Erkrankungen und Phänotypen“ (AZ der Ethikkommission D447/09). Darüber hinaus wurden Restmaterialien von Blutproben verwendet, die zu diagnostischen Zwecken für eine molekulargenetische Untersuchung entnommen worden waren, und bei denen die Patienten ihr Einverständnis für die anonymisierte Nutzung der Daten und des Restmaterials für wissenschaftliche Zwecke auf dem jeweiligen Einsendeschein gegeben oder die einsendenden Ärzte bestätigt hatten, dass ihnen dieses vorliegt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität hat der anonymisierten Nutzung von Restmaterialien und der Auswertung von Daten aus der humangenetischen Diagnostik zugestimmt, sofern diese Bestätigung vorliegt (z.B. unter D402/09). Für alle in die Studie aufgenommenen Patienten waren zuvor im Rahmen der Diagnostik numerische Chromosomenaberrationen, Mutationen und das Vorhandensein eines 5T-Allels im *CFTR*-Gen, sowie Deletionen im *AZF*-Gen als Ursache für eine Infertilität ausgeschlossen worden.

3.1.2 Klinische Daten

Die Patientengruppe hatte zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion im Mittel ein Alter von 35 Jahren (+/- 4,78 Jahre). Kontrollpersonen waren im Durchschnitt 38 Jahre alt (+/-6,43 Jahre). Erhobene klinische Daten umfassten unter anderem Spermiogrammbefunde, wobei entsprechend den WHO-Kriterien Daten zu Ejakulatvolumen, pH-Wert, Spermiedichte, Spermienmotilität, Spermienvitalität und Spermiantikörpern ausgewertet wurden (WHO 2010). Des Weiteren wurden die Daten zum Hormonstatus (FSH, LH, Testosteron, Prolaktin) ausgewertet. Die Daten zur urologischen Anamnese umfassten Informationen zu Lageanomalien des Hodens, Varikozelen, Spermatozelen, Infektionen (Mumpsorchitis, Epididymitis, Prostatitis), Hodentorsion, Entwicklung des Genitales und Hodenvolumen. Außerdem waren im reproduktionsmedizinischen Bereich von Interesse: bisher

erfolgte ärztlich assistierte Reproduktionsversuche, Fehlgeburten bei der Partnerin, Kinder der Partnerin aus früheren Beziehungen bzw. ältere eigene Kinder im Sinne einer sekundären Sterilität. Erfasst wurde weiterhin das DNA-Extraktionsverfahren. Hinsichtlich der Lebensgewohnheiten der Patienten wurden lediglich Aussagen zu einem Nikotinabusus dokumentiert. Einen Überblick über die erfassten Parameter zeigt Tabelle A1 im Anhang. Umfassende Befunde von Patienten, die aus der Kinderwunschambulanz der Frauenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Dr. Walter Jonat) überwiesen wurden, sind von dort freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien sind in unten stehender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1: *Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien*

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Beads für Pyrosequenzierung	Qiagen, Hilden, Deutschland
Binding Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TBE Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TriDye 100bp DNA Ladder	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
Tris-EDTA Buffer (100x)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Waschpuffer	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 Reaktions-Kits

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verwendeten Reaktionskits.

Tabelle 2: *Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kit-Systeme*

Reaktionskits	Hersteller
AccuPrime™ PCR Systems	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
AmpliTaQ® Gold	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
EZ-DNA Methylation Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA
EpiTect 96 Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gentra Puregene Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin 96 Blood Kit	Machery & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.5 Mikroarray

Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array® (Illumina, San Diego, CA, USA)

3.1.6 Geräte

Die unten stehende Tabelle zeigt verwendete Geräte mit genauer Bezeichnung und Herstellerangaben.

Tabelle 3: *Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte*

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Feinwaage	LC620P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	Hoefer HE 33 mini horizontal submarine unit	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
	Modell 41-2026	peqLab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland
Geldokumentation	Bio DOC Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Heizplatte		
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Plattenschüttler	MS3 basic	IKA Works Inc, Wilmington, NC, USA

Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Pyrosequenzierer	PyroMark Q96 ID	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vaccum Workstation	PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Thermomixer	Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	REAX2000 Vortex Genie 2	Heidolph, Schwabach, Deutschland Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Mikro200 Biofuge primoR Universal 16 Megafuge 1.OR Speedvac RC1010	Hettich, Tuttlingen, Deutschland Heraeus, Buckinghamshire, England Hettich, Tuttlingen, Deutschland Heraeus, Buckinghamshire, England Jouan Abbott, Waukegan, IL, USA

3.1.7 Software und Onlinedatenbanken

Tabelle 4 enthält eine Auflistung der in der Arbeit verwendeten Software und Onlinedatenbanken.

Tabelle 4: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Software, Adressen Onlinedatenbanken

Software und Version	Hersteller
BioDoc Analyse Software 2.1	Biometra, Göttingen, Germany
Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim Deutschland
GenomeStudio	Illumina, San Diego, CA, USA
GOrilla-Tool	http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
NanoDrop Software 3.3.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA
PyroMark Assay Design 2.0	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyro Q-CpG Software 1.0.9	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qlucore OMICS Explorer	Qlucore AB, Lund, Schweden
USCS Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim Deutschland

3.1.8 Primer

In folgender Tabelle 5 sind Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer aufgelistet. Die Primer wurden von der Firma Biomers.net (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die HOXA5-Primersequenzen wurde aus der entsprechenden Vorgängerstudie von Bens et al. übernommen (Bens et al. 2011).

Tabelle 5: Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm
HOXA5-1324_PS_F (Vorwärtsprimer)	TTTTTGGTAAGTTTGGGAAGTTAGGTT	57° C
HOXA5-1324_PS_R (Rückwärtsprimer)	AAAACCCCAACAAAACCCAATCT	57° C
HOXA5-1324_PS_S (Sequenzierprimer)	GGTTTTGAAAGTTGTTGTG	42° C

3.1.9 Puffer und Lösungen

Gel-Loading-Puffer

0,125 g Bromphenolblau

28,7 g Glycerol

wurden mit destilliertem H₂O auf 100 ml aufgefüllt und lichtgeschützt gelagert.

3.2 Methoden

Die Vorbereitung des Probenmaterials und die Pyrosequenzierung erfolgten nach Standardarbeitsanleitungen des Institutes für Humangenetik. Die Methylierungsarrays wurden nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt.

3.2.1 Vorbereitung des Probenmaterials

3.2.1.1 DNA-Extraktion aus EDTA Blut

Für die DNA-Microarray-Analysen und die Pyrosequenzierung wurde genomische DNA der infertilen Patienten und fertilen Probanden aus bei -80° Celsius gelagertem EDTA-Blut isoliert. Die DNA-Extraktion wurde mit dem NucleoSpin 96 Blood Kit® und dem Genra Puregene Blood Kit® nach Standardprotokoll durchgeführt. Das Verfahren wird im Folgenden exemplarisch für das Genra Puregene Blood Kit® beschrieben. Die DNA wurde dabei in 6 Schritten aus dem Material isoliert:

1. Lyse der roten Blutzellen
2. Lyse der weißen Blutzellen
3. Proteinverdau
4. Proteinfällung
5. DNA-Präzipitation
6. Elution der DNA

Zu Beginn wurden die Blutproben auf Raumtemperatur gebracht und durch leichtes Schwenken gemischt. Die Menge der verwendeten Lösungen richtet sich nach der Menge des Ausgangsmaterials und ist hier für etwa 3 ml Ausgangsvolumen angegeben. Das Blut wurde in 15 ml-Röhrchen überführt, mit 9 ml RBC-Lösung versetzt und durch mehrmaliges Schwenken des Röhrchens 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gemischt. Es schloss sich eine 5-10 minütige Zentrifugation bei 1500 U/min (1082G, Haereus Megafuge 1.0R) an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 9 ml RBC-Lösung gewaschen, bis es eine weißliche Färbung zeigte. Das Pellet wurde im Anschluss in 3 ml Cell Lysis Puffer resuspendiert. Im Folgenden wurde die Zellsuspension 24 Stunden bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurde 1 ml Protein-Precipitation-Lösung zum Lysat gegeben und etwa 1 Minute gevortext. Nach mindestens 1 Minute auf Eis wurde 15-30 Minuten bei 4500 U/min (3170G, Hettich Universal 16) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und Isopropanol zugegeben. Die DNA fiel durch Schwenken des Röhrchens als weißer Faden aus und wurde dann mit 500µl 70%igem Ethanol einmal gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in der Speedvac® 10-20 Minuten getrocknet und je nach Pelletgröße in einer entsprechenden Menge Aqua dest. gelöst. Das Pellet wurde dann entweder eine Stunde bei etwa 65° C oder mindestens 16 Stunden bei Raumtemperatur gelöst. Danach wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop ND-1000® bestimmt.

3.2.1.2 DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop® ND-1000

Der NanoDrop ND-1000® diente der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration. Dabei wurde die optische Dichte der Nukleinsäuren bei 260 nm gegen eine Referenzlösung (H₂O) gemessen. Um Verunreinigungen aus dem Aufreinigungsprozess auszuschließen, wurde weiterhin das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt, wobei der Wert für reine DNA bei etwa 1,8 liegt. Für die Microarray-Analysen und Pyrosequenzierung war eine Einstellung der DNA-Konzentration der Proben auf 1 µg notwendig.

3.2.1.3 Bisulfitkonversion

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung des Methylierungsgrades der DNA (Laird 2010). Neben dem Verdau mit Methylierungs-spezifischen Restriktionsenzymen kommt vor allem der chemischen Modifikation der methylierten Cytosine und deren anschließender Auswertung mittels Pyrosequenzierung oder Methylierungsarray eine große Bedeutung zu (Ammperpohl et al. 2009). Die epigenetische Modifikation der Methylgruppe am C-5-Atom des Cytosins wird durch die Bisulfit-Behandlung in einen Sequenzunterschied übersetzt (Frommer et al. 1989). Durch Behandlung mit Natriumbisulfit werden alle in der DNA-Sequenz enthaltenen nicht methylierten Cytosine desaminiert und zu Uracil konvertiert. Die Konversion methylierter Cytosine erfolgt bei reduzierter Reaktivität sehr viel langsamer, sodass dieses erhalten bleibt (Frommer et al. 1992, Laird 2010). Im Rahmen der anschließenden Amplifikation mittels PCR werden Uracil-Basen durch Thymin-Basen ersetzt. Auf diese Weise lässt sich in der nachfolgenden Methylierungsanalyse der Methylierungsgrad der untersuchten DNA-Abschnitte analysieren. Das Prinzip ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

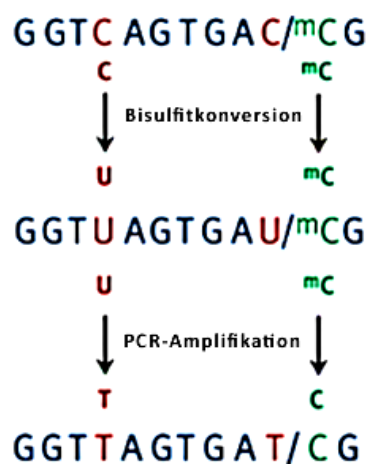


Abbildung 2: Prinzip der Bisulfitkonversion.

Modifiziert nach einer Abbildung der Qiagen-Website (Qiagen 2011). In Rot dargestellt ist ein unmethyliertes Cytosin, welches mittels Bisulfitkonversion in Uracil umgewandelt wird und nach PCR-Amplifikation als Thymin in der DNA-Sequenz erscheint. Methylierte Cytosine, hier grün, sind „geschützt“ und verbleiben nach PCR als Cytosine in der Sequenz.

Illumina, die Herstellerfirma des Methylierungsarrays, empfiehlt die Verwendung des EZ-DNA Methylation Kits® für die Bisulfitkonvertierung. Die zu untersuchenden Proben wurden entsprechend unter Verwendung dieses Kits vorbereitet. Für die Pyrosequenzierung von *HOXA5* wurde das EpiTect 96 Bisulfite Kit® zur DNA-Konversion genutzt. Das Verfahren wird im Folgenden exemplarisch für das EpiTect 96 Bisulfite Kit® beschrieben.

Zunächst wurden sowohl DNA-Proben als auch Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und der im Kit enthaltene Bisulfit-Mix in 9ml destilliertem Wasser gelöst. Darauffolgend wurden pro Aliquot 0,2 ml PCR-Tubes nach folgendem Protokoll bestückt:

1 µg DNA gelöst in 20 µl	Aqua dest.
85 µl	Bisulfite Mix
<u>35 µl</u>	<u>DNA Protect Buffer</u>
140 µl	gesamt

Ein Farbumschlag nach Zugabe des Bisulfit-Mixes von grün nach blau diente als Indikator für einen optimalen pH und ein korrektes Mischverhältnis. Die Proben wurden im Anschluss auf die EpiTect®-Konversions-Platte pipettiert und mit EpiTect®-Cover-Folie versiegelt. Die Platte mit den Reaktionsansätzen wurde dann gevortext und bei 2000 rpm zentrifugiert, um sie danach im Thermocycler bei folgenden Temperaturen zu inkubieren.

Thermocycler-Protokoll:

95°C	5 min
60°C	25 min
95°C	5 min
60°C	85 min
95°C	5 min
60°C	175 min
20°C	∞

Im Rahmen der Aufreinigung wurde jedes Aliquot zunächst mit 560 µl BL-Puffer versetzt. Die Proben wurden dann auf spezielle EpiTect®-Säulen pipettiert. Die Bindung der DNA an die Säulen erfolgte unter Anlage einer Vakuumabsaugung durch Absaugen der Flüssigkeit. Der dabei entstandene Durchfluss wurde verworfen und nach Abschaltung des Vakuums zu jeder Probe 500 µl BW-Puffer pipettiert. Es wurde erneut ein Vakuum angelegt und entsprechend Puffer und Salze abgetrennt. Im Folgenden wurden die Proben nach Zugabe von 250 µl BD-Puffer 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde noch zweimal, wieder unter Verwendung des Vakuums, mit 500 µl BW-Puffer gewaschen. Darauf wurde jeder Probe 250 µl Ethanol hinzugefügt und ein letztes Mal das Vakuum bis zur kompletten Trocknung angelegt. Zum Schluss erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit 70 µl EB-Puffer und 10 µl Top Elute Fluid. Die Proben wurden vorübergehend bei -20° C bis zur

weiteren Verwendung gelagert. Bei jeder Durchführung wurden zusätzlich zu den entsprechenden Patienten- und Kontroll-DNA-Proben auch universell methylierte und gepoolte DNA, isoliert aus peripherem Blut, als Kontrollen mit angesetzt. Die gepoolte DNA stammte von 10 männlichen und 10 weiblichen Proben von gesunden Personen.

3.2.2 Genomweite Methylierungsanalyse

3.2.2.1 BeadChip Methylierungsarray

Die Methylierungsanalysen wurden unter Verwendung des Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit[®] nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Array ermöglicht eine genomweite Analyse von Methylierungsmustern, wobei pro DNA-Probe insgesamt 485.577 verschiedene CpG-Dinukleotide untersucht werden können. Er deckt 96% der CpG-Inseln, inklusive Island-shores und flankierenden Regionen ab. Pro Genregion werden Methylierungswerte für durchschnittlich 17 CpG-Positionen ermittelt (Bibikova et al. 2011). Der Array inkorporiert zwei verschiedene Funktionsweisen, die im Folgenden näher erläutert werden. Der Infinium I arbeitet mit zwei verschiedenen Beads, einem M-Bead (methyliert) und einem U-Bead (nicht-methyliert), an die jeweils Oligonukleotide gekoppelt sind. Diese unterscheiden sich in ihrer Sequenz an der Stelle, an der sich im komplementären, zu untersuchenden DNA-Strang die entsprechende CpG-Position befindet. Aufgrund dessen bindet die konvertierte DNA, je nach Methylierungsstatus entweder an den einen oder den anderen Bead. Nicht methyliertes Cytosin wird durch die vorausgegangene Bisulfitbehandlung der DNA zu Thymin konvertiert – das an den Bead gekoppelte Oligonukleotid muss, um binden zu können, an dieser Stelle ein Adenin-Molekül enthalten. Methyliertes Cytosin ist geschützt und verbleibt als solches in der Sequenz – die DNA kann an das Oligonukleotid binden, welches ein Guanin-Molekül enthält. Auf diese Weise kann, je nachdem, an welchen Bead der DNA-Strang bindet, der Methylierungsgrad des CpGs bestimmt werden. An diesem Bead kommt es zur Kettenverlängerung, wobei farblich markierte Nukleotide eingebaut werden, die im Anschluss detektiert werden können. Abbildung 3 fasst die Funktionsweise graphisch zusammen.

Das Prinzip des Infinium II verwendet nur einen Bead, an den wiederum ein Oligonukleotid gekoppelt ist. Wenn die bisulfitkonvertierte DNA bindet, dient sie als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges am Oligonukleotid. Wenn sich im bisulfitbehandelten DNA-Strang Thymin befindet, wird eine mit einem Farbstoff markierte Adenin-Base eingebaut. In Analogie dazu wird bei Cytosin in der Sequenz Guanin eingefügt, welches mit einem weiteren Farbstoff markiert ist. Das Farbsignal wird detektiert und es wird entsprechend der Methylierungsgrad des CpG-Locus festgelegt. Eine Übersicht über das Prinzip verschafft Abbildung 4.

