

Aus dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann



**„Charakterisierung von Mikrodeletionen in der AZFc-Region des Y-Chromosoms bei  
Männern, die zur assistierten Befruchtung vorgesehen sind.“**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marco Omenzetter

geboren am 18.06.1973 in Magdeburg

Gutachter:

1. Herrn Prof. Dr. med. habil. P. Wieacker
2. Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Behre
3. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. I. Hansmann

Verteidigung: 04.02.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000006292**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006292>]

## **Referat:**

Männliche Infertilität kann durch Mikrodeletionen auf dem Y-Chromosom bedingt sein. In dieser Arbeit wurden 270 männliche Infertilitätspatienten, für die eine Indikation zur intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) besteht, auf Deletionen an 5 Loci des DAZ-Gen-Komplexes in der AZFc-Region des Y-Chromosoms untersucht. Es konnte bei zwei Probanden eine Deletion des DAZ-Gen-Komplexes festgestellt werden. Die nähere Charakterisierung beider Deletionen ergab für beide Probanden eine identische Deletion der AZFc-Region. Die Analyse klinischer Befunde zeigte eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Spermatogenesestörung und der Häufigkeit von DAZ-Deletionen. Bei Probanden mit Azoospermie betrug die Häufigkeit von DAZ-Deletionen 7,7%, bei Probanden mit Kryptozoospermie 5%. Probanden mit einer Spermienzahl von 1 Million Spermien pro ml Ejakulat aufwärts wiesen keine DAZ-Deletion auf.

Um Unterschiede in der Häufigkeit des Thymidinsequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens festzustellen, wurden die Häufigkeiten für das 5T-, 7T- und 9T-Allel des ICSI-Probandenkollektivs, mit den Häufigkeiten der T-Allele von Probanden eines Kontrollkollektivs verglichen. Im ICSI-Probandenkollektiv als Gesamtheit konnte kein Unterschied in den Häufigkeiten festgestellt werden. Die Untergruppe der Azoospermiepatienten wies aber eine signifikante Erhöhung des 5T-Allels gegenüber der Kontrollpopulation auf. Die Auswertung der Häufigkeit von CFTR-Mutationen ergab neun Probanden mit heterozygoten Mutationen bei 218 untersuchten Probanden. Das ist vergleichbar mit der Häufigkeit in der Normalbevölkerung. Allerdings fand sich eine Häufung bei ICSI-Patienten mit Normozoospermie. Die Auswertung von 218 Karyogrammen ergab sechs Chromosomenmutationen. Das ist 2,5 mal häufiger als in der Normalbevölkerung. Die Betrachtung in Untergruppen zeigte, dass dies auf eine Häufung von Chromosomenmutationen in der Normozoospermiegruppe zurückzuführen ist. ICSI-Patienten mit Normozoospermie weisen eine 8 mal höhere Rate an Chromosomenmutationen im Vergleich zur Normalbevölkerung auf. Zusammenfassend ist es nach den Ergebnissen dieser Studie sinnvoll, allen ICSI-Patienten eine genetische Beratung anzubieten, da aufgrund der vorliegenden Daten bei ihnen ein erhöhtes Risiko an AZF-Deletionen, Chromosomen- und CFTR-Mutationen in verschiedenen Untergruppen besteht.

**Omenzetter, Marco:** Charakterisierung von Mikrodeletionen in der AZFc-Region des Y-Chromosoms bei Männern, die zur assistierten Befruchtung vorgesehen sind. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2003

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	iii
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	v
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	vi
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Männliche Infertilität.....	1
1.2 Mikrodeletionen des Y-Chromosoms als Ursache von Infertilität.....	1
1.3 Kandidatengene für die Spermatogenese in der AZFc-Region.....	3
1.4 Genotyp/Phänotyp -Korrelation der AZF-Deletionen.....	5
1.5 CFTR-Mutationen und Infertilität.....	5
1.6 Weitergabe genetischer Ursachen männlicher Infertilität durch assistierte Befruchtung.....	7
1.7 Zielstellung.....	7
<b>2 Material und Methoden</b>	
2.1 Material.....	8
2.1.1 Chemikalien.....	8
2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	8
2.1.1.2 Biochemikalien und Kits.....	8
2.1.1.3 Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide (Primer).....	9
2.1.2 Gebrauchswaren.....	9
2.1.3 Puffer und Stammlösungen.....	10
2.1.4 Geräte.....	10
2.2 Das Probandenkollektiv.....	11
2.2.1 Das Probandenkollektiv und die Herkunft der Probanden-DNA.....	11
2.2.2 Erhebung der klinischen Daten.....	11
2.3 Methoden.....	14
2.3.1 Isolierung hochmolekularer Kern-DNA aus menschlichem Blut mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	14
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	15
2.3.3 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.3.4 PCR-Ansatz.....	17
2.4.5 DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese.....	17

2.4.6	Herstellung eines Agarosegels.....	18
2.4.7	Statistische Methoden.....	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Suche nach Deletionen in der DAZ-Region des Y-Chromosoms.....	20
3.2	Charakterisierung von Deletionen.....	22
3.3	Kasuistik der Probanden mit Deletion.....	25
3.4	Analyse der Befunde.....	29
3.4.1	Spermiogramme.....	29
3.4.2	Hormonstatus.....	31
3.4.3	Andrologische Befunde.....	32
3.4.4	Vergleich des Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens der Probandengruppe mit einer Kontrollgruppe.....	33
3.4.5	Mutationen im CFTR-Gen und Chromosomenmutationen.....	36
3.4.6	Hodenhistologie von Probanden ohne Deletion in der DAZ-Region.....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Deletionshäufigkeit.....	41
4.2	Lokalisierung von Deletionen auf Yq.....	44
4.3	Kasuistik von Proband 935 und Proband 1053.....	46
4.4	Spermiogramme, hormonelle und andrologische Befunde.....	48
4.5	Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens.....	49
4.6	Mutationen im CFTR-Gen und Chromosomenmutationen.....	50
4.7	Hodenhistologien.....	52
4.8	Schlussfolgerung.....	53
4.9	Ausblick.....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ-	mikro (1 x 10 <sup>-6</sup> )
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>ANalysis Of Variance</i>
AZF	Azoospermiefaktor
bp	Basenpaare
c	Konzentration
CBAVD	<i>Congenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferenz</i>
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DAZ	<i>Deleted in AZoospermia</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	“et alii”, und andere
f	Verdünnungsfaktor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
H-Test	Kruskal-Wallis-Test
K	Konzentrationskoeffizient
I	Intensität
IVS8-5T	<i>5-Thymidine Variant of Intron 8</i>
ICSI	IntraCytoplasmatische SpermienInjektion
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molarität
MART	<i>Medical Assisted Reproductive Technology</i>
Mb	Megabasen
min	Minute
ml	Milliliter
MLU	Martin-Luther-Universität
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>

---

n-	nano- ( $1 \times 10^{-9}$ )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OTA	Oligo-Terato-Asthenozoospermie
PAR	PseudoAutosomale Region
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
s	Sekunde
SCO-Syndrom	<i>Sertoli-Cell-Only-Syndrom</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNK-Test	Student-Newman-Keuls-Test
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\chi^2$	chi-Quadrat
$\Delta$	delta

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b>Abb. 1:</b> a) Die „Vollrath“-Karte des Y-Chromosoms. b) Ideogramm des Y-Chromosoms.....	2
<b>Abb. 2:</b> Vergleich von menschlichem DAZ, DAZH und Maus DazH.....	4
<b>Abb. 3:</b> Effekt des 5T-Allels auf das Spleißen des CFTR-Transkripts.....	6
<b>Abb. 4:</b> Spezifität der Primer für die Deletionsanalyse der DAZ-Region.....	20
<b>Abb. 5:</b> Ergebnis einer Gelelektrophorese.....	21
<b>Abb. 6:</b> Übersicht der Ergebnisse der PCR-Analyse.....	23
<b>Abb. 7:</b> Deletionskarte zur schematischen Darstellung der Deletionsgröße.....	24
<b>Abb. 8:</b> Hodenhistologie des Probanden 935.....	26
<b>Abb. 9:</b> Hodenhistologie des Probanden 1053.....	28
<b>Abb. 10:</b> Einteilung von 218 Probanden mit Spermiogrammen in die drei Gruppen Azoo-, Oligozoospermie und Normozoospermie.....	29
<b>Abb. 11:</b> T-Allelverteilung in Prozent.....	35
<b>Abb. 12:</b> Genotypverteilung der 5T-, 7T- und 9T-Allele.....	35
<b>Abb. 13:</b> Hodenhistologie des Probanden 1095.....	38
<b>Abb. 14:</b> Hodenhistologie des Probanden 1074.....	39
<b>Abb. 15:</b> Hodenhistologie des Probanden 1343.....	40
<b>Abb. 16:</b> Zunahme der Deletionshäufigkeit mit zunehmender Spermatogenese- störung. Einteilung von 218 Probanden nach dem Parameter Spermien pro Milliliter Ejakulat in die Gruppen Azoospermie, Oligozoospermie (unterteilt in Kryptozoospermie, schwere und milde Oligozoospermie) und Normozoospermie.....	42
<b>Abb. 17:</b> Bruchpunktanalyse von 95 Infertilitätspatienten mit Deletionen auf dem langen Arm des Y-Chromosoms.....	45

**Tabellenverzeichnis**

	Seite
<b>Tab. 1:</b> Häufigkeit von Patienten mit Azoo- bzw. Oligozoospermie unter 185 infertilen Männern mit Mikrodeletionen.....	2
<b>Tab. 2:</b> Relative Prävalenz von Deletionen der AZFa, b und c Region bei 265 infertilen Männern, die eine Deletion aufweisen.....	3
<b>Tab. 3:</b> Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) und deren Produktgröße.....	9
<b>Tab. 4:</b> Eingrenzung der Deletion der DAZ-Region bei Proband 935 und bei Proband 1053.....	22
<b>Tab. 5:</b> Spermogrammparameter von Januar 1997 bis Januar 1998 für Proband 935.....	25
<b>Tab. 6:</b> Spermogrammparameter von April 1997 bis April 1998 für Proband 1053.....	27
<b>Tab. 7:</b> Durchschnittliches Ejakulatvolumen der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie.....	30
<b>Tab. 8:</b> Median des pH der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie.....	30
<b>Tab. 9:</b> Mittelwert der Spermienmotilität der Probanden mit Oligozoospermie und Normozoospermie im Vergleich.....	31
<b>Tab. 10:</b> Auswertung des Hormonstatus des Probandenkollektivs.....	31
<b>Tab. 11:</b> Klinische Befunde Maldeszensus testis, Samenwegsinfektion und Varikozele bei 64 Probanden.....	32
<b>Tab. 12:</b> Mittelwert der Hodenvolumina der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie.....	33
<b>Tab. 13:</b> Häufigkeit der 5T-, 7T- und 9T- Allele im Intron 8 des CFTR-Gens im gesamten Probandenkollektiv.....	34
<b>Tab. 14:</b> Häufigkeit der Genotypen für den 5T-, 7T- und 9T-Allel-Sequenzpolymorphismus.....	34
<b>Tab. 15:</b> Probanden mit Chromosomenmutationen oder Mutationen im CFTR-Gen.....	36
<b>Tab. 16:</b> Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1095.....	38
<b>Tab. 17:</b> Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1074.....	39
<b>Tab. 18:</b> Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1343.....	40
<b>Tab. 19:</b> Übersicht der histologischen Befunde der Probanden mit schwerer Spermatogenesestörung.....	52

<b>Tab. 20:</b>	Häufigkeit der 5T-, 7T- und 9T- Allele im Intron 8 des CFTR-Gens im Kontrollkollektiv.....	57
<b>Tab. 21:</b>	Häufigkeit der Genotypen für den 5T-, 7T- und 9T-Allel-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens im Kontrollkollektiv.....	57
<b>Tab. 22:</b>	Ergebnisse des $\chi^2$ -Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der 5T-, 7T- und 9T-Allele im Probandenkollektiv als Gesamtheit und unterteilt in die Gruppen „Azoospermie“, „Oligozoospermie“ und „Normozoospermie“ zur Kontrollgruppe.....	58
<b>Tab. 23:</b>	Ergebnisse des $\chi^2$ -Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der 5T-, 7T- und 9T-Allele innerhalb der Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermiegruppe.....	58
<b>Tab. 24:</b>	Ergebnisse des $\chi^2$ -Vierfelder-Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der Genotypen mit dem 5T-Allel im Probandenkollektiv sowie unterteilt in die Gruppen Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie zum Kontrollkollektiv.....	59

## 1 Einleitung

### 1.1 Männliche Infertilität

Ungefähr 10-15% aller Paare sind ungewollt kinderlos (Krausz und Forti, 2000). Die Ursache der Infertilität eines Paares liegt zu 20-30% beim Mann, zu 35% bei der Frau und in den restlichen Fällen bei beiden Partnern oder es ist keine Ursache eruierbar (de Kretser, 1997).

Männliche Infertilität ist zu ca. 70% primär und zu 30% sekundär (Seshagiri, 2001). Die Ursachen sind vielgestaltig. Es kommen exogene Ursachen (Medikamente, Bestrahlungen, Umweltgifte, Drogenmissbrauch, Rauchen), entzündliche und immunologische Ursachen (Prostatitis, Hoden- und Nebenhodenentzündungen, Autoantikörper), anatomische Ursachen (z.B. Leistenhoden mehr als 2 Jahre), psychische Ursachen und genetische Ursachen in betracht (Dohle et al., 2002; Foresta et al., 2001). Insgesamt wird nur in ca. 70% der Fälle eine Ursache für männliche Infertilität gefunden, in ca. 30 % bleibt die Ursache ungeklärt (idiopathische Infertilität) (Krausz und Forti, 2000).

Ungefähr 90% der infertilen Männer weisen eine beeinträchtigte Samenqualität, wie eine reduzierte Spermienanzahl (Azoo-, Oligozoospermie), eingeschränkte Beweglichkeit (Asthenozoospermie) und abnorme Morphologie (Teratozoospermie), auf. Sie sind oftmals anderweitig klinisch unauffällig und weisen nur eine Störung der Spermatogenese auf (Huynh et al., 2002; Foresta et al., 2001).

Genetische Veränderungen sind für 10-15% der Fälle männlicher Infertilität verantwortlich (Miny und Schloo, 1999). Diese umfassen z.B. Chromosomenmutationen, Mikrodeletionen des Y-Chromosoms, cystische Fibrose und Rezeptordefekte (Hargreave, 2000).

### 1.2 Mikrodeletionen des Y-Chromosoms als Ursache von Infertilität

Tiepolo und Zufardi fanden 1976 unter 1170 infertilen Männern sechs mit einer distalen Deletion des Y-Chromosoms. Alle 6 Patienten wiesen eine Azoospermie auf. Sie konnten bei 2 Patienten nachweisen, dass die Deletionen des Y-Chromosoms *de-novo* Mutationen waren. Es wurde die Existenz eines Spermatogenesefaktors, genannt *Azoospermiefaktor* (AZF) postuliert (Tiepolo und Zufardi, 1976).

Vogt et al. konnten 1996 zeigen, dass Mikrodeletionen auf dem langen Arm des Y-Chromosoms mit einer Spermatogenesestörung einhergehen. Die Lokalisation der

Mikrodeletionen konnte von seiner Arbeitsgruppe auf drei nichtüberlappende Regionen auf Yq11 eingegrenzt werden (Vogt et al., 1996). Diese Regionen werden seitdem mit AZFa, AZFb und AZFc bezeichnet und umfassen eine Größe von jeweils 1-3 Mb für die AZFa-Region und AZFb-Region, sowie von ca. 1.4 Mb für die AZFc-Region (McElreavey und Krausz, 1999). Kent-First et al. (1999) beschrieben eine vierte Region, AZFd. Diese wird jedoch von den meisten Autoren mit zur AZFc-Region gezählt. Die folgende Abbildung zeigt die Lokalisation der AZF-Regionen auf der „Vollrath“-Karte, welche das Y-Chromosom in 43 Subintervalle unterteilt.

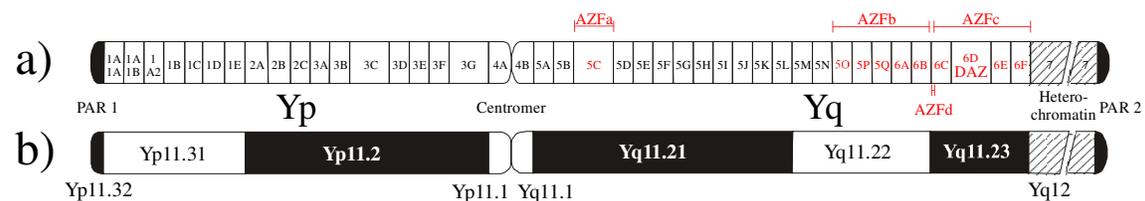


Abb. 1: a) Die „Vollrath“-Karte des Y-Chromosoms. Unterteilung des Y-Chromosoms in 43 Subintervalle. Die AZF-Regionen sind rot gekennzeichnet (modifiziert dargestellt aus Huynh et al., 2002; Foresta et al., 2001; Kent-First et al., 1999; Vollrath et al., 1992). PAR=pseudoautosomale Region  
 b) Ideogramm des Y-Chromosoms (aus Foresta et al., 2001).

Aktuell sind 211 Gene auf dem Y-Chromosom bekannt (Stand 09/2002, NCBI). Davon sollen 30 in den Prozess der Spermatogenese involviert sein, wobei, so wird angenommen, mehr als 2000 Gene insgesamt an dem Prozess der Spermatogenese beteiligt sind (Hargreave, 2000). Eine Literaturstudie von Foresta et al. (2001) zeigt, dass Mikrodeletionen in den AZF-Regionen vor allem bei Azoospermie und schwerer Oligozoospermie vorkommen (Tab. 1) und dass die AZFc-Region die höchste Prävalenz an Deletionen unter infertilen Männern mit Mikrodeletionen auf dem Y-Chromosom aufweist (Tab. 2).

Tab. 1: Häufigkeit von Patienten mit Azoo- bzw. Oligozoospermie (in %) unter 185 infertilen Männern mit Mikrodeletionen (Literaturstudie aus 22 vergleichbaren Untersuchungen, nach Foresta et al., 2001).

Patienten mit	n	%
Oligozoospermie 5-20 x 10 <sup>6</sup> Spermien/ml	3	1,6
Oligozoospermie < 5 x 10 <sup>6</sup> Spermien/ml	26	14,1
Azoospermie	156	84,3

Tab. 2: Relative Prävalenz von Deletionen der AZFa, b bzw. c Region bei 265 infertilen Männern mit Deletion (Literaturstudie aus 25 vergleichbaren Untersuchungen, nach Foresta et al., 2001)

deletierte Region	n	%
AZFa	13	4,9
AZFb	42	15,8
AZFc	158	59,6
AZFa+b	4	1,5
AZFb+c	22	8,3
AZFa+b+c	10	3,8
außerhalb AZF	16	6,0

Es gibt mehrere Kandidatengene für die Spermatogenese in den AZF-Regionen. Für die AZFa-Region werden das *single copy*-Gen USP9Y (*ubiquitin-specific protease 9, Y-chromosome*) (Kent-First, 2000; Sargent et al., 1999) und das DBY (*dead box on the Y-chromosome*) (Foresta et al., 2000; Lahn und Page, 1997), sowie das UTY (*ubiquitous TPR motif on the Y*) (Mazeyrat et al., 1998) in Betracht gezogen. In der AZFb-Region sind neben weiteren Genen u. a. das RBMY (*RNA binding motif*) und das EIF1AY (*eucaryotic translation initiation factor 1A Y*) Kandidatengene für die Spermatogenese (Huynh et al., 2002; Elliot, 2000).

### 1.3 Kandidatengene für die Spermatogenese in der AZFc-Region

In der AZFc-Region (6C-6F) konnten Reijo et al. (1995) ein Gen charakterisieren. Es wurde DAZ, *Deleted in Azoospermia*, genannt. Es konnte gezeigt werden, dass Männer mit Deletionen des DAZ-Gens einen variablen Phänotyp aufweisen, der von Azoospermie, über Oligozoospermie und in seltenen Fällen bis hin zur Fertilität reicht (Pryor et al., 1997; Vogt et al., 1996).

DAZ erstreckt sich über eine DNA-Sequenz von 48 kb und enthält 16 Exons. Das Protein ist testisspezifisch und findet sich im Zellkern der Spermatogonien und im Zytoplasma primärer Spermatozyten (Reijo et al., 2000). Es besteht aus einer RNA bindenden Region, plus 8-24 Wiederholungen einer Sequenz von 24 Aminosäuren (Yen et al., 1997; Reijo et al., 1995). Die Funktion dieser Wiederholungssequenzen ist unbekannt. DAZ kommt in vier Kopien in zwei Clustern in der AZFc-Region vor (Saxena et al., 2000).

Zu DAZ existiert ein homologes Gen auf Chromosom 3 (DAZH). Dieses liefert nur im Ovar und im Testis ein Transkriptionsprodukt (Saxena et al., 1996). Es ist möglich, dass DAZ

während der Evolution aus DAZH durch Translokation und Amplifikation hervorgegangen ist. Auch in anderen Spezies finden sich DAZ-Homologe, deren Deletion mit einer Störung der Spermatogenese verbunden ist (z.B. Maus: Ruggiu et al., 1997; Drosophila: Eberhart et al., 1996; Castrillon et al., 1993). Abb. 2 zeigt den Vergleich der Nukleotidsequenz der cDNA des DAZ-Gens, mit dem menschlichen DAZH und dem murinen DazH (Saxena et al., 1996).

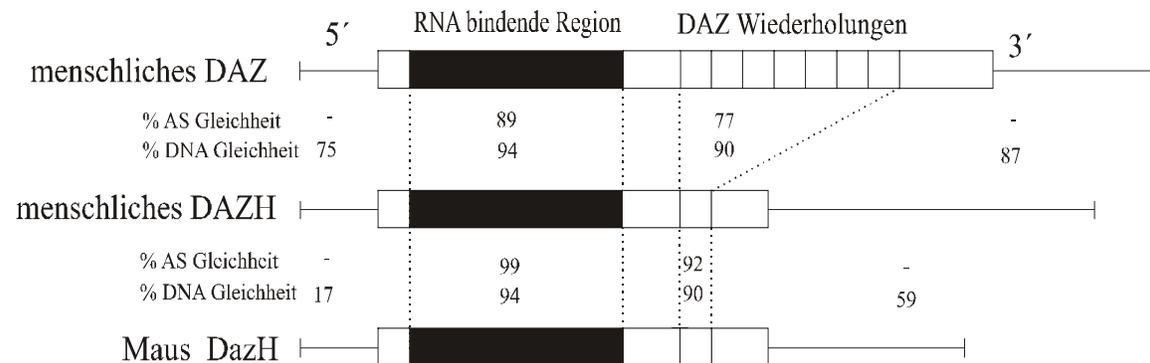


Abb. 2: Vergleich von menschlichem DAZ, DAZH und Maus DazH (cDNA), aus Saxena et al., 1996.

