

Aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie

des Universitätsklinikums Halle an der Saale

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

**Die Rolle der Proteine Piwi-like 1 und Piwi-like 3 für die
Spermatogenese des Menschen
und die männliche Fertilität**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (*Dr. med.*)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Carina Möisinger

geboren am 17.01.1988 in Coburg

Betreuer: Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

2. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

3. PD Dr. rer. nat. Holger Herlyn

15.09.2015

07.06.2016

Referat

Besteht eine ungewollte Kinderlosigkeit (definiert als Nicht-Eintreten einer Schwangerschaft trotz ungeschützter Kohabitation länger als 12 Monate), so wird von Infertilität ausgegangen, deren Ursache bei Bedarf einer umfangreichen Diagnostik des Patienten benötigt. Es sind zahlreiche Ursachen der männlichen Infertilität bzw. Subfertilität bekannt. Jedoch ist bei etwa einem Drittel keine Störung erkennbar, es wird daher von idiopathischer männlicher Infertilität gesprochen. Aktuell leiden etwa 15 % der Paare in Deutschland an ungewollter Kinderlosigkeit. Gerade für Patienten, bei denen eine idiopathische Infertilität diagnostiziert wurde, ist noch umfassende Grundlagenforschung nötig, um Störungen der Spermatogenese besser verstehen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wird die prädiktive Rolle der Proteine Piwi-like 1 und Piwi-like 3, als Mitglieder der Argonaute-Proteinfamilie, bei Störungen in der Spermatogenese untersucht. Es ist bereits durch tierexperimentelle Studien bekannt, dass die Piwi-Proteine in der Keimbahn für die Selbsterneuerung und Teilung der Stammzellen, sowie für die Keimzellentwicklung von großer Bedeutung sind.

Es wurden die Ejakulatproben von 51 Probanden mit unauffälligen Spermogrammen und 46 Probanden mit auffälligen Variablen im Spermogramm hinsichtlich ihrer Expression von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 untersucht. Diese wurden mit Hilfe von quantitativer real-time PCR vermessen. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test, Kreuztabellen und ROC-Kurven Analyse herangezogen.

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob das Level der Expression von Piwi-like 1 bzw. Piwi-like 3 mit Auffälligkeiten von Spermogrammvariablen assoziiert ist. Mit Abschluss der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Piwi-like 1 mit einem geringeren Prozentsatz an progressiv motilen Spermien signifikant korreliert. Ebenso zeigte sich dies für die Vitalität der Spermien.

Durch die gewonnenen Daten kann die These bestehender Arbeiten unterstützt werden, dass eine regelgerechte Expression von Piwi-like 1 in der Spermatogenese des Menschen von hoher Relevanz ist. Dies trifft auch für die progressive Spermienmotilität zu, welche eine große Rolle für die männliche Fertilität bzw. für die erzielten Schwangerschaftsraten spielt. Zudem konnten Hinweise für eine Assoziation zur Vitalität der Spermien spezifiziert werden.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	01
1.1 Infertilität.....	01
1.1.1 Männliche Infertilität.....	02
1.2 Spermatogenese.....	03
1.3 Spermiogramm.....	05
1.4 Die Argonaute-Proteinfamilie.....	08
1.4.1 Die Piwi-Proteine.....	10
1.5 RNA-Interferenz.....	10
2 Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Patientenproben.....	16
3.1.2 Chemikalien.....	17
3.1.3 Kits.....	19
3.1.4 Puffer, Medien, Lösungen.....	19
3.1.5 Primer und Enzyme.....	20
3.1.6 Bakterienstämme und Vektoren.....	20
3.1.7 Geräte.....	21
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Untersuchung von mRNA.....	23
3.2.1.1 RNA-Isolation.....	23
3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	23
3.2.1.3 cDNA-Synthese.....	24
3.2.1.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	25

3.2.2 Herstellung eines pGL4 –Vektors mit Promotorregionen von Piwi-like 1 und Piwi-like 3	26
3.2.2.1 PCR.....	26
3.2.2.2 Gelelektrophorese.....	27
3.2.2.3 Gel-Extraktion.....	28
3.2.2.4 Ligation.....	28
3.2.2.5 Transformation.....	29
3.2.2.6 Kolonien picken.....	30
3.2.2.7 Plasmidisolation.....	30
3.2.2.8 Restriktionsverdau und PGL4 Restriktionsverdau.....	30
3.2.2.9 Luciferase-Reporter-Messungen zur Promoteranalyse.....	31
3.2.3 Statistische Analysen.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Beschreibung der Kohorte.....	32
4.2 Ergebnisse der experimentellen Arbeit.....	36
4.2.1 Ergebnisse der RNA-Isolation.....	36
4.2.2 Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR.....	37
4.3 Ergebnisse der statistischen Analysen.....	38
4.3.1 Ergebnisse der nichtparametrischen Korrelation.....	38
4.3.2 Ergebnisse beim Mittelwertvergleich.....	39
4.4 Generierung von Luciferase-Reporter-Konstrukten und Promotoranalysen.....	44
5 Diskussion	48

6 Zusammenfassung	53
7 Literaturverzeichnis	54
8 Thesen	61
9 Anhang	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A _D	A (Dark)-Spermatogonien
AGO	Argonaute
A _P	A (Pale)-Spermatogonien
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
et al.	et altera
mRNA	„messenger RNA“
miRNA	microRNA
μl	Mikroliter
nt	Nukleotide
PAZ	Akronym (PIWI, Argonaute und Zwillie)
PCR	Polymerase Chain Reaction
piRNA	Piwi-interacting RNA
Piwi	P-element induced wimpy testis
RISC	RNA-induced silencing-Complex
sRNA	small RNA
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
WAGO	Worm-specific Argonaute
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Infertilität

Die WHO definiert Infertilität als die ungewollte Kinderlosigkeit eines Paares über 12 Monate trotz regelmäßiger ungeschützter Kohabitation (Quelle: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/> Letzter Aufruf Februar 2015). Aktuell sind in Deutschland etwa 15 % der Paare betroffen, wobei in 20% der Fälle von einer männlichen und in 39% von einer weiblichen Infertilität ausgegangen werden kann. Für 26% sind sowohl männliche als auch weibliche Ursachen für die ungewollte Kinderlosigkeit verantwortlich. Die Gruppe der idiopathischen Infertilität macht 15% aus. (s. Abb. 1) (Nieschlag et al. 2009, S. 6)

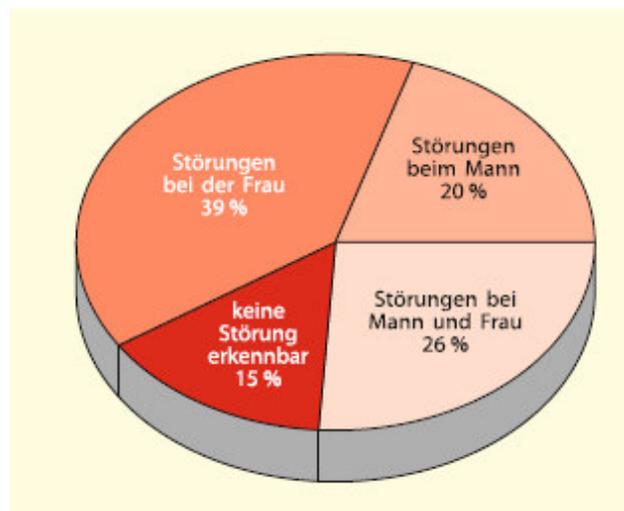


Abb. 1: Verteilung der Ursachen ungewollter Kinderlosigkeit zwischen Mann und Frau
(Nieschlag et al. 2009, S. 6)

Die Folgen der Infertilität finden sich beim Individuum hauptsächlich im psychosozialen Bereich. So zeigen Studien, die sich mit den emotionalen Auswirkungen und langfristigen Folgen der Kinderlosigkeit beschäftigen, dass bei einigen Paaren das Bedauern der Kinderlosigkeit besonders im Alter zunimmt und sich diese negativen Gedanken auf das subjektive Wohlbefinden und somit die Lebensqualität auswirken (Wirtberg et al. 2007).

Es konnte belegt werden, dass die Rate an Depressionen und Angststörungen bei infertilen Paaren signifikant erhöht ist im Vergleich zu Paaren, die ihren Kinderwunsch erfüllen konnten (Shahid 2009).