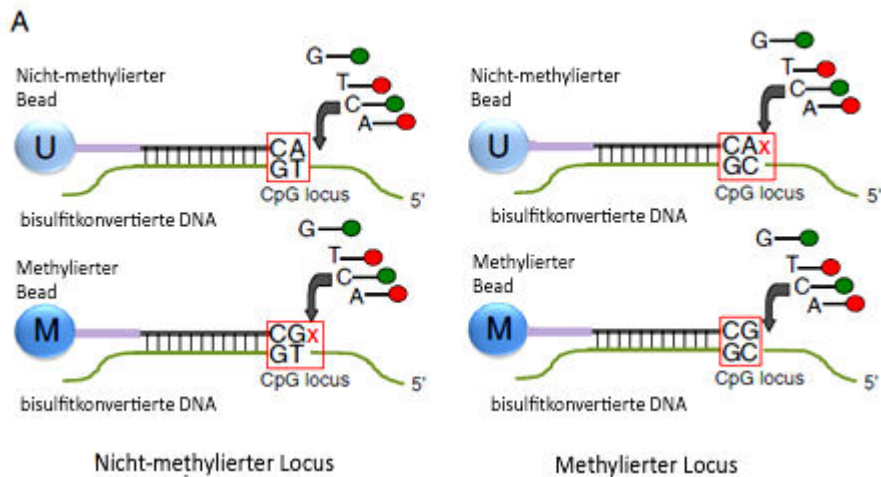


Abbildung 3: Funktionsprinzip des Infinium I.

Aus Bibikova et al (Bibikova et al. 2011). Pro CpG Locus werden ein methylierter (M) und ein nicht-methylierter (U) Bead mit unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen verwendet. An dem Bead, an den der konvertierte DNA Strang bindet, kommt es zur Kettenverlängerung und Einbau farblich markierter Nukleotide.

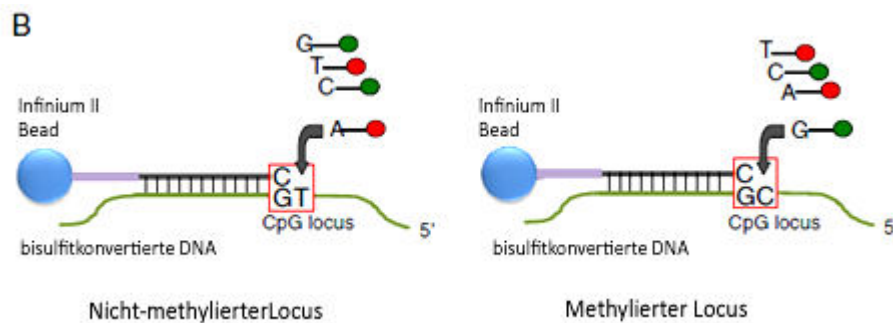


Abbildung 4: Funktionsprinzip des Infinium II.

Aus Bibikova et al (Bibikova et al. 2011). Pro CpG Locus wird nur ein Bead gekoppelt an ein Oligonukleotid verwendet. An der bisulfitebehandelten DNA wird daran ein Komplementärstrang synthetisiert, wobei der Einbau von Guanin ein grünes Signal erzeugt, der Einbau von Adenin ein rotes, welches im Anschluss detektiert wird.

Auf diese Weise wird für Patienten- und Kontroll-DNA-Proben der average beta value (=mittlere Methylierungswert) für jeden CpG-Locus errechnet. Der Illumina average beta value stellt eine Annäherung an den Methylierungswert dar und wird entsprechend der Fluoreszenzsignale der Allele (U: nicht-methyliert, M: methyliert) nach folgender Formel errechnet:

$$Beta = \frac{Max(M,0)}{Max(U,0) + Max(M,0) + 100}$$

Ein Wert von ‚0‘ bedeutet, dass ein CpG unmethyliert ist. Ein Wert von ‚1‘ steht für komplette Methylierung (Martin-Subero et al. 2009, Kuan et al. 2010). Allerdings weichen vor allem im mittleren Methylierungsbereich der Illumina average beta value und tatsächliche Methylierungswerte voneinander ab (Roessler et al. 2012).

3.2.2.2 Datenauswertung und Qualitätsprüfung

Grundlage für die Auswertung der Proben sind die mittels Illumina iScan® gescannten Fluoreszenzdaten, welche als Bilddateien vorliegen. Der Illumina 450k Human Methylation BeadChip Array® erfasst insgesamt 485.577 zugeordnete Signale für jede Probe. Mit Hilfe der GenomeStudio Software® erfolgte zunächst die Erfassung, Normalisierung und Annotierung der Daten. Schließlich wurde auf dieser Grundlage der detection p-value festgelegt und die jeweiligen average beta values für die Proben bestimmt. Der detection p-value bestimmt, ab wann ein Signal als detektiert gilt und wurde in diesem Fall auf < 0,01 festgelegt (Kuan et al. 2010). Basierend darauf wurde die Gene Call Rate berechnet: Die Software ermittelt für jede einzelne Probe die prozentuale Anzahl der erkannten Dinukleotide und stellt somit ein Maß für die Sensitivität der Methode sowie der Qualität der Materialaufarbeitung dar.

3.2.2.3 Supervidierte Analyse der Arraydaten

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in wieweit sich die Methylierungsmuster von fertilen und infertilen Männern unterscheiden, wurden die Ergebnisse ferner nach bestimmten Kriterien gefiltert. Um biologisch bedeutende Methylierungsveränderungen von rein statistischen Effekten abzugrenzen, ist es erforderlich, dass Abweichungen in den Methylierungswerten für das entsprechende CpG bei den beiden Gruppen ausreichend groß sind. So erfolgte für die weiteren Berechnungen durch die Genome Studio Software® die Festlegung, dass sich die Methylierungswerte für das jeweils untersuchte CpG bei Patienten und Kontrollen um mindestens 10% unterscheiden müssen, um als relevant eingestuft zu werden (Illumina delta beta-value größer 0,1) bei einem p-Wert von kleiner als 0,01 (=Illumina DiffScore >20 oder <-20). Für die vergleichenden Gruppenanalysen wurde ein zweiseitiger T-Test verwendet.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse in Form einer Heatmap wurden die Daten in den Qlucore OMICS Explorer® exportiert und normalisiert. Bei der Heatmap handelt es sich um eine farbcodierte Darstellung der jeweiligen Methylierungswerte für jeden einzelnen Probanden und jeden untersuchten CpG-Locus.

3.2.2.4 Principal Component Analysis

Die Berechnung und Darstellung der PCA erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Qlucore OMICS Explorer®.

Die Principal Component Analysis oder Hauptkomponentenanalyse ist ein Verfahren der multivariaten Statistik. Sie ermöglicht die Auswertung multidimensionaler Datensätze sowie deren Kompression und somit die Identifikation von Subgruppen mit ähnlichen Merkmalen (Pearson 1901). Die Darstellung erfolgt nach Reduktion der Daten in einem dreidimensionalen, rotierten Koordinatensystem. Dazu wurden die Daten zunächst nach der Varianz gefiltert. Auf diese Weise wurden CpGs heraus gerechnet, die nur eine geringe Varianz in allen Proben zeigen.

Der Ursprung des Koordinatensystems befindet sich im Zentrum einer Punktwolke aus den erhobenen Daten. Die erste Achse entspricht der Richtung der maximalen Varianz. Es folgt die Erzeugung einer zweiten Achse, die so lange um die erste Achse rotiert wird, bis die Streuung entlang der neuen Achse maximal ist. Die dritte Achse zeigt in Richtung der verbleibenden Maximalstreuung. Der Vorgang wird wiederholt, bis alle Dimensionen aufgebraucht sind (Basler 2000).

3.2.2.5 Gene Ontology Analyse

Mit Hilfe der Gene Ontology Analyse war es möglich, eine Überrepräsentation von Genen oder Gengruppen in bestimmten biologischen Prozessen und funktionellen Pathways, aber auch zellulären Komponenten aufzudecken. Die Analyse wurde mit Hilfe des GOrilla-Tools vorgenommen, welches online für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung steht (Eden et al. 2009). Die Ergebnisse wurden für multiples Testen korrigiert.

3.2.3 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

3.2.3.1 Assaydesign

Das Design der PCR- und Sequenzierprimer für Amplifikation und Pyrosequenzierung der bisulfitkonvertierten DNA erfolgte mit Hilfe der Pyro Mark Assay Design 2.0 Software® (Qiagen, Hilden, Deutschland). In Kapitel 3.1.8. sind die Primersequenzen mit den entsprechenden Schmelztemperaturen aufgelistet.

3.2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine zyklische Reaktion, die der Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase unter Verwendung sequenzspezifischer Primer dient. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst erfolgt eine Denaturierung zur Aufschmelzung der doppelsträngigen DNA bei hohen Temperaturen um 90-95°C. Im Anschluss ermöglicht ein Absenken der Temperaturen auf 50-65° das Binden der Oligonukleotidprimer an die nun einzelsträngige DNA. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet. Die Primer flankieren die zu amplifizierende Sequenz. Am 3'-Ende kommt es nun zur Kettenverlängerung, der sogenannten Elongation. Die Temperaturen werden in diesem Schritt an das Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase angepasst. Durch zyklische Wiederholung der drei Schritte kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes.

Für die Amplifikation von *HOXA5* wurden die AccuPrime™ Polymerase und das AmpliTaq® Gold PCR Kit verwendet. Die Optimierung der PCR-Bedingungen auf Basis der Daten aus der Vorgängerstudie erfolgte mit Hilfe vollständig methylierter DNA (Methylierungskontrolle, MK) und DNA aus gepooltem peripherem Blut von 10 weiblichen und 10 männlichen gesunden Probanden (Pool). Außerdem wurden genomische, nicht konvertierte DNA (genomische Kontrolle, GK) und eine Wasserkontrolle (H₂O) eingesetzt, bei denen es zu keiner Amplifikation des PCR-Produktes kommen sollte. Das PCR-Amplifikat wurde unter Verwendung von 0 µl, 0,5 µl und 1 µl MgCl₂ (25mM) bei je 55°, 60° und 65° C Annealingtemperatur evaluiert. Die PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt und im Thermocycler amplifiziert:

38 µl	Aqua dest.
5 µl	10x Pufferlösung II
1 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTP Mix
1 µl	F-Primer (20 pmol/µl)
1 µl	R-Primer (20 pmol/µl)
<u>1 µl</u>	<u>Accuprime Polymerase</u>
48 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	} 45 Zyklen
60°C	30 sec	
68°C	30 sec	
4°C	5 min	
20°C	∞	

Das meiste PCR-Produkt wurde mit 1 µl MgCl₂ bei 60° erzielt und entspricht somit den PCR-Bedingungen der Vorgängerstudie. Die PCR-Produktgröße betrug 250bp. Für die 29 Patienten- und 10 Kontrollproben sowie die mitgeführten Kontrollen konnte eine ausreichende Amplifikation des PCR-Produktes nachgewiesen werden, wie in Abbildung 5 illustriert.

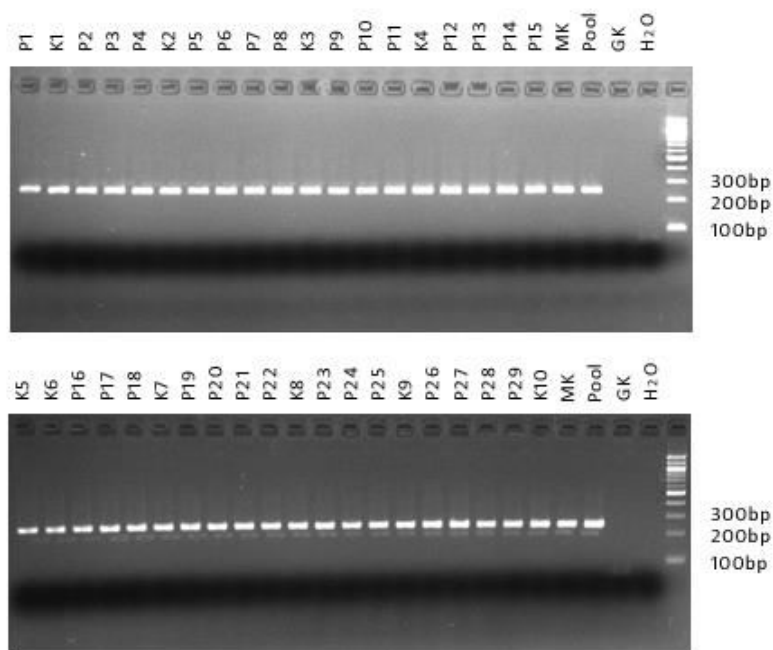


Abbildung 5: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für *HOXA5*.

Für die 29 Patienten (P)- und 10 Kontrollproben (K) sowie die methylierte Kontrolle (MK) und die gepoolte DNA (Pool) konnte eine ausreichende Amplifikation des 250 bp großen Produktes nachgewiesen werden (Längenstandard TriDye 100bp DNA Ladder, rechts). Die genomische Kontrolle (GK) und die Wasserprobe (H₂O) in den letzten beiden Slots zeigen kein Amplifikat. Eine Kontamination der Reagenzien kann somit ausgeschlossen werden.

3.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation

Ziel ist die elektrophoretische Auftrennung von genomischer DNA bzw. DNA-Fragmenten nach PCR-Amplifikation und diese dann durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe zu bestimmen. Als Matrix zur Auftrennung wird ein Agarosegel verwendet. In einem elektrischen Spannungsfeld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode. Die einzelnen Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer Größe und elektrophoretischer Beweglichkeit unterschiedlich schnell und werden dadurch aufgetrennt. Nach einiger Zeit sind die Moleküle an unterschiedlichen Stellen im Gel einzeln nachweisbar und können mit einem fotografischen Verfahren sichtbar gemacht werden.

Auf diese Weise erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte über ein 2% Agarosegel. Hierfür wurden 4g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die TBE-Lösung wurde nach folgendem Schema angesetzt: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml EDTA, aufgefüllt auf 1 Liter destilliertes Wasser. Im Anschluss wurde die Lösung mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt. In die Geltaschen wurden je 5 µl PCR-Produkt mit 3,5 µl Ladepuffer, bestehend aus 0,125 g Bromphenolblau und 28,7g Glycerol auf 100 ml pipettiert. Als Längenstandart wurden bei einer zu erwartenden Fragmentlänge von 250 Basenpaaren 12 µl TriDye 100bp DNA Ladder® mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter elektrischer Spannung von 5V/cm bis die DNA Fragmente und der Längenstandard genügend aufgetrennt, mindestens aber über eine Strecke von 6 cm gelaufen waren. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA wurden unter UV-Licht (Anregung bei 285 nm) die amplifizierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar und konnten mit Hilfe des Bio DOC Analyzers® fotografiert werden.

3.2.3.4 Bisulfit-Pyrosequenzierung

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung ermöglicht die quantitative Methylierungsanalyse von DNA-Abschnitten, die in einer vorausgegangenen PCR amplifiziert wurden. Das Prinzip der Pyrosequenzierung beruht auf der Generierung eines Lichtsignals beim Einbau einzelner Nukleotide im Rahmen eines DNA-Sequenziervorganges und dessen Detektion mit einer CCD-Kamera (Ronaghi, 2001). Dabei werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) an einen spezifischen Sequenzierprimer komplementär zu dem zu sequenzierenden einzelsträngigen DNA-Fragment synthetisiert. Dies geschieht über eine DNA-Polymerase, wobei beim Einbau der Nukleotide Pyrophosphat (PPi) freigesetzt wird. Eine ATP-Sulfurylase wandelt über eine Reaktion mit Adenosin-5'-Phosphosulfat dieses Pyrophosphat zu ATP und SO_4^{2-} um. Das ATP wiederum stellt die nötige Energie bereit, um Luziferin mittels einer Luziferase zu oxidieren und dabei einen Lichtimpuls zu

generieren, der im sogenannten Pyrogramm als Peak sichtbar wird. Zusammenfassend wird der Mechanismus in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

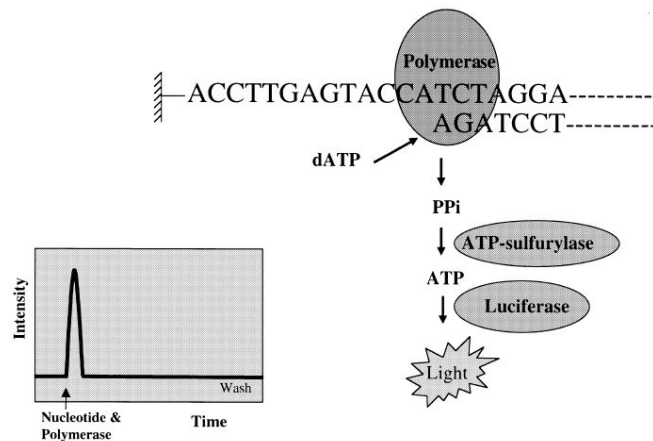


Abbildung 6: Prinzip der Pyrosequenzierung.

Abbildung nach Ronaghi (Ronaghi 2001). Beim Einbau eines dNTP in einen naszierenden DNA-Strang durch eine Polymerase wird PPi frei, welches mittels ATP-Sulfurylase in ATP umgewandelt wird. ATP dient der Energiebereitstellung für die Oxidation des Luziferins, wobei ein Lichtimpuls generiert wird.

Die Aufreinigung von 20 µl des PCR-Produktes erfolgte mittels VaccumPrep Workstation®. Die Sequenzierung wurde mit dem PyroMark Q96 ID Pyrosequenzierer® durchgeführt. Die zu verwendenden Mengen an Enzym und Substrat wurden abhängig von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt mit Hilfe der Pyro Q-CpG Software® errechnet. Für *HOXA5* wurden 0,8 µl Sequenzierprimer (20 pmol/µl) verwendet.