Weitere Gene in der AZFc-Region sind das CDY1 (*chromodomain Y1*), BPY2 (*basic protein Y2*), PRY (*PTA-BL Related Y*) und TTY2 (*testis transcript Y2*) und Vertreter der RBM-Familie (Kent-First, 2000; Lahn und Page, 1997; Yen et al., 1997). Diese Gene kommen in mehreren Kopien auf dem Y-Chromosom vor. Die Genprodukte werden ausschließlich im Hoden exprimiert (Lahn und Page, 1997). Eine CDY1 Kopie liegt zwischen beiden DAZ-Genclustern und ist bei DAZ-Deletionen ebenfalls deletiert. CDY1 ist ein weiteres Kandidatengen für die Spermatogenese, dessen Verlust mit einer Spermatogenesestörung einhergeht (Huynh et al., 2002).

#### 1.4 Genotyp/Phänotyp -Korrelation der AZF-Deletionen

Deletionen in der AZFa-Region werden mit einer kleinen Statur und mit Skelettanomalien, ähnlich einem Turner-Phänotyp, assoziiert (Affara et al., 1996; Salo et al., 1995). Hodenhistologien von Patienten mit AZFa-Deletionen zeigen ein *Sertoli-Cell-Only-Syndrom* oder eine Hypospermie. Ein Spermatogenese-arrest wird nicht beobachtet (Foresta et al., 2001).

Hodenhistologien von Patienten mit AZFb-Deletionen zeigen einen Spermatogenese-arrest in verschiedenen Stadien (Elliott, 2000). Auch eine fokale Ausreifung bis hin zu reifen Spermien wurde beobachtet (Foresta et al., 2001).

Patienten mit AZFc-Deletion zeigen ein heterogenes Bild der Hodenhistologien. Es wurden *Sertoli-Cell-Only-Syndrom*, Spermatogenese-arrest, Mischbilder und in einigen Fällen auch eine regelrechte Spermatogenese beobachtet (Saut et al., 2000; Chang et al., 1999; Pryor et al., 1997).

#### 1.5 CFTR-Mutationen und Infertilität

Mutationen in beiden Allelen des CFTR-Gens auf Chromosom 7 führen zu cystischer Fibrose (CF), einem Krankheitsbild, das durch Bildung eines zähen Sekretes in exkretorischen Drüsen charakterisiert ist. Ursache ist ein defektes CFTR-Gen, das für ein Protein kodiert, welches als Anionenkanal fungiert (Riordan et al., 1989). Das Protein liegt vor allem in Epithelzellen vor. Die Krankheit manifestiert sich allermeistens schon im Kindesalter in Form von rezidivierenden Bronchitiden und Pankreatiden (Stuhrmann und Dörk, 2000). Nahezu alle männlichen CF-Patienten sind aufgrund einer beidseitigen Fehlausprägung des Samenleiters (beidseitige angeborene Aplasie des *vas deferens*, CBAVD), welche zu einer obstruktiven Azoospermie führt, infertil (Sertic, 2001; Stuhrmann und Dörk, 2000). Ursache ist die embryonal unvollständige Entwicklung des Wolffschen-Ganges in die obigen Strukturen (Stuhrmann und Dörk, 2000; Stern et al., 1982; Kaplan et al., 1968). Die CBAVD kann aber auch isoliert vorkommen, ohne weitere Symptome der cystischen Fibrose. Diese Patienten sind häufig *compound heterozygot*  $\Delta F508/R117H$  oder auch  $\Delta F508/IVS8-5T$  (Dörk et al., 1997).

Bei IVS8-5T handelt es sich um einen Thymidinsequenzpolymorphismus im Polypyrimidintrakt im Intron 8 des CFTR-Gens. Es gibt Allele mit einer Folge von 5, 7 und 9

Thymidinen (Kiesewetter et al., 1993). Personen mit einem 5T-Allel bauen Exon 9 nur noch zu ca. 10-40% in die mRNA ein, Personen mit dem 7T-Allel bzw. 9T-Allel zu 70-100% (Abb. 3). Für eine vollständige Funktion des CFTR-Gens sind alle 27 Exons notwendig (Chu et al., 1993; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Heterozygote 5T-Allelträger sind symptomfrei. Liegt auf dem zweiten Allel eine Mutation vor, führt dies zu einer milden Form von cystischer Fibrose. Die meisten homozygoten 5T-Allelträger weisen Symptome der cystischen Fibrose auf (Chu et al., 1993).

Larriba et al. fanden 1998, dass Träger des 5T-Allels das CFTR-Genprodukt ohne Exon 9 vermehrt im Hodengewebe exprimieren und im Vergleich zu Trägern ohne ein 5T-Allel weniger reife Spermien im Tubuluslumen aufweisen.

Patienten mit einer congenitalen bilateralen Aplasie des *vas deferens* (CBAVD) weisen zu 12%-27% das 5T-Allel auf (Stuhrmann und Dörk, 2000; Zielenski et al., 1995). Das 5T-Allel kommt dagegen nur zu ca. 5% in der Normalbevölkerung vor (Chu et al., 1993).

Ob heterozygote CFTR-Mutationen gehäuft bei infertilen Männern vorkommen, ist unklar. Es gibt Studien, die dies belegen (Jakubiczka et al., 1999; van der Ven et al., 1996), aber auch Studien, die keine Assoziation nachweisen können (Ravnik-Glavac et al., 2001; Tuerlings et al., 1998). Die Heterozygotenfrequenz für CFTR-Mutationen in der Normalbevölkerung beträgt 1:29,2 im deutschen Raum (Bobatilla et al., 2002).

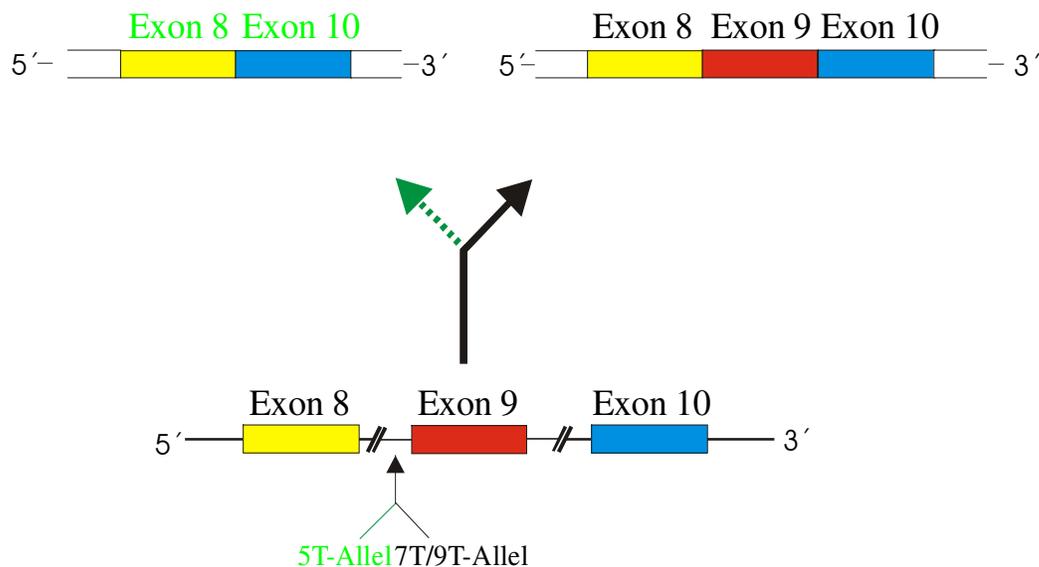


Abb. 3: Effekt des 5T-Allels auf das Spleißen des CFTR-Transkripts. Bei Vorliegen einer Sequenz von 5 Thymidinen im Polypyrimidintrakt des Intron 8 ist das Exon 9 zu 60%-90% nicht im CFTR-mRNA-Transkript enthalten (aus Dörk und Stuhrmann, 1996).

## **1.6 Weitergabe genetischer Ursachen männlicher Infertilität durch assistierte Befruchtung**

Von Infertilität betroffenen Paaren kann mittels Techniken der assistierten Befruchtung (MART - *medical assisted reproductive technology*) geholfen werden. Eine weitverbreitete Form der assistierten Befruchtung ist die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Sie wurde zum erstenmal 1991 in Belgien erfolgreich angewendet (Palermo et al., 1992). Die Erfolgsquote dieser Methode liegt bei bis zu 35% (Van Steirteghem et al., 1993).

Bei der Anwendung von MART ist die Kenntnis von genetisch bedingter Infertilität von großer Bedeutung, um die Möglichkeit der Weitergabe von genetischen Veränderungen auf den Nachwuchs zu erkennen (Foresta et al., 2001; Seshagiri, 2001) und eine genetische Beratung anzubieten. Deshalb ist es wichtig Screeningprogramme für Patienten zu entwickeln, für die eine Indikation zur assistierten Befruchtung gestellt wurde, um eine effiziente Diagnostik zu ermöglichen.

## **1.7 Zielstellung**

Zu Beginn dieser Arbeit im Jahr 1997 lagen noch keine Daten über die Häufigkeit von Mikrodeletionen in der DAZ-Region des Y-Chromosoms bei Männern vor, für die eine Indikation zur ICSI gestellt wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in einem Patientenkollektiv von 270 Männern, für die eine Indikation zur ICSI gestellt wurde, folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie häufig sind Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes bei unselektierten männlichen ICSI Patienten?
- Gibt es klinische Hinweise auf Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes?
- Bestehen Unterschiede in den Häufigkeiten der T-Allele (5T, 7T, 9T) im Intron 8 des CFTR-Gens bei männlichen ICSI-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung?
- Sind die Häufigkeiten von CFTR- und Chromosomenmutationen bei männlichen ICSI-Patienten verschieden von der in der Normalbevölkerung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

##### 2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Tris	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Serva, Heidelberg
Mineralöl, Light white oil	Sigma-Aldrich Chemie
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt

##### 2.1.1.2 Biochemikalien und Kits

10fach NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer	InViTek, Berlin
50 mM MgCl <sub>2</sub>	InViTek, Berlin
InViTAQ DNA-Polymerase	InViTek, Berlin
10fach NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer	Biometra, Göttingen
50 mM MgCl <sub>2</sub>	Biometra, Göttingen
Dynazyme	Biometra, Göttingen
dNTP-Mix	Biometra, Göttingen
QIAamp Tissue Kit	QIAGEN, Hilden, Köln
50 bp-DNA-Leiter	Life Technologies GmbH, Eggstein
Seakem ME-Agarose	Biozym, Oldendorf
Primer	Amersham, Freiburg

### 2.1.1.3 Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide (Primer)

Die Sequenzen für die fünf Primerpaare zur Analyse der DAZ-Region (Fettdruck) und die Sequenzen der Primerpaare zur genaueren Charakterisierung und Kartierung der nachgewiesenen Deletionen, wurden aus der Arbeit von Reijo et al. (1996) entnommen und sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Für Referenz-PCRs wurden die Y-spezifischen Primerpaare SY 78 (Zentromerregion), SY 14 (SRY) und ein Primerpaar für das CFTR-Gen (Exon 10) benutzt (Graudruck).

Tab. 3: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) und deren Produktgröße. Die Reihenfolge der Primer entspricht nicht der physikalischen Anordnung auf dem Y-Chromosom. In Fettdruck sind die für die Analyse verwendeten 5 Primerpaare dargestellt. Grau aufgeführt sind die 3 Primerpaare für die Referenz-PCRs.

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	Produktgröße (bp)
CFTR-Exon10	gtttcctggattatgcctggcac	gtggcatgctttgatgacgcttc	98
SY 78 (cen)	tcctttccacaatagacgtca	ggaagtatctcccttaaagctatg	170
SY 14 (SRY)	gctctccggagaagctcttc	agctgggtctccattcttgag	460
SY 85	tggcaatttgctatgaagt	acaggctattgactggcag	369
SY 132	gagagtcataatgccgacgt	tggctcaggaagttttgc	159
SY 143	gcaggatgagaagcaggtag	ccgtgtgctggagactaatc	311
SY 153	gcacctcattttatgtcca	caacccaaaagcactgagta	139
SY 154	ttgcaccaggattaagtga	tttttcagataaactttcagtgg	245
SY 156	aggacctggcaggattagcc	atgtcagggtttcctttgcc	900
SY 158	ctcagaagtctcctaataagtcc	acagtggttgtagcgggta	231
SY 159	tacatgttatgcctatgcc	caattatataatgatgatgtgtc	448
SY 160	tacgggtctcgaatggaata	tcattgcattcctttccatt	236
SY 239	cattcatcttccctttgaagg	atgcaagtcgcaggaatct	200
<b>SY 254</b>	<b>gggtgttaccagaaggcaa</b>	<b>gaaccgtatctaccaaagcagc</b>	<b>379</b>
<b>SY 255</b>	<b>gttacaggattcggegtgat</b>	<b>ctegtcatgtgcagccac</b>	<b>123</b>
SY 257	aggttgttggccttgagc	tctatgatctgtaccgggtgc	123
<b>SY 277</b>	<b>gggtttgacctgatacgttaatta</b>	<b>cctaaaagcaattctaaacctccag</b>	<b>311</b>
<b>SY 279</b>	<b>ccacctatggtagtaaaattgta</b>	<b>ctcttattatcttattgctacaacg</b>	<b>870</b>
<b>SY 283</b>	<b>cagtgatacactcggacttgtgta</b>	<b>gttattgaaaagctacaggg</b>	<b>497</b>

### 2.1.2 Gebrauchswaren

Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Tubes	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Eppendorf Varipette	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Gilson Pipetman	Gilson, Middleton USA

Filter-Tips	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Parafilm „M“	American National Can <sup>TM</sup> , USA

### 2.1.3 Puffer und Stammlösungen

TBE-Puffer:	500 mM Tris/HCl 500 mM Borsäure 20 mM EDTA pH mit HCl auf 8,2 eingestellt
-------------	--

Lysepuffer:	0,32 M Saccharose 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1% Triton 100
-------------	--

Stopperlösung:	0,1 M EDTA 0,1% SDS 0,2% Bromphenolblau 40% Glycerol
----------------	---

### 2.1.4 Geräte

Power Pack P25	Biometra, Göttingen
EASY-CAST Elektrophorese System	Owl Separation Systems, Woburn USA
Zentrifugen	Hettich, Tuttlingen
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Transilluminator	Herolab, Wiesloch
Videoprinter	Mitsubishi, Japan
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Spektralphotometer	Pharmacia, Freiburg

## **2.2 Das Probandenkollektiv**

### **2.2.1 Das Probandenkollektiv und die Herkunft der Probanden-DNA**

Es standen DNA-Proben, die aus Leukozyten gewonnen wurden, von 270 männlichen Probanden zur Verfügung, die im Zusammenhang mit einer Infertilitätsbehandlung eine genetische Beratungsstelle (Dr. med. Pruggmeyer, Facharzt für Gynäkologie und Medizinische Genetik mit zytogenetischem Labor, Peine; Genetische Beratung des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) aufsuchten. Insgesamt 101 Probanden kamen aus der Fertilitätssprechstunde einer gynäkologischen Gemeinschaftspraxis (Dr. med. Algermissen, Dr. med. Justus, Dr. med. Wilke, Hildesheim). Die Spermioogramme dazu wurden bei Dr. med. Pruggmeyer angefertigt. 169 Probanden kamen aus der Fertilitätssprechstunde der Universitätsklinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. habil. F. Röpke) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Diese 270 Probanden wurden als Kollektiv zur Analyse von Deletionen der DAZ-Region auf dem Y-Chromosom untersucht.

Zur Analyse des Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens wurde das Probandenkollektiv mit einem Kontrollkollektiv verglichen. Das Kontrollkollektiv bestand aus 61 Frauen und 34 Männern, bei denen zum Ausschluss einer Erkrankung an cystischer Fibrose eine Untersuchung des CFTR-Gens durchgeführt wurde.

### **2.2.2 Erhebung der klinischen Daten**

Zur Analyse des in der Einleitung dargestellten Zieles wurden von den 270 Probanden des Untersuchungskollektivs die Befunde erhoben für das Spermioogramm, den Hormonstatus, der andrologischen Untersuchung, der Chromosomenanalyse, der Analyse des CFTR-Locus und der Hodenhistologien. Die Befunde wurden aus den Akten der Patienten übernommen.

#### Spermiogrammbefunde:

Von 218 Probanden waren Spermiogramme vorhanden: von 89 Probanden aus der Praxis Dr. Pruggmeyer (Peine) und von 129 Probanden aus dem UKK, welche von verschiedenen Ärzten der Klinik zugewiesen wurden.

Die Spermiogramme wurden von verschiedenen Untersuchern angefertigt. Sie beinhalten die auswertbaren Parameter „Anzahl der Spermien pro Milliliter Ejakulat“, „Volumen“ und „pH“ des Ejakulates sowie Angaben über die Motilität der Spermien. Die Beurteilung der Motilität der Spermien erfolgte in den vier Kategorien schnell motil, langsam motil, lokal motil und immotil. Aussagen über die Morphologie der Spermien, sowie Hinweise auf Infektionen waren unregelmäßig vorhanden und auch nach verschiedenen Maßstäben eingeteilt worden, so dass diese Parameter retrospektiv nicht auswertbar waren.

Im Durchschnitt hatte ein Patient 3-9 Spermiogramme, viele sogar von unterschiedlichen Untersuchern. In einem Drittel der Fälle gab es erhebliche Abweichungen der Spermiogrammparameter für ein und denselben Probanden. In diesen Fällen wurden die aktuellsten Spermiogramme zur Auswertung herangezogen.

#### Hormonstatus:

Von 102 Probanden sind in verschiedenen Laboren die Werte für das follikelstimulierende Hormon (FSH), für das luteinisierende Hormon (LH) sowie für Testosteron bestimmt worden. Die Laborwerte ließen sich aufgrund der Tatsache, dass sie nicht im selben Labor angefertigt wurden, nicht direkt vergleichen. Im Vergleich zu den Referenzwerten des jeweiligen Labors konnte zumindest eine Aussage über eine Erhöhung oder Erniedrigung getroffen werden.

#### Andrologische Befunde:

Von Frau Dr. med. Drunkenmölle (Praxis für Dermatologie, Phlebologie, Allergologie und Andrologie, Halle) lagen andrologische Befunde von 64 Probanden vor. Es handelt sich um Angaben über die Hodengröße (sonografisch bestimmt), über die andrologische Anamnese, über das Leiden an Varikozelen und das Vorliegen von Samenwegsinfektionen.

#### Chromosomenanalyse:

Das Ergebnis einer Chromosomenanalyse war von 218 Probanden vorhanden. Diese wurden im Labor „Postnatale Zytogenetik“ im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der MLU angefertigt. Die Chromosomenanalysen wurden nicht selbständig durchgeführt, die Befunde wurden aus den Akten übernommen.

#### CFTR-Locus:

Die Untersuchung des Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens, sowie eine Untersuchung auf das Vorhandensein der häufigsten Mutationen im CFTR-Gen, wurden im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der MLU, im Labor „Molekulare Diagnostik“, durchgeführt. Von 230 Probanden lagen Ergebnisse über diese Untersuchungen vor. Die Ergebnisse wurden aus den Akten übernommen, die molekulargenetische Untersuchung nicht selbständig durchgeführt.

#### Hodenhistologien:

Von 5 Probanden lagen Befunde von Hodenbiopsien vor. Die Hodenhistologien sind von verschiedenen Untersuchern bewertet worden. Es wurden das Keimepithel/Spermatogenese und das Interstitium beurteilt. Befunde und Präparate wurden von Herrn Professor Dr. med. habil. W. F. Rath (Direktor des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), Herrn Professor Dr. med. habil. M. Bergmann (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Herrn Professor Dr. med. habil. W.C. Marsch (Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) angefertigt und zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Methoden

Die im folgenden beschriebenen Methoden wurden nach Protokollen in den Methodenbüchern „*Current Protocols in Molecular Biology*“ von Ausubel et al. (1989), „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“ von Maniatis et al. (1989) und „*Gentechnologische Arbeitsmethoden*“, von Hagemann (1990) durchgeführt.

### 2.3.1 Isolierung hochmolekularer Kern-DNA aus menschlichem Blut mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

5 ml EDTA-Blut werden in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit Lysepuffer auf 25 ml aufgefüllt. Die Probe wird 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt. In dieser Zeit wird die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt.

Nach 30 min wird die Probe bei 4170 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen, das Pellet auf Zellstoff getrocknet. Danach wird das Pellet resuspendiert mit folgenden Lösungen:

267 µl physiologische Kochsalzlösung, 267 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 53 µl 10% SDS, 117µl 5 M NaClO<sub>4</sub> und 667 µl Phenol (pH 8,0). Dieses Gemisch wird 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

Die Oberphase (phenolische Phase) wird abpipettiert und verworfen. Es werden wieder 667 µl Phenol zugegeben, das Gemisch geschüttelt und 15 min zentrifugiert. Die Oberphase wird wiederum abpipettiert und verworfen.

Jetzt werden 667µl Chloroform dazugegeben, geschüttelt und anschließend 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

Die Oberphase (wässrige Phase) wird in ein neues Tube abpipettiert. Es werden wieder 667 µl Chloroform dazugegeben und der Vorgang wiederholt.

Nach dem Abpipettieren der Oberphase in ein neues Tube wird Isopropanol dazugegeben und die DNA auf einen Glasstab gewickelt.

Danach wird die auf den Glasstab aufgespulte DNA mit 70% igem Ethanol überspült. Die DNA wird an einem Glasstab an der Luft getrocknet. Anschließend wird sie in 100-400 µl sterilem Wasser gelöst und steht dann für molekulargenetische Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch in einem Spektralphotometer bestimmt. In einem Wellenbereich von 200 bis 400 nm sind vier Wellenlängen von Bedeutung.