Eine iranische Studie von Masoumi et al. zeigt, dass annähernd 50% der infertilen Paare an einer zumindest leichten Ausprägung einer Depression leiden (Masoumi et al. 2013).

Auch die Paarbindung scheint häufiger unter unerfülltem Kinderwunsch zu leiden, so berichten infertile Männer über Schuldgefühle gegenüber ihrer Partnerin, sowie eine stärker konfliktbelasteten Partnerschaft (Nachtigall et al. 1992).

Die Folgen der Infertilität sind aber nicht nur für die Lebensqualität der Betroffenen, sondern auch für die Allgemeinheit von Bedeutung. So kann bei einer Prävalenz der Infertilität von 15% bereits von einem gesellschaftlichen Gesundheitsproblem gesprochen werden, mit allen seinen volkswirtschaftlichen Konsequenzen (Masoumi et al. 2013).

Aufgrund der bereits angesprochenen Folgen der Kinderlosigkeit, ist es dringend notwendig, sich mit den Ursachen der Infertilität auseinanderzusetzen.

1.1.1 Männliche Infertilität

Die bisher bekannten Gründe für Infertilität beim Mann sind vielfältig, jedoch ist in bisher 30% der Fälle die Kausalität ungeklärt (Nieschlag et al. 2009, S. 9).

Grob kann man die Ursachen für die männliche Unfruchtbarkeit in Störung der Spermatogenese und in Störungen des Spermientransports unterscheiden.

Störungen der Spermatogenese können beispielsweise auf exogenen Noxen, wie Nikotin, Zytostatika oder Röntgenstrahlung beruhen. Außerdem können genetische Ursachen wie das Klinefelter-Syndrom oder spezifische Mutationen die Spermienbildung negativ beeinflussen. Krankheitsbilder wie der Maldescensus testis, Hodentumoren oder die Varikozele sind ebenfalls mögliche Ursachen, die den Ablauf der Spermatogenese stören können.

Finden sich Störungen im endokrinologischen Bereich, wie beispielsweise eine Hyperprolaktinämie oder ein Mangel an Testosteron, kann es zu Fehlregulationen der Spermatogenese kommen. Trotz der zahlreichen bekannten Ursachen für Infertilität gibt es im Zusammenhang mit Störungen der Spermatogenese einen hohen Anteil an idiopathischen Krankheitsbildern, zu denen noch weiterführende Forschung notwendig ist.

Für Störungen des Spermientransports sind meist Entzündungen der ableitenden Samenwege, welche zur Vernarbungen führen, oder eine retrograde Ejakulation verantwortlich. Desweiteren kann es im Rahmen einer Mukoviszidose zu einer Verschlussazoospermie

kommen. Eine Sonderform ist die beidseitig angeborene Aplasie des Ductus deferens (Müller und Hanhart 2012, S. 394–398).

Neben diesen bekannten Ursachen gilt es weitere, bisher unbekannte Auslöser der Infertilität zu erforschen, da etwa 7% aller Männer im Laufe ihres Lebens mit Problemen der Fertilität konfrontiert werden (Nieschlag et al. 2009, S. 9).

Die Ursachen können auf jeweils unterschiedlicher Ebenen der Spermatogenese eingreifen, weshalb ein grundlegendes Verständnis dieses komplexen Vorgangs notwendig ist.

1.2 Spermatogenese

Die männlichen Keimzellen werden im Epithel der Tubuli seminiferi, welches aus Keimzellen und Sertoli-Zellen aufgebaut ist, gebildet und schließlich nach ihrer Reifung in das Lumen abgegeben. Den Sertoli-Zellen kommen gleich mehrere Aufgaben zu, so sind sie für den Aufbau der Blut-Hoden-Schranke verantwortlich, aber auch für die Bereitstellung von Hormonrezeptoren. Außerdem produzieren die Sertoli-Zellen eine Vielzahl wichtiger Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteine. Für das Keimepithel fungieren sie als Stützgerüst, an dem von basal nach luminal die Keimzellentwicklung stattfindet (Weinbauer 2009, S. 17–19).

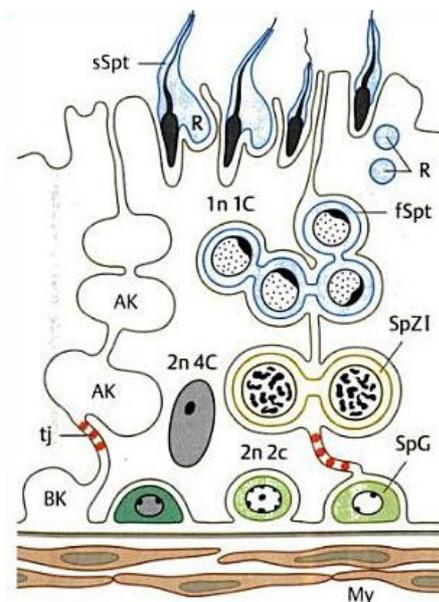


Abb. 20.3 Keimepithel (Schema). Die Sertoli-Zellen (grau) bilden mit Tight junctions (tj) die Blut-Hoden-Schranke, durch die basales und adluminales Kompartiment (BK und AK) voneinander getrennt werden. SpG, Spermatogonien: Stammzelle (dunkelgrün) und proliferierende SpG (hellgrün). SpZ I, Spermatozyten I, durch Zytoplasmabrücke verbunden. Spermatozyten II nicht gezeigt, da wegen der kurzen Verweildauer sehr selten zu finden. fSpt und sSpt, frühe und späte Spermatozoen. fSpt: Zelle und Kern rund, Bildung des Akrosoms (dunkle Kappe) hat begonnen; sSpt: Kern stark kondensiert, überflüssiges Zytoplasma wird abgeworfen und von den Sertoli-Zellen als Residualkörper (R) phagozytiert. My, peritubuläre Myofibroblasten. n und C, s. Abb. 20.4.

Abb.2: Keimepithel; Darstellung der Spermatogenese (Lüllmann-Rauch 2009, S. 470)

Zur Übersicht kann die Spermatogenese in drei Phasen unterteilt werden. Zunächst wird mittels mitotischer Teilung ein Pool an noch teilungsfähiger Spermato gonien geschaffen. Im nächsten Schritt entstehen durch die Meiose haploide Sperm atiden, die nun im letzten Abschnitt, der Spermio genese, zu reifen Spermien differenziert werden müssen (Bergmann 2005, S. 39–45).

Betrachtet man die einzelnen Schritte etwas genauer, so zeigt sich, dass es verschiedene Untergruppen der Spermato gonien gibt. Man unterscheidet die A-Spermato gonien von den B-Spermato gonien, wobei bei der Gruppe der A-Spermato gonien wiederum in teilungsfähige $A_{P(ale)}$ und $A_{D(ark)}$ mit Stammzellfunktion unterteilt werden kann. Aus den A_P -Spermato gonien entwickeln sich durch mitotische Teilung die B-Spermato gonien, die nun in die Meiose eintreten können (Weinbauer 2009, S. 20–23).

Zunächst kommt es in der präleptotänen Phase zur Verdoppelung der DNA, die tetraploiden Keimzellen werden jetzt als Spermatozyten I bezeichnet. Diese durchlaufen die klassischen Phasen der Meiose. Im Leptotän kommt es zur Kondensierung des Chromatins, im Folgenden Zygotän paaren sich die homologen Chromosomen. Im sich anschließenden Pachytän kommt es zur Chiasmabildung mit „Crossing over“. Schließlich kommt es im Diplotän zur ersten meiotischen Reifeteilung und es entstehen durch die Reduktion der Chromatiden die Spermatozyten II, aus denen wiederum durch die zweite Reifeteilung haploide Sperm atiden resultieren. Es folgt die Spermio genese, bei denen die zunächst runden Sperm atiden durch Zellkernkondensation mit der Ausbildung des Spermienkopfes beginnen. Die Kondensation gelingt durch den Ersatz der Histone durch Protamine. Gleichzeitig kommt es zur Akrosombildung in der so genannten Golgi-Phase. Die durch den Golgi-Apparat abgeschnürten Bläschen lagern sich dem kondensierenden Zellkern kappenförmig auf. Nun beginnt die Bildung der Geißel mit Ausgangspunkt bei den Zentriolen. Eine der beiden Zentriolen wächst in Richtung des kondensierten Zellkerns, aus der anderen wachsen Mikrotubuli, was letztlich zur geißelartigen Ausstülpung der Zelloberfläche führt. Zur fertigen Geißel kommt es auf diese Weise erst mit der Freisetzung des Spermiums in das Lumen. Im letzten Schritt der Spermio genese entstehen die Residualkörper durch Abschnürung des überschüssigen Zytoplasmas. Die Residualkörper werden schließlich durch die Sertoli-Zellen phagozytiert (Bergmann 2005, S. 39–45). Im Prozess der Spermiation werden die reifen, elongierten Sperm atiden in das Lumen der Tubuli seminiferi abgegeben und werden dann als Spermien bezeichnet. Bis zu diesem Schritt vergehen etwa 74 Tage, rechnet man die Zeit im Nebenhodengang dazu, so dauert es von der Bildung bis zur Ejakulation eines Spermiums ca. 86 Tage.