Der Grad der Methylierung wurde über die Pyro Q-CpG Software® in Form von Pyrogrammen für jede Probe visualisiert. Im Rahmen der vorangegangenen Bisulfitkonversion wurde der Methylierungszustand der Cytosine in einen T/C Polymorphismus übersetzt. Nach Hybridisierung der konvertierten Probe an einen Sequenzierprimer kam es zur Kettenverlängerung. Die in einer Enzymkaskade generierten Lichtblitze beim Nucleotideinbau wurden im Pyrogramm als Peak sichtbar. Die Peakhöhe verhält sich dabei proportional zur Anzahl der eingebauten Nucleotide. Aus dem Verhältnis der Signale T zu C ließ sich auf diese Weise die Methylierung des CpG-Dinucleotides bestimmen. Abbildung 7 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Patienten.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine genomweite Methylierungsanalyse von DNA aus Blutlymphozyten von 33 infertilen Patienten und 10 fertilen Kontrollprobanden mit Hilfe des Infinium Human Methylation450 BeadChip Array® durchgeführt. Die Daten wurden im Rahmen einer Qualitätsprüfung validiert und bioinformatisch aufgearbeitet. Gene, die differentiell methylierte CpG-Dinukleotide enthielten, wurden mittels einer Gene-Ontology-Analyse auf Anreicherungen in bestimmten Pathways überprüft. Außerdem wurde aufgrund von Vorergebnissen aus einer Studie von Bens und Kollegen (Bens et al. 2011) der Methylierungsstatus für 14 CpG-Positionen in der Promotorregion des Genes *HOXA5* für 29 infertile Patienten im Vergleich zu 10 fertilen Kontrollen durch das Bisulfit-Pyrosequenzierverfahren ermittelt und validiert.

4.1 Das Kandidatengen *HOXA5*

Ergebnisse einer Vorgängerstudie am Institut für Humangenetik des UKSH-Campus Kiel und der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel führten zur Generierung der Hypothese, dass bei männlichen Patienten mit bislang ungeklärter Infertilität veränderte Methylierungsmuster in der Promotorregion des Genes *HOXA5* vorliegen könnten (Bens et al. 2011). Die Studie hatte mittels Pyrosequenzierung bei Patienten mit Androgenrezeptormutationen die Methylierung für 14 CpG-Loci in dieser Region untersucht. Dementsprechend wurde in Rahmen dieser Arbeit bisulfitkonvertierte DNA von 29 infertilen Patienten mittels Pyrosequenzierung im Vergleich zu 10 fertilen Kontrollprobanden auf aberrante Methylierung für die gleichen Loci untersucht.

4.1.1 Bisulfit-Pyrosequenzierung

Der Methylierungsstatus wurde an insgesamt 14 CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion von *HOXA5* bestimmt. Bei der Korrelation der gewonnenen Daten aus der ersten Pyrosequenzierung mit denen des zweiten Laufes zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ($R^2 = 0,91$, Pearson Korrelationskoeffizient). Abbildung 8 stellt die Resultate graphisch dar. Dies bestätigt insgesamt die Methode als valides Messinstrument.

Beim Vergleich der Methylierungswerte von 29 infertilen Patienten und 10 fertilen Kontrollen konnte für keine der 14 untersuchten Positionen unter Verwendung eines zweiseitigen T-Testes ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in unten stehender Tabelle 6 zusammengefasst. Insgesamt scheint die *HOXA5*-Methylierung der Promotorregion in Blutlymphozyten nur selten eine Rolle in der Pathogenese der sporadischen männlichen Infertilität zu spielen.

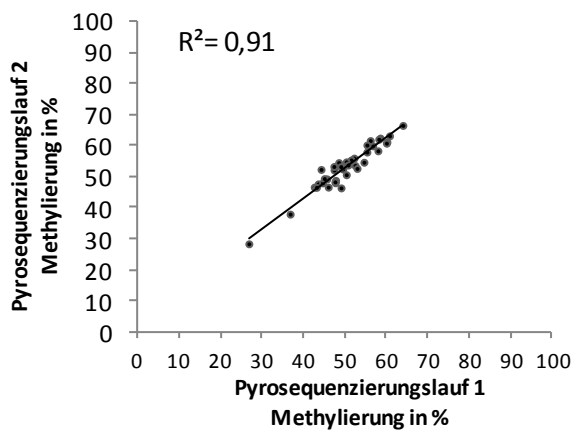


Abbildung 8: Qualitätskontrolle Pyrosequenzierung *HOXA5*.

Die im ersten Pyrosequenzierungslauf ermittelten Methylierungswerte für 29 Patienten und 10 Kontrollen korrelieren gut mit den in einer zweiten Untersuchung erhobenen Ergebnissen.

Tabelle 6: Methylierungswerte 14 CpG-Positionen *HOXA5*.

Die Tabelle vergleicht die Mittelwerte der Methylierung für 14 CpG-Dinukleotide in der Promotorregion von *HOXA5* von infertilen Patienten im Vergleich zu fertilen Kontrollen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

CpG- Position	Mittelwert Methylierung Patienten in Prozent (SD) n=29	Mittelwert Methylierung Kontrollen in Prozent (SD) n=10	p-Wert (t-Test)
1	67,8 (8,0)	65,1 (7,0)	0,18
2	60,6 (8,1)	58,6 (7,6)	0,32
3	63,3 (8,3)	61,2 (8,0)	0,34
4	62,3 (8,5)	60,0 (7,7)	0,17
5	62,5 (8,4)	59,8 (7,8)	0,20
6	65,7 (8,2)	63,5 (7,5)	0,29
7	66,1 (7,8)	64,3(7,1)	0,36
8	52,3 (8,4)	50,8 (9,0)	0,50
9	39,5 (7,9)	38,9 (8,1)	0,77
10	37,7 (6,7)	37,8 (8,4)	0,95
11	53,3 (8,0)	52,1 (8,3)	0,57
12	39,7 (5,9)	38,7 (5,8)	0,49
13	37,0 (7,1)	37,2 (7,6)	0,92
14	21,7 (5,2)	22,1 (5,0)	0,72

Um Einzelfälle mit etwaiger aberranter Methylierung zu identifizieren, erfolgte zusätzlich eine Darstellung in Form einer sogenannten Heatmap, einer farbcodierten Darstellung der jeweiligen Methylierungswerte für jeden einzelnen Probanden und jeden untersuchten CpG-Locus. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 visualisiert. Niedrige Methylierungswerte spiegeln sich in grüner Farbe wider, hohe Methylierungswerte sind in Rottönen dargestellt. Im Rahmen dieser Analyse fallen zwei Probanden durch eine globale Hypomethylierung der 14 CpG-Dinukleotide im Vergleich zu den anderen Proben auf. Da es sich neben einem infertilen Patienten (P26) ebenfalls um eine fertile Kontrolle (K4) handelt, scheint dieser Effekt keinen maßgeblichen Einfluss auf die Fruchtbarkeit zu haben.

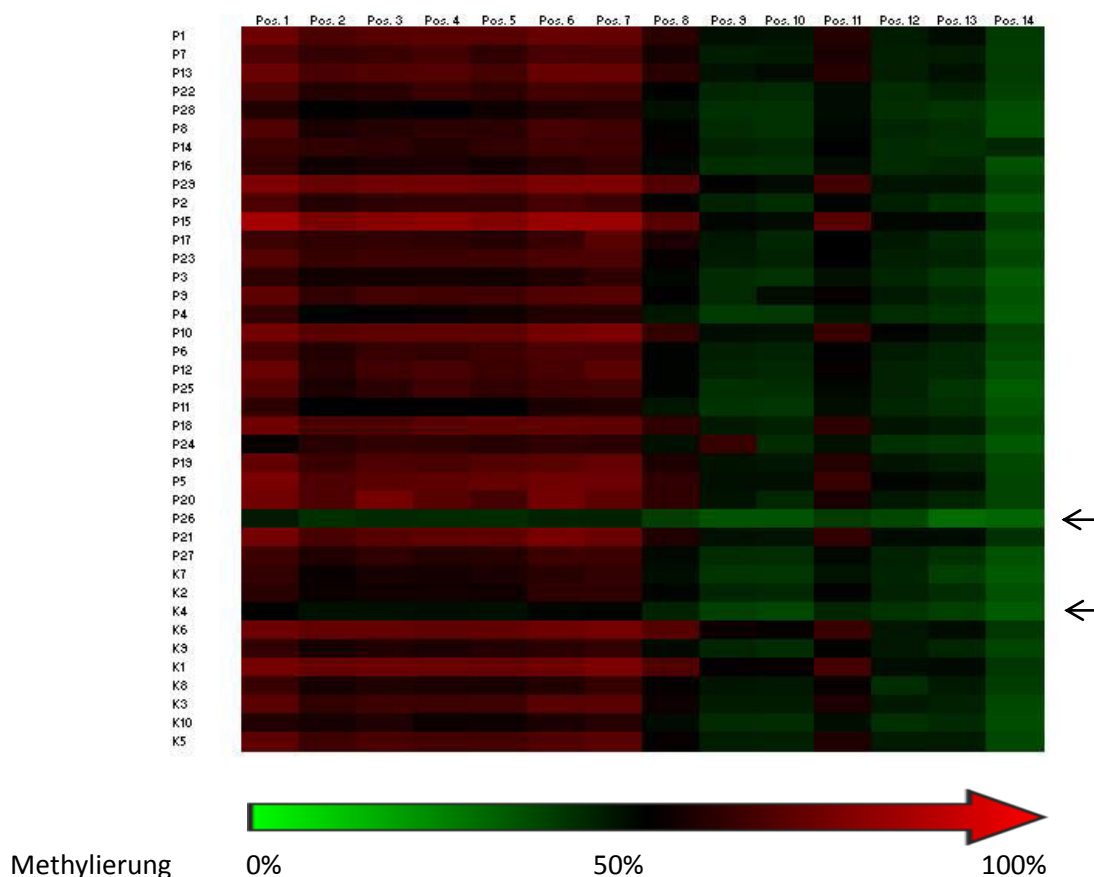


Abbildung 9: Farbkodierte Darstellung der Methylierungswerte für *HOXA5*.

Die Abbildung zeigt farbkodiert die Methylierungswerte für die 14 CpG-Dinukleotide in der Promotorregion von *HOXA5* (Spalten) für je 29 Patienten und 10 Kontrollen (Zeilen). Niedrige Methylierungswerte grün. Hohe Methylierungswerte rot. Die Pfeile markieren zwei Proben, die eine globale Hypomethylierung zeigen.

4.2 Methylierungsarray-Analyse

Um Unterschiede in den Methylierungsmustern im Blut fertiler und infertiler Männer aufzudecken und neben *HOXA5* weitere, möglicherweise an der Pathogenese der Infertilität beteiligte Gene zu ermitteln, wurde eine genomweite Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays® durchgeführt.

4.2.1 Qualitätsprüfung

4.2.1.1 Gene Call Rate: Detektierte CpGs

Die Illumina-Software erfasst für jede untersuchte Probe die Anzahl der erkannten Dinukleotide. Die CpG-Loci sind bei einem detection p-value < 0,01 in den Patientenproben im Mittel zu 99,81%, in den Kontrollproben zu 99,95% erkannt worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 in Form eines Boxplots veranschaulicht.

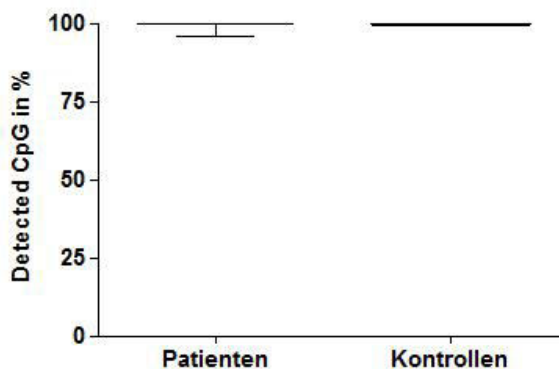


Abbildung 10: Gene Call Rate.

Vom Methylierungsarray erkannte CpG-Dinukleotide in Prozent. CpG-Dinukleotide sind sowohl für Patienten – als auch Kontrollproben zu annähernd 100 Prozent erkannt worden (*detection p-value < 0,01*)

4.2.2 Supervidierte Analyse der Arraydaten

Unter Festlegung der Bedingung, dass sich für das jeweils untersuchte CpG Methylierungsmittelwerte von Patienten und Kontrollen um mindestens 10% unterscheiden müssen, konnte für insgesamt 596 Loci ein signifikanter Unterschied in der Methylierung gezeigt werden ($p < 0,01$). Davon zeigten 42 CpG-Loci eine Differenz in der Methylierung von mindestens 20% ($p < 0,01$). Die *Heatmap* in Abbildung 11 stellt diese Ergebnisse farbkodiert dar. Die einzelnen Spalten entsprechen jeweils den Patienten- und Kontrollproben, die Zeilen den differentiell methylierten Loci. Niedrige Methylierungswerte werden grün dargestellt, hohe Methylierungswerte kommen in roter Farbe zum Ausdruck. Die Abbildung wurde mit dem OMICS Explorer® der Firma Qlucore® erstellt.

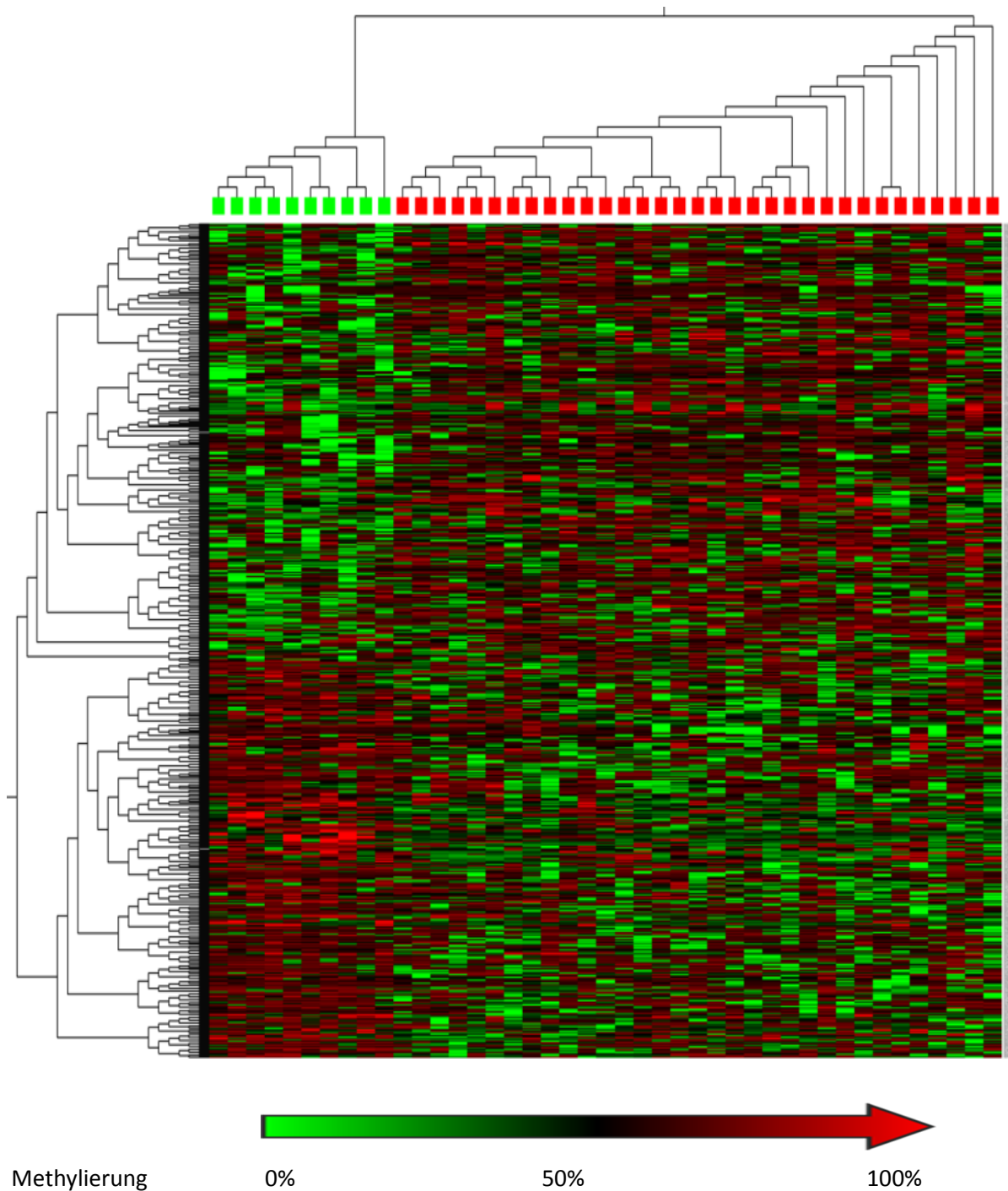


Abbildung 11: Hierarchisch geclusterte Heatmap.

Farbkodierte Darstellung der Methylierungswerte für 596 Loci. Jede Zeile entspricht einem CpG-Dinukleotid. Die einzelnen Spalten entsprechen den 10 fertilen Kontrollen (links, grüne Quadrate) und 33 infertilen Patienten (rechts, rote Quadrate). Hohe Methylierungswerte rot. Niedrige Methylierungswerte grün.

Im Rahmen des Clustering werden Proben mit ähnlichen Merkmalen durch das Programm automatisch in Untergruppen zusammengefasst. Die Abbildung verdeutlicht, dass eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen erfolgt und tatsächlich fassbare Unterschiede in den Methylierungsmustern fertiler und infertiler Männer existieren.

4.2.3 Principal Component Analysis

Die Berechnungen für die Hauptkomponentenanalyse basieren auf den 596 CpG-Loci, die sich bezüglich der DNA-Methylierung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe um mindestens 10% unterscheiden. Auch unter Verwendung dieser Methode zeigt sich, dass Patienten und Kontrollen anhand ihrer Methylierungsmuster klar voneinander abzugrenzen sind. Die PCA ist in Abbildung 12 dargestellt.