230 nm: Absorptionsbereich von Salzen

260 nm: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren

280 nm: Absorptionsmaximum von Proteinen

320 nm: Absorptionsminimum von Nukleinsäuren

Gemessen wird die Abschwächung des Lichtstrahls definierter Wellenlänge durch die Probe. Das Verhältnis der Intensität des Lichtstrahls einer Referenzprobe (dest. H<sub>2</sub>O) zur Intensität des Lichtstrahls nach Durchstrahlen der Probe wird als Extinktion (E) bezeichnet .

$$E = I_0 / I_1$$

Sie ist für einen Großteil der Substanzen unterschiedlich.

Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = (E_{\max} - E_{\min}) * f * K (\mu\text{g/ml})$$

Dabei ist: c = Konzentration

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

K = Konzentrationskoeffizient

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 280nm ergibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Das Verhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260nm und 230nm ermöglicht ein Abschätzen des Salzgehaltes der Probe.

### 2.3.3 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) wurde 1987 von *K. B. Mullis* entwickelt. Mittels dieses Reaktionsablaufes lassen sich von bestimmten DNA-Sequenzen multiple Kopien (Amplifikation) erstellen.

Die dabei verwendete thermostabile Polymerase ist ein Enzym mit der Eigenschaft, zu einer Einzelstrang-DNA einen komplementären Strang synthetisieren zu können, wenn eine Startsequenz (Primer) vorhanden ist. Um einen bestimmten DNA-Bereich zu amplifizieren, sind immer zwei Startsequenzen nötig.

Die Primer hybridisieren nach Denaturierung (Einzelstrangbildung) der DNA durch Temperaturerhöhung an ihre komplementäre Sequenz. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet. Die Polymerase synthetisiert in 5`-3`Richtung an die Primer die zur DNA-Sequenz komplementären Nukleotide an. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet.

Die Primer werden so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich auf den komplementären Strängen von ihnen flankiert wird.

Das Prinzip der PCR ist die nun folgende zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Dies erfolgt in einem Automaten, einem sogenannten Thermocycler.

Ab der zweiten Wiederholung entstehen DNA-Stränge definierter Größe, deren Anzahl sich bei jedem weiteren Reaktionsdurchlauf verdoppelt. Es kommt zu einem exponentiellen Wachstum der Anzahl dieser DNA-Stränge.

Durch Anfärbung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich diese DNA-Stränge (=PCR-Produkte) sichtbar machen.

Es lassen sich folgende Aussagen treffen:

Entstehen bei regelrechter Durchführung keine PCR-Produkte, so haben die Startsequenzen keine komplementäre Region zum Hybridisieren gefunden. Das heißt, es könnte eine Deletion vorliegen.

Entstehen PCR-Produkte mit nicht erwarteter Basenpaarlänge, so könnten Deletionen oder Insertionen in der von den Primern eingegrenzten Region liegen.

Entstehen PCR-Produkte regelrechter Basenpaarlänge, so liegen wahrscheinlich keine Deletionen oder Insertionen in der amplifizierten Region vor.

### 2.3.4 PCR-Ansatz

Es wurde folgender PCR-Ansatz in einem 0,5 ml Eppendorf-Tube zusammenpipettiert:

2 µl TemplateDNA  
5 µl 10 x NH<sub>4</sub>-Reaktionspuffer  
1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
4 µl dNTP's  
0,2 µl Taq-Polymerase (InViTek)  
1 µl Vorwärtsprimer  
1 µl Rückwärtsprimer  
35,3 µl dest. H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und dann in den Thermocycler gestellt.

Die PCR lief für die Primer nach folgendem Programm ab (die Primersequenzen sind unter 2.1.1.3 aufgeführt):

1. Denaturierung: 94°C 5 min
2. Denaturierung: 94°C 1 min
3. Annealing: 60°C 1 min
4. Elongation: 72°C 1 min
5. Schritte 2-4 31 mal
6. abschließende Elongation: 72°C 5 min
7. Aufbewahrung: 4°C

### 2.4.5 DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte können mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Das Prinzip ist folgendes:

Das Agarosegel bildet ein 3-dimensionales Netzwerk mit Poren, deren Größe von der Agarosekonzentration abhängig ist. Das ganze Gel liegt in der Pufferlösung, die auch zum Herstellen des Gels verwendet wurde. Wird nun DNA in einen Slot am Anfang des Gels gegeben und ein elektrisches Feld angelegt, so wandert die DNA in Richtung Kathode durch das Gel. Die Geschwindigkeit, mit der ein DNA-Molekül durch das Gel wandert, hängt von

der Porengröße des Gels, der angelegten Spannung, der Ladungsträgerdichte des Moleküls und letztendlich von der Molekülgröße ab. Werden die ersten drei Parameter konstant gehalten, ergibt sich eine unterschiedliche Laufgeschwindigkeit für unterschiedlich große Moleküle.

Wird die Elektrophorese nach einer gewissen Zeit gestoppt, so haben kleine DNA-Fragmente einen längeren Weg zurückgelegt als große DNA-Fragmente.

Da das Gel Ethidiumbromid enthält, das eine hohe Affinität zu DNA besitzt, und unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert, kann die DNA auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden.

Wird ein Längenstandard in einem Slot des Gels mitgeführt, lässt sich die Länge der bei der PCR entstandenen DNA-Fragmente mit diesem korrelieren.

### 2.3.6 Herstellung eines Agarosegels

Zur Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese wurden entsprechend der PCR-Produktgröße 2%ige und 3%ige Agarosegele verwendet.

Es wird die entsprechende Agarosemenge mit 0,5 x TBE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und 20 min in einem Dampftopf sterilisiert. Danach wird Ethidiumbromid in die noch flüssige Agarose gegeben (Endkonzentration = 500µg/ml).

Die fertige Agarose wird in eine Form gegossen und ein Kamm eingesetzt, der die gewünschte Zahl von Probenaschen (Slots) ausbildet.

### 2.3.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Excel, WinStat für Excel und SPSS, sowie der „*Biostatistik*“ von Glantz (1998) und „*Angewandte Statistik*“ von Sachs (1996). Es erfolgte für alle quantitativen Daten eine Untersuchung auf Normalverteilung mittels des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests. Lag Normalverteilung vor, wurden Mittelwertvergleiche mittels des t-Testes (zweiseitig) zum Vergleich zweier Mittelwerte und für den Vergleich mehrerer Mittelwerte mittels einfaktorier ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) durchgeführt.

Mit Daten, die von der Normalverteilung abwichen, wurden nichtparametrische Tests durchgeführt und der Median berechnet. Für den Vergleich dreier unabhängiger Stichproben wurde der H-Test (Kruskal-Wallis-Test) eingesetzt. Zeigte sich im H-Test ein signifikanter

Unterschied, wurde der SNK-Test (Student-Newman-Keuls-Test) zum multiplen Paarvergleich durchgeführt.

Zum Vergleich der Häufigkeit eines Merkmals zwischen zwei Gruppen wurde der  $\chi^2$ -Vierfelder-Test verwendet. Zur Beurteilung auf Hardy-Weinberg-Gleichverteilung wurden die beobachteten Häufigkeiten mit den nach der Hardy-Weinberg-Formel berechneten Häufigkeiten mittels  $\chi^2$ -Test verglichen. Zum Vergleich der Häufigkeit eines Merkmals in einer Gruppe mit der Häufigkeit eines Merkmals in der Gesamtpopulation, wurde der Binomialtest (einseitig) verwendet. Für Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p < 0,05$  wurden die Unterschiede zwischen den Stichproben als signifikant verschieden voneinander interpretiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Suche nach Deletionen in der DAZ-Region des Y-Chromosoms

Es wurden 270 männliche Probanden-DNAs mittels PCR-Analyse auf Deletionen von 5 Loci (SY 254, SY 255, SY 277, SY 279 und SY 283) im Bereich der DAZ-Region analysiert. Im Rahmen eines Vorversuchs wurde die Spezifität der verwendeten Primerpaare für das Y-Chromosom an der DNA unauffälliger männlicher Probanden (mit nachgewiesener Fertilität), im Vergleich zu weiblichen Probanden, überprüft. Die für den jeweiligen Locus spezifischen Amplifikate von SY 254 mit 379 bp, SY 255 mit 123 bp, SY 277 mit 311 bp, SY 279 mit 870 bp und SY 283 mit 497 bp sind in Abb. 4 dargestellt.

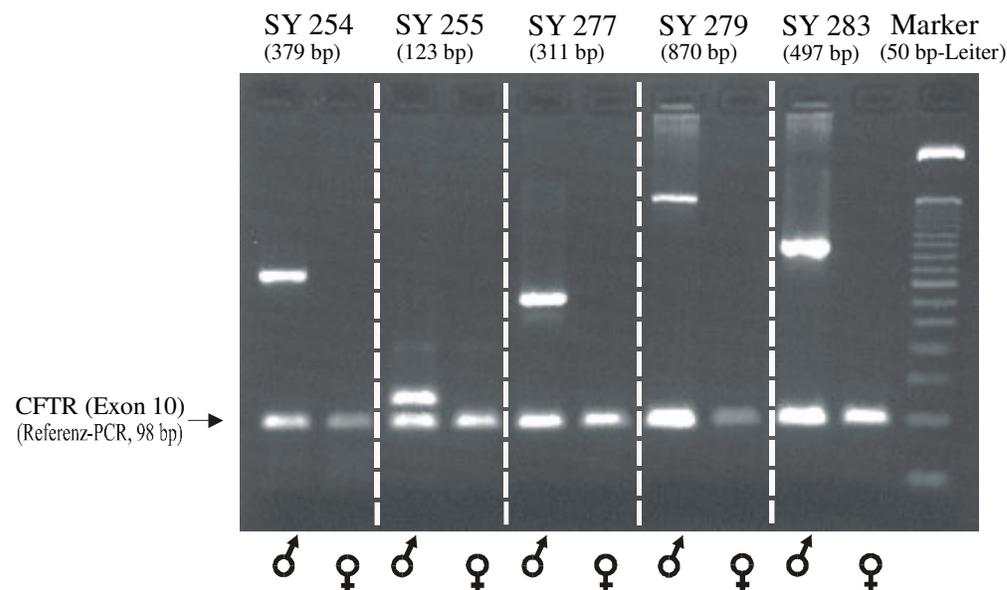


Abb. 4: Spezifität der Primer für die Deletionsanalyse der DAZ-Region.

Für jedes Primerpaar der 5 DAZ Loci wurden DNAs männlicher und weiblicher Probanden als Template verwendet. In jedem Ansatz wurde eine nicht Y-spezifische Referenz (CFTR, Exon 10 mit 98 bp Größe) zur Kontrolle mitgeführt. Die DAZ-Primerpaare liefern nur im Ansatz mit männlicher DNA ein PCR-Produkt. Es finden sich keine signifikanten Nebenbanden.

Insgesamt wurde zur Analyse der 5 Loci mit drei Ansätzen gearbeitet. Dazu wurden die Primerpaare der Loci SY 254 und SY 255, sowie SY 277 und SY 283, jeweils in einem PCR-Ansatz verwendet (Multiplex-PCR). Das Primerpaar SY 279 wurde als Einzel-PCR angesetzt. Neben der Probanden-DNA wurde für jeden Ansatz eine PCR ohne DNA (Nullkontrolle) und eine PCR mit weiblicher DNA, zur Kontrolle angesetzt. Waren diese beiden negativ, wurde das Ergebnis gewertet. War ein Probanden-DNA-Ansatz negativ, so wurde das Ergebnis in

zwei weiteren unabhängigen Untersuchungen überprüft und bei übereinstimmenden Ergebnissen als Deletion interpretiert.

Die Abb. 5 zeigt die Gelelektrophorese der Analyse exemplarisch bei 9 Probanden für die beiden Loci SY 254 und SY 255. Die Nullkontrolle ( $\emptyset$ ) und die weibliche Kontrolle ergaben kein PCR-Produkt. Bei Proband 935 sind keine spezifischen PCR-Produkte nachweisbar (Pfeil). Zwei Wiederholungsuntersuchungen bestätigten das Ergebnis, so dass für Proband 935 auf eine Deletion der Y-spezifischen Loci SY 254 und SY 255 geschlossen wurde.

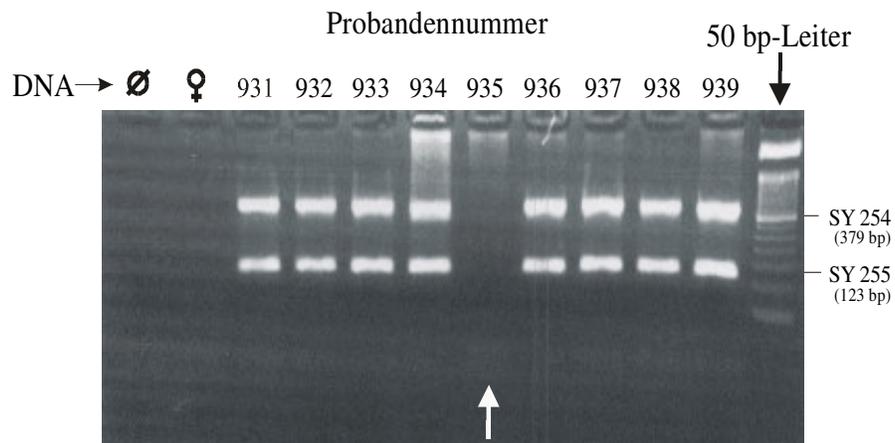


Abb. 5: Ergebnis einer Gelelektrophorese bei 9 Probanden für die beiden Loci SY 254 und SY 255. Bei Proband 935 sind für beide Loci keine PCR-Produkte nachweisbar (Pfeil). Die weibliche Kontrolle und die Nullkontrolle ( $\emptyset$ ) sind negativ.

Mit dieser Methodik wurden unter den 270 Probanden 2 Probanden (0,75%), Proband 935 und Proband 1053, mit Deletionen gefunden. Bei beiden Probanden liegt eine Deletion für alle der 5 untersuchten Loci vor. Bei den restlichen Probanden waren keine Deletionen nachweisbar.

### 3.2 Charakterisierung der Deletionen

Um die Deletionen der beiden Probanden 935 und 1053 in ihrer Größe näher zu charakterisieren, wurde von den deletierten Loci proximal und distal nach Deletionen flankierender Loci gesucht. Zu den bisherigen 5 Loci wurden 13 zusätzliche Loci auf dem Y-Chromosom analysiert. Bei beiden Probanden sind übereinstimmend 11 Loci deletiert, wobei die Bruchpunkte proximal zwischen SY 143 und SY 153 sowie distal zwischen SY 158 und SY 159 liegen (Tab. 4).

Tab. 4: Eingrenzung der Deletion der AZFc-Region bei Proband 935 und bei Proband 1053. Die Reihenfolge der Loci entspricht der physikalischen Lage auf dem Y-Chromosom. „-“ Locus deletiert, „+“ Locus vorhanden. In Fettdruck dargestellt sind die Loci der DAZ-Region.

Loci	Proband	
	935	1053
SY 14	+	+
SY 78	+	+
SY 85	+	+
SY 132	+	+
SY 143	+	+
SY 153	-	-
SY 154	-	-
SY 239	-	-
SY 257	-	-
SY 156	-	-
<b>SY 254</b>	-	-
<b>SY 255</b>	-	-
<b>SY 277</b>	-	-
<b>SY 279</b>	-	-
<b>SY 283</b>	-	-
SY 158	-	-
SY 159	+	+
SY 160	+	+

Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analyse für die beiden Probanden mit Deletionen im Vergleich zu einem unauffälligem Probanden und schematisch die Lokalisation auf dem Y-Chromosom.

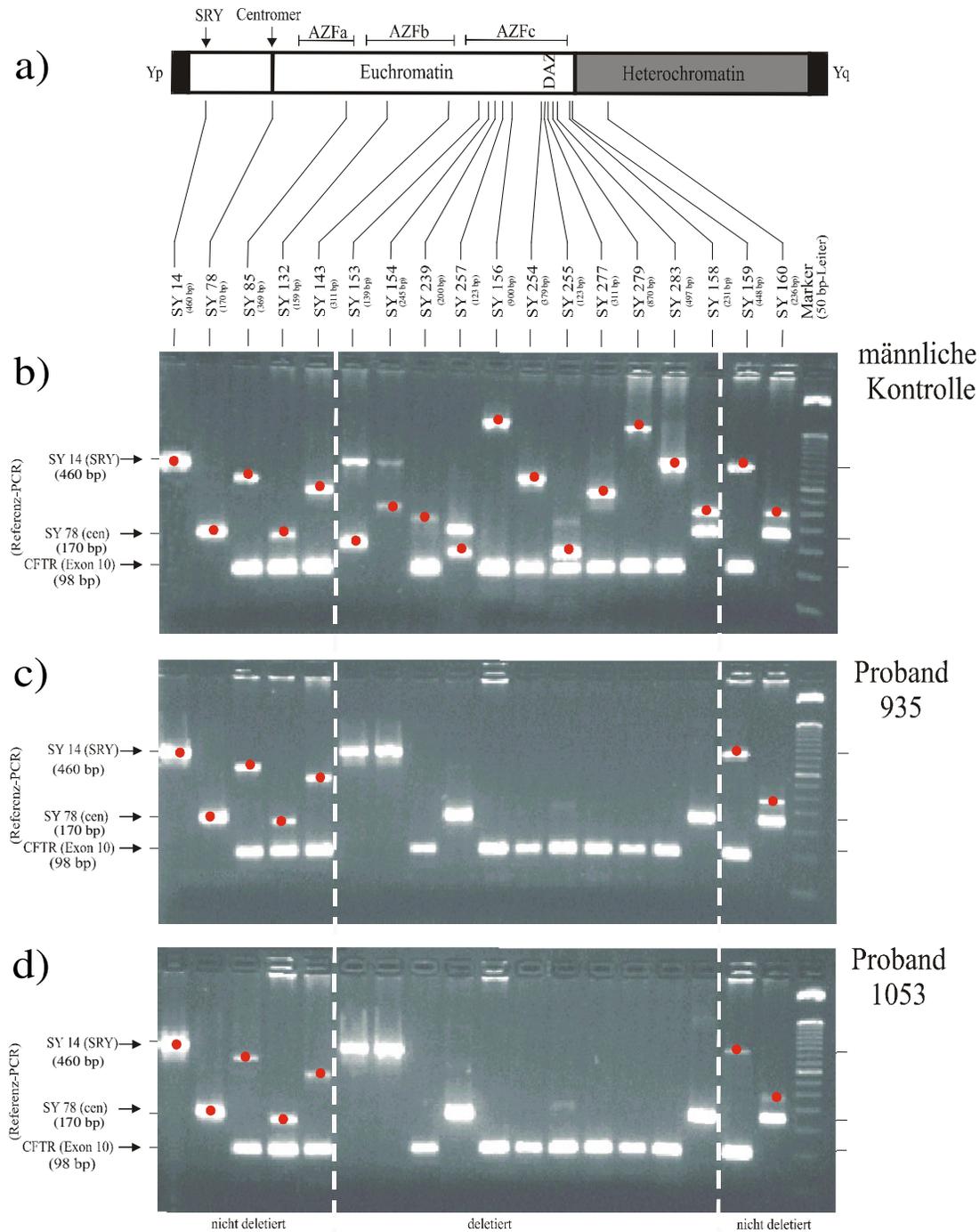


Abb. 6a-d: Übersicht der Ergebnisse der PCR-Analyse bei Proband 935 und bei Proband 1053.

- a) -Schematische Darstellung des Y-Chromosoms mit Lokalisation der untersuchten Loci.
- b) -Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten eines klinisch gesunden Probanden. In jedem Ansatz, außer für die Loci SY 14 und SY 78, wurde zu den Primern des zu untersuchenden Locus ein Primerpaar für eine Referenz-PCR mitgeführt, um das Vorhandensein von Probanden-DNA auch bei Deletionen anzuzeigen. Die Loci für SY 14 und SY 78 befinden sich auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Die Primerpaare SY 14 und SY 78 wurden gleichzeitig als Referenz-PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte der für die Deletionscharakterisierung eingesetzten Primerpaare sind mit einem roten Punkt markiert. Die PCR-Produkte ohne roten Punkt stellen die Amplifikate der Referenz-PCR dar (Kontrolle).
- c) -Proband 935: Es fehlen die PCR-Produkte der Primerpaare von SY 153 bis SY 158. Die Referenz-PCR-Produkte sind vorhanden
- d) -Proband 1053: Es fehlen dieselben PCR-Produkte wie bei Proband 935.

Abb. 7 stellt die Lokalisation der Deletion bei beiden Probanden auf dem Y-Chromosom schematisch dar. Der Locus SY 160 befindet sich im Beginn des proximalen Heterochromatins, alle übrigen Loci im euchromatischen Bereich (Reijo et al., 1995).

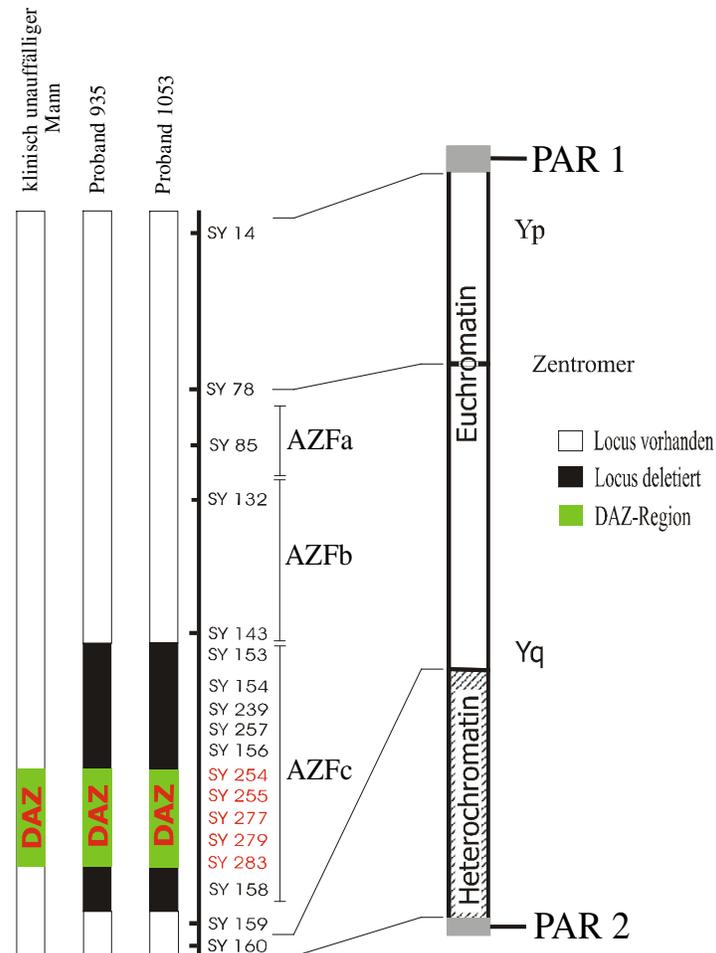


Abb. 7: Deletionskarte zur schematischen Darstellung der Deletionsgröße.