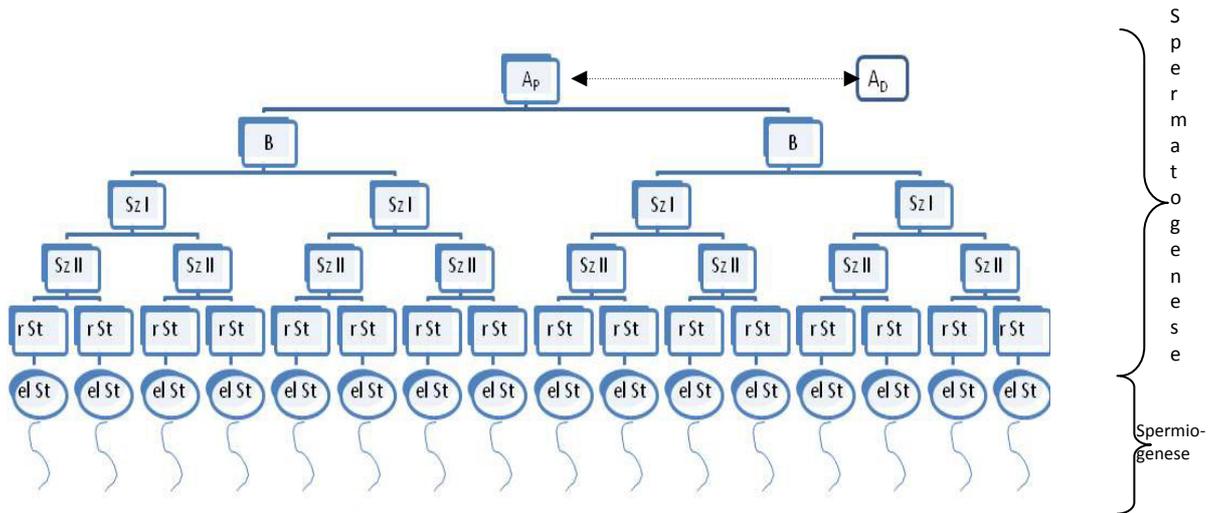


Abb. 3: Ablauf der Spermatogenese (A_p = A_{pale} -Spermatogonie; A_D = A_{dark} -Spermatogonie; B = B -Spermatogonie; $Sz I$ = Spermatozyte I; $Sz II$ = Spermatozyte II; r St= runde Spermatozoen; el St= elongierte Spermatozoen) (modifiziert nach Lüllman-Rauch, Histologie 2006; 466)

Die in der Spermatogenese gereiften, potentiell befruchtungsfähigen Spermien können nun mit Hilfe des Spermioграмms quantifiziert und qualifiziert werden.

1.3 Spermioграмm

Die wohl wichtigste Diagnostik im Rahmen der männlichen Infertilität ist die Anfertigung eines Spermioграмms. Zum Zwecke der Standardisierung wird das Ejakulat nach den Vorgaben des WHO-Laborhandbuchs zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates von 2010 ausgewertet.

Das Ejakulat selbst ist ein Produkt aus den verschiedenen Sekreten von bulbourkavernösen Drüsen, Nebenhoden, Samenblase und Prostata. Zunächst sezernieren die bulbourkavernösen Drüsen eine glykoproteininhaltige Lösung zur Neutralisation und Lubrikation der Urethra. Es folgt die gleichzeitige Kontraktion von Prostata, Nebenhoden und Ductus deferentes, so dass die Spermien auf das Prostatasekret treffen. Die Kontraktion der Samenblase mit Abgabe des Sekrets führt letztlich zur eigentlichen Ejakulation.

Es können verschiedene Fraktionen eingeteilt werden, die präejakulatorische Fraktion, die Vorfraktion, die Hauptfraktion und die Schlußfraktion (Wokalek et al. op. 1995, S. 17–18).

Erst nach Verflüssigung und der damit einhergehenden Durchmischung der Fraktionen ist eine qualitative und quantitative Analyse möglich. Man kann zwischen dem zellulärem Anteil, der etwa 5% ausmacht und dem Seminalplasma unterscheiden (Henkel 1998, S. 26–27).

Für die qualitativ bestmögliche Auswertung ist bei der Probengewinnung eine minimale Karenzzeit von 2 Tagen und eine maximale Karenzzeit von 7 Tagen notwendig. Zeigt sich bei der Analyse ein pathologisches Spermogramm, so wird die Anfertigung eines Kontrollspermogramms nach drei Monaten empfohlen, da es mitunter eine große Variationsbreite der Variablen geben kann. Zeigen sich auch im Kontrollspermogramm diese Variablen außerhalb des Referenzbereichs, so ist von einer eingeschränkten Fertilität auszugehen.

Bei der Analyse werden zunächst Aussehen sowie Konsistenz des Ejakulates und Dauer der Liquifizierung beurteilt. Der Großteil der Proben verflüssigt sich in den ersten 15 Minuten nach Gewinnung. Sollte die Liquifizierung nach 60 Minuten noch nicht abgeschlossen sein, so ist dies im Spermogramm zu vermerken. Die Konsistenz wird mit Hilfe einer Pipette beurteilt. Anschließend wird das Volumen durch Erfassung des Gewichts bestimmt. Bei der Berechnung wird von einer Dichte des Ejakulates von 1g/ml ausgegangen. Die Messung des pH-Werts sollte bis maximal 1 Stunde nach Gewinnung mittels pH-Papier erfolgen.

Für die Beurteilung der Motilität ist die Anfertigung eines Feuchtpräparates notwendig. Unter dem Mikroskop können nun der Grad der Agglutination und die Motilität klassifiziert werden. Man unterscheidet Progressive Motilität (PR), also Spermien, die sich aktiv vorwärts bewegen von Nichtprogressive Motilität (NP) und Immotilität. Unter Nichtprogressiver Motilität versteht man Spermien, bei denen eine Bewegung erkennbar ist, beispielsweise Schwanzbewegung, aber keine Strecke zurückgelegt werden kann. Bei der Immotilität kann keinerlei Bewegung verzeichnet werden.

Auf die Vitalität der Spermien kann durch die Bestimmung der Zellmembranintaktheit geschlossen werden. Durch die Eosin-Färbung wird die Zellmembran vitaler Spermien angefärbt und so kann der prozentuale Anteil vitaler und avitaler Spermien beurteilt werden. Die Spermienanzahl selbst wird mittels Mikroskop unter Verwendung von Zählkammern bestimmt und hochgerechnet. Um eine Aussage über die Morphologie der Spermien treffen zu können, wird eine Anfärbung nach Papanicolaou vorgenommen, und nach bestimmten Kriterien analysiert.

Im Anschluss an die Bestimmung dieser Variablen können bei entsprechender Indikation diverse Tests durchgeführt werden. Hierzu zählen beispielsweise die Bestimmung der Peroxidase-positiven Zellen zur Quantifizierung von Granulozyten bei Verdacht auf Entzündung oder der Immunobeadtest zum Nachweis von Antikörpern (Nieschlag et al. 2012, S. 12–60).

Tab.1 :Untere Grenze mit Konfidenzintervall für Ejakulatvariablen nach WHO Laborhandbuch

Variablen (Einheit)	Unterer Grenzwert (95%Konfidenzintervalle)
Volumen der Samenflüssigkeit (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Gesamtpermienzahl (10 ⁶ pro Ejakulat)	39 (33-46)
Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Gesamtmotilität (progressiv und nichtprogressiv, %)	40 (38-42)
Progressive Motilität (%)	32 (31-34)
Vitalität (lebende Spermatozoen, %)	58 (55-63)
Spermienmorphologie (normale Form,%)	4 (3,0-4,0)
Andere Grenzwerte nach Konsensus	
pH	≥ 7,2

Anhand der in der Tabelle aufgeführten Grenzwerte der Ejakulatvariablen können die Abweichungen entsprechend der Nomenklatur des WHO Laborhandbuchs von 2010 beschrieben werden.