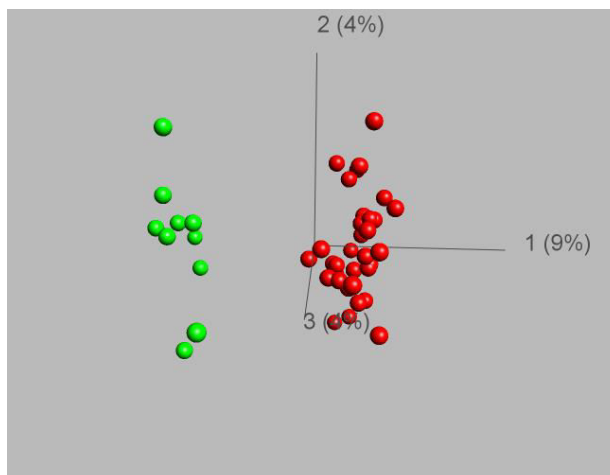


Abbildung 12: Principle Component Analysis.

Multivarianzanalyse der Mikroarraydaten (average beta-Werte). Grüne Kugeln entsprechen den einzelnen Kontrollproben (n=10), rote den Patientenproben (n=33). Patienten und Kontrollen sind auch in dieser Darstellung deutlich voneinander abzugrenzen.

4.2.4 Gene Ontology Analyse

Mithilfe einer Gene Ontology Analyse wurden die 596 differentiell methylierten Loci auf Anreicherungen in bestimmten funktionellen Pathways, biologischen Prozessen oder zellulären Komponenten untersucht. Die Analyse zeigte eine 39,23-fache Anreicherung für Gene der *PIWIL*-Familie (*PIWIL1*, *PIWIL2*), die eine Rolle in der piRNA-Bindung spielen ($p= 8,5 \times 10^{-4}$).

Es konnte weiterhin eine Überrepräsentation verschiedener *HLA*-Gene in den differentiell methylierten Loci gezeigt werden. Folgende Bereiche waren angereichert: *MHC*-Klasse-II-Proteinkomplexe (18,10-fache Anreicherung), *MHC*-Klasse-II-Rezeptoraktivität (22,06-fache Anreicherung) und Antigenprozessierung und -präsentation (13,84-fache Anreicherung). Abbildung 13 zeigt ein Beispiel für eine Gene Ontology Analyse.

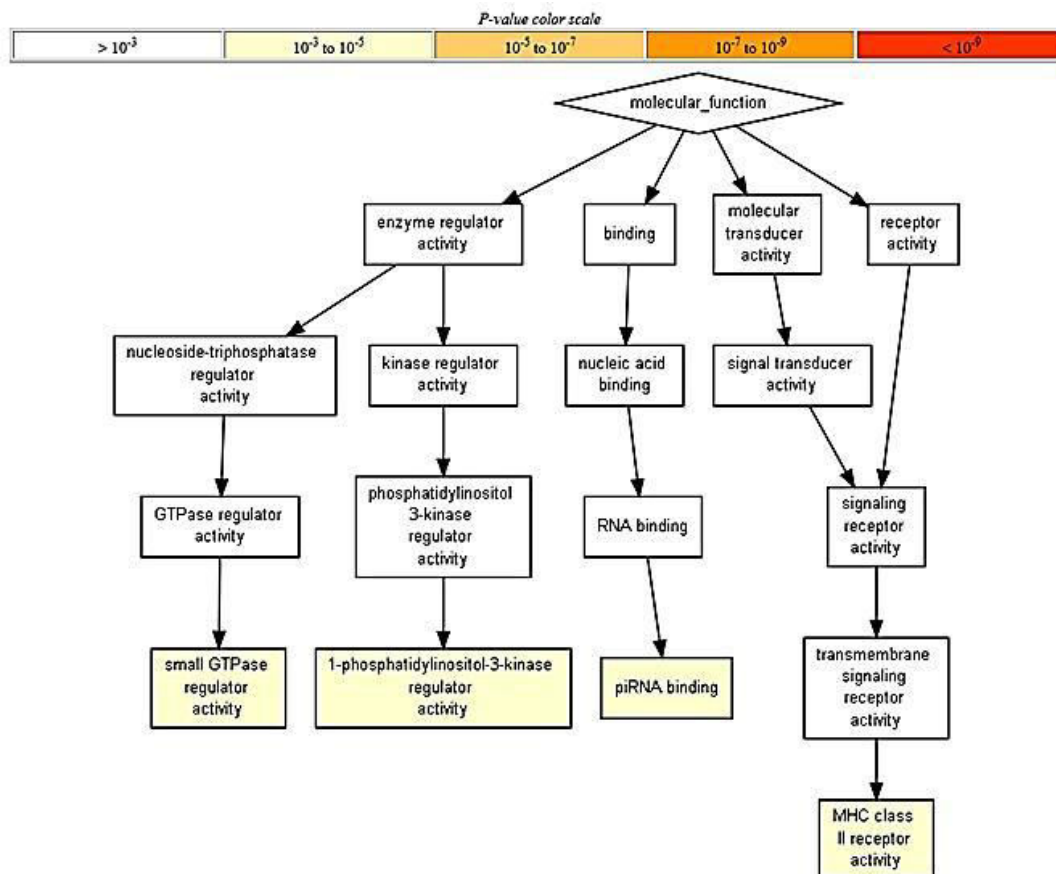


Abbildung 13: Gene Ontology Analyse.

Die Abbildung zeigt molekularbiologische Pathways, für die Anreicherungen in der untersuchten Gruppe der 596 differentiell methylierten Gene gefunden werden konnten. Ähnliche Analysen sind für die Beteiligung an biologischen Prozessen und Anreicherung in zellulären Komponenten gemacht worden.

Die Gene Ontology Analyse identifizierte *PIWIL 1* und *PIWIL2* als relevante Kandidatengene. Eine aberrante Methylierung in diesen Genen könnte somit eine Rolle in der Pathogenese der männlichen Infertilität spielen.

4.3 Die Kandidatengene *PIWIL1* und *PIWIL2*

Die Gene Ontology Analyse in Kombination mit einer Literaturrecherche verweist auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Infertilität und den Genen *PIWIL1* und *PIWIL2*. *PIWI* steht für p-element induced wimpy testis. Da diese Gene somit potentielle Kandidatengene für bislang ungeklärte männliche Infertilität darstellen, sind sie im Folgenden näher untersucht worden. Für *PIWIL1* liegt das differentiell methylierte CpG-Dinukleotid in einer CpG-Insel auf Chromosom 12 (chr12: 130.824.082 bp, hg19). Im Vergleich zu fertilen Kontrollen konnten für den entsprechenden CpG-Locus bei infertilen Patienten insgesamt signifikant höhere Methylierungswerte beobachtet werden ($p < 0,01$). Die mittlere Methylierung lag für Patienten-DNA bei 59,5% ($SD=8,1\%$). Im Vergleich dazu betrug die DNA-Methylierung bei Kontrollen im Mittel 48,2% ($SD=16,4\%$).

Das untersuchte CpG-Dinukleotid für *PIWIL2* befindet sich auf Chromosom 8 (chr8: 22.133.375 bp, hg19) in einer Shore-Region, welche eine CpG-Insel flankiert. Für diese Position zeigten Patienten insgesamt niedrigere Methylierungswerte im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden ($p < 0,01$). Die mittlere Methylierung belief sich für Patientenproben auf 71,4% ($SD=19,4\%$) im Vergleich zu 83,7% für Kontroll-DNA ($SD=2,3\%$). Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 7: Mittlere Methylierung *PIWIL1*, *PIWIL2*.

Die Tabelle stellt für 2 CpG-Dinukleotide im Vergleich die mittlere Methylierung von Patienten- und Kontroll-DNA dar. Weiterhin zu entnehmen sind Standardabweichung und p-Wert.

CpG-Position (hg19)	Patienten Mittelwert Methylierung in % (SD) n=33	Kontrollen Mittelwert Methylierung in % (SD) n=10	p-Wert (<i>Illumina costum</i>)
chr12: 130.824.082	59,5 (8,1)	48,2 (16,4)	<0,01
chr8: 22.133.375	71,2 (19,4)	83,7 (2,3)	<0,01

4.3.1 Streudiagramme *PIWIL1* und *PIWIL2*

Um einen besseren Überblick über die Verteilung der Methylierungswerte innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppen zu gewinnen, wurden die Ergebnisse weiterhin in Form eines Streudiagrammes in Abbildung 14 dargestellt. Bei der Verteilungsanalyse des CpG-Dinukleotids in *PIWIL1* war auffällig, dass 3 Kontrollprobanden niedrigere Methylierungswerte zeigen als die Gesamtgruppe der infertilen Patienten (Abb. 14A). Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen protektiven Effekt handeln könnte, wurde eine weitere statistische Analyse durchgeführt. Bei zwar geringer Probandenzahl ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$, *Fisher's Exact Test*). Für das untersuchte CpG-Dinukleotid in *PIWIL2* konnte eine Subgruppe von 8 Patienten identifiziert werden,

die deutlich niedrigere Methylierungswerte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (Abb. 14B). Die Methylierung beträgt für diese 8 infertilen Patienten im Mittel 37,8% im Vergleich zu 83,7% in der Kontrollgruppe. Statistisch ist dieser Effekt jedoch nicht signifikant ($p=0,165$; Fisher's Exact Test).

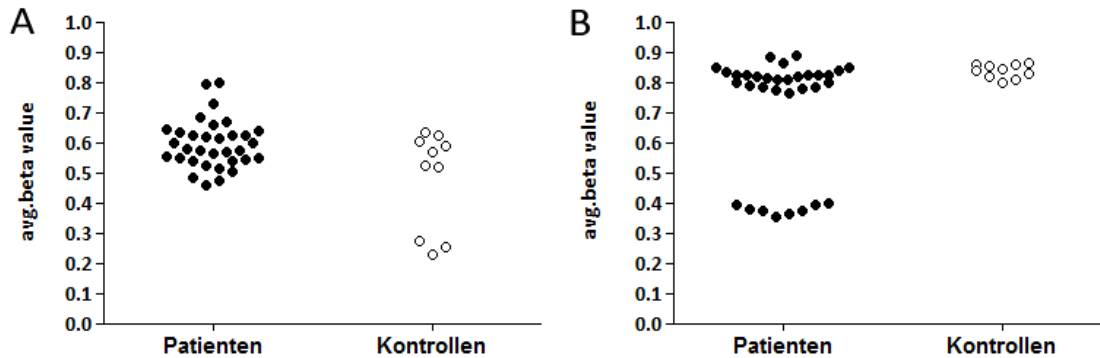


Abbildung 14: Streudiagramm *PIWIL1* (A) und *PIWIL2* (B).

- (A) Die Verteilungsanalyse der average beta values für das CpG-Dinukleotid in *PIWIL1* identifiziert 3 Kontrollprobanden mit signifikant niedrigeren Methylierungswerten ($p<0,001$).
- (B) Die Verteilung der average beta values des CpG-Locus in *PIWIL2* zeigt eine Subgruppe von 8 Patienten, die im Vergleich zu fertilen Kontrollen niedrigere Methylierungswerte aufweisen ($p=0,165$)

4.3.2 Array-Analyse von Patienten mit Hinweis auf sekundäre Sterilität

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit erfolgte eine alternative Auswertung des Methylierungsarrays mit den selben Patienten- und Kontrollproben, wobei 3 Patienten mit Hinweisen auf das Vorhandensein einer sekundären Sterilität aus der initialen Kohorte ($n=33$) ausgeschlossen wurden (Friemel et al. 2014). Für die verbleibenden 30 Patienten konnten im Vergleich zu den 10 fertilen Kontrollen bei dieser zweiten Analyse 471 differentiell methylierte CpG-Loci identifiziert werden. Dies schließt auch die bereits im ersten Lauf auffälligen CpG-Positionen in den Genen *PIWIL1* und *PIWIL2* ein. Ferner konnte die bereits in Kapitel 4.3.1. (Abbildung 14) beschriebene Streuung in verschiedene Subgruppen reproduziert werden. So konnten für das CpG-Dinukleotid in *PIWIL1* erneut 3 Kontrollprobanden mit deutlich niedrigeren average beta-Werten identifiziert werden. Von ehemals 8 infertilen Patienten zeigten in dieser Auswertung immer noch 7 deutlich niedrigere Methylierungswerte als der Rest der Kohorte (Friemel et al. 2014). Eine genauere Analyse der aberrant methylierten CpG-Dinukleotide konnte ferner aufdecken, dass sich 94,5% davon in oder in der Nähe von bekannten SNPs befinden.

4.3.3 SNP-Analyse *PIWIL*-Gene

Um mehr Informationen über die entsprechenden CpG-Dinukleotide in *PIWIL1* und *PIWIL2* zu gewinnen, wurden die betreffenden Sequenzen mit Daten der UCSC-Human-Genome-Browser-Datenbank abgeglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei den aberrant methylierten CpG-Loci, wie vermutet, um bekannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) handelt. Dies sind Variationen einzelner Basen im DNA-Strang, die bei mindestens einem Prozent der Bevölkerung auftreten. Bei dem SNP in *PIWIL1* (rs10773767) kommt es zu einem Basenaustausch von Guanin zu Adenin bei einer Allelfrequenz von A: 15,58% und G: 84,42%. Die durchschnittliche Heterozygotenfrequenz liegt bei 0,26 (+/- 0,25) (Sherry et al. 2001). Das Vorhandensein des A-Allels ändert in diesem Fall das CpG-Dinukleotid zu einem CpA-Dinukleotid. Eine Sequenzierung der entsprechenden Region bei 28 Patienten- und 10 Kontrollproben konnte zeigen, dass die 3 Kontrollprobanden, die sich durch deutlich niedrigere average beta values auszeichneten (Abbildung 14A), für das A-Allel homozygot (A/A) sind. Außerdem tragen 4 weitere Kontrollen das Allel in heterozygoter Form (A/G). Eine Homozygotie für A/A konnte wiederum in keiner einzigen Patientenprobe (n=28) nachgewiesen werden (Friemel et al. 2014). Insgesamt ist das A-Allel in der infertilen Kohorte signifikant seltener vorhanden (13/56) als in der Kontrollgruppe (10/20) ($p=0,0449$, Fisher's Exact Test) (Friemel et al. 2014).

Dem SNP in *PIWIL2* (rs6982089) liegt ein Austausch von Cytosin zu Adenin zugrunde. Die Allelfrequenzen betragen 95,57% für Cytosin und 4,43% für Adenin bei einer Heterozygotenfrequenz von 0,07 (+/- 0,18) (Sherry et al. 2001). Aus dem CpG-Dinukleotid entsteht somit eine ApG-Variante. In der Supgruppe der 7 Patienten mit deutlich niedrigeren average beta values konnte eine Sequenzierung zeigen, dass diese Probanden alle das A-Allel heterozygot tragen (C/A). In den verbleibenden Patientenproben (n=21) und allen Kontrollproben (n=10) konnte das A-Allel nicht nachgewiesen werden (C/C) (Friemel et al. 2014).

Diese Ergebnisse werfen nun die Frage auf, inwiefern Polymorphismen in CpG-Dinukleotiden Einfluss auf den Methylierungsgrad haben und welche Rolle sie in der Pathogenese der männlichen Infertilität spielen.

4.4 Die Kandidatengene *KAL1*, *SPAG11B*, *CST9L*, *SRD5A3*, *DNAJB13*

In einer weiteren Analyse wurden die 596 differentiell methylierten CpG-Loci mit den betroffenen Genen in einer PubMed-Recherche auf bekannte Assoziationen zu männlicher Infertilität hin evaluiert. Für insgesamt 5 Gene konnte ein entsprechender thematischer Bezug gefunden werden.

4.4.1 *KAL1*

Mutationen und Deletionen im Gen *KAL1*, in dem sich ein weiterer aberrant methylierter CpG-Locus in der N-Shore Region befindetet, führen zum X-chromosomal rezessiv vererbten Kallmann-Syndrom, einem Symptomkomplex aus Hypo- beziehungsweise Anosmie und hypogonadotropem Hypogonadismus (Dodé und Hardelin 2009). Für den CpG-Locus in *KAL1* (chrX: 8.696.915 bp, hg19) zeigten Patienten eine durchschnittliche Methylierung von 40,8% ($SD=34,0\%$). Kontrollen waren im Vergleich höher methyliert bei einem Mittelwert von 61,2% ($SD=28,1\%$). Das Streudiagramm in Abbildung 15A zeigt, dass sich eine Gruppe von 17 Patienten durch deutlich niedrigere Methylierungswerte von den Kontrollen unterscheidet. Eine statistische Signifikanz wird unter Verwendung des Fisher's Exact Test nicht erreicht ($p=0,1448$; *Fisher's Exact Test*). Dennoch wurde die entsprechende Region mit der UCSC-Datenbank auf das Vorhandensein von SNPs überprüft. Tatsächlich handelt es sich auch bei dem CpG-Dinukleotid in *KAL1* um einen genetischen Polymorphismus (rs1236387), bei dem es zu einem Austausch von Guanin zu Adenin kommt. Die Allelfrequenz beträgt 42,5% für Adenin und 57,5% für Guanin bei einer Heterozygotenfrequenz von 0,496 (+/- 0,043) (Sherry et al. 2001).