Dargestellt sind alle Loci, die untersucht wurden. Der Deletionsbereich ist schwarz abgebildet. Die DAZ-Region im Deletionsbereich ist grün und die Primer zum Screening sind rot dargestellt. Der proximale Bruchpunkt liegt zwischen den Loci SY 143 und SY 153, der distale Bruchpunkt zwischen den Loci SY 158 und SY 159. Der Deletionsbereich betrifft die gesamte AZFc-Region. Die Abbildung ist modifiziert dargestellt aus Reijo et al. (1995) und Kent-First et al. (1999).

### 3.3 Kasuistik der Probanden mit Deletion

#### Proband 935:

Alter: 30 Jahre zum Zeitpunkt der genetischen Beratung, geb. 1966

Kinder: keine

Anamnese: Hypospadias glandis, keine weiteren andrologischen Krankheiten oder Operationen bekannt

Klinische Diagnose: primärer Hypogonadismus, OTA Syndrom III<sup>O</sup> (1997), Azoospermie (1998), Varikozele Grad I bds.

Hormonstatus: FSH erhöht, LH, Prolaktin, Testosteron normal

Karyogramm: 46,XY

Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens: 7T/7T

Mutationen im CFTR-Gen: nicht nachweisbar

Untersuchung männlicher Angehöriger: Vater unbekannt, keine männlichen Geschwister

Spermiogrammparameter: Die Spermiogrammparameter sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Spermiogrammparameter von Januar 1997 bis Januar 1998 für Proband 935. k.A. = keine Angaben vorhanden

Parameter	Spermiogramme (Monat/Jahr)							
	Jan/97	Feb/97	März/97	April/97	Jun/97	Juli/97	Aug/97	Jan/98
Volumen Ejakulat in ml	2	1,5	1	3,5	3,5	1,5	k.A.	k.A.
pH des Ejakulates	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,1	8,1	8,1
Spermien/ml Ejakulat	3	0,5	0	1	0	0	0	0
Motilität der Spermien	5% schnell motil, 10% langsam motil 5% lokal motil 80% immotil	k. A.		k. A.				

Hodenhistologie: Befund Professor Dr. med. habil. M. Bergmann, Biopsie Ende 12/96

- 75 Tubulusanschnitte untersucht
- 65 Tubuli mit *Sertoli-Cell-Only*-Syndrom
- 2 Tubuli mit Sertoli-Zellen und Spermatogonien
- 3 Tubuli mit allen Stadien der Spermatogenese bis zu primären Spermatozyten
- 2 Tubuli mit allen Stadien der Spermatogenese bis zu elongierten Spermatisden
- 1 Tubulus mit allen Stadien der Spermatogenese bis zu runden Spermatisden

**Diagnose:**

*Sertoli-Cell-Only*-Syndrom mit fokal erhaltener spermatogenetischer Restfunktion

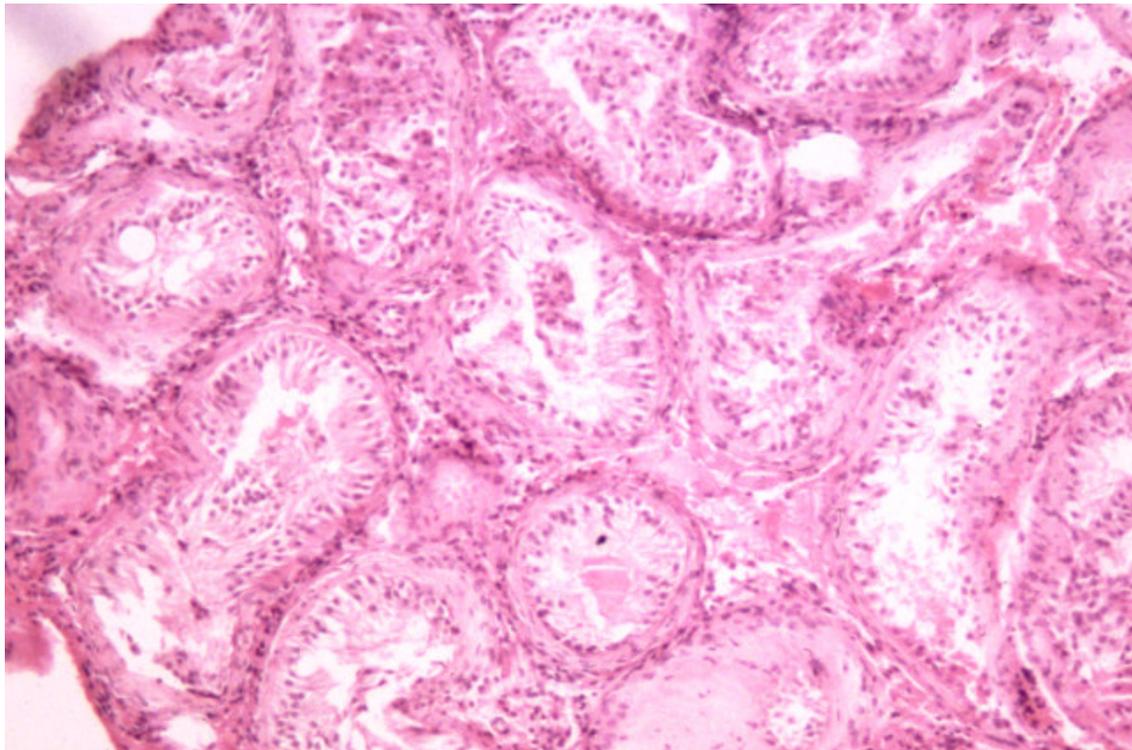


Abb. 8: Hodenhistologie des Probanden 935 (Ausschnitt aus einem Präparat, Vergrößerung 50fach, Färbung: Hämatoxylin-Eosin)

**Proband 1053:**

Alter: 43 Jahre zum Zeitpunkt der genetischen Beratung, geb. 1955  
 Kinder: keine  
 Anamnese: keine andrologischen Krankheiten oder Operationen bekannt  
 Klinische Diagnose: primärer Hypogonadismus, Kryptozoospermie, Spermatozele rechts, Varikozele beidseits, vergrößerter Nebenhoden links  
 Hormonstatus: FSH erhöht, LH, Prolaktin, Testosteron normal  
 Karyogramm: 46,XY  
 Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens: 7T/7T  
 Mutationen im CFTR-Gen: nicht nachweisbar  
 Untersuchung männlicher Angehöriger: Vater verstorben, ein Bruder kinderlos  
 Spermogrammparameter: Die Spermogrammparameter sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Spermogrammparameter von April 1997 bis April 1998 für Proband 1053. k.A = keine Angaben vorhanden

Parameter	Spermogramme (Monat/Jahr)			
	4/97	11/97	12/97	April/98
Volumen Ejakulat in ml	5	7	3	3,5
pH	8,3	8,2	8,1	8,2
Spermien/ml	1 Spermium gesichtet	0	3 Spermien gesichtet	1 Spermium gesichtet
Motilität	k.A	k.A	k.A	k.A

Hodenhistologie: Befund Prof. Dr. med. habil. H.-J. Holzhausen /Dr. med. R. Hinze, Biopsie 4/98

- Keimepithel des Hodens mit deutlichen Atrophiezeichen
- abschnittsweise ausschließlich Sertoli-Zellen nachweisbar
- an anderen Stellen Stadien der Spermatogenese, fokal auch bis zum Bild regelrechter Spermien; atrophisches Hodengewebe mit interstitieller Fibrose sowie geringer Leydig-Zell-Hyperplasie

**Diagnose:**

Hodengewebe mit Zeichen einer fokal unterschiedlich ausgeprägten tubulären Atrophie.

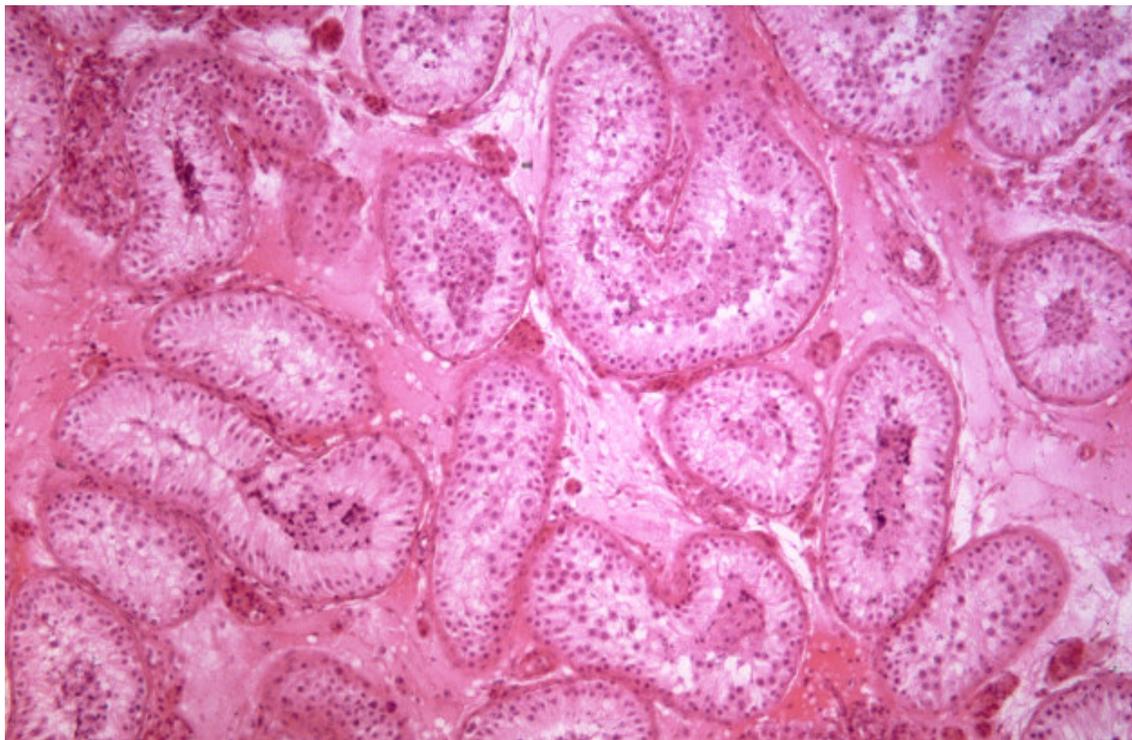


Abb. 9: Hodenhistologie des Probanden 1053 (Ausschnitt aus einem Präparat, Vergrößerung 50fach, Färbung: Hämatoxylin-Eosin)

### 3.4 Analyse der Befunde

#### 3.4.1 Spermogramme

Von 218 Probanden lagen Befunde der Spermogramme vor. Analysiert wurden die Parameter Volumen des Ejakulates, pH des Ejakulates und die Spermienmotilität. Dazu wurden die Probanden anhand der Anzahl der Spermien pro Milliliter in die Gruppen Azoospermie (keine Spermien nachweisbar), Oligozoospermie (bis 20 Millionen Spermien pro Milliliter Ejakulat) und Normozoospermie (mehr als 20 Millionen Spermien pro Milliliter Ejakulat) eingeteilt (Abb. 10). Proband 935 wurde in die Azoospermiegruppe und Proband 1053 in die Oligozoospermiegruppe eingeordnet.

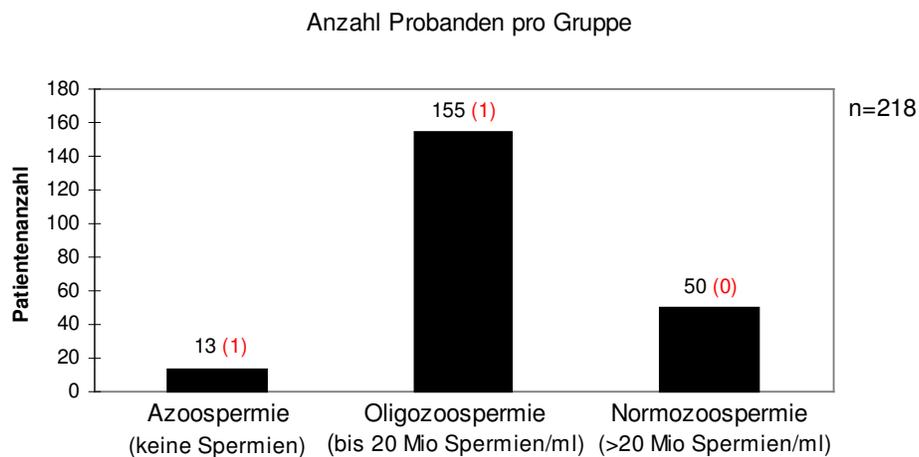


Abb. 10: Einteilung von 218 Probanden mit Spermogrammen in die drei Gruppen Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie. Proband 935 ist der Azoospermiegruppe, Proband 1053 der Oligozoospermiegruppe zugeordnet. In Klammern und rot dargestellt, sind die Anzahl der Probanden mit den in dieser Arbeit gefundenen Deletionen.

Der Vergleich der Spermogrammparameter Ejakulatvolumen und pH des Ejakulates der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie, ergab bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  keinen signifikanten Unterschied der durchschnittlichen Ejakulatmenge (Tab. 7), aber einen signifikanten Unterschied des pH's des Ejakulates zwischen Probanden mit Oligozoo- und Normozoospermie (Tab. 8). Die Analyse der durchschnittlichen Motilität der Spermien zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Probanden mit Oligozoospermie und Normozoospermie. Probanden mit Oligozoospermie haben signifikant weniger schnelle und langsam motile und signifikant mehr immotile Spermien als Probanden mit Normozoospermie (Tab. 9). Die Normwerte nach WHO-Richtlinien betragen: pH 7,2-8,0,

Ejakulatvolumen  $\geq 2\text{ml}$ , Motilität: Einteilung in die vier Kategorien schnell, langsam, lokal und immotil, dabei müssen mehr als 50 % der Spermien der Kategorie schnell und langsam motil entstammen, dabei aber mehr als 25% der Spermien der Kategorie schnell motil (WHO-Laborhandbuch, 1993).

Tab. 7: Durchschnittliches Ejakulatvolumen der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie. Die einzelnen Gruppen wurden mittels ANOVA miteinander verglichen. Besteht ein signifikanter Unterschied, ist in der Zelle, wo sich die Spalten und Zeilen der zu vergleichenden Gruppen überschneiden, ein „ja“ eingetragen. Besteht kein signifikanter Unterschied, so ist ein „nein“ eingetragen ( $p < 0,05$ ). Im Kolmogoroff-Smirnoff-Test wurde Normalverteilung der Parameter nachgewiesen. Das Ergebnis des Bartlett-Testes zur Prüfung auf Gleichheit der Varianzen der Parameter in den Gruppen als Voraussetzung für die ANOVA ist ebenfalls aufgeführt.

Probanden mit	Mittelwert des Ejakulatvolumen	Signifikanz der Mittelwertunterschiede des durchschnittlichen Ejakulatvolumens (Test mittels ANOVA)											
Azoospermie n=12	2,54ml	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Gruppe</th> <th>Azoospermie</th> <th>Oligozoospermie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oligozoospermie</td> <td>nein</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Normozoospermie</td> <td>nein</td> <td>nein</td> </tr> </tbody> </table>			Gruppe	Azoospermie	Oligozoospermie	Oligozoospermie	nein	-	Normozoospermie	nein	nein
Gruppe	Azoospermie				Oligozoospermie								
Oligozoospermie	nein				-								
Normozoospermie	nein	nein											
Oligozoospermie n=151	3,2ml												
Normozoospermie n=47	2,95ml												
Bartlett-Test auf Gleichheit der Varianzen in den Gruppen	$\chi^2 = 4,03$ f = 2 p = 0,13												

Tab. 8: Median des pH der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie. Zum Vergleich wurde der parameterfreie H-Test durchgeführt, da keine gleiche Varianz der Gruppen bestand und auch keine Normalverteilung vorlag. Der H-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an ( $H=11,3$ ,  $f=2$ ,  $p=0,003$ ). Um zu ermitteln, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht, wurde der parameterfreie Student-Newman-Keuls-Test (SNK-Test) für multiple Vergleiche durchgeführt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden der Oligozoo- und Normozoospermiegruppe ( $p < 0,05$ ).

Probanden mit	Median des pH des Ejakulates	Ergebnis der Varianzanalyse mittels Student-Newman-Keuls-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen											
Azoospermie n=12	7,93	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Gruppe</th> <th>Azoospermie</th> <th>Oligozoospermie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oligozoospermie</td> <td>nein</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Normozoospermie</td> <td>nein</td> <td>ja</td> </tr> </tbody> </table>			Gruppe	Azoospermie	Oligozoospermie	Oligozoospermie	nein	-	Normozoospermie	nein	ja
Gruppe	Azoospermie				Oligozoospermie								
Oligozoospermie	nein				-								
Normozoospermie	nein	ja											
Oligozoospermie n=151	8,18												
Normozoospermie n=47	7,90												

Tab. 9: Mittelwert der Spermienmotilität der Probanden mit Oligozoospermie und Normozoospermie im Vergleich. Die Motilität ist eingeteilt in die Gruppen „schnell-“, „langsam-“, „lokal-“ und „immotil-“. Der t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte, bei Varianzgleichheit, ergab in den Gruppen „schnell motil“, „langsam motil“ und „immotil“ signifikante Unterschiede der Mittelwerte. Für den Parameter „lokal motil“ besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Probanden mit Oligozoospermie und Probanden mit Normozoospermie. Zum Test auf Varianzgleichheit wurde der F-Test durchgeführt. Dieser ergab gleiche Varianz für die Parameter aus denen die Mittelwerte berechnet und verglichen wurden. Im Kolmogoroff-Smirnoff-Test wurde Normalverteilung der Parameter nachgewiesen.

Probanden mit	Mittelwert der Spermienmotilität in Prozent			
	schnell motil	langsam motil	lokal motil	immotil
Oligozoospermie n=138	14,1%	15,8%	16,2%	53,9%
Normozoospermie n=50	18,2%	18,6%	18,6%	44,6%
t-Test für homogene Varianzen auf Gleichheit der Mittelwerte	t=-2,03 p=0,04	t=-2,3 p=0,02	t=-1,5 p=0,13	t=3,3 p=0,001

### 3.4.2 Hormonstatus

Die Laborwerte von 102 Probanden wurden mit den jeweiligen Laborreferenzwerten des anfertigenden Labors verglichen. So konnte eine Aussage über eine Erhöhung oder Erniedrigung getroffen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Auswertung des Hormonstatus des Probandenkollektivs.

In den Spalten sind dem Probandenkollektiv (n=102) und der Unterteilung des Probandenkollektivs in Probanden mit Azo-, Oligozoo- und Normozoospermie die Anzahl Probanden zugeordnet, die für das jeweilige Hormon eine Erhöhung (↑) oder Erniedrigung (↓) aufweisen. Unter der absoluten Anzahl ist die relative Anzahl in Prozent angegeben.

Gruppe	Hormon					
	FSH		LH		Testosteron	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Azoospermie n=5	3 60%	0	0	2 40%	1 20%	1 20%
Oligozoospermie n=76	28 36%	2 2,6%	3 3,9%	6 7,8%	8 10,5%	8 10,5%
Normozoospermie n=21	0	3 14%	1 4,8%	3 14,3%	1 4,8%	2 9,6%
Gesamt n=102	31 30%	5 4,9%	4 3,9%	11 10,7%	10 9,8%	11 10,7%

### 3.4.3 Andrologische Befunde

Von 64 Probanden sind Angaben über einen Maleszensus testis in der Anamnese, über Samenwegsinfektionen und für Varikozelen vorhanden. Ein Proband kann mehrere Befunde gleichzeitig aufweisen. Tab. 11 zeigt die Befunde für die 64 Probanden insgesamt und aufgeteilt in die Gruppen Azoo-, Oligozoospermie- und Normozoospermie.

Tab. 11: Klinische Befunde Maleszensus testis, Samenwegsinfektion und Varikozele bei 64 Probanden und aufgeteilt für diese Patienten in Azoo-, Oligozoospermie- und Normozoospermieprobanden. Neben der absoluten Anzahl ist in Klammern die relative Anzahl in Prozent angegeben.

klinischer Befund	Probandengruppe			
	Azoospermie n=4	Oligozoospermie n=37	Normozoospermie n=23	Gesamtkollektiv n=64
Maleszensus testis	3 (75%)	11 (30%)	3 (13%)	17 (26%)
Samenwegs- infektion	1 (25%)	25 (68%)	15 (65%)	41 (64%)
Varikozele	1 (25%)	31 (84%)	11 (48%)	43 (67%)

Von 64 Probanden sind die Hodenvolumina ultrasonografisch bestimmt worden. Eine Analyse der Mittelwerte zeigt signifikante Unterschiede der Hodenvolumina der Probanden der Normozoospermiegruppe, zu den Probanden der Oligozoospermie- und Azoospermiegruppe. Zwischen den Probanden der Oligozoospermiegruppe und der Azoospermiegruppe besteht kein signifikanter Unterschied. Eine Aufteilung der Probanden der Oligozoospermiegruppe in Probanden mit normalem und erhöhtem FSH-Wert zeigt, dass Probanden mit FSH-Wert Erhöhung ein signifikant geringeres Hodenvolumen aufweisen, im Vergleich zu den Hodenvolumina der Probanden mit normalen FSH-Wert und den Probanden mit Normozoospermie. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Mittelwert der Hodenvolumina der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie. Die Probanden der Oligozoospermiegruppe sind zusätzlich in Probanden mit erhöhtem und normalem FSH-Wert unterteilt. Im Signifikanztest für multiple Vergleiche mittels ANOVA sind die einzelnen Gruppen gegenübergestellt. Besteht ein signifikanter Unterschied, ist in der Zelle, wo sich die Spalten und Zeilen der zu vergleichenden Gruppen überschneiden, ein „ja“ eingetragen. Besteht kein signifikanter Unterschied, so ist ein „nein“ eingetragen ( $p < 0.05$ ). Das Ergebnis des Bartlett-Testes zur Prüfung auf Gleichheit der Varianzen als Voraussetzung für die ANOVA ist ebenfalls aufgeführt. Im Kolmogoroff-Smirnoff-Test wurde Normalverteilung der Parameter nachgewiesen.