Folgende Tabelle gibt eine Auswahl der häufigsten Diagnosen:

Tab. 2: Übersicht der häufigsten Diagnosen nach WHO-Laborhandbuch 2010

Asthenozoospermie	Prozentanteil der progressiv-motilen Spermien unterhalb des Referenzwertes
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Ejakulat (Grenze der Quantifizierungsmethode)
Oligozoospermie	Gesamtzahl der Spermatozoen unterhalb des Referenzwertes
Teratozoospermie	Prozentanteil der morphologisch normalen Spermatozoen unterhalb des Referenzwertes
Hypospermie	Ejakulatvolumen unterhalb des Referenzwertes
Oligoasthenozoospermie	Gesamtzahl und Prozentanteil von progressiv-motilen Spermatozoen

	unterhalb des Referenzwertes
Oligoasthenoteratozoospermie	Gesamtzahl und Prozentanteil von sowohl progressiv-motilen als auch morphologisch normalen Spermatozoen unterhalb des jeweiligen Referenzwertes

Von Normozoospermie wird gesprochen, wenn die Werte bezüglich Motilität, Anzahl und Morphologie gleich oder größer der angegebenen Referenzwerte sind.

Bei der Reifung und Entwicklung der Spermien spielen viele, teilweise bisher nur wenig untersuchte Proteine eine entscheidende Rolle. Hierzu werden auch Mitglieder der Argonaute-Proteinfamilie gezählt.

1.4 Die Argonaute-Proteinfamilie

Bei der Argonaute-Familie handelt es sich um eine Gruppe hochkonservierter Proteine. Wichtigstes Strukturmerkmal sind zwei unterschiedlichen Domänen, die PIWI-Domäne und die PAZ-Domäne, der sowohl eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion zugesprochen wird, als auch in der Vermittlung von Homo- und Heterodimerisation.

Argonaute-Proteine wurden anhand ihres Vorkommens lange Zeit in zwei Subklassen eingeteilt. Man unterschied diejenigen, die mit dem in *Arabidopsis* vorkommenden Protein AGO1 strukturelle Ähnlichkeit haben und diejenigen, die eher Ähnlichkeit mit dem bei *Drosophila* vorkommenden PIWI-Proteinen aufweisen (Carmell et al. 2002). Im Laufe der Jahre konnte eine weitere Gruppe der Argonaute-Proteinfamilie beschrieben werden, so dass es aktuell drei identifizierte Subfamilien gibt. Die AGO Subfamilie kommt in Tieren, Pflanzen und Hefen vor und ist an transkriptionellen und posttranskriptionellen Silencing-Mechanismen beteiligt. Die PIWI-Subfamilie konnte bis jetzt bei Tieren nachgewiesen werden und interagiert mit piRNA in der Keimzellentwicklung. Die dritte Subfamilie ist die WAGO, auch Gruppe III Argonauten genannt, sie kommt bei Würmern vor (Faehnle und Joshua-Tor 2007).

Dies bestätigte sich auch in den folgenden Jahren, so konnten in *Caenorhabditis elegans* 26 verschiedene existierende Argonaute-Gene und darunter der dritte Stamm, der als WAGO bekannt ist, nachgewiesen werden (Meister 2013). Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht zu bisher bekannten Mitgliedern der Argonaute-Proteinfamilie.

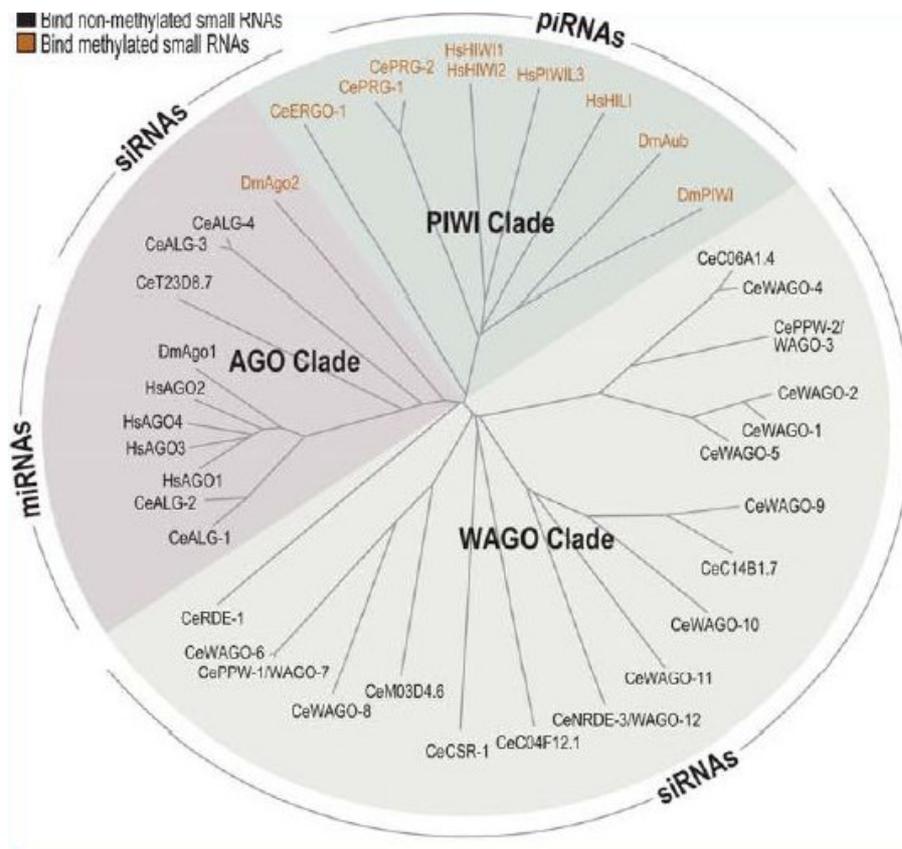


Abb.4: Stammbaum der Argonauteproteine (Montgomery et al. 2012)

Kürzlich wurde die Struktur des menschlichen AGO2 publiziert und es konnte gezeigt werden, dass diese Struktur extrem ähnlich zu der bereits bekannten Struktur der Argonaute-Proteine von Bakterien ist. Dies unterstreicht den hohen Grad der Konservierung der sRNA Signalwege. (Meister 2013)

Die Argonaute-Proteine sind elementarer Bestandteil des RNA-induced silencing complex (RISC) und spielen so eine Hauptrolle bei der Stilllegung von Genen im Rahmen der RNA-Interferenz. Die Stilllegung von Genen durch Argonaute-Proteine kann durchgeführt werden, indem die Ziel-RNA abgebaut wird, hierzu wird die RNase-H ähnliche Domäne der Argonaute-Proteine verwendet. Außerdem führt zur Stilllegung der Gene die Unterdrückung der Translation und die Verstärkung der Chromatinmodifikation. Generell benötigen Argonaute-Proteine, um ihre Funktion an der Ziel-RNA ausführen zu können, Kofaktoren (Luteijn und Ketting 2013). Zu diesen Kofaktoren zählen RNA-bindende Proteine (TRBP; dFXR), RNase III Enzyme (Dicer), Helikasen (MOV10; Gemin2 und 3), Einzelstrang-bindende Proteine (TNRC6B) und die Arginin-Methyltransferase PRMT5.

Im Rahmen der Keimzellentwicklung ist es die Untergruppe der PIWI-Proteine, denen diesbezüglich eine wichtige Rolle zugeschrieben wird.

1.4.1 Die Piwi-Proteine

Piwi steht für P-element induced wimpy testis und wird in der embryonalen Gonadenanlage exprimiert, dort spielt das Protein eine Rolle in der Keimzellentwicklung wie der Oogenese, außerdem werden Piwi-Proteine zur Selbsterneuerung und Teilung der Stammzellen aus der Keimbahn benötigt (Carmell et al. 2002). Im Rahmen der RNA-Interferenz haben Piwi-Proteine die Aufgabe der Regulation von Transposons. Diese Elemente haben die Fähigkeit sich innerhalb des Genoms zu bewegen, sich zu vermehren und an neue Positionen zu setzen. Sie stellen auf diese Weise eine enorme Gefahr für die genomische Stabilität des Organismus dar. Es konnte in den meisten Tierstudien gezeigt werden, dass Piwi-Proteine transposable Elemente unterdrücken (Luteijn und Ketting 2013).