4.4.2 *CST9L*

Die PubMed-Recherche für *CST9L* ergab insgesamt nur 3 Treffer. Einen Hinweis für eine Beteiligung an der Pathogenese der männlichen Infertilität liefert die Tatsache, dass das es im Hoden exprimiert wird (Eriksson et al. 2002). Für das CpG-Dinukleotid in *CST9L* (chr20: 23.550.632 bp, hg19) zeigten Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine deutliche Hypomethylierung von im Mittel 53,3% ($SD=30,2\%$). Die mittlere Methylierung der Kontrollen lag bei 70,9% ($SD=16,4\%$). Für diesen Locus konnte in einem Streudiagramm (Abb. 15B) ebenfalls eine Subgruppe von 9 Patienten identifiziert werden, die erheblich niedrigere Methylierungswerte zeigte. Auch in diesem Fall ergibt sich keine statistische Signifikanz ($p=0,0888$; *Fisher's Exact Test*). Allerdings handelt es sich bei dieser Position ebenfalls um einen SNP (rs6076093) bei dem Adenin anstelle von Guanin in der DNA-Sequenz vorhanden ist. Die Frequenzen betragen 38,75% für Adenin und 61,3% für Guanin bei einer Heterozygotenfrequenz von 0,487 (+/- 0,079) (Sherry et al. 2001).

4.4.3 *SRD5A3*

Für das Gen *SRD5A3* ist kein direkter Zusammenhang mit Infertilität publiziert. Allerdings greift es in den Androgenstoffwechsel ein und stellt somit ein interessantes Kandidatengen dar (Uemura et al., 2008). Für den CpG-Locus im Gen *SRD5A3* (chr4: 56.231.727 bp, hg19) zeigten die infertilen Patienten insgesamt eine mittlere Methylierung von 73,9% ($SD=21,9\%$). Die Kontroll-DNA war dahingegen

niedriger methyliert bei einem Mittelwert von 61,9% ($SD=24,8\%$). Insgesamt kann bei der Darstellung in Form eines Streudiagrammes (Abb. 15C) in dem untersuchten Kollektiv eine Gruppe von 19 Patienten identifiziert werden, die im Vergleich zu den Kontrollen höhere Methylierungswerte zeigt. Eine statistische Signifikanz ist auch in diesem Fall nicht gegeben ($p=0,1623$; *Fisher's Exact Test*). Es handelt sich auch bei diesem CpG um einen SNP (rs66630638). An der entsprechenden Stelle wird in der DNA-Frequenz Guanin durch Adenin ersetzt. Die Allelfrequenzen betragen 15,91% für Adenin und 84,0% für Guanin bei einer Heterozygotenfrequenz von 0,444 (+/- 0,157) (Sherry et al. 2001).

4.4.4 DNAJB13

Ein weiteres auffälliges CpG-Dinukleotid wurde im Gen *DNAJB13* gefunden (chr11: 73.661.251 bp, hg19). *DNAJB13* ist in der PubMed-Recherche im Zusammenhang mit Veränderungen der Spermienmorphologie bei Mäusen und apoptotischen Vorgängen in humanen Spermien aufgefallen (Guan et al. 2009, Liu et al. 2004). Unsere Patienten zeigten im Vergleich zu fertilen Kontrollen niedrigere Methylierungswerte von im Mittel 70,4% ($SD=17,7\%$). Demgegenüber lagen die durchschnittlichen Methylierungswerte für diesen Locus bei Kontrollen bei 80,6% ($SD=7,8\%$). Die Analyse des Streudiagrammes (Abb. 15D) zur Verteilung der einzelnen Methylierungswerte zeigt auch hier eine größere Subgruppe mit deutlich niedrigeren Methylierungswerten. Die statistische Auswertung zeigt auch hier keine Signifikanz ($p=0,128$; *Fisher's Exact Test*). Weitere Recherchen zu der entsprechenden Genregion konnten zeigen, dass es sich auch in diesem Fall um einen genetischen Polymorphismus handelt (rs72982956), bei dem es zum Austausch von Guanin zu Adenin kommt. Die Allelfrequenzen betragen 11,2% für Adenin und 88,8% für Guanin bei einer Heterozygotenfrequenz von 0,500 (+/- 0,00) (Sherry et al. 2001).

4.4.5 SPAG11B

Die Datenbankrecherche identifizierte außerdem *SPAG11B* (Sperm associated antigen) als weiteres Kandidatengen und lässt auf einen immunologischen Zusammenhang mit männlicher Infertilität schließen (von Horsten et al. 2002). Auch hier zeigten unfruchtbare Patienten für ein CpG-Dinukleotid im Vergleich zu Kontrollen eine veränderte Methylierung (chr8: 7.320.532 bp, hg19) (Sherry et al. 2001). Die durchschnittliche Methylierung liegt für Patienten bei 64,8% ($SD=21,2\%$). Kontrollen zeigen im Vergleich dazu niedrigere Methylierungswerte von im Mittel 45,0% ($SD=25,2\%$). *Fisher's Exact Test* zeigt in diesem Fall eine statistische Signifikanz bezüglich der Verteilung der sich über ein Streudiagramm (Abb. 15E) ergebenden Subgruppen ($p=0,0441$; *Fisher's Exact Test*). Für diese CpG Position ist jedoch kein Polymorphismus bekannt.

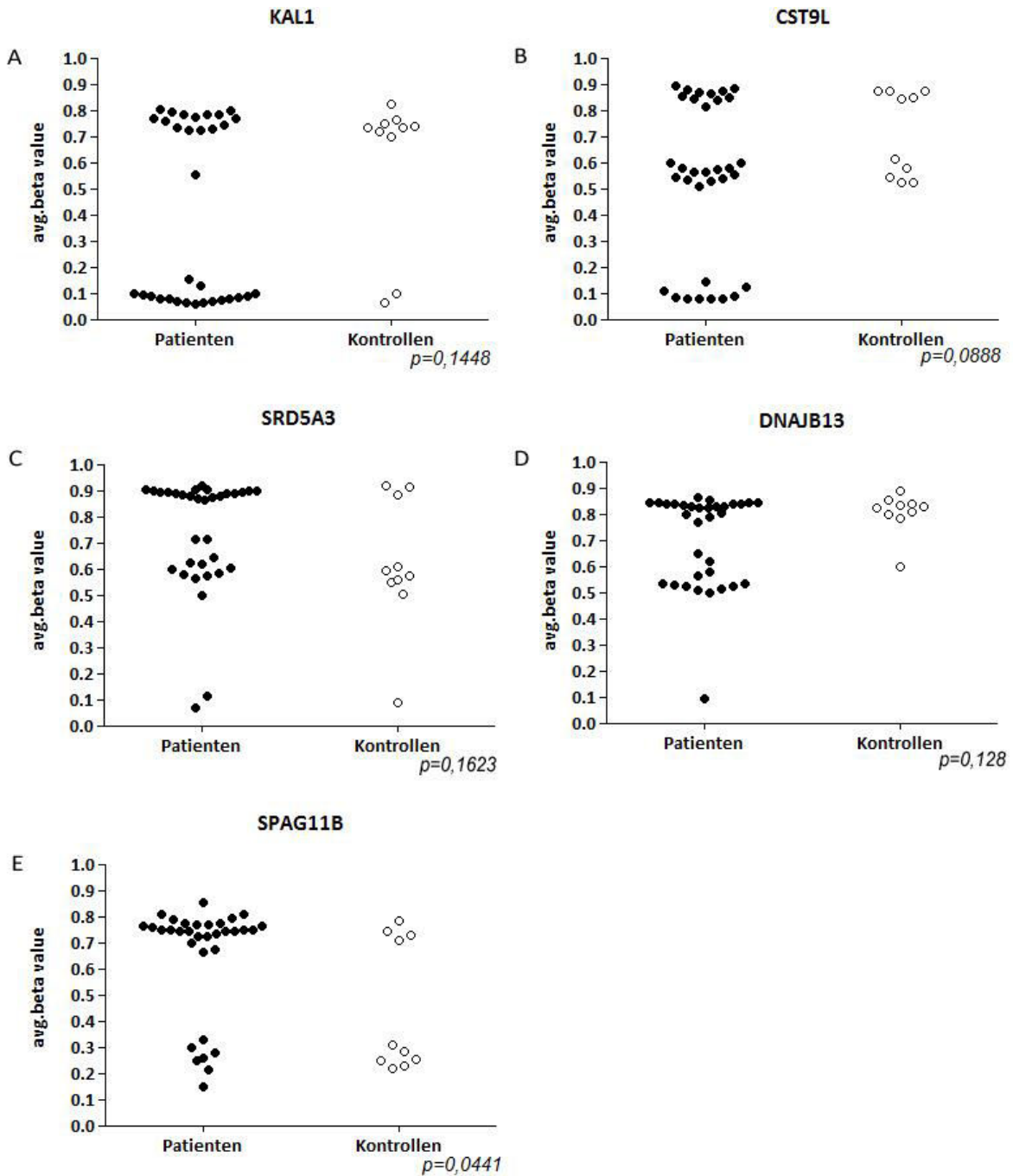


Abbildung 15: Streudiagramme Kandidatengene *KAL1*, *SCT9L*, *SRD5A3*, *DNAJB13* und *SPAG11B*.
Average Beta-Werte verteilt auf einzelne Patienten- und Kontrollproben für 5 weitere Kandidatengene mit entsprechenden p-Werten (Fisher's Exact Test).

4.5 Abgleich der Methylierungsanalyse mit klinischen Daten

Weiterhin wurden die Patienten im Hinblick auf die erhobenen klinischen Merkmale untersucht. Im Rahmen dieser Analyse wurde festgestellt, dass 2 Patienten, die eine Mumpserkrankung in der Anamnese hatten, für 41 CpG-Dinukleotide, im Vergleich zu 8 Individuen, für die eine Infektion ausgeschlossen werden konnte, aberrante Methylierungswerte zeigten. Jedoch ist für keines der betroffenen Gene bislang ein Zusammenhang mit Unfruchtbarkeit oder Beeinträchtigung der Spermio-genese bekannt. Weiterhin zeigten 2 Patienten mit erhöhten LH-Werten für 12 CpG-Positionen eine veränderte Methylierung im Vergleich zu 9 Patienten mit normwertigem LH. Auch in diesem Fall sind keine mit Infertilität bekannt assoziierten Gene betroffen. In Abbildung 16 sind die entsprechenden *Heatmaps* dargestellt. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass eine aberrante DNA-Methylierung in bestimmten CpG-Loci bei infertilen Männern mit den erhobenen klinischen Parametern korreliert.

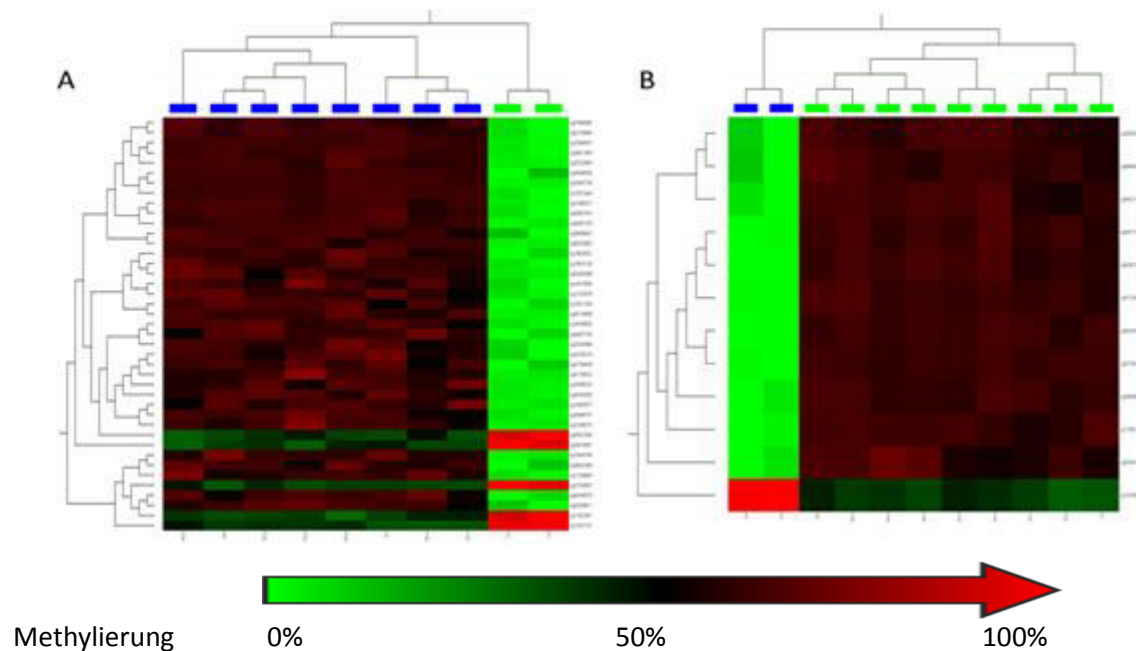


Abbildung 16: Heatmaps Evaluation klinische Daten.

- (A) 2 Patienten mit Mumpserkrankung (2 Spalten rechts, grüne Rechtecke) in der Vorgeschichte zeigen für 41 CpG-Dinukleotide (Zeilen) im Vergleich zu 8 Patienten (8 Spalten links, blaue Rechtecke) ohne Infektion veränderte Methylierung.
- (B) 2 Patienten mit erhöhten LH-Werte (2 Spalten links, blaue Rechtecke) zeigen für 12 CpG-Positionen (Zeilen) veränderte Methylierung im Vergleich zu 9 infertilen Patienten (9 Spalten rechts, grüne Rechtecke) mit normwertigem LH.
- Normalisierung: Mittelwert 0, Varianz 1. Hohe Methylierungswerte rot. Niedrige Methylierungswerte grün.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob sich bei Männern mit bisher ungeklärter Infertilität ein von fertilen Männern abweichendes Methylierungsmuster im peripheren Blut nachweisen lässt. In einer genomweiten Methylierungsanalyse unter Verwendung des Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array® konnten insgesamt 596 in beiden Gruppen differentiell methylierte CpG-Loci identifiziert werden. In einer Gene Ontology Analyse wurden Gene der *PIWIL*-Familie, repräsentiert durch *PIWIL1* und *PIWIL2*, als funktionell relevante Kandidatengene ermittelt. Eine Pubmed-Literaturrecherche deckte 5 weitere Gene auf, für die sich ein thematischer Bezug zu männlicher Infertilität herstellen lässt. Ein Abgleich mit den erhobenen klinischen Daten konnte zeigen, dass Patienten mit einer Mumpserkrankung in der Anamnese ein von nicht-Erkrankten abweichendes Methylierungsmuster im peripheren Blut zeigen. Gleiches gilt für Patienten mit erhöhten LH-werten im Vergleich zu solchen mit normwertigem LH. Eine detaillierte Analyse der potentiellen Kandidatengene zeigte, dass es sich bei den jeweils aberrant methylierten CpG-Dinukleotiden häufig um Regionen handelt, für die Polymorphismen (SNPs) bekannt sind.

5.1 Methodvalidierung Pyrosequenzierung und BeadChip Array

Alle in dieser Arbeit angewandten Verfahren zur Evaluierung der DNA-Methylierung basieren auf der chemischen Modifikation der DNA durch Bisulfitkonversion, die erstmals von Frommer et al. 1992 beschrieben und publiziert wurde (Frommer et al. 1992). Vor- und Nachteile dieses Verfahrens sind unter anderem in den Arbeiten von Ammerpohl und Kollegen sowie Laird beschrieben (Ammerpohl et al. 2009, Laird 2010).

Unter Verwendung dieser Methode bleibt im Gegensatz zum DNA-Verdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen deren Integrität erhalten (Ammerpohl et al. 2009). Da die Möglichkeit besteht, konvertierte DNA zu amplifizieren, sind nur geringe Mengen Ausgangsmaterial nötig (Kuan et al. 2010). Das Verfahren erlaubt die Verwendung von DNA verschiedenen Ursprungs (Frommer et al. 1992).

Die Bisulfitkonversion gelingt jedoch nicht immer vollständig. Dies liegt vor allem an der unvollständigen Denaturierung CpG-reicher Sequenzen. Dies kann zur Ermittlung falsch erhöhter Methylierungswerte führen (Warnecke et al. 2002). Cytosine, die außerhalb von CpG-Dinukleotiden liegen, dienen jedoch als Indikator für die Güte der Konversion. Diese Cytosine sind in der Regel nicht methyliert und müssten demnach alle zu Thymin konvertiert werden. Die Pyrosequenzierung nutzt diesen Umstand als Qualitätskontrolle, was zur Exaktheit der Methode beiträgt (Ammerpohl et al. 2009). Ein weiterer Aspekt besteht in der Tatsache, dass unmethylierte DNA nach Konversion der

Cytosine zu Thymin nur noch 3 Basen enthält und damit das Primer-Design erschwert (Laird 2010, Ammerpohl et al. 2009).

Die Pyrosequenzierung ist eine etablierte Technik zur Methylierungsanalyse bisulfitkonvertierter DNA. Das Verfahren ist schnell und ermöglicht die Auswertung mehrerer Proben zum gleichen Zeitpunkt (Ronaghi 2001). Es erlaubt die Sequenzierung jeder beliebigen DNA-Sequenz, ist jedoch limitiert durch die DNA-Länge. Pro Lauf können nur 100-150 bp sequenziert werden (Ammerpohl et al. 2009).

Hier bietet die Array-basierte Methylierungsanalyse durch die genomweite Abdeckung Vorteile (Bibikova et al. 2011). Der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array® erkennt über 485.000 CpG-Dinukleotide pro Probe. Pro Gen sind im Durchschnitt 17 CpG-Dinukleotide verteilt auf Promotorregionen, 5'UTR, Exone und 3'UTR abgebildet sowie 96% der CpG Islands und flankierende Regionen. Damit ist die Methode ein geeignetes Verfahren zur Ermittlung von Kandidatengen, wobei eine genaue Validierung unter Zuhilfenahme der Pyrosequenzierung erfolgen kann (Ammerpohl et al. 2009).

Studien konnten zeigen, dass der Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array® qualitativ gleichwertige Ergebnisse zu etablierten Verfahren wie der Bisulfitsequenzierung liefert (Bibikova et al. 2011).