Patienten mit (n=64)	Mittelwert der Hodenvolumina	Signifikanz der Mittelwertunterschiede der Hodenvolumina (Test mittels ANOVA)																																					
Azoospermie (n=4)	22,3 ml	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Gruppe</th> <th rowspan="2">Azoospermie</th> <th colspan="3">Oligozoospermie</th> </tr> <tr> <th>gesamt</th> <th>FSH ↑</th> <th>FSH norm</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Azoospermie</td> <td>-</td> <td>nein</td> <td>nein</td> <td>ja</td> </tr> <tr> <td>Oligozoospermie</td> <td>nein</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>FSH normal</td> <td>ja</td> <td>-</td> <td>ja</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>FSH erhöht</td> <td>nein</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>ja</td> </tr> <tr> <td>Normozoospermie</td> <td>ja</td> <td>ja</td> <td>ja</td> <td>nein</td> </tr> </tbody> </table>	Gruppe	Azoospermie	Oligozoospermie			gesamt	FSH ↑	FSH norm	Azoospermie	-	nein	nein	ja	Oligozoospermie	nein	-	-	-	FSH normal	ja	-	ja	-	FSH erhöht	nein	-	-	ja	Normozoospermie	ja	ja	ja	nein				
Gruppe	Azoospermie				Oligozoospermie																																		
			gesamt	FSH ↑	FSH norm																																		
Azoospermie	-		nein	nein	ja																																		
Oligozoospermie	nein		-	-	-																																		
FSH normal	ja		-	ja	-																																		
FSH erhöht	nein		-	-	ja																																		
Normozoospermie	ja	ja	ja	nein																																			
Oligozoospermie gesamt (n=38)	28,7 ml																																						
FSH normal (n=20)	33,2 ml																																						
FSH erhöht (n=18)	23,6 ml																																						
Normozoospermie (n=23)	36,05 ml																																						
Bartlett-Test auf Gleichheit der Varianzen	$\chi^2=6,8$ f=3 p=0,08																																						

#### 3.4.4 Vergleich des Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens der Probandengruppe mit einer Kontrollgruppe

In der Probandengruppe mit bekanntem Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens (n=230) kam das 5T-Allel mit einer Häufigkeit von 3,7%, das 7T-Allel mit einer Häufigkeit von 85,2% und das 9T-Allel mit einer Häufigkeit von 11,1% vor.

Die Kontrollgruppe wies eine Häufigkeit für das 5T-Allel von 3,2%, für das 7T-Allel von 85,2% und für das 9T-Allel von 11,6% auf.

Tab. 13 zeigt die Häufigkeit der einzelnen Allele und Tab. 14 die Häufigkeit der Genotypen im Kontrollkollektiv, im Probandenkollektiv und aufgeteilt in die Gruppen Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie. Abb. 11 und Abb. 12 zeigen die Häufigkeiten noch einmal grafisch.

Es besteht sowohl für das Probandenkollektiv als Gesamtheit als auch für die Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermiegruppe ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Kontrollgruppe, bestehend aus 61 weiblichen und 34 männlichen Probanden, zeigt für die männliche und weibliche Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Häufigkeiten für das 5T-, 7T- und 9T-Allel (Tab. 20 im Anhang). Auch besteht für beide Gruppen ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Genotypen (Tab. 21 im Anhang). Die Kontrollgruppe wurde deshalb als einheitliche Gruppe betrachtet und nicht gesondert in männliche und weibliche Probanden unterteilt.

Tab. 13: Häufigkeit der 5T-, 7T- und 9T- Allele im Intron 8 des CFTR-Gens im Probandenkollektiv (n=230) und im Kontrollkollektiv. Das Probandenkollektiv ist zusätzlich in die Gruppen Azoospermie, Oligozoospermie und Normozoospermie aufgeteilt. Die Zahl in der obersten Zeile jeder Zelle gibt die absolute Häufigkeit, die Prozentzahl darunter die relative Häufigkeit an.

Gruppe	Häufigkeit der T-Allele		
	5T	7T	9T
Kontrolle n=95, 190 Allele	6 3,2%	162 85,2%	22 11,6%
Probandenkollektiv n=230, 460 Allele	17 3,7%	392 85,2%	51 11,1%
Probanden mit Spermiogrammen, n=218			
Normozoospermie n=50, 100 Allele	3 3%	84 84%	13 13%
Oligozoospermie n=155, 310 Allele	9 2,9%	271 87,4%	30 9,7%
Azoospermie n=13, 26 Allele	4 15,3%	16 61,5 %	6 23,2 %

Tab. 14: Häufigkeit der Genotypen für den 5T-, 7T- und 9T-Allel-Sequenzpolymorphismus im Probandenkollektiv und im Kontrollkollektiv. Das Probandenkollektiv ist zusätzlich in die Gruppen Azo-, Oligoo- und Normozoospermie aufgeteilt. Die Zahl in der obersten Zeile jeder Zelle gibt die absolute Häufigkeit, die Prozentzahl darunter die relative Häufigkeit des Genotyps an. In den letzten beiden Spalten ist das Ergebnis des  $\chi^2$ -Tests auf Hardy-Weinberg-Gleichverteilung aufgeführt, unter der Berücksichtigung, dass im  $\chi^2$ -Test die Häufigkeiten größer 1 und insgesamt 20% nicht kleiner als 5 sein dürfen. Dazu wurden Genotypen mit kleinen Häufigkeiten zusammengefasst. In Klammern ist der Freiheitsgrad angegeben.

Gruppe	Häufigkeit der T-Allelkombinationen						Hardy-Weinberg-Gleichverteilung	
	5T/5T	5T/7T	5T/9T	7T/7T	7T/9T	9T/9T		
Kontrolle n=95	0	6 6,3%	0	69 72,7%	18 18,9%	2 2,1%	ja	$\chi^2=0,13$ (2) p=0,94
Probanden gesamt n=230	0	12 5,2%	5 2,2%	168 73,1%	44 19,1%	1 0,4 %	ja	$\chi^2=0$ (3) p=1
Probanden mit Spermiogrammen n=218								
Normozoospermie n=50	0	2 4%	1 2%	34 68%	13 26%	0	ja	$\chi^2=0,02$ (1) p=0,89
Oligozoospermie n=155	0	8 5,2%	1 0,6%	118 76,2%	27 17,4%	1 0,6%	ja	$\chi^2=0,04$ (2) p=0,98
Azoospermie n=13	0	1 7,7%	3 23,1%	6 46,1%	3 23,1%	0	ja	$\chi^2=0,34$ (1) p=0,56

## T-Allelverteilung

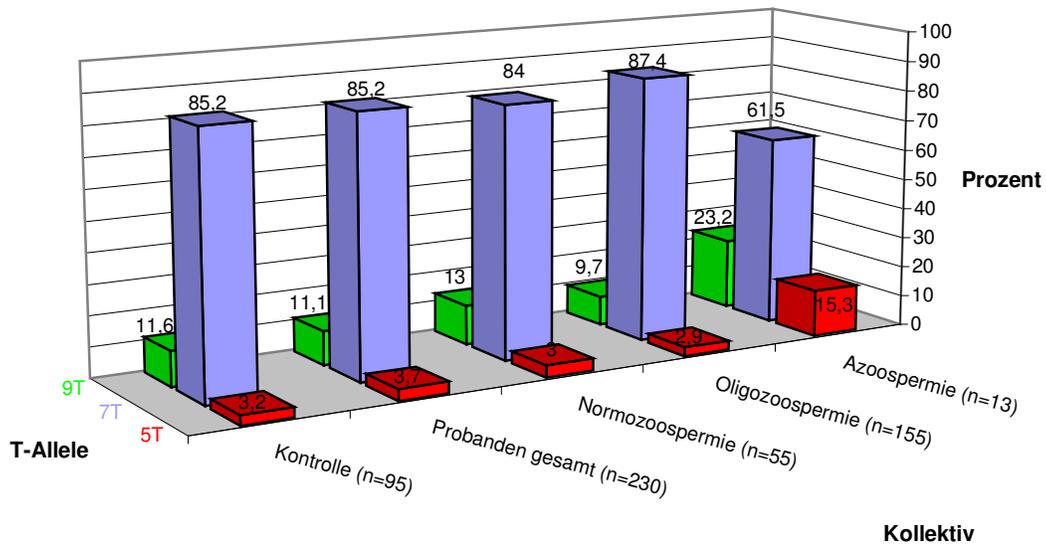


Abb. 11: T-Allelverteilung in Prozent in der Kontrollgruppe (n=95), in der Probandengruppe (n=230) und in den Gruppen der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie.

## Genotypverteilung

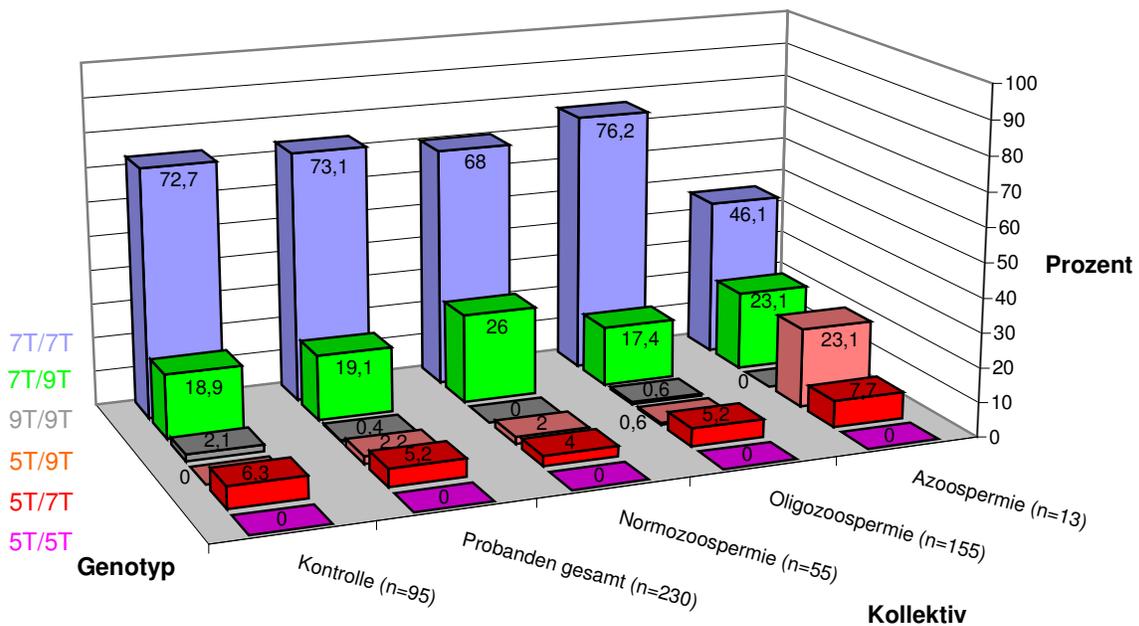


Abb. 12: Genotypverteilung der 5T-, 7T- und 9T-Allele in Prozent in der Kontrollgruppe (n=95), in der Probandengruppe (n=230) und in den Gruppen der Probanden mit Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermie.

Der Vergleich der Häufigkeiten der 5T-, 7T- und 9T-Allele zwischen dem Probandenkollektiv als Gesamtheit und der Kontrollgruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede. Jedoch kommt das 5T-Allel in der Azoospermiegruppe gegenüber dem Kontrollkollektiv und der Oligozoospermiegruppe signifikant häufiger, und das 7T-Allel signifikant weniger häufig vor. Für das 9T-Allel besteht kein signifikanter Häufigkeitsunterschied. Auch findet sich eine signifikante Häufung der Genotypen mit 5T-Allel in der Azoospermiegruppe, gegenüber dem Kontrollkollektiv. Die Testung auf signifikante Häufigkeitsunterschiede erfolgte mittels des  $\chi^2$ -Vierfelder-Tests. Die Ergebnisse der statistischen Berechnung sind aufgrund des erheblichen Umfangs im Anhang aufgeführt (Tab. 22, Tab. 23 und Tab. 24 im Anhang).

### 3.4.5 Mutationen im CFTR-Gen und Chromosomenmutationen

Es fanden sich im Rahmen der Untersuchung auf die häufigsten CFTR-Mutationen 6 Probanden mit einer  $\Delta$ F508 Mutation, 2 Probanden mit einer R553X-Mutation und ein Proband mit einer R117H Mutation (Tab. 15).

Die Chromosomenanalyse von 218 Probanden mit Spermogrammen ergab 6 Chromosomenmutationen (2,7%): ein Klinefelter-Syndrom mit 47,XXY, eine Translokation 46,XY,t(3;10)(q29;p12.2), eine Translokation 46,Y,t(X;4)(q26;q21), eine Robertsonsche Translokation 46,XY,t(21;22)(q10;q10), eine Inversion 46,XY,inv(10)(p11.1;q11.2) und eine reziproke Translokation 46,XY,t(2;17)(p11.2;q12).

Tab. 15: Probanden mit Mutationen im CFTR-Gen oder Chromosomenmutationen in der Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermiegruppe. In Klammern ist die Anzahl angegeben.

	Azoospermie n=13	Oligozoospermie n=155	Normozoospermie n=50
Chromosomenmutationen und Mutationen im CFTR-Gen	47,XXY (1)	$\Delta$ F508 (2) 46,XY,t(3;10)(q29;p12.2) (1)	$\Delta$ F508 (4) R553X (2) R117H (1) 46,Y,t(X;4)(q26;q21) (1) 46,XY,t(21;22)(q10;q10) (1) 46,XY,t(2;17)(p11.2;q12) (1) 46,XY,inv(10)(p11.1;q11.2) (1)
Anteil Chromosomenmutationen in Prozent	7,7%	0,65%	8%
Anteil CFTR-Mutationen in Prozent	0	1,3%	14%

Alle Probanden mit der CFTR-Mutation  $\Delta$ F508 haben den Genotyp 7T/9T. Die Probanden mit den CFTR-Mutationen R553X und R117H haben den Genotyp 7T/7T.

### **3.4.6 Hodenhistologien von Probanden ohne Deletion in der DAZ-Region**

Es standen von drei Probanden ohne Deletionen in der DAZ-Region Befunde von Hodenhistologien zur Verfügung. Hier ergibt sich die Möglichkeit, die histologischen Befunde der Probanden ohne DAZ-Deletion mit den histologischen Befunden der Probanden mit DAZ-Deletion zu vergleichen, um Hinweise auf eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation zu finden. Im folgenden sind die histologischen Befunde und Diagnosen der Probanden ohne DAZ-Deletion sowie vorhandene klinische Befunde aufgeführt.

Proband 1095:

Der Proband 1095 hat eine ausgeprägte Oligozoospermie mit Werten zwischen 0,1 und 1 Mill. Spermien/ml. Das FSH ist erhöht. Prolaktin, Testosteron, LH sind normal. Es besteht ein normaler Karyotyp und ein 7T/7T Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens. Die Anamnese und die klinische Untersuchung sind unauffällig.



Abb. 13: Hodenhistologie des Probanden 1095 (Vergrößerung 50fach, Färbung: Hämatoxylin-Eosin).

Tab. 16: Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1095.

Histologischer Befund	5 Diagnose
<p>Linker Hoden: Samenkanälchen ohne Nachweis eines Keimepithels. Lediglich Sertoli-Zellen. Vereinzelt Samenkanälchen mit Atrophie und Hyalinose der Lamina propria. Komplexe von Leydig-Zellen gut erkennbar.</p> <p>Rechter Hoden: Hier finden sich neben Hodenkanälchen, die ebenso lediglich Sertoli-Zellen aufweisen, auch entsprechende Kanälchen mit einem noch samenbildenden Epithel. Dieses ist aber ausgesprochen defizitär, weil es quantitativ reduziert und auch vielfach auf der Stufe der Spermatozyten erster Ordnung blockiert ist. Bisweilen zeigen sich aber auch Ausreifungen bis hin zu Spermatozoen. Das keimbildende Epithel ist aber auch dort, wo es noch zu Spermatozoen ausreift, quantitativ massiv reduziert.</p>	<p>Linker Hoden: SCO-Syndrom, Hodenparenchymstörung IV. Grades</p> <p>Rechter Hoden: Reduktion des keimbildenden Epithels, Hodenparenchymstörung I. Grades, Anteile mit Hodenparenchymstörung IV. Grades</p>

Der histologische Befund und die Diagnose wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. habil. W.C. Marsch (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Proband 1074:

Der Proband 1074 hat eine Azoospermie. Das FSH ist erhöht, das Testosteron ist erniedrigt. Prolaktin und LH sind normal. Es besteht ein normaler Karyotyp und ein 7T/9T Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens. Es besteht Status nach Maleszensus testis mit Orchidopexie im 12. Lebensjahr. Der Proband leidet an einer Varikozele 2. Grades links.

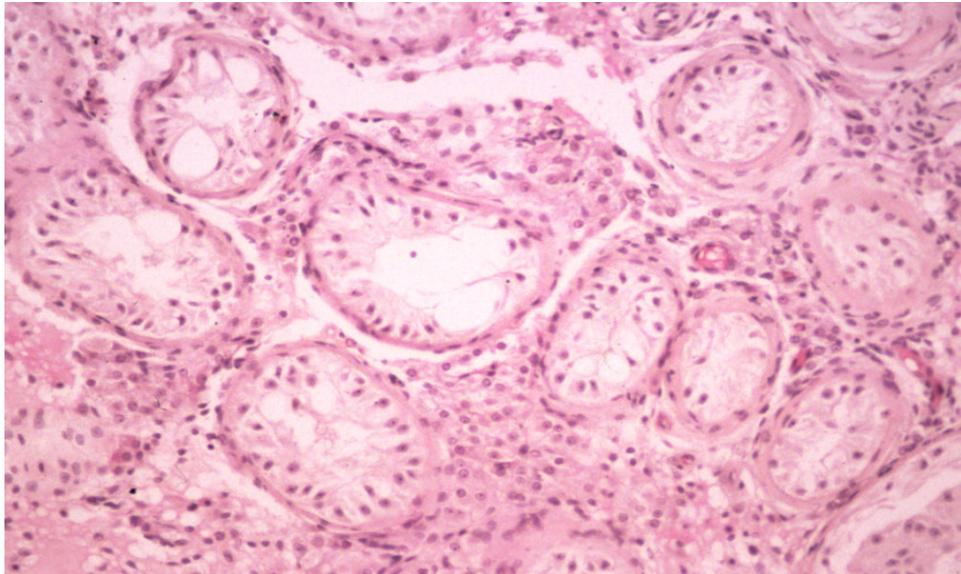


Abb. 14: Hodenhistologie des Probanden 1074 (Vergrößerung 50fach, Färbung: Hämatoxylin-Eosin).

Tab. 17: Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1074.

Histologischer Befund	Diagnose
Hoden: 64 Tubulusanschnitte untersucht. Davon enthielten alle Tubuli ausschließlich Sertoli-Zellen. Die Lamina propria war generell verdickt. Hoden links: Untersucht wurden insgesamt 44 Tubulusanschnitte. Davon enthielten 2 Tubuli alle Stadien der Spermatogenese einschließlich Sertoli-Zellen. Die Lamina propria war generell verdickt. Die Morphologie der somatischen Sertoli-Zellen und der Leydig-Zellen war unauffällig.	SCO-Syndrom rechts, SCO-Syndrom mit fokaler Restfunktion links

Der histologische Befund und die Diagnose wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. habil. M. Bergmann (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Proband 1343:

Der Proband 1343 weist über einen Zeitraum von 2 Jahren einen fortschreitenden Verlust an Spermienzellen bis hin zur Azoospermie auf (von 18 Mio/ml). Laborwerte sind nicht vorhanden. Es bestehen ein normaler Karyotyp und ein 7T/9T Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens. Die Anamnese und klinische Untersuchung sind nicht bekannt.

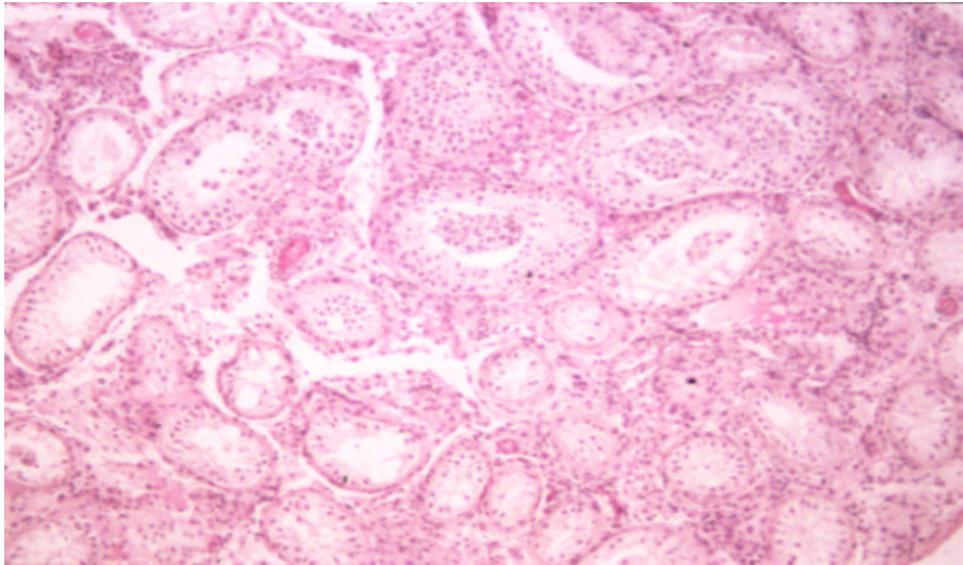


Abb. 15: Hodenhistologie des Probanden 1343 (Vergrößerung 50fach, Färbung: Hämatoxylin-Eosin).

Tab. 18: Histologischer Befund und Diagnose für die Hodenhistologie des Probanden 1343.

<b>Histologischer Befund</b>	<b>Diagnose</b>
ge Atrophie des germinativen Epithels. Die Hodenkanälchen werden ausgekleidet durch Sertoli-Zellen. Es ist keine Restspermiogenese ersichtlich. Keine atypischen Keimzellen. Die Basalmembranen der Tubuli seminiferi sind nicht verbreitert. Im Interstitium sieht man einen physiologischen Leydig-Zellbesatz. Keine relevante Entzündung. Kein Anhalt für Malignität.	Tubuli seminiferi mit vollständiger Atrophie des germinativen Epithels.