Im Folgenden soll der Mechanismus der RNA-Interferenz genauer erläutert werden.

1.5 RNA-Interferenz

Es wird angenommen, dass der Mechanismus der RNA-Interferenz ursprünglich zu den antiviralen Abwehrmechanismen zählt, durch den die Transkription der Transposons auf ein niedriges Level gebracht wird (Cerutti et al. 2000).

Heute ist bekannt, dass kleine, nichtkodierende RNAs mit ihren zugehörigen Proteinen die Transkription von mindestens 30% der menschlichen Gene regulieren (Lewis et al. 2005).

Auf diese Weise werden lebenswichtige Prozesse wie Zellwachstum, Gewebendifferenzierung oder Zellproliferation koordiniert. Auf der anderen Seite ist eine Fehlfunktion der RNA-Interferenz mit einer Vielzahl von kardiovaskulären, neurologischen oder onkologischen Erkrankungen assoziiert (Wilson und Doudna 2013).

Zusammengefasst kann man sagen, dass RNA-Interferenz und die verwandten Phänomene evolutionär konservierte Mechanismen sind, die den Organismus sowohl vor exogener (z.B. Virus) als auch vor endogener (z.B. mobile genetische Elemente) Invasion durch genetische Parasiten schützen (Bernstein et al. 2001). Es sind im Wesentlichen die zwei genannten Genfamilien, die bei der RNA-Interferenz eine Rolle spielen, die Dicer-Familie, ein Mitglied der Ribonuclease III Familie und die Argonaute-Proteinfamilie (Carmell et al. 2002).

Das Prinzip der RNA-Interferenz besteht im Abbau der mRNA, so dass letztlich die Translation verhindert wird und das Gen stillgelegt ist. Der Abbau der mRNA geschieht in Komplexen, dem RNA-induced silencing complex (RISC), der im Wesentlichen aus Argonaute-Proteinen und kleinen, nichtkodierenden RNA-Abschnitten, den sRNAs besteht. Es gibt drei große Gruppen

von sRNA: Die small interfering RNA (siRNA), die microRNA (miRNA) und die Piwi-interacting RNA (piRNA).

Der entscheidende Schritt bei der RNA-Interferenz ist die Zerkleinerung der mRNA durch siRNA gesteuerte Endonukleasen. Es konnte gezeigt werden, dass das Argonaute -Protein innerhalb des RISC sowohl die sRNA:mRNA-Bindung katalysiert als auch die mRNA schneidet (Faehnle und Joshua-Tor 2007).

Das Herz des RISC sind die bereits genannten Argonaute-Proteine. Beim Menschen existieren 8 Formen dieser Proteine, wobei vier dem AGO-Stamm (AGO1-4) und vier dem PIWI-Stamm (PIWI1-4) angehören. Damit die RNA-Interferenz ablaufen kann, müssen zunächst die nötigen sRNAs produziert werden. Die siRNAs und miRNAs, welche ca. 20-30 nt lang sind, stammen von doppelsträngigen RNA-Vorläufern (dsRNA), als Transkriptionsprodukt von sense und anti-sense DNA-Strängen, sowie von Pseudogenen und Repeat-Sequenzen. Die siRNAs werden schließlich durch Dicer, ein Enzym der Ribonuclease III- Familie produziert. Dicer schafft einen Überhang von 2 Nukleotiden am 3'-Ende und es wird eine Phosphatgruppe am 5'-Ende angehängen. Die miRNAs werden hauptsächlich von der RNA-Polymerase II zunächst als primäre miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Im Zellkern wird anschließend durch das RNase III-Enzym Drosha die pre-miRNA hergestellt, ein kleines RNA-Fragment, welches eine Haarnadel-Sequenz beinhaltet und insgesamt etwa 65-70 Nucleotide lang ist. Im Zytoplasma entsteht schließlich durch Dicer die miRNA mit einer Länge von 22 nt. Nach der Biogenese der sRNAs schließt sich nun die Assoziation der RNA-Fragmente mit den Proteinen der entsprechenden Argonaute-Familie an (Gomes et al. 2013). Nicht jedes AGO-Protein besitzt die Fähigkeit zum Schneiden, nur AGO2 ist in der Lage die durch siRNA induzierte Genstilllegung durchzuführen. AGO2 hat drei funktionelle Domänen, die PIWI-Argonaute-Zwille (PAZ)- Domäne, die MID (middle)- und die PIWI-Domäne. Die PIWI-Domäne besitzt eine RNase H-Falte, die eine Slicer-Aktivität beinhaltet zum Schneiden von RNA. Die 5'-Monophosphat-Gruppe des Führungsstrangs liegt zwischen der MID und der PIWI-Domäne und ist an ein Magnesium-Ion gebunden. Unterdessen erkennt die PAZ-Domäne den 3'-Überhang des Führungsstrangs. Auf diese Weise präsentiert sich der Führungsstrang so, dass zwischen 2nt und 8 nt die komplementäre Ziel-mRNA zur Basenpaarung gebunden werden kann. Die nächste Basenpaarung findet bei 10nt-11nt statt, dort kommt die PIWI-Domäne ihrer Slicer-Funktion nach und schneidet die mRNA. (Deng et al. 2014)

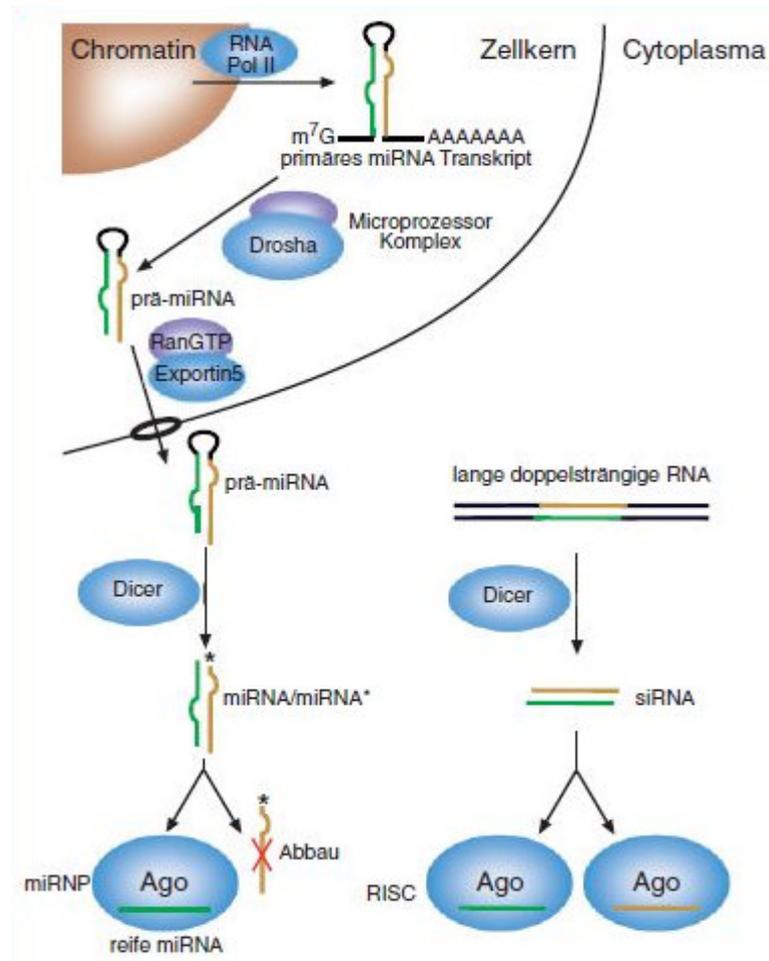


Abb.5 : Schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs und siRNAs (Peters und Meister 2006)

Die Biogenese der piRNA unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der siRNA oder miRNA-Biogenese. PiRNAs haben eine Länge von 24-30 nt und spielen eine Rolle in der Spermatogenese, sie finden sich in der pachytänen Phase von Spermatozyten und in runden Spermatischen. Diese Form der sRNAs interagiert mit der Argonaute-Subfamilie der PIWI-Proteine (Bak et al. 2011). PiRNAs sind länger, als die an Argonaute-Proteine gebundene siRNAs oder miRNAs und benötigen einzelsträngige RNA als Vorläufer. Sie leiten sich hauptsächlich von repetitiven genomischen Elementen wie Transposons oder Satelliten ab, den piRNA-Clustern (Luteijn und Ketting 2013).