5.2 Methylierungsstörungen als Ursache für männliche Infertilität

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Methylierungsveränderungen eine Rolle in der Pathogenese der männlichen Infertilität spielen. So konnten unter Verwendung des Illumina 450k Human Methylation BeadChip Array® für insgesamt 596 CpG-Loci signifikante Unterschiede in den Methylierungsmustern fertiler und infertiler Probanden ermittelt werden. Die betroffenen CpG-Dinukleotide liegen unter anderem in Kandidatengen, die für die Pathogenese der männlichen Infertilität von Bedeutung sein können. Einen limitierenden Faktor für die Interpretation der Ergebnisse stellt das verwendete Material dar. Studien, die sich bislang mit Methylierungsstörungen als Ursache für männliche Unfruchtbarkeit befasst haben, verwendeten als Zielgewebe Spermienproben bzw. Hodenmaterial infertiler Probanden (Houshdaran et al. 2007, Marques et al. 2007, Boissonnas et al. 2010, Navarro-Costa et al. 2010). In dieser Arbeit wurde mit DNA isoliert aus Blutlymphozyten gearbeitet. Dass sich die Methylierungsmuster in verschiedenen Geweben unterscheiden ist lange bekannt und vermutlich die Ursache für die gewebespezifische Expression von Genen (Shiota 2004). Dies konnte vor kurzem nochmals im Rahmen des humanen Epigenom-Projektes (HEP) bestätigt werden. Das HEP hat die genomweite intra- und interindividuelle Charakterisierung epigenetischer Muster für verschiedene Gewebe, Geschlechter und Altersgruppen zum Ziel. Eine Analyse der Methylierungsmuster der Chromosomen 6, 20 und 22 deckte auf, dass

Spermien insgesamt die größten Unterschiede im Vergleich zu anderen Geweben zeigen (Eckhardt et al. 2006). Die Gesamtmethylierung in Spermien weicht im Mittel zu 17-18% von der in Blutlymphozyten ab. Dies ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass es im Rahmen der Geschlechtszellentwicklung zur extensiven Reprogrammierung epigenetischer Muster kommt (Eckhardt et al. 2006). In wie fern sich Material aus peripherem Blut für ein Screening auf Methylierungsveränderungen bei Infertilität eignet, werden zukünftige Untersuchungen zeigen müssen. Dass sich aberrante DNA-Methylierungsmuster bei bestimmten Erkrankungen jedoch nicht nur im jeweiligen Zielgewebe, sondern auch in Blutlymphozyten nachweisen lassen, konnte durch Kinoshita und Kollegen bestätigt werden. Sie untersuchten die genomweite DNA-Methylierung in peripherem Blut von Patienten mit Schizophrenie und konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zu einem psychisch gesunden Kontrollkollektiv feststellen (Kinoshita et al. 2013).

Ursache für die Tatsache, dass biologisch relevante Methylierungsveränderungen nicht nur im Zielgewebe, sondern auch im peripheren Blut nachweisbar sind, könnten sehr frühe Fehler in der Löschung und Reprogrammierung der Methylierungsmuster in der Embryonalentwicklung sein (Houshdaran et al. 2007). Disruptoren, wie Infektionen oder Umwelteinflüsse, könnten epigenetische Veränderungen verursachen, die über embryonale Stammzellen hinaus in verschiedenen Geweben persistieren. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), die mit Methylierungsveränderungen assoziiert sind, finden sich unabhängig davon in allen Geweben wieder (Vignal et al. 2002).

5.3 Methylierungsassoziierte Single Nucleotide Polymorphisms

Eine statistische Analyse der potentiell an der Pathogenese der männlichen Infertilität beteiligten Kandidatengene zeigte, dass es sich bei den jeweils aberrant methylierten CpG-Dinukleotiden fast ausschließlich um Regionen handelt, für die Polymorphismen (SNPs) bekannt sind. Solche Sequenzvariationen können möglicherweise über eine Veränderung in der allel-spezifischen DNA-Methylierung (ASM) zu einer aberranten Expression bestimmter Gene führen. Die Studienlage legt nahe, dass weitaus größere Bereiche des Genoms als bislang angenommen auf diese Weise über methylierungsassoziierte SNPs (mSNP) reguliert werden.

Die Arbeitsgruppe um Robert Shoemaker bestätigt unsere Hypothese, dass Sequenzvariationen in Form von SNPs einen entscheidenden Einfluss auf die DNA-Methylierung haben (Shoemaker et al. 2010). Sie untersuchten verschiedene Zelllinien auf einen Zusammenhang zwischen allel-spezifischer Methylierung und entsprechende Sequenzvariationen. Für die jeweils untersuchten heterozygoten Polymorphismen konnte in allen untersuchten Zelllinien bei 23%-37% eine Veränderung der Methylierung beobachtet werden. Bei 38%-88% beeinflusste ein CpG-SNP, also eine Sequenzveränderungen in einem CpG-Dinukleotid, das Methylierungspotential. Es existieren schätzungsweise über 200.000 SNPs in CpG-Dinukleotiden (Shoemaker et al. 2010).

Dass diese Veränderungen funktionell relevant sind, konnten Arbeitsgruppen aus Schweden und Australien nachweisen (Taqi et al. 2011). Sie untersuchten Prodynamorphin-SNPs im dorsolateralen präfrontalen Kortex 14 verstorbener alkoholabhängiger Patienten im Vergleich zu 14 gesunden postmortalen Kontrollpräparaten. Drei CpG-SNPs, die bekanntermaßen Risikoallele für die Entwicklung einer Suchterkrankung darstellen, zeigten unterschiedliche Methylierungswerte in den beiden Gruppen. Für einen der untersuchten mSNPs in der 3' UTR konnte für das methylierte Allel im Gegensatz zum unmethylierten Allel eine veränderte Affinität zu dem DNA-Bindungsfaktor (Ta-BF) nachgewiesen werden (Taqi et al. 2011).

Auf diese Weise wäre es möglich, dass bestimmte Risikoallele zu epigenetischen Veränderungen und aberranter Genexpression führen und somit maßgeblich an der Entstehung bestimmter Störungen, wie zum Beispiel der männlichen Infertilität, beteiligt sind.

5.4 Die Kandidatengene *PIWIL1* und *PIWIL2*

Die detaillierte Analyse der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* offenbarte Sequenzvariationen in CpG-Dinukleotiden (SNPs), die in der Folge vermutlich zu einer aberranten Methylierung führen und einen Einfluss auf die Fertilität zu haben scheinen. Die Bedeutung der Gene der *PIWI*-Familie für die Reproduktionsfähigkeit eines Organismus ist seit langem bekannt. Maßgeblich an der Forschung beteiligt war die Arbeitsgruppe um Daniel Cox. Sie konnte erstmals zeigen, dass *PIWI*-Drosophilamutanten im Vergleich zu Wildtypindividuen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung des Geschlechtsstammzellvorrates verloren (Cox et al. 1998).

Einen ersten Hinweis darauf, dass *PIWI* auch beim Menschen eine entsprechende Funktion erfüllen könnte, erbrachte die Isolation eines Homologs in der cDNA von humanem Hodengewebe, welches sich zu 47,1% identisch mit der DNA Sequenz der Fruchtfliegen zeigte (Cox et al. 1998). Dies bezieht sich vor allem auf eine konservierte, C-terminale Region. Die Übereinstimmung der humanen *PIWI*-Sequenz (*HIWI*, *PIWI-like*) mit der murinen (*MIWI*) war mit 97% nochmals deutlich höher (Kuramochi-Miyagawa et al., 2001). Inzwischen sind drei humane Gene mit ihrer chromosomalen Lokalisation bekannt, die der *PIWIL*-Familie zugehörig sind: *PIWIL1* (*HIWI*), *PIWIL2* (*HILI*) und *PIWIL4* (*MIWI2*) (Bak et al. 2011).

Die hohe phylogenetische Übereinstimmung der murinen und humanen *PIWI*-Sequenzen sowie die Beobachtung, dass *MIWI* und *MILI*, das murine Homolog zu *PIWIL2*, cytoplasmatisch lokalisiert sind und RNA-Bindungsmotive aufweisen, legten die Vermutung nahe, dass sich die Funktionsweise der *PIWI*-Gene im Säugetierorganismus jedoch im Vergleich zu *Drosophila* unterscheidet (Kuramochi-Miyagawa et al. 2001).

Experimente mit Knock-out-Mäusen erlaubten erste Rückschlüsse auf den Wahrheitsgehalt dieser Hypothese. Sowohl männliche *MILI*- also auch *MIWI*-Knockoutmäuse zeigten eine normale

Entwicklung, waren jedoch steril mit deutlich reduziertem Hodenvolumen und –gewicht. Histologisch waren keine reifen Spermien in Nebenhoden auffindbar (Kuramochi-Miyagawa et al. 2004, Deng und Lin 2002). Es konnte jeweils ein Arrest der Spermiogenese in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beobachtet werden. Bei *MILI*-defizienten Tieren fand der Stopp mit Eintritt in die Meiose in der frühen Prophase (Zygotän- bis frühes Pachytänstadium) statt, bei *MIWI* -/- Mäusen deutlich später auf Stufe der haploiden frühen Spermatiden (Kuramochi-Miyaga et al. 2004, Deng und Lin 2002). Dieser Phänotyp spiegelt sich auch bei dem von uns untersuchten, humanen Kollektiv wider. Die Patienten, die heterozygot für einen SNP in *PIWIL2* sind und im Vergleich zu fertilen Kontrollen eine geringere Methylierung aufwiesen, zeigten bei sonst unauffälliger körperlicher Entwicklung sehr wenige bis gar keine Spermien im Ejakulat. Bei einem der Patienten ist weiterhin ein reduziertes Hodenvolumen gesichert. Histologische Untersuchungen an Hodengewebe könnten Aufschluss darüber geben, ob ein ähnlich distinkter Entwicklungsstopp der Keimzellen auch beim Menschen beobachtet werden kann.

Die Vermutung, dass die *PIWIL*-Genfamilie über posttranskriptionelle RNA-Modifikationen einen Einfluss auf die Geschlechtszellreifung und –differenzierung haben könnte, motivierte weitere Forschung auf diesem Gebiet (He et al. 2009). So gelang die Isolation einer neuen Klasse von RNA-Molekülen, die zur Gruppe der smallRNAs gehört und nachweislich mit *PIWI*-Proteinen interagieren. Hierbei handelt es sich um piRNA (piwi-interacting RNA), die sich mit 26-31 Nukleotiden in der Größe von bekannten smallRNAs unterscheidet (Aravin et al. 2006). Bei Säugetieren werden zwei verschiedene piRNAs unterschieden. Zum einen die pachytäne piRNA, wobei in Geschlechtszellen von Mäusen eine Akkumulation ab dem Pachytän bis kurz vor vollendeter Reife der Spermien beobachtet werden konnte und die prepachytäne RNA, die vor Eintritt in die Meiose exprimiert wird (Aravin et al. 2006). Die Expression von piRNA ist signifikant reduziert in *MIWI*-Knockoutmäusen (Grivna et al. 2006).

Dass die einzelsträngig vorliegenden piRNA-Moleküle auch beim Menschen eine Rolle spielen könnten, bestätigten Girard und Kollegen, indem sie ein Vorkommen von piRNA in menschlichem Hodenmaterial nachweisen konnten (Girard et al. 2006). Es ist bereits von anderen smallRNAs bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle beim Schutz des Genoms vor pathogenen oder parasitären DNA-Sequenzen über deren Stilllegung spielen. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Retrotransposons, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Retroviren aufweisen (Aravin et al. 2007).

Die in dieser Arbeit aufgeworfene These, dass epigenetische Phänomene an einer gestörten Funktion respektive einem Funktionsverlust der Gene der *PIWIL*-Familie beteiligt sein könnten, wurde ferner durch Heyn und Kollegen untermauert. Sie untersuchten Methylierungsmuster in Hodengewebe von infertilen Patienten mit Sertoli-Cell-Only-Syndrom, obstruktiver Azoospermie und Spermienreifungsstörungen mit konsekutiver Azoospermie bzw. Oligozoospermie (Heyn et al. 2012).

Für *PIWIL2* konnte für Patienten mit gestörter Spermio-genese eine Hypermethylierung für einen CpG-Locus in der Promotorregion gezeigt werden, die mit einer gestörten Genexpression und piRNA-Bildung einher ging. Betroffen waren vor allem Patienten, die histologisch einen Arrest der Spermio-genese in frühen Entwicklungsstadien zeigten, was mit Ergebnissen dieser Arbeit und Beobachtungen im Mausmodell vereinbar ist (Heyn et al. 2012, Kuramochi-Miyagawa et al. 2004, Deng und Lin 2002). Auch Schütte und Kollegen konnten zeigen, dass Methylierungsveränderungen in *PIWIL2* mit einer reduzierten Spermienzahl bei infertilen Männern assoziiert sind (Schütte et al. 2013).

Eine aberrante Methylierung der *PIWI*-Gene könnte zu einer gestörten piRNA-Bindung und somit zu einem Funktionsverlust des *PIWI*/piRNA Komplexes führen. Folge wären womöglich ein Verlust genomischer Stabilität durch ungehinderten Einbau parasitärer Sequenzen und Degradierung der Spermienqualität.

5.5 Die Kandidatengene *KAL1*, *SPAG11B*, *CST9L*, *SRD5A3*, *DNAJB13*

Eine Datenbankrecherche identifizierte neben *PIWIL1* und *PIWIL2* fünf weitere, im Vergleich zum Kontrollkollektiv differentiell methylierte Gene, die über ihre Funktion eine potentielle Rolle in der Pathogenese der männlichen Infertilität spielen könnten.

5.5.1 *KAL1*

Mutationen und Deletionen im Gen *KAL1*, in dem sich bei unserem untersuchten Patientenkollektiv ein aberrant methylierter CpG-Locus befindet, können bekannterweise zur Entwicklung eines Kallmann-Syndroms führen. Dies ist charakterisiert durch die Symptomkonstellation aus Hypo-beziehungsweise Anosmie und hypogonadotropem Hypogonadismus (Hardelin et al. 1993).

Ein nicht vorhandener bzw. reduzierter Geruchssinn ist für die Diagnosestellung obligat, jedoch bei keinem der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten bekannt. Patienten mit olfaktorischen Defiziten müssen sich jedoch ihrer Einschränkung nicht zwingend bewusst sein, vor allem da diese verschiedene Schweregrade annehmen kann (Dodé und Hardelin 2009).

Weiterhin ist das Kallmann-Syndrom durch einen isolierten hypogonadotropen Hypogonadismus charakterisiert. Dies geht einher mit niedrigen oder normalen Serum FSH- und LH-Werten und niedrigem Testosteron (Bhagavath et al. 2007). Eine solche Befundkonstellation ergab sich bei 2 Patienten, die für den untersuchten CpG-Locus in *KAL1* niedrigere Methylierungswerte zeigten. 3 weitere Patienten, für die ein Hormonstatus erhoben wurde, wiesen hohe Testosteronwerte bei entweder zu hohen oder normal LH- und FSH-Spiegeln auf. Nur bei einem Patienten mit deutlich niedrigeren Methylierungswerten konnte ein reduziertes Hodenvolumen evaluiert werden, allerdings ohne, dass der damit verbundene Hormonstatus bekannt ist.

Das *KAL1*-Genprodukt *Anosmin-1* ist ein sekretorisches Protein und im Rahmen der Embryonalentwicklung des Telencephalons über chemotaktische Stimulation an der Migration olfaktorischer und GnRH-Neurone aus der Nasenplakode beteiligt (Cariboni et al. 2004). Bei einem Funktionsverlust von *Anosmin-1*, z.B. als Folge von Mutationen, verharren sowohl die olfaktorischen Nervenzellen als auch die GnRH-Neurone, die entlang der sensiblen Neurone aussprossen, oberhalb der Lamina cribrosa des Os ethmoidale (Cariboni et al. 2004). Allerdings korreliert der molekulargenetische Befund nicht immer eindeutig mit der neuroradiologischen Bildgebung und dem klinischen Phänotyp (Quinton et al. 1996).

Pathogene Veränderungen im *KAL1*-Gen sind ferner sehr heterogen. Nicht in allen betroffenen Familien mit dem klinischen Bild eines Kallmann-Syndoms ist eine auslösende Mutation nachweisbar. In diesen Familien bleibt der Vererbungsmechanismus unklar (Hardelin et al. 1993). In einem von Bhagavat und Kollegen untersuchten Kollektiv von 109 Männern mit isoliertem hypogonadotropem Hypogonadismus mit und ohne Anosmie zeigte nur die Hälfte der Fälle mit familiärer Häufung zugrundeliegende *KAL1*-Mutationen. In 30 sporadischen aufgetretenen Fällen mit normalem Geruchssinn konnte keine *KAL1*-Mutation identifiziert werden (Bhagavath et al. 2007). Epigenetische Veränderungen im *KAL1*-Gen stellen eine mögliche Ursache für die vielen bislang ungeklärten Fälle der Erkrankung dar. Methylierungsmuster können außerdem an Nachfolgegenerationen weitergegeben werden und so die familiäre Häufung bedingen. Das von uns untersuchte Patientenkollektiv zeigt nicht den klassischen klinischen Phänotyp. Methylierungsstörungen könnten jedoch mit einer mildereren Verlaufsform einhergehen und somit auch die Fälle von isoliertem idiopathischen hypogonadotropem Hypogonadismus ohne Beeinträchtigung des Geruchssinnes erklären. Bislang existieren über diesen Ansatz keine Studien.