Der histologische Befund und die Diagnose wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. habil. W. F. Rath (Direktor des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Deletionshäufigkeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit im Jahr 1997 war nicht bekannt, ob in der Gruppe der Männer, für die eine Indikation zur ICSI gestellt wurde, DAZ-Deletionen in der AZFc-Region des Y-Chromosoms auftreten und in welcher Häufigkeit. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden Analysen auf Mikrodeletionen des Y-Chromosoms an Patientenkollektiven mit Azoospermie und schwerer Oligozoospermie durchgeführt (Vogt et al., 1996; Reijo et al., 1995).

Reijo et al. (1995) untersuchten 89 Patienten mit Azoospermie an 83 Loci des Y-Chromosoms (Yq und Yp). Sie fanden 12 Deletionen (13%) auf Yq. Neun Patienten wiesen eine AZFc-Deletion auf, zwei Patienten einen kompletten Verlust des distalen Teils des langen Arms des Y-Chromosoms inklusive der AZFb-Region und ein Patient einen kompletten Verlust des distalen Teils des langen Arms des Y-Chromosoms inklusive der AZFa-Region. In einer weiteren Studie 1996 fanden Reijo et al. unter 35 Patienten mit schwerer Oligozoospermie zwei Patienten mit Deletionen der AZFc-Region. Sie konnten damit zeigen, dass AZFc-Deletionen nicht nur bei Azoospermiepatienten vorhanden sein können, sondern auch bei Patienten mit Oligozoospermie, was für die assistierte Befruchtung von Bedeutung ist.

Vogt et al. (1996) untersuchten 370 Patienten mit Azoospermie und schwerer Oligozoospermie an 76 Loci auf dem langen Arm des Y-Chromosoms. Sie fanden 13 Patienten mit Deletionen (3,5%), neun Azoospermiepatienten und fünf Oligozoospermiepatienten. Drei dieser Patienten wiesen eine identische Deletion proximal auf Yq, drei Patienten eine identische Deletion medial auf Yq und sieben Patienten eine identische Deletion distal des euchromatischen Bereichs auf Yq auf. Vogt et al. (1996) bezeichneten diese Regionen dann als die AZFa-, AZFb- und AZFc-Regionen.

Aufgrund des damaligen Wissenstandes, dass ein Teil der männlichen Fertilitätsstörungen auf Y-chromosomale Mikrodeletionen zurückzuführen sind, sollte mit dieser Arbeit eruiert werden, wie häufig DAZ-Deletionen in einem unselektierten männlichen Patientenkollektiv sind, bei denen eine Indikation für eine ICSI gestellt wurde. Die Kenntnis von DAZ-Deletionen auf dem Y-Chromosom als Ursache der männlichen Infertilität hat hinsichtlich der genetischen Beratung des Paares und der Weitergabe dieser Deletionen auf männliche Nachkommen eine große Bedeutung.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit 270 Probanden mit Indikation zur ICSI an 5 Loci der DAZ-Region untersucht.

Es konnten 2 DAZ-Deletionen, bei einem Proband mit Azoospermie (Proband 935) und einem Probanden mit Kryptozoospermie (Proband 1053), gefunden werden, deren nähere Charakterisierung eine identische komplette AZFc-Deletion ergab (Abb. 7).

Da unter den ICSI-Patienten nur ein geringer Anteil der Männer eine DAZ-Deletion aufwies (0,75%), war zu überlegen, ob in diesem Kollektiv Untergruppen mit einem höheren Anteil an Deletionen identifiziert werden können. Eine Einteilung des Probandenkollektivs nach dem quantitativen Parameter Spermienzahl/ml Ejakulat (bei 218 Probanden war dies möglich) in die Gruppen Azoospermie, Oligozoospermie und Normozoospermie zeigt, dass die Häufigkeit von DAZ-Deletionen mit der Schwere der Spermatogenesestörung zunimmt (Abb. 16). In der Azoospermiegruppe und Oligozoospermiegruppe weisen je ein Patient eine DAZ-Deletion auf. Das ergibt eine Deletionshäufigkeit von 7,7% in der Azoospermiegruppe und von 0,6% in der Oligozoospermiegruppe. Eine Unterteilung der Oligozoospermiegruppe in Patienten mit Kryptozoospermie (bis 1 Million Spermien pro Milliliter Ejakulat), schwerer Oligozoospermie (1-5 Millionen Spermien pro Milliliter Ejakulat) und milder Oligozoospermie (5-20 Millionen Spermien pro Milliliter Ejakulat) wie in Abb. 16 dargestellt, ergibt in der Kryptozoospermiegruppe eine Deletionshäufigkeit von 5%.

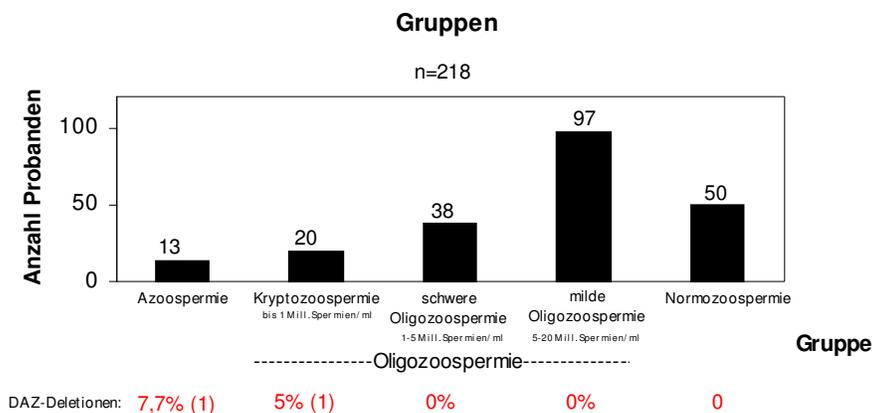


Abb. 16: Zunahme der Deletionshäufigkeit mit zunehmender Spermatogenesestörung. Einteilung von 218 Probanden nach dem Parameter Spermien pro Milliliter Ejakulat in die Gruppen Azoospermie, Oligozoospermie (unterteilt in Kryptozoospermie, schwere und milde Oligozoospermie) und Normozoospermie. Unter der Grafik sind die Anzahl gefundener Deletionen in Prozent pro Gruppe aufgeführt. In Klammern nach der Prozentzahl ist die absolute Anzahl der Deletionen pro Gruppe angegeben.

Zwischenzeitlich sind drei weitere Studien zur Häufigkeit von Mikrodeletionen auf dem Y-Chromosom an ICSI-Patientenkollektiven durchgeführt worden (Van Landuyt et al., 2000; Krausz et al., 1999; Kremer et al., 1997). Kremer et al. (1997) fanden an 164 ICSI-Patienten

(19 Azoospermiepatienten, 111 Oligozoospermiepatienten, 34 Normozoospermiepatienten), die sie an je zwei Loci in der AZFa-, AZFb- und AZFc-Region untersuchten, sieben (4,3%) Patienten mit Deletionen der Loci der AZFc-Region. Alle sieben Patienten wiesen eine Oligozoospermie mit einer durchschnittlichen Spermienkonzentration von 0,5 Mill/ml Ejakulat auf (Kryptozoospermie).

Krausz et al. (1999) fanden bei 134 ICSI-Patienten (22 Azoospermiepatienten, 108 Oligozoospermiepatienten, 4 Normozoospermiepatienten), die sie an 6 Loci (ein Locus in der AZFa-, zwei Loci in der AZFb- und drei Loci in der AZFc-Region) untersuchten, drei (2,2%) Patienten mit Deletionen. Ein Patient wies eine Deletion der Loci der AZFc-Region (Kryptozoospermie), ein Patient eine Deletion der Loci der AZFb- und AZFc-Region (Kryptozoospermie) und ein Patient eine Deletion der AZFa- und AZFc-Region, sowie teilweiser Deletion der AZFb-Region (Azoospermie) auf.

Van Landuyt et al. (2000) untersuchten 402 unselektierte ICSI-Patienten an je einem Locus der drei AZF-Regionen. Sie fanden acht (2%) Patienten mit Deletionen. Die Gruppe der unselektierten Azoospermiepatienten (n=197) wies vier (2%) AZFc-Deletionen auf, die Gruppe der Kryptozoospermiepatienten (n=59) ebenfalls vier (6,7%). Sieben dieser acht Patienten haben die gleiche Lokalisation der Deletion wie die Probanden 935 und 1053 in der vorliegenden Arbeit. Ein Patient hat eine Deletion der proximalen AZFc-Region und der kompletten AZFb-Region.

Eine der größten Studien über Deletionen der drei AZF-Regionen auf dem Y-Chromosom wurden von Maurer et al. (2001) durchgeführt. Diese Forschergruppe untersuchte 1470 infertile Männer und fand insgesamt 19 Probanden (1,3%) mit Deletionen (15 AZFc, 3 AZFb, 1 AZFa, 1 AZFb und AZFc). Das Probandenkollektiv setzte sich aus drei Gruppen zusammen. Gruppe 1: 228 retrospektiv und prospektiv selektierte Probanden mit schwerer Spermatogenesestörung, Gruppe 2: 378 unselektierte Patienten und Gruppe 3: 864 prospektiv selektierte Patienten und ICSI-Kandidaten. Die Häufigkeit der Deletionen in den einzelnen Gruppen waren acht (3,5%) Deletionen in Gruppe eins, eine (0,3%) Deletion in Gruppe zwei und zehn (1,2%) Deletionen in Gruppe drei.

Die Studien von Van Landuyt et al. (2000), Krausz et al. (1999), Kremer et al. (1997) sowie der vorliegenden Arbeit fanden insgesamt 21 (2%) Deletionen der AZFc-Region bei 990 unselektierten ICSI-Patienten. Alle Patienten mit Deletionen der AZFc-Region haben eine Azoospermie bzw. Kryptozoospermie. Die vier Studien zusammengefasst, ist die Häufigkeit von Deletionen der AZFc-Region bei ICSI-Patienten mit Azoospermie mit bis zu 7,7% (eigene Ergebnisse) und bei ICSI-Patienten mit Kryptozoospermie mit bis zu 6,7% (Van

Landuyt et al., 2000) anzugeben.

## 4.2 Lokalisierung von Deletionen auf Yq

Die beiden Probanden mit DAZ-Deletion in dieser Arbeit weisen identische Deletionen auf. Auch in anderen Arbeiten wurden Deletionen mit der gleichen Lokalisation festgestellt (Van Landuyt et al., 2000; Reijo et al., 1995). Die Ursache der Mikrodeletionen beruht wahrscheinlich auf ungleichem *crossing-over* während der Meiose zwischen homologen Arealen des X- und Y-Chromosoms oder zwischen den beiden Schwesterchromatiden des Y-Chromosoms, aufgrund repetitiver Sequenzen (McElreavey und Krausz, 1999). Dieser Mechanismus führt dann zu Deletionen oder Duplikationen auf den Chromatiden (Ji et al., 2000). Abb. 23 zeigt eine Bruchpunktanalyse der Deletionen bei 93 Patienten aus 5 Studien (Van Landuyt et al., 2000; Kent-First et al., 1999; Kim et al., 1999; Reijo et al., 1996; Vollrath et al., 1992) sowie der Deletionen der zwei Probanden aus der vorliegenden Arbeit. Dargestellt ist die physikalische Anordnung von 114 Loci auf dem langen Arm des Y-Chromosoms. Neben den 114 Loci ist die Anzahl von Bruchpunkten aufgeführt, die zwischen je 2 Loci lokalisiert sind. Diese Anzahl ist daneben proportional als schwarzer Balken dargestellt. Eine Unterscheidung, ob es sich um einen proximalen oder distalen Bruchpunkt handelt, kann daraus nicht entnommen werden. Insgesamt sind 202 Bruchpunkte von 95 Patienten mit Deletionen in der Grafik aufgeführt. Sechs Patienten hatten zwei Deletionen auf dem Y-Chromosom.

Die Grafik (Abb. 23) zeigt ein Clustering der 202 Bruchpunkte auf Yq. Es finden sich nur an 52 (46%) der 113 möglichen Lokalisationen überhaupt Bruchpunkte. 34 (65,4%) dieser Lokalisationen liegen in den AZF-Regionen, 3 (5,8%) in der AZFa-Region, 8 (15,4%) in der AZFb-Region und 23 (44,2%) in der AZFc-Region, nur 18 (34,6%) außerhalb. Selbst in der AZFc-Region findet sich ein signifikantes Clustering. Proximal in der AZFc-Region finden sich zwischen den Loci SY 272 und SY 232 47 (50,5%) aller AZFc-Bruchpunkte (93), distal zwischen den Loci SY 202 und SY 159 27 (29,6%). Eine weitere Häufung findet sich im Übergangsbereich von der euchromatischen Region zur heterochromatischen Region außerhalb der AZF-Regionen, zwischen den Loci SY 159 und SY 160.

Das Clustering zeigt, dass bestimmte Bereiche bevorzugt zu Bruchpunkten neigen. Möglicherweise liegen in diesen Regionen vermehrt spezifische, z.B. repetitive Sequenzen vor, so dass strukturell bedingt, diese Regionen für ungleiches *crossing-over* während der Meiose anfälliger sind.

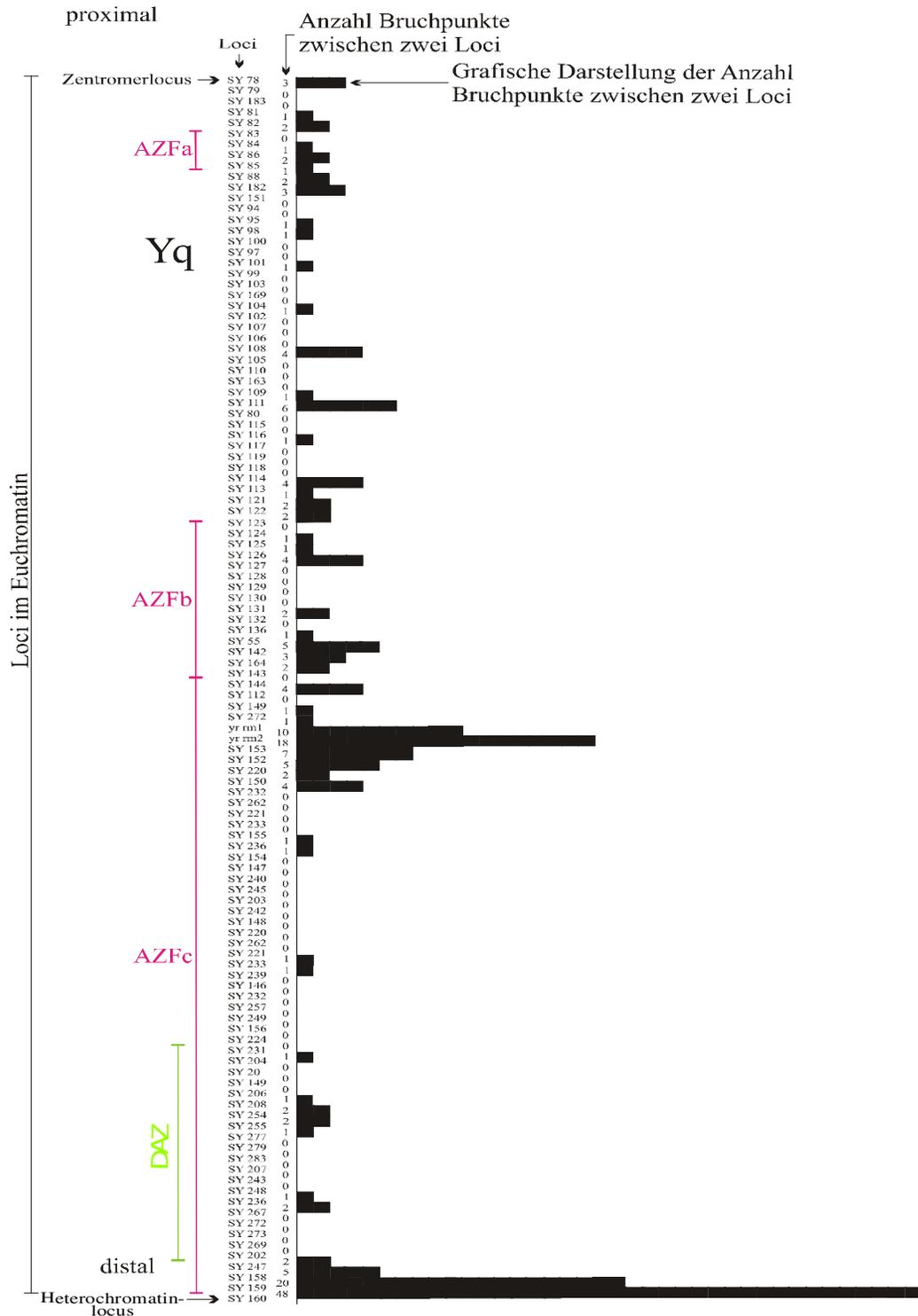


Abb. 17: Bruchpunktanalyse von 95 Infertilitätspatienten mit Deletionen auf dem langen Arm des Y-Chromosoms. Es sind 114 Loci von proximal nach distal in ihrer physikalischen Anordnung dargestellt. Zwischen je 2 Loci ist die Anzahl der Bruchpunkte an dieser Lokalisation aufgeführt und grafisch abgebildet (schwarze Balken). War eine Deletion mit weniger Loci als dargestellt beschrieben, wurde der Bruchpunkt am ersten deletierten Locus dargestellt. Die Bruchpunkte der Deletionen und die Anordnung der Loci wurden aus den Arbeiten von Van Landuyt et al. (2000), Kent-First et al. (1999), Kim et al. (1999), Reijo et al. (1996) und Vollrath et al. (1992) sowie vorliegender Arbeit entnommen.

### 4.3 Kasuistik von Proband 935 und Proband 1053

Beide Probanden mit DAZ-Deletion, Proband 935 und Proband 1053, haben eine schwere Spermatogenesestörung.

Proband 935 zeigt über einen Zeitraum von einem Jahr einen zunehmenden Verlust an Samenzellen bis hin zur Azoospermie. Auch in anderen Studien werden solche Verläufe beschrieben (Calogero et al., 2001; Girardi et al., 1997). Proband 1053 zeigt über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr unverändert eine Kryptozoospermie. Über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr zeigen beide Patienten hinsichtlich der Spermienmenge im Ejakulat einen unterschiedlichen Verlauf, obwohl beide in vorliegender Arbeit die gleiche Deletion aufweisen. Auch in der Studie von Van Landuyt et al. (2000) weisen die 7 Probanden mit übereinstimmender Deletionen wie Proband 935 und Proband 1053, entweder eine Azoo- oder Kryptozoospermie auf.

Eine eindeutige Ausprägung der Spermatogenesestörung kann auch von anderen Autoren einer DAZ-Deletion nicht zugeordnet werden. Es sind Patienten mit Azoospermie und unterschiedlich stark ausgeprägter Oligozoospermie beschrieben (McElreavey und Krausz, 1999). Es sind auch seltene Fälle bekannt, in denen Väter mit DAZ-Deletion Kinder zeugten. Die Söhne trugen alle die gleiche Deletion wie deren Väter, waren aber infertil (Saut et al., 2000; Chang et al., 1999). Saut et al. (2000) postulieren hier seltene X-chromosomale oder autosomale Allele, die eine DAZ-Deletion kompensieren können. Bei beiden Probanden in vorliegender Arbeit war eine DNA-Analyse männlicher Angehöriger nicht möglich. Proband 1053 hat anamnestisch einen kinderlosen Bruder.

Die klinische Anamnese ist bei Proband 935 ungewöhnlich. Er hat eine isolierte Hypospadias glandis. Weitere Fehlbildungen sind nicht bekannt. Eine Assoziation einer Hypospadias glandis oder andere Fehlbildungen mit einer DAZ-Deletion sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Tateno et al. (2000) untersuchten 44 Patienten mit isolierter Hypospadias glandis an 33 Loci auf Yq, einschließlich der DAZ-Region. Sie fanden keine Deletionen der untersuchten Loci.

Proband 935 und Proband 1053 weisen Varikozelen auf. Nach einer Metastudie von Redmon et al. (2002) ist ein Leiden an Varikozelen keine Ursache für Infertilität und ein ebenso häufiger Befund bei fertilen Männern.

Beide Probanden haben einen erhöhten pH (>8) des Ejakulates, was für einen entzündlichen Prozess der Prostata, des Nebenhodens oder der Bläschendrüsen spricht (Braun-Falco et al., 1996).

Proband 1053 weist in der andrologischen Untersuchung eine Vergrößerung des linken Nebenhodens auf, was zu einem entzündlichen Prozess und einer pH-Erhöpfung über 8 passt. Für Proband 935 finden sich keine weiteren Hinweise auf einen entzündlichen Prozess.

Beide Probanden haben keine Krankheiten in ihrer Anamnese, die eine Infertilität bedingen könnten. Auch in der Studie von Kremer et al. (1997) weisen Patienten mit Deletionen in der AZFc-Region eine blande Anamnese auf, Patienten ohne Deletionen dagegen gehäuft schwerwiegende Erkrankungen (z.B. St. n. Radiatio/Chemotherapie, entzündliche Erkrankungen, Kryptorchismus). Es sind aber auch in der Literatur Patienten mit Kryptorchismus, obstruktiver Azoospermie und hormonellen Störungen beschrieben, die eine AZFc-Deletion aufweisen (Krausz et al., 1999).

Beide Probanden haben eine Erhöhung des FSH-Wertes. Das FSH stimuliert die Sertoli-Zellen mit einem negativen Feedbackmechanismus durch Inhibin, welches von den Sertoli-Zellen synthetisiert wird (Massicotte et al., 1984). Die Höhe des FSH-Wertes korreliert negativ mit der Spermatogenese und dem Hodenvolumen (Bujan et al., 1989). In der Studie von Kremer et al. (1997) weisen die Patienten mit AZFc-Deletionen einen normalen FSH-Wert im Gegensatz zu dieser Studie auf. In der Studie von Van Landuyt et al. (2000) haben mindestens 2 Patienten mit DAZ-Deletion eine FSH-Erhöpfung. Andere Studien finden bei Infertilitätspatienten mit AZFc-Deletionen ebenfalls FSH-Erhöpfungen, vereinzelt aber auch normale FSH-Werte (Krausz et al., 2001; Kim et al., 1999). Warum eine schwere Spermatogenesestörung nicht bei allen Patienten zu einer FSH-Erhöpfung führt, ist nicht klar. Die Hormone Testosteron und LH sind bei beiden Probanden normal, ebenso das Karyogramm und der Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens (7T/7T). Zusammen mit der blanden Anamnese und dem Befund der DAZ-Deletion liegt bei beiden Patienten eine Spermatogenesestörung mit gegenregulatorischer Erhöhung des FSH-Wertes vor, was auch als primärer Hypogonadismus beschrieben wird (Braun-Falco et al., 1996).