Die Mehrheit der piRNAs ist komplementär zu den Transkriptionsprodukten der aktiven Transposons, mit denen sie eine Bindung eingehen können. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Dicer bei Fliegen keinerlei Auswirkung auf die piRNA oder die Expression der Transposons hat, daher wurde postuliert, dass piRNAs in Drosophila einen alternativen Signalweg haben müssen (Faehnle und Joshua-Tor 2007).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Biogenese der piRNAs unabhängig von Dicer ist. Bisher sind zwei wesentliche Signalwege der piRNA-Produktion bekannt, der primäre und der sekundäre Weg. Zunächst wird primäre piRNA transkribiert, die dann in einem Amplifizierungszyklus, dem ping-pong-loop vervielfältigt wird.

Im primären Weg werden die piRNAs aus genetischen Regionen, den piRNA Clustern generiert. In Drosophila werden diese Regionen in lange einzelsträngige Vorläufer-RNAs transkribiert und dann durch das Enzym Zucchini (Zuc) in kleinere Fragmente geschnitten. Diese Fragmente werden anschließend mit der Hilfe von Shutdown (Shu) und Hitzeschock-Protein 83 (Hsp 83) in PIWI oder Aubergine (Aub) aufgenommen. Nun wird das 3'-Ende durch ein bisher unbekanntes Enzym, welches Trimmer genannt wird, gekürzt. Zum Abschluss des primären Weges findet eine Methylierung des 3'-Endes durch Hen1 statt.

Im sekundären Weg erkennt, bindet und schneidet Aub das zu kontrollierende Transkriptionsprodukt eines Transposons. Das entstandene Fragment kann nun von dem Protein Argonaute 3 (Ago3) mit der Hilfe von Shu gebunden werden. Wie schon im primären Weg, folgt die Kürzung des 3'-Endes durch Trimmer und die Methylierung durch Hen1. Im Anschluss daran kann nun ein Transkriptionsprodukt aus dem piRNA Cluster in antisense-Richtung gebunden werden. Durch die Slicer-Funktion wird der neu gebundene Strang geschnitten. Das aus dem antisense -Strang entstandene Fragment wird von Aub gebunden und nach Kürzung und Methylierung kann erneut ein sense-Transkriptionsprodukt eines Transposons gebunden werden und der Amplifizierungszyklus beginnt von vorne (Luteijn und Ketting 2013).

Die entstandene piRNA trägt für gewöhnlich ein Uridin sowie ein Monophosphat am 5'-Ende und das Nukleotid am 3'-Ende besitzt eine 2'-O-Methylierung (Gomes et al. 2013).

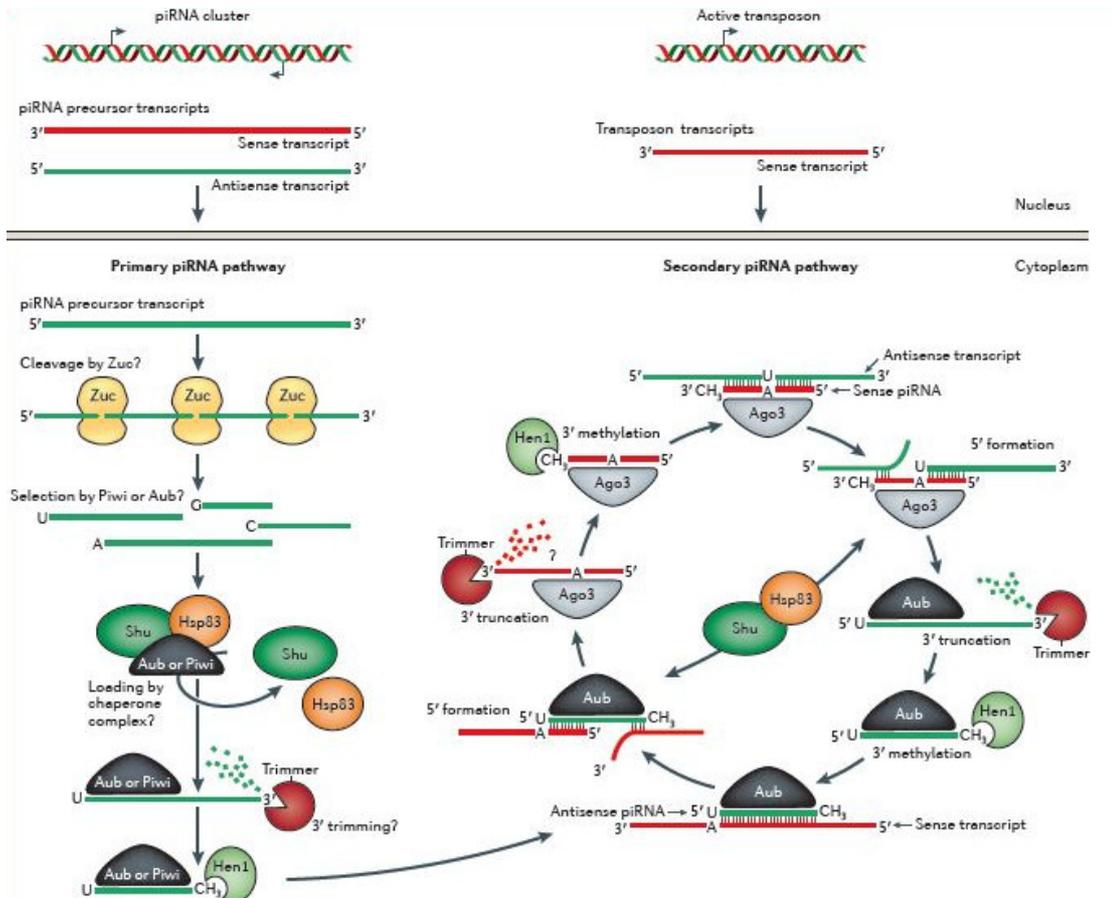


Abb.6: Biogenese der piRNA (Luteijn und Ketting 2013)

Die entstandene piRNA kann nun wie bereits oben beschrieben, im Rahmen der RNA-Interferenz gemeinsam mit PIWI-Proteinen zur Gen-Stilllegung beitragen, indem die mRNA zerschnitten und abgebaut wird.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Piwi-Proteine für die menschliche Spermatogenese darzustellen. Insbesondere sollte ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression der Gene Piwi-like1 und Piwi-like 3 in ejakulierten Spermien und den Spermioogrammvariablen hergestellt werden. Hierzu wurden die Ejakulatproben von insgesamt 97 Probanden hinsichtlich ihrer mRNA-Expression von Piwi-like 1 und Piwi-like3 untersucht. Die Kohorte setzte sich aus 51 Probanden mit normwertigen Variablen und 46 Probanden mit Spermioogrammvariablen außerhalb des Referenzbereichs zusammen.

Es sollte untersucht werden, ob ein höheres Level der Genexpression von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 mit bestimmten Einschränkungen der Spermienqualität assoziiert ist. Hinweise darauf wurden bereits in Experimenten an der Maus gezeigt. Um Beobachtungen zu unterstützen wurde auch das Level der Genexpression von Piwi-like1 und Piwi-like 3 der Probanden mit normwertigen Spermioogrammvariablen untersucht. Sollte die Genexpression tatsächlich einen Einfluss auf die Spermioogrammvariablen haben, so müsste das Level der Genexpression von den Probanden mit auffälligen Spermioogrammvariablen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Probanden mit normwertigen Variablen aufweisen.

Es wurde mittels Real-Time-PCR die mRNA-Expression der Gene Piwi-like 1 und Piwi-like3 ermittelt und dann mit den einzelnen Spermioogrammvariablen korreliert um einen eventuell vorhandenen signifikanten Zusammenhang zu erkennen.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten PGI4-Vektoren mit den Promotorstellen von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 hergestellt werden und auf die Induzierbarkeit durch Testosteron und Dihydrotestosteron untersucht werden.