5.5.2 *CST9L*

Ein weiterer Locus, für den sich Patienten und Kontrollen in der Methylierung unterscheiden liegt im *CST9L*-Gen (Cystatin-9-like). Basierend auf der Tatsache, dass es ausschließlich im Hoden exprimiert wird, spielt es wahrscheinlich eine Rolle in der Entwicklung bzw. Funktion dieses Gewebes (Eriksson et al. 2002). Ein Screening auf *CST9L*-Mutationen bei 29 DSD-Patienten (disorder of sexual development) als mögliche Ursache für Störungen der Genitalentwicklung erbrachte jedoch bislang keine signifikanten Ergebnisse und konnte somit diese These nicht bestätigen (Eriksson et al. 2002). Welche Rolle *CST9L* in der Pathogenese der Infertilität spielen könnte, ist bislang nicht geklärt. Für 9 Patienten, die besonders niedrige Methylierungswerte für das entsprechende CpG-Dinukleotid aufwiesen, ergab sich bei einem Abgleich mit den klinischen Parametern kein Hinweis auf Entwicklungsstörungen des Genitale. Für 2 Patienten waren jedoch anamnestisch Lageanomalien der

Hoden zu eruieren. So könnte *CST9L* eine mutmaßliche Rolle beim Genitaldeszensus zugeschrieben werden.

5.5.3 *SRD5A3*

Auch im Gen *SRD5A3* (steroid 5 alpha-reductase 3) konnte für eine CpG-Position eine Veränderung der Methylierung bei infertilen Patienten gefunden werden. Das Gen greift in den Androgenstoffwechsel ein, indem es an der Produktion von 5 alpha-Dihydrotestosterone (DHT) aus Testosteron beteiligt ist (Uemura et al. 2008). Ein ausgeglichener Hormonstatus ist unabdingbar für Sexualentwicklung und Fertilität. *SRD5A3* ist vor allem im Zusammenhang mit Prostatamalignomen untersucht, in denen es überexprimiert ist (Uemura et al. 2008). In Anbetracht seines Einflusses auf den Hormonstoffwechsel ist jedoch eine Bedeutung für die männliche Fertilität zu diskutieren. Dagegen spricht die fehlende Expression des Gens im adulten Hoden sowie gesundem Prostatagewebe (Uemura et al. 2008).

5.5.4 *DNAJB13*

Ein weiteres betroffenes CpG befindet sich im Gen *DNAJB13*, welches auch unter dem Namen *TSARG6* (testis spermatogenesis apoptosis-related protein 6) bekannt ist. Die Patienten, die für das untersuchte CpG-Dinukleotid besonders niedrige Methylierungswerte im Vergleich zum Kontrollkollektiv aufwiesen, zeigten bei Auswertung der klinischen Daten eine auffällig reduzierte Spermienmotilität. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von Guan und Kollegen. Demnach ist *DNAJB13*, welches zur Gruppe der Heatshock-Proteine (HSP) gehört, in Mäusesperma mit dem Axonema des Schwanzstückes assoziiert und vermutlich an der Schwanzbildung in Rahmen der Spermindifferenzierung beteiligt (Guan et al. 2009). Liu und Kollegen isolierten das humane Homolog und sehen *TSARG6* in Zusammenhang mit anti-apoptotischen Vorgängen (Liu et al. 2004). Methylierungsveränderungen könnten demnach über eine Störung der Genfunktion einen Abbau degenerativ veränderter Spermien verhindern und somit zu einer reduzierten Fertilität beitragen.

5.5.5 *SPAG11B*

Eines der aberrant methylierten CpG-Dinukleotide liegt im Gen *SPAG11B* (sperm associated antigen 11B) auf Chromosom 8p23. *SPAG11B* kodiert für Androgen-abhängige, Nebenhoden-spezifische sekretorische Proteine (von Horsten et al. 2002). Die strukturelle Ähnlichkeit mit Beta-Defensinen und seine Expression in Hodengewebe suggerieren eine mögliche antimikrobielle Aktivität der Proteine als Schutz vor aufsteigenden Infektionen des männlichen Genitaltraktes (von Horsten et al. 2002). Funktionsverlust durch aberrante Methylierung könnte möglicherweise die lokale Reaktion

auf pathogene Erreger mindern. Entsprechende Infektionen können klinisch inapparent verlaufen, aber dennoch eine Ursache für Unfruchtbarkeit darstellen.

5.6 Das Kandidatengen *HOXA5*

Im Rahmen des von der EU geförderten EuroDSD-Projektes wurden am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Pädiatrische Endokrinologie der Klinik für Allgemeine Pädiatrie die Muster der DNA-Methylierung in Fibroblasten und Labia majora von Personen mit Geschlechtsentwicklungsstörungen aufgrund eines Androgen-Rezeptor Defektes untersucht (Bens et al. 2011). Ein männlicher, infertiler Proband zeigte dabei auffällige Methylierungsmuster in der Promotorregion des Genes *HOXA5*. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob ähnliche Methylierungsmuster für *HOXA5* auch bei bislang ungeklärten Fällen männlicher Infertilität beobachtet werden und somit Aufschlüsse über eine mögliche Pathogenese geben können. Für die 14 untersuchten CpG-Dinukleotide konnte für insgesamt 29 infertile Patienten kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu fertilen Individuen beobachtet werden. Auch ließen sich Ergebnisse aus der Vorgängerstudie mit DNA aus Fibroblasten nicht an Blutlymphozyten reproduzieren, was für das Vorliegen gewebespezifischer Methylierungsmuster spricht.

5.7 Einfluss klinischer Parameter auf DNA-Methylierung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ferner eine Analyse der erhobenen klinischen Parameter unter der Fragestellung, ob bestimmte Befunde mit wiederkehrenden Methylierungsmustern assoziiert sind und für entsprechend betroffene Gene Assoziationen mit Infertilität bekannt sind. Zwar konnten differentiell methylierte CpG-Loci bei 2 Patienten mit Mumpserkrankung in der Anamnese und Patienten mit erhöhten LH-Werten identifiziert werden, es ist jedoch nach Literaturrecherche für keines der Gene ein Zusammenhang mit Unfruchtbarkeit bekannt.

Das Mumpsvirus gehört zur Gruppe der RNA-Viren (Hof et al. 2009 b). Dass sowohl RNA- als auch DNA-Viren in der Lage sind, über mehrere Mechanismen epigenetische Veränderungen hervorzurufen, ist vor allem durch die Forschung an malignen Tumoren belegt (Poreba et al. 2011). So interagieren virale Onkoproteine mit DNA-Methyltransferasen und Histon-modifizierenden Enzymen und verändern dadurch deren Aktivität (Burgers et al. 2006). Weiterhin haben sie Einfluss auf die Prozessierung von smallRNAs (Flanagan 2007). So ist es denkbar, dass auch die Erreger der parotitis epidemica Einfluss auf das Epigenom nehmen und auf diese Weise an der Pathogenese der Infertilität beteiligt sind. Die Arbeitsgruppe um Schütte konnte mit ihrer Forschung weitere Hinweise liefern, die diese These untermauern. Sie untersuchten mittels Array die globale DNA-Methylierung

im Sperma von 38 infertiler Patienten (Schütte et al. 2013). Es konnte im Rahmen einer Gene Ontology Analyse der auffälligen Loci gezeigt werden, dass die jeweils aberrant methylierten Gene eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen und Autoimmunität spielen (Schütte et al. 2013). In dieser Arbeit konnte ferner eine Überrepräsentation verschiedener *HLA*-Gene in den zwischen Patienten und Kontrollen differentiell methylierten Loci gezeigt werden, was wiederum eine immunologische Beteiligung an der Pathogenese der männlichen Infertilität suggeriert. Tsujimara und Kollegen konnten diesen Zusammenhang ebenfalls aufdecken. Sie identifizierten *HLA-DRB1* und *HLA-DQB1* als kritische Regionen in Zusammenhang mit der Entwicklung einer nicht-obstruktiven Azoospermie bei japanischen Männern (Tsujimara et al. 2001).

5.8 Ausblick

Die Wurzeln der Epigenetik reichen bis in die 50er Jahre zurück. Dennoch sind bis heute viele grundlegende Fragen noch nicht abschließend geklärt, sodass es weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet bedarf.

Die vorliegende Arbeit liefert erste Hinweise darauf, dass epigenetische Phänomene auch an der Pathogenese der männlichen Infertilität beteiligt sind. So konnten wir mögliche der männlichen Infertilität ursächlich zugrunde liegende Pathomechanismen aufdecken, die in Folgestudien näher untersucht werden müssen.

Welche Kandidatengene tatsächlich eine entscheidende Rolle spielen bzw. inwiefern eine epigenetische Testung im Rahmen der Diagnostik bei unerfülltem Kinderwunsch im klinischen Alltag Anwendung finden kann, müssen weiterführende Arbeiten klären.

In einer prospektiv angelegten Studie sollten zunächst die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse unter Verwendung höherer Fallzahlen unter exakter Erhebung weiterer klinischer Parameter validiert werden. Weiterhin gilt es, die Expression der betroffenen Gene in verschiedenen Geweben mit den Methylierungsdaten und dem Vorhandensein von SNPs abzugleichen. Ferner von Interesse ist die Frage, ob sich die in Blutlymphozyten ermittelten Methylierungswerte für andere Gewebe, wie Hoden oder Spermien reproduzieren lassen.

Auch die Entwicklung neuer Therapiestrategien und Verbesserung der Beratung unfruchtbarer Paare stellen einen reizvollen Forschungsansatz dar. So muss in diesem Zusammenhang eruiert werden, wie sich distinkte epigenetische Veränderungen beim Mann auf Schwangerschafts- und Abortraten sowie den Schwangerschaftsverlauf im Rahmen assistierter Reproduktionsverfahren auswirken. Ferner drängt sich die Frage auf, ob entsprechende Auffälligkeiten über mehrere Generationen hinweg vererbt werden.

6 Zusammenfassung

Laut Schätzungen der WHO können über 30% der Fälle von männlicher Infertilität nicht ursächlich geklärt werden. Epigenetische Fehlregulationen werden inzwischen mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert, was die Hypothese nahe legt, dass fehlerhafte DNA-Methylierung auch an der Pathogenese der männlichen Infertilität beteiligt sein könnte. Im Rahmen dieser Dissertation sollte darum der Frage nachgegangen werden, ob sich bei Männern mit bisher ungeklärter Infertilität ein von fertilen Männern abweichendes Methylierungsmuster im peripheren Blut nachweisen lässt.

Dazu wurden bei 33 Männern, die zur Abklärung genetischer Ursachen eines unerfüllten Kinderwunsches im Institut für Humangenetik untersucht wurden, die DNA-Methylierungsmuster in Blutlymphozyten mit Hilfe des Infinium Human Methylation450 BeadChip Array® im Vergleich zu 10 fertilen Kontrollen analysiert. Weiterhin wurde die DNA-Methylierung für 14 CpG-Dinukleotide im Gen *HOXA5* mittels Pyrosequenzierung untersucht. Die betroffenen Gene wurden in einer Gene Ontology Analyse und PubMed-Recherche hinsichtlich einer bekannten Assoziation mit männlicher Infertilität evaluiert.

Insgesamt konnten für 596 CpG-Loci signifikante Unterschiede in den Methylierungsmustern fertiler und infertiler Männer ermittelt werden ($p < 0,01$, *illumina custom*). Die Gene Ontology Analyse verwies weiterführend auf Anreicherungen für die Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* ($p = 8,5 \times 10^{-4}$). Für insgesamt 5 weitere Gene (*KAL1*, *SPAG11B*, *DNAJB13*, *SRD5A3* und *CST9L*) konnte in der Literatur ein thematischer Bezug zu Infertilität gefunden werden. Ferner konnte herausgearbeitet werden, dass es sich bei den jeweils aberrant methylierten CpG-Dinukleotiden häufig um Regionen handelt, für die Polymorphismen (SNPs) bekannt sind. Die Analyse der 14 CpG-Dinukleotide im Gen *HOXA5* ergab keine zielführenden Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Veränderung der DNA-Methylierung in peripherem Blut und Infertilität.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Methylierungsveränderungen eine Rolle in der Pathogenese der männlichen Infertilität spielen. Es konnte ein möglicherweise relevanter Pathomechanismus aufgedeckt werden, sowie Kandidatengene ermittelt werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit einen entscheidenden Einfluss haben. Von besonderem Interesse sind die Gene der *PIWIL*-Familie. Über eine Interaktion mit piRNA-Molekülen spielen sie eine entscheidende Rolle beim Schutz des Genoms vor pathogenen oder parasitären DNA-Sequenzen. Eine aberrante Methylierung der *PIWI*-Gene könnte zu einem Funktionsverlust des *PIWI*/piRNA Komplexes und folglich zu genomischer Instabilität führen. Ferner können Sequenzvariationen in Form von SNPs möglicherweise über eine Veränderung in der allel-spezifischen DNA-Methylierung (ASM) zu einer aberranten Expression bestimmter Gene führen.

Literaturverzeichnis

- Ammerpohl, O., Martín-Subero, J.I., Siebert, R. et al. (2009): Hunting for the 5th base: techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 847-862
- Anway, M.D., Skinner, M.K. (2006): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 147, 43-49
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Skinner, M.K. et al. (2005): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308, 1466-1469
- Aravin, A., Hannon, G.J., Brennecke, J. (2007): The PIWI-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 318, 761-764
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Tuschl, T. et al. (2006): A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442, 203-207
- Aravin, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. et al. (2008): A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*, 31, 785-799
- Bak, C.W., Yoon, T., Choi, Y. (2011): Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. *Clin Exp Reprod Med*, 38, 61-67
- Barthold, J.S., Gonzalez, R. (2003): The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy. *J Urol*, 170, 2396–2401
- Bartolomei, M.S., Ferguson-Smith, A.C. (2011): Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Article ID a002592
- Basler, M. (2000): Proseminar II "Bildverarbeitung". Principle Components (Datenverarbeitung II). Universität Jena, Institut für Geographie
- Bens, S., Ammerpohl, O., Holterhus, P.M., et al. (2011): Androgen receptor mutations are associated with altered epigenomic programming as evidenced by HOXA5 methylation. *Sex Dev*, 70-76
- Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S. (2007): The mammalian epigenome. *Cell*, 128, 669-681
- Bestor, T.H., Goll, M.G. (2005): Eucaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 481-514
- Bhagavath, B., Xu, N., Layman, L.C. et al. (2007): KAL1 mutations are not a common cause of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism in humans. *Mol Hum Reprod*, 13, 165–170
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C. et al. (2011): High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98, 288–295
- Bird A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21
- Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V. et al. (2010): Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet*, 18, 73-80
- Burgers, W.A., Blanchon, L., Fuks, F. et al. (2007): Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*, 26, 1650-1655

- Cariboni, A., Pimpinelli, F., Maggi, R. et al. (2004): The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet*, 13, 2781–2791
- Carone, R.B., Fauquier, L., Rando, O.J. et al. (2010): Paternally-induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 143, 1084-1096
- Cavallini, G. (2006): Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl*, 143-157.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J. et al. (1998): A novel class of evolutionarily conserved genes defined by PIWI are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 12, 3715–3727
- Dada, R., Kumar, M., Agarwal, A. et al. (2012): Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet*, 29, 213–223.
- Davis, N.F., McGuire, B.B., Fitzpatrick, J.M. et al. (2010): The increasing incidence of mumps orchitis: a comprehensive review. *BJU International*, 105, 1060–1065
- De Braekeleer, M., Férec, C. (1996): Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod*, 2, 669-677
- De Kretser, D.M. (1979): Endocrinology of male infertility. *Br Med Bull*, 35, 187-192
- Deaton, A.M., Bird, A. (2011): CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25, 1010-1022.
- Deng, W., Lin, H. (2002): MIWI, a Murine Homolog of PIWI, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Dev Cell*, 2, 819–830
- Dodé, C., Hardelin, J.-P. (2009): Kallmann syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 139–146
- Dohle, G.R., Diemer, T., Giwercman, A. et al. (2010): Guidelines on male infertility. *European Association of Urology*
- Dohle, G.R., Halley, D.J.J., Govaerts, L.C.P. et al. (2002): Genetic risk factor in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod*, 17, 13-16
- Eckhardt, F., Lewin, J., Beck, S. et al. (2006): DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, 1378–1385
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I. et al. (2009): GOrilla: A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, 48-55
- Eden, S., Cedar, H. (1994): Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev*, 255-259
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 29, 457-463
- Eriksson, A., Töhönen, V., Nordqvist, K. et al. (2002): Isolation of the human testatin gene and analysis in patients with abnormal gonadal development. *Mol Hum Reprod*, 8, 8-15

- Esteves, S.C. (2013): A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci*, 6, 176–182
- Flanagan, J.M. (2007): Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *Br J Cancer*, 96, 183-188
- Foresta, C., Zuccarello, D., Ferlin, A. et al. (2008): Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev*, 29, 560–580
- Friemel, C., Ammerpohl, O., Bens, S. et al. (2014): Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *fertil steril*, 101, 1097-1103
- Frommer, M., McDonald, L. E., Paul, C.L. et al. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *PNAS*, 1827–1831
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196, 261-282
- Gasser, T. (2011): Sexualpathologie des Mannes. In: Gasser, T., *Basiswissen Urologie*. 140-148, Springer-Verlag, Liestal
- Girard, A., Sachidanandam, R., Carmell, M.A. et al. (2006): A germline-specific class of small RNAs binds mammalian PIWI proteins. *Nature*, 442, 199-202
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. (2007): Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*, 128, 635-639
- Grivna, S.T., Beyret, E., Lin, H. et al. (2006): A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 20, 1709-1714
- Guan, J., Kinoshita, M., Yuan, L. (2009): Spatiotemporal association of DNAJB13 with the annulus during mouse sperm flagellum development. *BMC Dev Biol*, 9:23
- Habbema, J.D.F., Collins, J., teVelde, E.R. et al. (2004): Towards less confusing terminology in reproductive medicine: A proposal. *Hum Reprod*, 19, 1497-1501
- Hadziselimovic, F. (2002): Cryptorchidism, its impact on male fertility. *Eur Urol*, 41, 121-123
- Hamada, A.J., Esteves, S.C., Agarwal A.(2013): A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics*, 68, 39-60
- Hamada, A.J., Esteves, S.C., Agarwal, A. et al. (2012): Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol*, 38, 576-594
- Hardelin, J.-P., Levilliers, J., Petit, C. et al. (1993): Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* , 373-377
- He, Z., Kokkinaki, M., Pant, D. et al. (2009): Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 137, 901-911
- Heijmansa, B.T., Tobia, E.W., Lumey, L.H. et al. (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS*, 105, 17046–17049