#### 4.4 Spermioogramme, hormonelle und andrologische Befunde

In dieser Arbeit finden sich keine signifikanten Unterschiede im Ejakulatvolumen zwischen Probanden mit Azoospermie, Oligozoospermie und Normozoospermie (Tab. 7). Kremer et al. (1997) fanden in ihrer Arbeit einen signifikanten Unterschied des Ejakulatvolumens zwischen Patienten mit Azoo- und Oligozoospermie zu Patienten mit Normozoospermie. Das Ejakulat besteht nur bis zu 10% aus Nebenhodensekret, das restliche Volumen wird aus Sekreten der Prostata und Sekreten der Samenbläschen beigetragen, so dass die Spermatogenese nur einen kleinen Einfluss auf das Ejakulatvolumen haben kann.

Diese Arbeit zeigt in allen drei Gruppen einen pH des Ejakulates im oberen Normbereich (Tab. 8). In der Oligozoospermiegruppe sogar einen erhöhten pH, was für entzündliche Prozesse spricht. Vergleichbare Untersuchungen in der Literatur finden keine Erhöhung des pH des Ejakulats bei ICSI-Männern und auch keine signifikanten Unterschiede des pH zwischen Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermiepatienten (Kremer et al., 1997).

Oligozoospermie kann ein Symptom von Infektionen sein. Es ist möglich, dass sich vermehrt Probanden mit Infektionen in dieser Gruppe befinden. Tab. 11 zeigt, dass der Befund Samenwegsinfektion in der Oligozoospermiegruppe mit 68% (Normozoospermiegruppe 65%, Azoospermiegruppe 25%) tatsächlich am häufigsten vorkommt.

Die Motilitätsanalyse (Tab. 9) der Spermien zeigt zwischen Probanden mit Oligozoospermie und Normozoospermie signifikante Unterschiede. Die Motilität der Spermien der Oligozoospermieprobanden ist signifikant niedriger als in der Normozoospermiegruppe. Es finden sich auch vermehrt immotile Spermien in der Oligozoospermiegruppe. Gleiche Ergebnisse finden sich auch in der Arbeit von Kremer et al. (1997). Auffällig ist die gleichmäßige Verteilung der motilen Spermien auf die Gruppen schnell, langsam und lokal motil. Dies kann ein statistischer Effekt oder durch die Untersuchungsmethode bedingt sein, da die Beurteilung der Motilität subjektiv erfolgt, und auch in der Standardisierung der Motilitätsbeurteilung von Spermien ein Problem darstellt.

Die Tab. 10 zeigt, dass es unter den ICSI-Patienten auch Männer mit hormonellen Störungen gibt. So finden sich 5 Probanden mit einer FSH-Erniedrigung, was für einen hypophysären Hypogonadismus spricht und auch Probanden mit pathologischen Testosteron- und LH-Werten, im Sinne von hypophysären Störungen bzw. einer Insuffizienz der Leydigzellen.

Aus der Auswertung der andrologischen Befunde (Tab. 11) von 64 Patienten ist zu sehen, dass mit zunehmender Spermatogenesestörung der anamnestische Befund Maleszensus testis häufiger vorliegt. Die Befunde Samenwegsinfektion und Varikozele finden sich vor allem bei Probanden mit Oligozoospermie und Normozoospermie. Das kann bedeuten, dass das Vorliegen einer Samenwegsinfektion ein Hauptgrund für die Infertilität der Oligozoospermieprobanden und Normozoospermieprobanden ist und dass der Befund des Maleszensus testis überwiegend zu schweren Spermatogenesestörungen führt.

Tab. 12 zeigt signifikante Unterschiede der Hodenvolumina zwischen den Azoo-, Oligozoo- und Normozoospermieprobanden. Dieses Ergebnis passt zu der Erkenntnis, dass das Hodenvolumen positiv mit der Spermatogenese korreliert (Bujan et al., 1989).

#### 4.5 Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens

Der T-Allelpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens beeinflusst die Effizienz der Exonererkennung für Exon 9. Die 5T-Allelfolge führt zu einer Exonererkennung für Exon 9 im Splicing-Prozess von nur 10-40%, bei 7T und 9T-Allelfolgen dagegen zu 70-100% (Chu et al., 1993; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Heterozygote 5T-Allelträger sind symptomfrei. Liegt auf dem zweiten Allel jedoch eine Mutation vor, führt dies zu einer milden Form von cystischer Fibrose.

Eine Sonderform der cystischen Fibrose ist die isolierte congenitale Aplasie des *vas deferens* (CBAVD). Hier kommt das 5T-Allel mit 12-25% (Stuhrmann und Dörk, 2000, Zielenski et al., 1995) im Vergleich zur Normalbevölkerung mit ca. 5% (Chu et al., 1993) überproportional häufig vor.

Die Häufigkeiten für die T-Allelpolymorphismen liegen im Probandenkollektiv in dieser Arbeit bei 3,7% für das 5T-Allel, 85,2% für das 7T-Allel und 11,1% für das 9T-Allel. Es gibt keinen Unterschied zu den Häufigkeiten des T-Allelpolymorphismus in der Kontrollgruppe, mit 3,2% für das 5T-Allel, 85,2% für das 7T-Allel und 11,6% für das 9T-Allel (Tab. 13). In einer Studie von Jakubiczka et al. (1999) an 197 männlichen ICSI-Patienten aus Mitteldeutschland, welche die Häufigkeiten von CFTR-Mutationen, inklusive des T-Allelpolymorphismus untersuchte, ergab die Auswertung der Daten Häufigkeiten von 3,3% für das 5T-Allel, 84,7% für das 7T-Allel und 11,9% für das 9T-Allel. Das ist nicht signifikant verschieden von den Häufigkeiten dieser Arbeit.

Eine Unterteilung des Probandenkollektivs in Gruppen mit den Phänotypen Azoospermie, Oligozoospermie und Normozoospermie zeigt jedoch eine signifikant erhöhte Häufigkeit

(15,3%) für das 5T-Allel bei Probanden mit Azoospermie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 22). Damit kommt das 5T-Allel bei Probanden mit Azoospermie 4-5 mal häufiger vor als in der Kontrollgruppe. Auch die Genotypen mit einem 5T-Allel sind in der Azoospermiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant häufiger ( $\chi^2=5,1$ ,  $p<0,05$ ) (Tab. 24). In der Studie von Jakubiczka et al. (1999) beträgt die Häufigkeit für das 5T-Allel bei Azoospermiepatienten ( $n=27$ ), nach Auswertung der Daten dieser Gruppe, dagegen nur 3,7%. Patienten mit einer congenitalen bilateralen Aplasie des *vas deferens* wurden in der Studie von Jakubiczka et al. (1999) ausgeschlossen.

Der Unterschied in der Häufigkeit für das 5T-Allel bei Azoospermiepatienten von 15,3% in dieser Arbeit und 3,7% in der Arbeit von Jakubiczka et al. (1999), kann auf den Ausschluss von Patienten mit einer congenitalen bilateralen Aplasie des *vas deferens* in der Studie von Jakubiczka et al. (1999) zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit erfolgte kein Ausschluss von Patienten mit einer congenitalen bilateralen Aplasie des *vas deferens*, so dass durchaus Probanden mit diesem Krankheitsbild in der Azoospermiegruppe vertreten sein können. Da bei diesen Patienten das 5T-Allel vermehrt vorkommt, könnte dies zu einer Erhöhung der Häufigkeit des 5T-Allels beigetragen haben. Allerdings kommen in der Azoospermiegruppe keine CFTR-Mutationen vor (Tab. 15), was gegen das Vorhandensein von CBAVD, aufgrund einer *compound Heterozygotie* für CFTR-Mutationen und einem 5T-Allel, spricht.

#### 4.6 Mutationen im CFTR-Gen und Chromosomenmutationen

In dieser Arbeit wurden unter den 218 Probanden neun heterozygote Mutationen im CFTR-Gen gefunden (6  $\Delta F508$  Mutationen, 2 R553X-Mutationen und eine R117H Mutation, Tab. 15). Das entspricht einer Häufigkeit von einer Mutation auf 24 Probanden (4,12%) und ist nicht signifikant verschieden zu der Häufigkeit von heterozygoten CFTR-Mutationen in der Normalbevölkerung von 1:29,2 (3,4%) in Deutschland (Bobadilla et al., 2002).

Sieben dieser CFTR-Mutationen finden sich in der Normozoospermiegruppe. Diese Gruppe ( $n=50$ ) hat einen Anteil von Probanden mit heterozygoten CFTR-Mutationen von 14%. Das ist 3-4 mal häufiger als in der Normalbevölkerung ( $p<0,01$ ). In der Azoo- und Oligozoospermiegruppe ist der Anteil von Probanden mit heterozygoten CFTR-Mutationen niedriger, 0% und 1,3% (Tab. 15). Die Häufigkeit heterozygoter CFTR-Mutationen bei Probanden mit Azoo- und Oligozoospermie ist in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich zur Normalbevölkerung, nicht erhöht. Tuerlings et al. (1998) fanden 3 heterozygote CFTR-

Mutationen unter 75 niederländischen Oligozoospermiepatienten für die eine Indikation zur ICSI bestand. Dies war ebenfalls nicht höher als in der niederländischen Normalbevölkerung. Auch Ravnik-Glavac et al. (2001) fanden unter 200 unselektierten Azoo- und Oligozoospermiepatienten in Slowenien keine erhöhte Häufung von CFTR-Mutationen (13 heterozygote CFTR-Mutationen wurden gefunden) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus der slowenischen Normalbevölkerung.

Im Gegensatz dazu fanden Jakubiczka et al. (1999) eine signifikante Erhöhung heterozygoter CFTR-Mutationen bei mitteldeutschen männlichen ICSI-Patienten mit Oligozoo- und Azoospermie. Eine Analyse der Daten zeigte, dass dies auf Patienten mit Oligozoospermie (12 heterozygote CFTR-Mutationen, n=170, 1:14,2) zurückzuführen ist. ICSI-Patienten mit Azoospermie dagegen wiesen keine erhöhte Häufigkeit von heterozygoten CFTR-Mutationen (1:27) auf. Van der Ven et al. (1996) fanden allerdings eine Häufung von heterozygoten CFTR-Mutationen bei deutschen Patienten mit Azoo- und Oligozoospermie. Sie konnten bei 80 Oligozoospermiepatienten 14 und bei 21 Azoospermiepatienten 3 Patienten mit CFTR-Mutationen finden. Das entspricht einer Häufigkeit von heterozygoten CFTR-Mutationen bei Oligozoospermiepatienten von 17,5% (1:5,7) und bei Azoospermiepatienten von 14,3% (1:7). Studien über die Häufigkeit von CFTR-Mutationen an Probanden mit Normozoospermie, für die eine Indikation zur ICSI gestellt wurde, sind bisher nicht erfolgt.

Warum die Studien von Jakubiczka et al. (1999) und Van der Ven et al. (1996) eine erhöhte Häufigkeit von CFTR-Mutationen nachweisen und die Studien von Ravnik-Glavac et al. (2001) und Tuerlings et al. (1998) nicht, ist widersprüchlich. Eventuell sind regionale/ ethnische Unterschiede in der Häufigkeit von CFTR-Mutationen hierfür verantwortlich.

Die Häufigkeit von sechs Chromosomenmutationen bei 218 männlichen ICSI-Patienten (2,7%) in dieser Arbeit liegt im Bereich auch von anderen Studien. Kremer et al. (1997) konnten 2,4% Chromosomenmutationen bei 164 ICSI-Patienten feststellen. Meschede et al. (1998) fanden 2,1% Chromosomenmutationen bei ebenfalls unselektierten 432 männlichen ICSI-Patienten. Im Vergleich zur Normalbevölkerung, wo die Häufigkeit von Chromosomenmutationen unter 1% beträgt (Jacobs et al., 1992; Nielsen und Wohlert, 1991) haben ICSI-Patienten als Gesamtheit ein erhöhtes Risiko, Träger von Chromosomenmutationen zu sein ( $p=0,02$ , für diese Arbeit). Auffällig ist, dass sich vier (67%) der Chromosomenmutationen in der Normozoospermiegruppe befinden (Tab. 15). Die Normozoospermiegruppe hat einen Anteil an Probanden mit Chromosomenmutationen von 8%. Das ist 8 mal höher als in der Normalbevölkerung ( $p<0,01$ ). In der Azoospermiegruppe

mit einem Anteil von 7,7% Probanden mit Chromosomenmutationen ist die Häufigkeit nicht signifikant höher als in der Normalbevölkerung. Für Probanden mit Oligozoospermie besteht nach den Daten der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Chromosomenmutation. Dagegen weisen Normozoospermieprobanden eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Chromosomenmutationen auf. Kremer et al. (1997) fanden eine erhöhte Chromosomenmutationsrate von 10,8% bei Azoospermiepatienten und für Oligozoospermie- und Normozoospermiepatienten keine Häufung von Chromosomenmutationen. Eine Häufigkeitsanalyse von Chromosomenmutationen in den Untergruppen Azoo-, Oligozoo- bzw. Normozoospermieprobanden wurde in der Studie von Meschede et al. (1998) nicht angegeben.

#### 4.7 Hodenhistologien

Die histologischen Befunde der Probanden bei denen eine Hodenbiopsie aufgrund einer schweren Spermatogenesestörung erfolgt ist, sind in Tabelle 19, unterteilt in Probanden ohne und mit DAZ-Deletion, aufgeführt.

Tab. 19: Übersicht der histologischen Befunde der Probanden mit schwerer Spermatogenesestörung, unterteilt in Probanden mit DAZ-Deletion und Probanden ohne DAZ-Deletion. SCO = Sertoli-Cell-Only-Syndrom.

Probanden mit DAZ-Deletion		
Proband	histologischer Befund	Spermiogrammbefund
935	beidseits SCO-Syndrom mit fokal erhaltener spermatogenetischer Restfunktion	zunehmender Verlust an Samenzellen bis zur Azoospermie
1053	beidseits SCO-Syndrom mit fokalerhaltener spermatogenetischer Restfunktion	Kryptozoospermie
Probanden ohne DAZ-Deletion		
1074	Linker Hoden: SCO-Syndrom mit fokal erhaltener spermatogenetischer Restfunktion Rechter Hoden: SCO-Syndrom	Azoospermie
1095	Linker Hoden: SCO-Syndrom Rechter Hoden: SCO-Syndrom mit fokalerhaltener spermatogenetischer Restfunktion	Kryptozoospermie
1343	beidseits SCO-Syndrom	zunehmender Verlust an Samenzellen bis zur Azoospermie

Der Spermiogrammbefund Spermien/ml Ejakulat passt bei drei Probanden (935, 1074 und 1343) nicht zu dem Befund der Hodenhistologie. Bei zwei dieser drei Probanden (Proband 935 mit DAZ-Deletion und Proband 1343 ohne DAZ-Deletion) ist ein fortschreitender

Verlust der Samenzellen bis hin zur Azoospermie beobachtet worden. Sie haben einen variablen Phänotyp hinsichtlich der Spermatogenese. Variable Verläufe bei Patienten mit DAZ-Deletion sind in der Literatur beschrieben (Calogero et al., 2001). Diese Variabilität würde auch den Befund der Hodenhistologie und den Spermogrammbeefund von Proband 1074 erklären, bei dem histologisch eine spermatogenetische Restfunktion vorliegt, das Spermogramm dagegen eine Azoospermie aufweist. Die Biopsien sind zu einem anderen Zeitpunkt, als die Dokumentation der Spermogrammbeefunde erfolgt.

Proband 1053 (mit DAZ-Deletion) und Proband 1095 (ohne DAZ-Deletion) weisen eine Kryptozoospermie auf. Es kann keine Aussage getroffen werden, ob dies ein stationärer Zustand ist, oder ob diese Patienten auch einen zunehmenden Verlust der Spermatogenese aufweisen, und nur der Zeitpunkt der Kryptozoospermie dokumentiert ist.

In einer Studie von Foresta et al. (1997) wurde ein Sertoli-Cell-Only-Syndrom bei Patienten mit isolierten AZFc-Deletionen und isolierten AZFb-Deletionen beobachtet. Es wiesen aber auch Patienten mit AZFc-Deletionen eine nur reduzierte Spermatogenese auf. Insgesamt lässt sich einer DAZ-Deletion kein eindeutiger Phänotyp hinsichtlich der Hodenhistologie und der Spermatogeneseleistung zuordnen. Umgekehrt ist es auch nicht möglich, aus dem Befund der Hodenhistologien auf eine DAZ-Deletion zu schließen.

#### 4.8 Schlussfolgerung

Mikrodeletionen des Y-Chromosoms im Bereich der DAZ-Region sind nur bei wenigen ICSI-Patienten vorhanden. Die Häufigkeit in diesem Kollektiv beträgt 0,75%. Jedoch wird eine DAZ-Deletion nach Befunden der vorliegenden Arbeit mit zunehmender Spermatogenesestörung wahrscheinlicher. Bei Patienten mit Kryptozoospermie beträgt die Häufigkeit von DAZ-Deletionen 5% und bei Patienten mit Azoospermie 7,7%. Das bedeutet, eine DAZ-Deletion kann zu einem vollständigen Verlust der Spermatogenese führen, es kann aber auch eine qualitativ und quantitativ verminderte Spermatogenese vorhanden sein. Ebenso besteht kein eindeutiger Unterschied in den Befunden der Hodenhistologien zwischen DAZ-positiven und DAZ-negativen Patienten mit schwerer Spermatogenesestörung.

Das 5T-Allel des Thymidin-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens kommt in dem Kollektiv unselektierter Azoospermiepatienten überproportional häufig vor.

Die Häufung von Chromosomenmutationen bei ICSI-Patienten mit Normozoospermie legt den Schluss nahe, dass einige Fälle von Infertilität darauf zurückzuführen sind.

Ebenso scheinen heterozygote CFTR-Mutationen bei Infertilitätspatienten mit Normozoospermie einen Einfluss auf die Fertilität zu haben, da in dieser Gruppe eine Häufung zu beobachten ist.

#### **4.9 Ausblick**

Es ist nicht klar, warum Deletionen der AZFc-Region identischer Lokalisation bei verschiedenen Individuen zu differenten Phänotypen führen. Hier sollten die Deletionsgrenzen genauer lokalisiert werden, um eventuell doch Unterschiede zu finden und z.B. Hinweise auf Gene in den Bereichen der Deletionsgrenzen zu bekommen.

Es sollten weiterführend die Eltern und Verwandten von männlichen Infertilitätspatienten hinsichtlich des familiären Auftretens und der Manifestation der Infertilitätsproblematik untersucht werden. So könnte in Studien beurteilt werden, ob bisher unbekannte genetische Ursachen für einen Teil der idiopathischen Infertilität verantwortlich und ob diese autosomal oder gonosomal lokalisiert sind.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen mit welcher Häufigkeit bei männlichen Infertilitätspatienten, für die eine Indikation zur ICSI besteht, Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes in der AZFc-Region des Y-Chromosoms vorkommen. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob klinische Hinweise auf eine Deletion und ein eventueller Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp existieren. Weiterhin sollte analysiert werden, ob das 5T-Allel des Intron 8 des CFTR-Gens, CFTR-Mutationen und Chromosomenmutationen bei männlichen ICSI-Patienten vermehrt vorkommen.

Dazu wurden 270 ICSI-Patienten ohne Vorselektion an 5 Loci der DAZ-Region mittels PCR-Analyse molekulargenetisch untersucht und Angaben über klinische Befunde, Spermioграмme, Hormone, CFTR- und Chromosomenmutationen erhoben. Es wurden 2 Probanden (0,75%) mit Deletion aller 5 untersuchten Loci gefunden. Die nähere Charakterisierung ergab für beide Probanden eine identische Deletion der AZFc-Region.

Bei Betrachtung der Spermatogenesestörung in Gruppen konnte zwischen der Schwere der Spermatogenesestörung und der Häufigkeit von DAZ-Deletionen eine positive Korrelation festgestellt werden. Bei Probanden mit Azoospermie (n=13) betrug die Häufigkeit von DAZ-Deletionen 7,7%, bei Probanden mit Kryptozoospermie (n=20) 5%. Bei Probanden mit einer Spermienzahl von 1 Million Spermien pro ml Ejakulat aufwärts (n=185) wurden keine DAZ-Deletionen gefunden.

Neben der Schwere der Spermatogenesestörung konnten keine weiteren Parameter eruiert werden, die hinweisend auf Patienten mit einer DAZ-Deletion sind oder diese ausschließen. Auch konnte den Patienten mit einer DAZ-Deletion kein eindeutiger Phänotyp zugeordnet werden. Beide Probanden mit DAZ-Deletion weisen eine schwere Spermatogenesestörung, eine Azoospermie und eine Kryptozoospermie, auf. Anamnestisch sind beide Probanden, bis auf eine Hypospadias glandis bei Proband 935, unauffällig. Vergleichbare Studien an ICSI-Patienten fanden ebenfalls nur DAZ-Deletionen bei Probanden mit Azoo- und Kryptozoospermie. Daher ist es sinnvoll, eine Untersuchung auf Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes auf Patienten zu beschränken, die eine schwere Spermatogenesestörung aufweisen. In diesem Kollektiv wird die Häufigkeit von DAZ-Deletionen bei ca. 6% liegen.

Um Unterschiede in der Häufigkeit des Thymidinsequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens festzustellen, wurden die Häufigkeiten für das 5T-, 7T- und 9T-Allel des ICSI-Probandenkollektivs, mit den Häufigkeiten der T-Allele von Probanden eines

Kontrollkollektivs verglichen, bei denen zum Ausschluss auf cystische Fibrose auch der T-Allel-Sequenzpolymorphismus bestimmt wurde. Im ICSI-Probandenkollektiv als Gesamtheit konnte kein Unterschied in den Häufigkeiten festgestellt werden. Die Untergruppe der Azoospermiepatienten wies aber eine signifikante Erhöhung des 5T-Allels gegenüber der Kontrollpopulation auf. Das 5T-Allel des Thymidinsequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens ist in der Azoospermiegruppe 4-5 mal häufiger als in der Kontrollgruppe ( $\chi^2=5,22$ ,  $p<0,05$ ).

Die Auswertung der Häufigkeit von CFTR-Mutationen ergab neun Probanden mit heterozygoten Mutationen bei 218 untersuchten Probanden. Das ist vergleichbar mit der Häufigkeit in der Normalbevölkerung. Allerdings fand sich eine Häufung bei ICSI-Patienten mit Normozoospermie (n=50) von sieben Probanden mit heterozygoten CFTR-Mutationen. Das ist 3-4 mal höher als in der Normalbevölkerung ( $p<0,01$ ).