Die Untersuchungen könnten dazu beitragen die Ursachen von männlicher Infertilität bzw. Subfertilität besser verstehen zu können. Gerade im Bereich der idiopathischen Infertilität könnte diese Arbeit helfen neue Ansätze zu finden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenproben

Die Untersuchungen wurden mit Ejakulatproben von Patienten sowie freiwilligen Spendern durchgeführt. Die Patienten stammen aus der andrologischen Sprechstunde beziehungsweise der Kinderwunschsprechstunde des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Eine schriftliche Genehmigung des Forschungsvorhabens durch die Ethik-Kommission der MLU Halle lag zu Beginn der Studie vor (s. Anhang). Jeder Spender wurde ärztlich über die Studie aufgeklärt und willigte schriftlich zur Bereitstellung seines Ejakulats ein.

Die Spermioogramme wurden zum Teil im Andrologie Labor oder im IVF-Labor angefertigt. Die Spermioogramme wurden nach den aktuellen Leitlinien der WHO ausgewertet (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th edition, 2010).

Die Probandenproben wurden je nach Spermioogramm in Fallgruppe (abnormales Spermioogramm nach WHO 2010 Kriterien) und Kontrollgruppe (normales Spermioogramm nach WHO 2010 Kriterien) eingeteilt.

Befanden sich eine oder mehrere der folgenden Variablen außerhalb des Referenzbereichs, so galt dies als Einschlusskriterium für die Fallgruppe:

Tab. 3: Untere Grenze mit Konfidenzintervall für Ejakulatvariablen nach WHO Laborhandbuch

Variablen (Einheit)	Unterer Grenzwert (95%Konfidenzintervalle)
Volumen der Samenflüssigkeit (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Gesamtpermienzahl (10^6 pro Ejakulat)	39 (33-46)
Spermienkonzentration (10^6 /ml)	15 (12-16)
Gesamtmotilität (progressiv und nichtprogressiv, %)	40 (38-42)
Progressive Motilität (%)	32 (31-34)
Vitalität (lebende Spermatozoen, %)	58 (55-63)
Spermienmorphologie (normale Form,%)	4 (3,0-4,0)
Andere Grenzwerte nach Konsensus	
pH	$\geq 7,2$

Es wurden 46 Ejakulatproben für die Fallgruppe und 51 Ejakulatproben für die Kontrollgruppe untersucht.

Es wurden folgende Daten von den Probanden erfasst: Karenzzeit, Ejakulatvolumen, Ejakulataussehen, Konsistenz, pH-Wert, Spermienkonzentration/ml und Gesamtspermienanzahl, Motilität nach WHO a+b, c und d, Vitalität bzw. Eosintest und Morphologie (Normalform, Kopfdefekte, Mittelstückdefekte, Schwanzmittelstückdefekte)

Nach Erhalt des frischen Ejakulats wurde es zunächst für 5 Minuten bei 4.000 U/Min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, das Seminalplasma vom Spermienpellet getrennt und sowohl Seminalplasma als auch Pellet bei -80°C gelagert. Die zugehörigen Patientendaten und Spermioogramme wurden pseudonymisiert und in einer Forschungsdatei erfasst.

Für die Amplifizierung und Sequenzierung der Promotorregionen von Piwi-like 1 und Piwi-like3 wurde DNA von freiwilligen und anonymen Spendern verwendet.

3.1.2 Chemikalien

Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem (Darmstadt)
Borsäure	AppliChem (Darmstadt)
5- Bromo-4-chloro-3-indoyl β -D-galactopyranoside (X-Gal)	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
Desoxychololat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dihydrotestosteron	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
100bp DNA Ladder	Invitrogen (Carlsbad)
dNTP	Bioline (Luckenwalde)

EDTA (Darmstadt)	AppliChem
EGTA	AppliChem (Darmstadt)
Effectene Transfektionsreagenz	(Qiagen, Hilden)
Essigsäure	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ficoll 400	AppliChem (Darmstadt)
Firefly-Luciferase-Substrat	Promega (Heidelberg)
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories (Cölbe)
Gel Pilot Loading Dye, 5x	Qiagen (Hilden)
LB-Agar (Lennox L Agar) für Agarplatten	Invitrogen (Carlsbad)
MgCl ₂	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
Na-Acetat	AppliChem (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Cölbe)
2-Propanol (Isopropanol)	AppliChem (Darmstadt)
RPMI-1640-Medium	Lonza (Basel, Schweiz)
Testosteron	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Tris-HCl	AppliChem (Darmstadt)
Triton X	AppliChem (Darmstadt)
Trizol	Invitrogen (Carlsbad)
Wasser für die Molekularbiologie (Karlsruhe)	Roth

3.1.3 Kits

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Epicentre MasterPure DNA Purification Kit	Epicentre (Madison, USA)
HotStarTaq DNA Polymerase 250 unit	Qiagen (Hilden)
The Original TA Cloning Kit (pCR 2.1 Vektor)	Invitrogen (Carlsbad)
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNAse-free DNase Set	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Maxima SyBr Green Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.1.4 Puffer, Medien, Lösungen

TBE (10x) Puffer :	108g Tris
	55g Borsäure
	40ml 0,5 M EDTA
	mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen
LB-Medium (Lenox L Broth Base):	20 g LB in 1l Aqua bidest lösen und autoklavieren
RIPA- Puffer:	50mM (pH 7,4) Tris-HCl
	200mM NaCl
	1mM EDTA
	1mM EGTA
	1% TritonX-100
	0,25% Desoxycholot

3.1.5 Primer und Enzyme

Enzym	Restriktionsschnittstellen	Hersteller
Xho I	5`-...G/TCG AC...-3` 3`-...CAG CT/ C... -5`	Fermentas (St. Leon-Rot)

Taq-Polymerase (Hot StarTaq DNA Polymerase) Qiagen (Hilden)

T4 DNA Ligase

DNase Qiagen (Hilden)

PCR-Primer:

Primer	Sequenz	Hersteller
Piwil1 fw (a)	5` -AAA CTC GAG TGG TGC AGA GGC GAC CCT ATT TC-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piwil1 fw (b)	5` -AAA CTC GAG TGG TTC CCT CAG TGG ATG CTT AC-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piwil1 rev	5` -AAA CTC GAG TGG TAC GCC ATA CGC CCA GTA AC-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piwil3 fw (a)	5` -AAA CTC GAG TGG GAC CTA AGG GAC ATC CAA AG-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piwil3 fw (b)	5` -AAA CTC GAG TGG TCC CAA ATG CTG GGA TTA CG-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piwil3 rev	5` -AAA CTC GAG TGG GGA ACT AAC ACT GGC TAC AC-3`	Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.6 Bakterienstämme und Vektoren

pGL4.10(luc2)Vector Promega (Heidelberg)

pCR 2.1 Vektor (3929bp) Invitrogen(Carlsbad)

TOP 10 E. coli- Zellen Invitrogen(Carlsbad)

3.1.7 Geräte

Brutschrank IG750	Jouan (Unterhaching)
Eppendorf Tubes	Eppendorf (Hamburg)
Einweg-Handschuhe	Sempermed (Wien, Österreich)
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gelelektrophoresekammern	Peqlab (Erlangen)
Inkubator mit Rüttelplatte	Heidolph (Kehlheim)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikrowelle	Siemens (München)
Mini- Tischzentrifuge sprout	Kisker (Steinfurt)
Parafilm	Pechiney Plastic Packing (Menasha, USA)
Pipetboy comfort	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten eppendorf research	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one (Kremsmünster)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Plattenreader Genios	Tecan (Gröding, Österreich)
Real-Time PCR-Cycler MyiQ	Bio-Rad (München)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipette	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Styroporboxen (Epracks)	NeoLab (Heidelberg)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)

Tiefkühlschrank (-20°C)	Sanyo (München)
Tiefkühlschrank (-80°C) Revco	Thermo Fisher Scientific (Asheville, USA)
Timer	Roth (Karlsruhe)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Tubes 50ml	Greiner bio-one (Kremsmünster)
UV-Tisch	Kaiser (Buchen)
Video Copy Prozessor	Mitsubishi (Hong Kong, China)
Vortex- Schüttler	Velp (Usmate, Italien)
Waage	Kern (Balingen- Frommern)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Megafuge	Heraeus (Hanau)