- Heyn, H., Ferreira, H.J., Larriba, S. et al. (2012): Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PLoS ONE*, 7, e47892
- Hirsh, A. (2003): Male subfertility. *BMJ*, 327, 669-672
- Hof, H., Dörries, R., Geginat, G. (2009): Infektionen der männlichen Geschlechtsorgane. In: von Dörries, R., Geginat, G. Hof, H., *Medizinische Mikrobiologie*. 635-634, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart (a)
- Hof, H., Dörries, R., Geginat, G. (2009): Spezielle Virologie. In: von Dörries, R., Geginat, G. Hof, H., *Medizinische Mikrobiologie*. 635-634, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart (b)
- Holliday, R., Pugh, J.E. (1975): DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-232
- Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund K. et al. (2007): Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS ONE*, 12, Article ID e1289
- Jablonka, E. (2013): Epigenetic inheritance and plasticity: the responsive germline. *Prog Biophys Mol Biol*, 111, 99-117
- Jablonka, E., Lamb, M.J., Avital E. (1998): 'Lamarckian' mechanisms in darwinian evolution. *Trends Ecol Evol*, 13, 206-210
- Jaenisch, R., Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33, 245-254
- Jones, P.A., Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293, 1068-1070
- Kamel, R.M. (2010): Management of the infertile couple: An evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol*, 21-28
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S. et al. (2013): UCSC Genome Bioinformatics. <http://genome.ucsc.edu/>. Zugriff am 21. März 2013
- Kinoshita, M., Numata, S., Ohmori, T. et al. (2013): DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia. *Neuromol Med*, 15, 95-101
- Kuan, P.F., Wang, S., Chu, H. et al. (2010): A statistical framework for Illumina DNA methylation arrays. *Bioinformatics*, 26, 2849–2855
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Nakano, T. et al. (2001): Two mouse PIWI-related genes: MIWI and MILI. *Mech Dev*, 108, 121-133
- Kuramochi-Miyagawa S., Kimure T., Nakano T. et al. „MILI, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis.“ *Development*, 131, 2004: 839-849.
- Laird, P.W. (2010): Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 11, 191-203

- Lee, J.Y., Dada, R., Argawal, A. et al. (2004): Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 598-601
- Liu, G., Lu, G.-X., Xing, X.-W. (2004): Molecular cloning of TSARG6 gene related to apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 36, 93–98
- Lumey, L.H., Stein, A.D., Susser, E.S. et al. (2007): Cohort profile: The dutch hunger winter families study. *Int J Epidemiol*, 36, 1196–1204
- Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B. et al. (2008): Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*, 14, 67-74
- Martin-Subero, J.I., Ammerpohl, O., Siebert, R. et al. (2009): A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS ONE*, Article ID e6986
- Minocherhomji, S., Madon, P.F., Parikh, F.R. (2010): Epigenetic regulatory mechanisms associated with infertility. *Obstetrics and Gynecology International*, Article ID 198709
- Miyamoto, T., Tsujimura, A., Sengoku, K. et al. (2012): Male infertility and its causes in Human. *Adv Urol*, Article ID 384520
- Miyaoka, R., Esteves, S.C. (2012): A critical appraisal on the role of varicocele in male infertility. *Adv Urol*, Article ID 597495
- Monk, M., Boubelik, M., Lehnert, S. (1987): Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, 99, 371-382
- Navarro-Costa, P., Nogueira, P., Carvalho, M. et al. (2010): Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod*, 25, 2647-2654
- Nieschlag, E. (2000): Hodenfunktion. In: Thomas, L., Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 1124-1133, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main
- Okano, M., Bell, D.W., Li, E. et al. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247–257
- Osmonov, D., van der Horst, C., Juenemann, K.P. et al. (2006): Induktion der Spermiogenese nach antegrader Varikozelensklerosierung bei Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie. *Aktuelle Urologie*, 37, 132-137
- Paduch, D.A., Bolyakov, A., Travis, A., Cohen, P. (2009): Reproduction in men with Klinefelter syndrome: The past, the present, and the future. *Semin Reprod Med*, 27, 137-148
- Pearson, K. (1901): On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *Philos Mag*, 559–572
- Poreba, E., Broniarczyk, J.K., Gozdicka-Jozefiak, A. (2011): Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. *Clin Epigenetics*, 2, 233-247

- Pryor, J.L., Kent-First, M., Roberts, K.P., et al. (1997): Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*, 336, 534-539.
- Qiagen (2011): Applications: DNA Methylation Analysis.
<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7499&mn1=1373&mn2=1375>. Zugriff am 23. November 2011
- Quinton, R., Duke, V.M., Bouloux, P.M.G. et al. (1996): The neuroradiology of Kallmann's syndrome: A genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3010-3017
- Reik, W., Walter, J. (2001): Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2, 21-32
- Reik, W., Dean, W., Walter, J. (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093
- Roessler, J., Ammerpohl, O., Lehmann, U. et al. (2012): Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. *BMC Research Notes*, 5:210
- Ronaghi, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*, 11, 3-11
- Schünke, M. (2007): Äußere männliche Geschlechtsorgane: Hoden und Nebenhoden. In: von Schulte, E., Schumacher, U. Schünke, M., Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 224-225, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schütte, B., El Hajj, N., Haaf, T. et al. (2013): Broad DNA methylation changes of spermatogenesis, inflammation and immune response-related genes in a subgroup of sperm samples for assisted reproduction. *Andrology*, 1, 822-829
- Shames, D.S., Minna, J.D., Gazda, A.F. (2007): DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med*, 7, 85-102
- Sherry, S.T., Ward, M.-H., Sirotkin, K. et al. (2001): dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29, 308-311
- Shiota, K. (2004): DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*, 105, 325–334
- Shoemaker, R., Deng, J., Zhang, K. et al. (2010): Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Res*, 20, 883-889
- Silvestri, A., Galetta, P., Rosano, G.M.C. et al. (2003): Report of erectile dysfunction after therapy with beta-blockers is related to patient knowledge of side effects and is reversed by placebo. *Eur Heart J*, 24, 1928–1932
- Stauber, M. (2007): Sterilität und Infertilität. In: von Weyerstahl, T., Stauber, M., Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 429-454, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Stein, A.D., Zybert, P.A., Lumey, L.H. et al. (2004): Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: The dutch hunger winter. *Int J Epidemiol*, 33, 831–836

- Taqi, M.M., Bazov, I., Bakalkin, G. et al. (2011): Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: Elevated methylation in the brain of human alcoholics. *Addict Biology*, 16, 499–509
- Ting, A.H., McGarvey, K.M., Baylin, S.B. (2006): The cancer epigenome- components and functional correlates. *Genes Dev*, 20, 3215-3231
- Tournaye, H.J., Cohlen B.J. (2012): Management of male-factor infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 26, 769-775
- Tsujimura, A., Ota, M., Takahara, S. et al. (2001): Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia located near HLA-DR and -DQ loci in the HLA class II region. *Hum Genet*, 110, 192–197
- Uemura, M., Tamura, K., Nakagawa, H. et al. (2008): Blackwell publishing asia novel 5 α -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci*, 99, 81–86.
- Vignal, A., Milan, D., Eggen, A. et al. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*, 34, 275-305
- Visser, L., Repping, S. (2010): Unravelling the genetics of spermatogenic failure. *Reproduction*, 139, 303-307
- von Horsten, H. H., Derr, P., Kirchhoff, C. (2002): Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin. *Biol Reprod*, 67, 804–813
- Waddington, C.H. (1953): Genetic assimilation of an aquired character. *Evolution*, 7, 118-126
- Wagner, G., Saenz de Tejada, I. (1998): Update on male erectile dysfunction. *BMJ*, 316, 678-682
- Wang, Z., Milunsky, J., Milunsky, A. et al. (2002): Analysis by mass spectrometry of 100 cystic fibrosis gene muations in 92 patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*, 17, 2066-2072
- Warnecke, P.M., Stirzaker., C., Clark, S.J. (2002): Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*, 27, 101-107
- WHO (2010): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Fifth Edition. Cambridge University Press, Cambridge
- WHO (2000): WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge University Press, Cambridge
- Yatsenko, A.N., Yatsenko, S.A., Lipshultz, L.I. et al. (2010): Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. *J Urol*, 183 , 1636–1642
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intrangenomic parasites. *Trends Genet*, 13, 335–340

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNA-Methylierung in der Keimzellentwicklung.....	8
Abbildung 2: Prinzip der Bisulfitkonversion.	18
Abbildung 3: Funktionsprinzip des Infinium I.....	21
Abbildung 4: Funktionsprinzip des Infinium II.....	21
Abbildung 5: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für <i>HOXA5</i>	25
Abbildung 6: Prinzip der Pyrosequenzierung.	27
Abbildung 7: Pyrogramm <i>HOXA5</i>	28
Abbildung 8: Qualitätskontrolle Pyrosequenzierung <i>HOXA5</i>	30
Abbildung 9: Farbkodierte Darstellung der Methylierungswerte für <i>HOXA5</i>	31
Abbildung 10: Gene Call Rate.....	32
Abbildung 11: Hierarchisch geclusterte Heatmap.	33
Abbildung 12: Principle Component Analysis.	34
Abbildung 13: Gene Ontology Analyse.....	35
Abbildung 14: Streudiagramm <i>PIWIL1</i> (A) und <i>PIWIL2</i> (B).....	37
Abbildung 15: Streudiagramme Kandidatengene <i>KAL1</i> , <i>SCT9L</i> , <i>SRD5A3</i> , <i>DNAJB13</i> und <i>SPAG11B</i>	411
Abbildung 16: Heatmaps Evaluation klinische Daten.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien.....	13
Tabelle 2: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kit-Systeme.....	14
Tabelle 3: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte.....	14
Tabelle 4: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Software, Adressen Onlinedatenbanken ...	15
Tabelle 5: Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer.....	16
Tabelle 6: Methylierungswerte 14 CpG-Positionen <i>HOXA5</i>	30
Tabelle 7: Mittlere Methylierung <i>PIWIL1</i> , <i>PIWIL2</i>	36

Anhang

A1. Charakterisierung des Patientenkollektives. Alter der Patienten und Kontrollen zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Klinische Daten der Patienten, soweit bekannt.

Patienten	Patienten (n=33)	Kontrollen (n=10)
Mittleres Alter, Jahre	35,12 +/- 4,71	39,4 +/- 7,34
Evaluierte Einflusskriterien	Bekannt bei n Patienten	
Primäre Sterilität	11	
Sekundäre Sterilität	3	
Spermiogrammbefunde		
<i>Ejakulatvolumen < 2 ml</i>	5	
<i>pH < 7,2</i>	1	
<i>pH > 8</i>	2	
<i>Spermienkonzentration < 20 mio.</i>	21	
<i>Azoospermie</i>	6	
<i>Motilität < 50% Kategorie a/b</i>	18	
<i>Motilität < 25% Kategorie a</i>	18	
<i>Morphologie: <15% normal geformte</i>	7	
<i>Anteil lebender Spermien <50%</i>	7	
<i>Spermien AK vorhanden</i>	0	
Hormonanalysen		
<i>LH normwertig (2-10 IU/l)</i>	9	
<i>erniedrigt</i>	0	
<i>erhöht</i>	2	
<i>FSH normwertig (1-7 IU/l)</i>	7	
<i>erniedrigt</i>	0	
<i>erhöht</i>	5	
<i>Testosteron normwertig (3,5-8,6 ng/ml)</i>	8	
<i>erniedrigt</i>	4	
<i>erhöht</i>	0	
<i>Prolaktin normwertig (<15 ng/ml)</i>	10	
<i>erniedrigt</i>	0	
<i>erhöht</i>	1	
Urologische Anamnese		
<i>Lageanomalien des Hodens</i>	5	
<i>Mumpsorchitis</i>	2	

<i>Epididymitis</i>	0
<i>Prostatitis</i>	0
<i>Normal entwickeltes männliches Genitale</i>	11
<i>Reduziertes Hodenvolumen</i>	2
<i>Varikozele einseitig</i>	3
<i>Varikozele beidseitig</i>	0
<i>Spermatozele einseitig</i>	1
<i>Spermatozele beidseitig</i>	0
<i>Hodentorsion einseitig</i>	1
<i>Hodentorsion beidseitig</i>	0
Reproduktionsmedizinische Anamnese	
<i>Erfolgreiche ärztlich assistierte</i>	
<i>Reproduktionsversuche</i>	7
<i>Fehlgeburten</i>	1
<i>Patient: Kinder aus früheren Beziehungen</i>	0
<i>Partnerin: Kinder aus früheren Beziehungen</i>	3
Nikotinabusus	10

A2. Votum der Ethikkommission

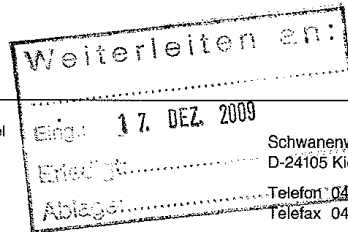
MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn Prof. Dr. med. R. Siebert
Institut für Humangenetik
UKSH, Campus Kiel
Schwanenweg 24
24105 Kiel



Schwanenweg 20
D-24105 Kiel
Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-1831
Datum: 9.12.2009

AZ.: D 447/09 (bitte stets angeben)
Studienplan: Studie zur Bedeutung von epigenetischen Veränderungen bei multifaktoriellen Erkrankungen und Phänotypen
Antrag, Eltern-/Betreuer-/Patienteninformation und Einverständniserklärung
Projektleiter: Prof. Dr. med. R. Siebert, Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel
Ihr Schreiben vom: 25.11.2009


Sehr geehrter, lieber Herr Siebert,

die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nimmt den obengenannten Antrag zur Kenntnis. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Es wird darauf hingewiesen, dass künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema „Veränderung der DNA-Methylierung bei männlicher Infertilität“ selbstständig unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe und alle von mir verwendeten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben sind. Weiterhin versichere ich, dass ich weder die gleiche, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe und mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Kiel bekannt ist.

Kiel,

Carolin Friemel

Danksagung

Zu aller erst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert, Direktor des Institutes für Humangenetik, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die vielen hilfreichen Ratschläge, überaus schnellen Korrekturen und die anregenden Gespräche.

Auch Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl und Frau Dr. med. Susanne Bens danke ich für die herausragende Betreuung. Beide haben mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und hatten immer ein offenes Ohr für Fragestellungen jeglicher Art- vor allem aber bezüglich der Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und den bioinformatischen Analysen.

Ich danke ferner allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik, insbesondere aber Frau Ute Jacobsen für die geduldige Hilfestellung bei der technischen Umsetzung und die vielen aufmunternden Worte. Die stets freundliche Arbeitsatmosphäre im Institut hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Auch Frau Imke Tangen war mir in der Zeit der Fertigstellung der Dissertation ein wichtiger Gesprächspartner und Motivator. Zum Schluss möchte ich meiner gesamten Familie danken für die immerwährende liebevolle Unterstützung und die finanzielle Hilfe- speziell aber meinen Eltern, dafür, dass sie immer für mich da sind und mir vor allem in schwierigen Zeiten immer den Rücken frei gehalten haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Carolin Friemel, geb. Wischmann
Geburtsdatum/-ort	21.07.1986 in Rostock
Anschrift	Ahlmannstraße 3 24118 Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

08/1993 - 07/1997	1. Grundschule Toitenwinkel, Rostock
08/1997 - 05/2006	Gymnasium Friderico Franciscum, Bad Doberan
01/2004 - 08/ 2004	Ruben S. Ayala High School, CA, USA; High School-Abschluss
05/2006	Abitur am Gymnasium Friderico Franciscum Bad Doberan (Note 1,3)

Studium

10/2007 – 11/2013	Studium der Humanmedizin Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
09/2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
11/2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

Famulaturen

02/2010 - 03/2010	Viszeralchirurgie, Städtisches Krankenhaus, Kiel
09/2010	Kardiovaskuläre Chirurgie, Texas Heart Institute, Houston, TX, USA
02/2011 - 03/2011	Ambulante hausärztliche Versorgung, Praxis Dr. med. Thomas Rahmig, Bargeshagen
09/2011 - 10/2011	Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsfrauenklinik, Kiel

Praktisches Jahr

1. Tertial	Gynäkologie und Geburtshilfe, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
2. Tertial	Innere Medizin, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
3. Tertial	Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Weiterbildung

Seit 02/2014

Assistenzärztin, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster

Publikation aus der Arbeit

1. Friemel, C., Ammerpohl, O., Gutwein, J., Schmutzler, A., Caliebe, A., Kautza, M., v. Otte, S., Siebert, S., Bens, S. (2014): Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *fertil steril*, 101, 1097-1103

Abstracts und Vorträge

1. Friemel, C., Bens, S., Caliebe, A., Gutwein, J., Richter, J., Schmutzler, A., Siebert, R., Ammerpohl, O. (2012): A methylation-sensitive SNP in PIWIL2 is associated with male infertility. Posterpräsentation auf der Tagung der European Society of Human Genetics, 23.-26.06.2012, Nürnberg
2. Friemel, C. (2011): Zeigen infertile Männer ein verändertes DNA-Methylierungsmuster im peripheren Blut. Vortrag auf dem „30. Treffen Norddeutscher Humangenetiker“, 05.11.2011, Christian-Albrechts-Universität Campus Kiel