Die Auswertung von 218 Karyogrammen ergab sechs Chromosomenmutationen. Vier Chromosomenmutationen fanden sich bei Probanden mit Normozoospermie (n=50), eine Chromosomenmutation bei Probanden mit Oligozoospermie (n=155) und eine Chromosomenmutation bei Probanden mit Azoospermie (n=13). ICSI-Patienten mit Normozoospermie weisen eine 8 mal höhere Rate ( $p<0,01$ ) an Chromosomenmutationen im Vergleich zur Normalbevölkerung auf. In den Gruppen der ICSI-Patienten mit Azoo- und Oligozoospermie besteht keine erhöhte Häufigkeit von Chromosomenmutationen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Im ICSI-Kollektiv als Gesamtheit finden sich Chromosomenmutationen mit einer Häufigkeit von 2,7%, dies ist mindestens 2,5 mal häufiger als in der Normalbevölkerung ( $p=0,02$ ).

Zusammenfassend ist es nach den Ergebnissen dieser Studie sinnvoll, allen ICSI-Patienten eine genetische Beratung anzubieten, da aufgrund der vorliegenden Daten bei ihnen ein erhöhtes Risiko an AZF-Deletionen, Chromosomen- und CFTR-Mutationen in verschiedenen Untergruppen besteht, und sie damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, Nachkommen mit genetisch bedingten Erkrankungen zu zeugen.

## 6 Anhang

Tab. 20: Häufigkeit der 5T-, 7T- und 9T- Allele im Intron 8 des CFTR-Gens im Kontrollkollektiv (n=95) und unterteilt für männliche und weibliche Probanden des Kontrollkollektivs. In der letzten Zeile ist das Ergebnis des  $\chi^2$ -Vierfelder-Tests mit Yates-Korrektur zur Prüfung auf gleiche Häufigkeiten der Allele im männlichen und weiblichen Kontrollkollektiv aufgeführt (f=1).

Kontrollkollektiv	Häufigkeit der T-Allele		
	5T	7T	9T
n= 95 Probanden	6 3,2%	162 85,2%	22 11,6%
Unterteilt in männlich und weiblich			
Männlich n = 34	3 4,4%	57 83,8%	8 11,8 %
Weiblich n = 61	3 2,5%	105 86,1%	14 11,4%
$\chi^2$ -Test	$\chi^2 = 0,09$ p = 0,76	$\chi^2 = 0,04$ p = 0,83	$\chi^2 = 0$ p = 1

Tab. 21: Häufigkeit der Genotypen für den 5T-, 7T- und 9T-Allel-Sequenzpolymorphismus im Intron 8 des CFTR-Gens im Kontrollkollektiv (n=95 Probanden) und unterteilt für männliche und weibliche Probanden des Kontrollkollektivs. Die Zahl in der obersten Zeile jeder Zelle gibt die absolute Häufigkeit, die Prozentzahl darunter die relative Häufigkeit des Genotyps an. In den letzten beiden Spalten ist das Ergebnis des  $\chi^2$ -Tests auf Hardy-Weinberg-Gleichverteilung aufgeführt, unter der Berücksichtigung, dass im  $\chi^2$ -Test die Häufigkeiten größer 1 und insgesamt 20% nicht kleiner als 5 sein dürfen. Dazu wurden Genotypen mit kleinen Häufigkeiten zusammengefasst. In Klammern ist der Freiheitsgrad angegeben.

Kontrollkollektiv	Häufigkeit der T-Allelkombinationen						Hardy-Weinberg-Gleichverteilung	
	5T/5T	5T/7T	5T/9T	7T/7T	7T/9T	9T/9T		
N= 95 Probanden	0	6 6,3%	0	69 72,7%	18 18,9%	2 2,1%	ja	$\chi^2 = 0,13$ (2) p = 0,94
Unterteilt in männlich und weiblich								
Männlich n = 34	0	3 8,8%	0 0%	24 70,7%	6 17,6%	1 2,9%	ja	$\chi^2 = 0,002$ (1) p = 0,96
Weiblich n = 61	0	3 4,9%	0 0%	45 73,8%	12 19,7%	1 1,6%	ja	$\chi^2 = 0,01$ (1) p = 0,92

Tab. 22: Ergebnisse des  $\chi^2$ -Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der 5T-, 7T- und 9T-Allele im Probandenkollektiv als Gesamtheit und unterteilt in die Gruppen „Azoospermie“, „Oligozoospermie“ und „Normozoospermie“ zur Kontrollgruppe. Der Test wurde für jedes Allel in Form einer Vierfeldertafel mit dem Ansatz „Merkmal vorhanden“ (zu untersuchendes Allel) und „Merkmal nicht vorhanden“ (restliche Allele der Gruppe) im Vergleich mit der Kontrollgruppe durchgeführt. Fett hervorgehoben sind die Werte für  $\chi^2$  und p die zur Ablehnung der Hypothese auf gleiche Häufigkeit, bei  $p < 0,05$ , führen.

Gruppe	Allel	Allele der Kontrollgruppe (n=190)		
		5T (6 Allele)	7T (162 Allele)	9T (22 Allele)
Azoospermiegruppe n=13, 26 Allele	5T (4)	<b><math>\chi^2=5,22</math>, p=0,02</b>	-	-
	7T (16)	-	<b><math>\chi^2=7,32</math>, p=0,007</b>	-
	9T (6)	-	-	$\chi^2=1,76$ , p=0,19
Oligozoospermiegruppe n=155, 310 Allele	5T (9)	$\chi^2=0$ , p=1	-	-
	7T (271)	-	$\chi^2=0,3$ , p=0,58	-
	9T (30)	-	-	$\chi^2=0,27$ , p=0,6
Normozoospermiegruppe n=50, 100 Allele	5T (4)	$\chi^2=0,001$ , p=0,97	-	-
	7T (83)	-	$\chi^2=0,11$ , p=0,74	-
	9T (13)	-	-	$\chi^2=0,027$ , p=0,87
gesamtes Probandenkollektiv n=230, 460 Allele	5T (17)	$\chi^2=0,01$ , p=0,92	-	-
	7T (392)	-	$\chi^2=0$ , p=1	-
	9T (51)	-	-	$\chi^2=0,002$ , p=0,96

Tab. 23: Ergebnisse des  $\chi^2$ -Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der 5T-, 7T- und 9T-Allele innerhalb der Azo-, Oligozoo- und Normozoospermiegruppe. Der Test wurde für jedes Allel in Form einer Vierfeldertafel mit dem Ansatz „Merkmal vorhanden“ (zu untersuchendes Allel) und Merkmal „nicht vorhanden“ (restliche Allele der Gruppe) im Vergleich mit der Kontrollgruppe durchgeführt. Fett hervorgehoben sind die Werte für  $\chi^2$  und p die zur Ablehnung der Hypothese auf gleiche Häufigkeit, bei  $p < 0,05$ , führen.

Gruppe	Allel	Allele der Azoospermiegruppe (n=26)		
		5T (4 Allele)	7T (16 Allele)	9T (6 Allele)
Oligozoospermiegruppe n=155, 310 Allele	5T (9)	<b><math>\chi^2=6,97</math>, p=0,008</b>	-	-
	7T (271)	-	<b><math>\chi^2=10,9</math>, p=0,001</b>	-
	9T (30)	-	-	$\chi^2=3,21$ , p=0,07
Normozoospermiegruppe n=50, 100 Allele	5T (4)	$\chi^2=2,79$ , p=0,095	-	-
	7T (83)	-	<b><math>\chi^2=4,44</math>, p=0,035</b>	-
	9T (13)	-	-	$\chi^2=1,63$ , p=0,2
		Allele der Normozoospermiegruppe (n=100)		
	Allel	5T (4 Allele)	7T (83 Allele)	9T (13 Allele)
Oligozoospermiegruppe n=155, 310 Allele	5T (9)	$\chi^2=0,047$ , p=0,83	-	-
	7T (271)	-	$\chi^2=0,91$ , p=0,341	-
	9T (30)	-	-	$\chi^2=0,57$ , p=0,45

Tab. 24: Ergebnisse des  $\chi^2$ -Vierfelder-Tests mit Yates-Korrektur zum Vergleich der Häufigkeiten der Genotypen mit dem 5T-Allel im Probandenkollektiv sowie unterteilt in die Gruppen Azo-, Oligozoo- und Normozoospermie zum Kontrollkollektiv. Fett hervorgehoben sind die Werte für  $\chi^2$  und p die zur Ablehnung der Hypothese auf gleiche Häufigkeit, bei  $p < 0,05$ , führen.

Gruppen	Genotypen		Vergleich mit Kontrollkollektiv 6 Genotypen mit 5T-Allel, 89 Genotypen ohne 5T-Allel
	mit 5T-Allel	ohne 5T-Allel	
Probandenkollektiv gesamt (n=230)	17	213	$\chi^2 = 0, p = 1$
Normozoospermie (n=50)	3	47	$\chi^2 = 0, p = 1$
Oligozoospermie (n=155)	9	146	$\chi^2 = 0, p = 1$
Azoospermie (n=13)	4	9	<b><math>\chi^2 = 5,1, p = 0,02</math></b>

## 7 Literaturverzeichnis

1. Affara N, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, Graves JM, Jones M, Mitchell M, Rappold G, Tyler-Smith C, Yen P, Lau YF: Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 73 (1996) 33-76
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K: Current Protocols in Molecular Biology. 2.Edition. John Wiley & Sons, New York, 1989
3. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM: Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19 (2002) 575-606
4. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH: Dermatologie und Venerologie. 4.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, S. 1473-1486
5. Bujan L, Mieusset R, Mansat A, Moatti JP, Mondinat C, Pontonnier F: Testicular size in infertile men: relationship to semen characteristics and hormonal blood levels. *Br J Urol* 64 (1989) 632-637
6. Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, De Palma A, Vicari E, Romeo R, Tumino S, D'Agata R: Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient: Case report. *Hum Reprod* 16 (2001) 1845-1848
7. Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wassermann SA: Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterisation of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* 135 (1993) 489-505
8. Chang PL, Sauer MV, Brown S: Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 14 (1999) 2689-2694

9. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG: Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 3 (1993) 151-156
10. de Kretser DM: Male infertility. *Lancet* 349 (1997) 787-790
11. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, Van den Ouweland AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC: Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 17 (2002) 13-16
12. Dörk T, Stuhmann M: Molekularbiologie der Mukoviszidose. *Biologie in unserer Zeit* 5 (1996) 282-291
13. Dörk T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wieczorek D, Bohm I, Mayerova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Pander HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J, Stuhmann M: Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet* 100 (1997) 365-377
14. Eberhart CG, Maines JZ, Wassermann SA: Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* 381 (1996) 783-785
15. Elliott DJ: RBMY genes and AZFb deletions. *J Endocrinol Invest* 23 (2000) 652-658
16. Foresta C, Ferlin A, Moro E: Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 9 (2000) 1161-1169
17. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux S, De Bortoli A: Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 1075-1080
18. Foresta C, Moro E, Ferlin A: Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22 (2001) 226-239

19. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN: Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 12 (1997) 1635-1641
20. Glantz SA: Biostatistik – Ein Fach für die Praxis. 4.Aufl. McGraw-Hill, 1998
21. Hagemann R: Gentechnische Arbeitsmethoden – Ein Handbuch. Akademie-Verlag, Berlin, 1990
22. Hargreave TB: Genetic basis of male fertility. *Br Med Bull* 56 (2000) 650-671
23. Huynh T, Mollard R, Trounson A: Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 8 (2002) 183-198
24. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H: Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29 (1992) 103-108
25. Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M, Nickel I, Müsebeck J, Krebs P, Fischer C, Kleinstein J, Wieacker P: Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme. *Hum Reprod* 14 (1999) 1833-1834
26. Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD: Structure of chromosomal duplication and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 10 (2000) 597-610
27. Kaplan E, Shwachmann H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS: Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 279 (1968) 265-269
28. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosch J: Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53 (1999) 27-41
29. Kent-First M: The Y chromosome and its role in testis differentiation and spermatogenesis. *Semin Reprod Med* 18 (2000) 67-80

30. Kiewewetter S, Macek M Jr, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR: A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 5 (1993) 274-278
31. Kim SW, Kim KD, Paick JS: Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril* 72 (1999) 349-353
32. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, McElreavey K, Scarselli G, Forti G: Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 14 (1999) 1717-1721
33. Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE: Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific für spermatogenetic failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 2638-2642
34. Krausz C, Forti G: Clinical aspects of male infertility. *Results Probl Cell Differ* 28 (2000) 1-21
35. Kremer JA, Tuerlings JH, Meuleman EJ, Schoute F, Mariman E, Smeets DF, Hoefsloot LH, Braat DD, Merkus HM: Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod* 12 (1997) 687-691
36. Lahn BT, Page DC: Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278 (1997) 675-680
37. Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, Estivill X, Casals T: Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1739-1743

38. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2.Aufl. Cold Spring Harbor, New York, 1989
39. Massicotte J, Lagace L, Labrie F, Dorrington JH: Modulation of gonadotropin secretion by Sertoli cell inhibin, LHRH, and sex steroids. *Am J Physiol* 247 (1984) 495-504
40. Maurer B, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E: Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience. *Andrologia* 33 (2001) 27-33
41. Mazeyrat S, Saut N, Sargent CA, Grimmond S, Longepied G, Ehrmann IE, Ellis PS, Greenfield A, Affara NA, Mitchell MJ: The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation is gene dense with syntenic homology to the human AZFa region. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1713-1724
42. McElreavey K, Krausz C: Sex Chromosome Genetics '99. Male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64(1999) 928-933
43. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J: Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 13 (1998) 576-582
44. Miny P, Schloo R: Ist Sterilität eine Erblast? *Ther Umsch* 56 (1999) 265-270
45. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155 (1987) 335-350
46. Nielsen J, Wohlert M: Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 87 (1991) 81-83
47. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340 (1992) 17-18

48. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 336 (1997) 534-539
49. Ravnik-Glavac M, Svetina N, Zorn B, Peterlin B, Glavac D: Involvement of CFTR gene alterations in obstructive and nonobstructive infertility in men. *Genet Test* 5 (2001) 243-247
50. Redmon JB, Carey P, Pryor JL: Varicocele – the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update* 8 (2002) 53-58
51. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347 (1996) 1290-1293
52. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10 (1995) 383-393
53. Reijo RA, Dorfmann DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H, Page DC: DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod* 63 (2000) 1490-1496
54. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245 (1989) 1066-1073
55. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245 (1989) 1059-1065

56. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ: The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389 (1997) 73-77
57. Sachs L: *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. 8.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996
58. Salo P, Kaariainen H, Page DC, de la Chapelle A: Deletion mapping of stature determinants on the long arm of the Y chromosome. *Hum Genet* 95 (1995) 283-286
59. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut N, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold GA, Affara NA: The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences *J Med Genet* 36 (1999) 670-677
60. Saut N, Terriou P, Navarro A, Lévy N, Mitchell MJ: The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. *Mol Hum Reprod* 6 (2000) 789-793
61. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC: The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 14 (1996) 292-299
62. Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JM, Page DC: Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 67 (2000) 256-267
63. Sertic S, Cvitkovic P, Myers A, Saiki RK, Stavljenic Rukavina A: Genetic markers of male infertility: Y chromosome microdeletions and cystic fibrosis transmembrane conductance gene mutation. *Croat Med J* 42 (2001) 416-420
64. Seshagiri PB: Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 26 (2001) 429-435

65. Stern RC, Boat TF, Doershuk CF: Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. *Lancet* 1 (1982) 1401-1404
66. Stuhmann M, Dörk T: CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia* 32 (2000) 71-83
67. Tateno T, Sasagawa I, Ashida J, Nakada T, Ogata T: Absence of Y-chromosome microdeletions in patients with isolated hypospadias. *Fertil Steril* 74 (2000) 399-400
68. Tiepolo L, Zuffardi O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34 (1976) 119-124
69. Tuerlings JH, Mol B, Kremer JA, Looman M, Meulemann EJ, te Meerman GJ, Buys CH, Merkus HM, Scheffer H: Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69 (1998) 899-903
70. van der Ven K, Messer L, van der Ven H, Jeyendran RS, Ober C: Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 11 (1996) 513-517
71. Van Landuyt L, Lissens W, Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Van Steirteghem A: Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population. *Mol Hum Reprod* 6 (2000) 291-297
72. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8 (1993) 1061-1066
73. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G: Human Y

- chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5 (1996) 933-943
74. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC: The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258 (1992) 52-59
75. World Health Organization: WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1993
76. Yen PH, Chai NN, Salido EC: The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions. *Mamm Genome* 8 (1997) 756-759
77. Zielenski J, Patrizio P, Corey M, Handelin B, Markiewicz D, Asch R, Tsui LC: CFTR gene variant for patients with congenital absence of vas deferens. *Am J Hum Genet* 57 (1995) 958-960

## 8 Thesen

1. Männliche Infertilität kann durch Mikrodeletionen des DAZ-Gen-Komplexes in der AZFc-Region des Y-Chromosoms bedingt sein. Durch Methoden der assistierten Befruchtung werden genetische Ursachen von Infertilität an die Nachkommen weitergegeben. Die Diagnostik von Mikrodeletionen des Y-Chromosoms ist bei männlich bedingter Infertilität eines Paares mit Kinderwunsch für die genetische Beratung von großer Bedeutung.
2. Es wurde ein Kollektiv von 270 männlichen Probanden, für das eine Indikation zur Infertilitätsbehandlung mittels intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) bestand, auf Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes in der AZFc-Region des Y-Chromosoms untersucht.
3. Die molekulargenetische Analyse auf Deletionen des DAZ-Gen-Komplexes mittels PCR-Technik ergab zwei Probanden mit Mikrodeletionen. Die nähere Charakterisierung der Deletionen zeigte bei beiden Probanden identische Deletionsgrenzen im Bereich der AZFc-Region. Eine Bruchpunktanalyse von in der Literatur dokumentierten Mikrodeletionen zeigte Bereiche auf dem Y-Chromosom, an denen bevorzugt Bruchpunkte auftreten
4. Beide Probanden mit Deletion weisen eine schwere Spermatogenesestörung (eine Azoospermie und eine Kryptozoospermie) auf. Sie haben beide eine Erhöhung des follikelstimulierenden Hormons. Ein Proband hat eine Hypospadias glandis. Anderweitig sind beide Probanden klinisch unauffällig.
5. Das Probandenkollektiv wurde nach dem Grad der Spermatogenesestörung in Gruppen eingeteilt. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Spermatogenesestörung die Wahrscheinlichkeit einer DAZ-Deletion zunimmt.
6. Der Thymidinsequenzpolymorphismus (5T, 7T, 9T) im Polypyrimidintrakt im Intron 8 des CFTR-Gens beeinflusst die Effizienz der Exonerennung für Exon 9. Bei Vorliegen einer Sequenz von 5 Thymidinen im Polypyrimidintrakt des Intron 8 ist das Exon 9 zu

60%-90% nicht im CFTR-mRNA-Transkript enthalten. Es wurde die Häufigkeit des 5T-Allels im Probandenkollektiv mit einem Kontrollkollektiv verglichen. Bei Probanden mit Azoospermie kommt das 5T-Allel signifikant häufiger vor als im Kontrollkollektiv.

7. Cystische Fibrose bedingt bei männlichen Patienten fast immer Infertilität. Es wurde untersucht, ob heterozygote CFTR-Mutationen gehäuft bei Männern vorkommen, für die eine Indikation zur intracytoplasmatischen Spermieninjektion gestellt wurde. Im Probandenkollektiv als Gesamtheit besteht keine Häufung von CFTR-Mutationen im Vergleich zur Normalbevölkerung. In der Untergruppe der Probanden mit Normozoospermie wurde aber eine signifikante Erhöhung von CFTR-Mutationen festgestellt.
8. Chromosomenmutationen kommen im Probandenkollektiv als Gesamtheit häufiger vor als in der Normalbevölkerung. Eine Analyse der Häufigkeit der Chromosomenmutationen in Untergruppen zeigte, dass dies durch eine Häufung von Chromosomenmutationen in der Normozoospermiegruppe bedingt ist.

## Lebenslauf

Persönliche Daten

Marco Omenzetter

geboren am 18.06.1973 in Magdeburg, Deutschland  
Sohn von Armin Omenzetter und Rosemarie Omenzetter,  
geb. Sandring

## Ausbildungsdaten

- 1980-1988 Polytechnische Oberschule „Richard-Dembny“ in Magdeburg
- 1988-1992 Erweiterte Oberschule/Gymnasium „Werner-von-Siemens“ und „Geschwister-Scholl“, Abitur
- 1993-2001 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wechsel im 4. Semester ins Studienfach Humanmedizin
- 2001-2002 Arzt im Praktikum an der Klinik für Rheumatologie- und Rehabilitation Zurzach-Baden (CH)
- ab Februar 2003 Arzt im Praktikum an der Klinik für Diagnostische Radiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Marco Omenzetter

### **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Die Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle/Saale, den 03.03.2003

Marco Omenzetter

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Ingo Hansmann, Direktor des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, sowie Frau Dr. rer. nat. Monika Hagemann, für die Überlassung des Themas und die freundliche und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.
- Den beiden MTAs C. Metz und R. Donath für die Einführung in die Laborarbeit und das damit verbundene angenehme Arbeiten.
- Herrn Professor Dr. med. habil. W. F. Rath (Direktor des Instituts für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), Herrn Professor Dr. med. habil. W. C. Marsch (Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Herrn Professor Dr. med. habil. M. Bergmann (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die freundliche Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der Hodenhistologien.
- Herrn Dr. med. A. Hammer (Institut für Pathologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die freundliche Zusammenarbeit und für die Anfertigung der Fotografien der Hodenhistologien.
- Frau OÄ Dr. med. H. Thiele (Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die freundliche Zusammenarbeit und die Überlassung der Patientendaten.
- Frau OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer (Universitätsklinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die freundliche Zusammenarbeit und Akteneinsicht ihrer Patienten.

- Dr. med. Algermissen, Dr. med. Justus und Dr. med. Wilke (Frauenärzte, Gynäkologische Gemeinschaftspraxis Hildesheim) für die freundliche Zusammenarbeit und Überlassung der Patientendaten und Spermiogrammbefunde.
- Dr. med. M. Pruggmeyer (Facharzt für Gynäkologie und Medizinische Genetik mit zytogenetischem Labor, Peine) für die Überlassung der Patientendaten.
- Herrn O. Kuß (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Direktor Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Haerting) für die freundliche Beratung.