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchung von mRNA

3.2.1.1 RNA- Isolation

Aus den Ejakulatproben wurde die RNA mithilfe der Phenol/Chloroform Methode isoliert. Hierbei handelt es sich um die Single-Step Methode nach Chomczynski und Sacchi von 1987. Dieses Verfahren wurde gewählt, da hierbei auch sehr kleine RNAs, wie miRNA, für spätere Anwendungen isoliert werden können. Das Pellet, welches zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren war, wurde aufgetaut und in 1 ml Trizol aufgenommen. Dadurch wurden Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Nach dem Vortexen der Probe wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, was zur Ausfällung der Proteine führte. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 12.000 U/Minute und 4°C zentrifugiert, woraufhin es zur Phasenbildung kam. In der unteren Phase und in der Zwischenphase befanden sich die Proteine, in der Zwischenphase die DNA und die obere, wässrige Phase enthielt die RNA. Die wässrige Phase wurde von der Proteinphase getrennt und es wurden 50 µl RDD- Puffer und 5 µl DNase zugegeben, um DNA-freie RNA zu erhalten. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden 500 µl von 96%igen Ethanol zugesetzt und die Probe wurde anschließend über Nacht bei -20°C inkubiert. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die RNA-Präzipitation. Am nächsten Tag wurde erneut bei 12.000 U/Min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 96%igen Ethanol gewaschen. Es folgte wiederholt eine Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen, der Überstand wurde verworfen und anschließend wurde eine zweite Waschung diesmal mit 700 µl 70%igen Ethanol durchgeführt. Die Probe wurde für 10 Minuten zentrifugiert mit 8.000U/Min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Trocknung in 20 µl H₂O gelöst.

3.2.1.2 Konzentrationsbestimmungen der RNA

Die Konzentration an RNA wurde mittels Absorbtionsspektrometrie ermittelt. Zunächst wurde die Probe verdünnt (2 µl RNA-Lösung+ 98 µlH₂O) und in eine Küvette gefüllt.

Die Konzentration wurde folgendermaßen ermittelt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

OD₂₆₀ = Absorption bei 260nm Wellenlänge

V= Verdünnungsfaktor (2:98 Verdünnung → Verdünnungsfaktor: 50)

F= Multiplikationsfaktor; liegt für RNA bei 40 (OD₂₆₀ = 40,0 µg/ml RNA)

Die Proben wurden gegen einen Leerwert gemessen. Die Proteinkontamination bzw. die Reinheit der Probe konnte mittels des R-Werts erfasst werden.

R-Wert= OD₂₆₀ / OD₂₈₀

Von einer akzeptablen Reinheit spricht man, wenn der R-Wert zwischen 1,6 und 2,0 liegt.

3.2.1.3 cDNA-Synthese

Als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-time PCR wird cDNA benötigt, die aus der bereits isolierten RNA hergestellt wurde.

Zunächst wurde ein Pre-Annealing- Mix hergestellt. Dieser bestand aus RNA, Random-Primer und H₂O. Random-Primer haben den Vorteil, dass sie zufällig an beliebige Stellen der RNA hybridisieren, so dass am Ende alle RNA-Transkripte in der cDNA vertreten sind.

Die eingesetzte Menge an RNA wurde über folgende Formel berechnet:

$$v_x = m_x / c_A \quad ; \quad m_x = 2000 \text{ ng} \quad ; \quad c_A = \text{jeweiliger am Photometer gemessener Wert}$$

Die Tubes wurden für 5 Minuten bei 65°C inkubiert um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen und die Primer zu hybridisieren. Das Programm wurde pausiert und die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die eigentliche Synthese wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Menge	Substanz
4 µl	Puffer
2 µl	dNTPS
2 µl	RNase –Inhibitor
1 µl	Reverse Transkriptase (M-MuLV)
9 µl	Reaktionsansatz

Bei der Reversen Transkriptase aus dem Moloney murine Leukemia Virus handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Der Pre-Annealing-Mix wurde nach Abkühlung auf Raumtemperatur zum Reaktionsansatz gegeben und die Tubes wurden erneut im Thermo-Cycler inkubiert.

Es wurde folgendes Programm gewählt:

1. 65°C 5 Minuten (dann Pausieren und Zugabe des Reaktionsansatzes)
2. 25°C 10 Minuten
3. 42°C 60 Minuten
4. 75°C 5 Minuten

3.2.1.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Quantitative real-time PCRs wurden durchgeführt, um eine Aussage über das Expressionsniveau von Piwi-like 1 bzw. 3 treffen zu können und um eventuelle Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Probanden feststellen zu können.

Die herkömmliche PCR dient der Amplifizierung von DNA. Hierbei wird zunächst die DNA denaturiert, damit sich im zweiten Schritt Primer anlagern können für die Synthese des Tochterstrangs. Um eine große Vervielfältigung zu erreichen, wird dieser Zyklus mehrfach wiederholt.

Die qRT-PCR detektiert die synthetisierte DNA-Menge im Zeitverlauf. Dies funktioniert über fluoreszierendes Licht, welches über Detektoren wahrgenommen wird. Um spezifische Aussagen treffen zu können wird das TaqMan-Prinzip angewendet. Es handelt sich um eine spezielle Sonde, die an ihrem 5'Ende einen Rezeptorfarbstoff und an ihrem 3' Ende einen Quencher zur Fluoreszenzunterdrückung trägt. Die TaqMan-Sonde bindet an einzelsträngige cDNA und wird im Laufe der Amplifizierung von der 5'-3'-Nuklease-Aktivität abgebaut. Dies führt zur räumlichen Trennung von Reporterfarbstoff und Quencher und somit zur Fluoreszenz, welche über Detektoren gemessen wird.

Die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über dem Hintergrund erscheint, wird als Threshold-Cycle (C_T) bzw. Schwellenwert festgelegt.

Für die PCR war folgender Reaktionsansatz nötig:

Menge	Substanz
9 µl	H ₂ O
1,5 µl	Puffer
1,2 µl	MgCl ₂
1,0 µl	dNTPs
2x 0,5 µl	TaqMan Primer (fw+rev)
0,3 µl	Taq Polymerase
14 µl	Reaktionsansatz

Es wurde folgendes Programm gewählt:

1. 95°C 15 Minuten
2. 45 Repeats von:
 - 45°C 0,30 Minuten
 - 60°C 1 Minute

Zur Quantifizierung wurde als Standard das House-keeping Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) mitgeführt. Es wurden die C_T-Werte von HPRT und Piwil1 und Piwil3 mittels $\Delta\Delta$ CT-Methode in Relation gesetzt.

3.2.2 Herstellung eines pGL4-Vektors mit Promotorregionen von Piwil1 und Piwil3

3.2.2.1 PCR

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt. Die DNA stammt aus Blut von freiwilligen Spendern, welche zunächst mithilfe der PCR amplifiziert wurde.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Menge	Substanz
9,1 µl	H ₂ O
1,5 µl	10x Puffer
1,2 µl	MgCl ₂
1,0 µl	dNTPs
1,0 µl (2x 0,5 µl)	Primer (fw+rev)
0,2 µl	Taq-Polymerase
14 µl	Reaktionsansatz

Es wurden vier verschiedene Primerkombinationen gewählt.

1. P1 fw (a) + P1 rev
2. P1 fw (b) + P1 rev
3. P3 fw (a) + P3 rev
4. P3 fw (b) + P3 rev

Zusätzlich wurde die PCR in einem Gradienten-Cycler durchgeführt, bei dem gleichzeitig verschiedene Temperaturen für die Primer liefen und so die optimale Annealing-Temperatur ermittelt werden konnte. Für jede Primerkombination wurden fünf verschiedene Temperaturen getestet: 60°C; 61,7°C; 64,3°C; 66°C und 68,5°C

3.2.2.2 Gelelektrophorese

Zunächst wurde ein Gel hergestellt, indem 0,7 g Agarose und 70ml TBE (10x)- Puffer gemischt und in der Mikrowelle erhitzt wurden. Nach Abkühlen des noch flüssigen Gels wurde 2 µl GelStar zugegeben um die DNA per Fluoreszenz sichtbar machen zu können.

Das Gel wurde in die mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen und nach Festwerden des Gels wurde die komplette Kammer mit TBE- Puffer aufgefüllt und die Proben inklusive Ladepuffer aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurden ein Leerwert und ein Marker aufgetragen. Der Marker war ein 100bp DNA-Ladder. Die Gelkammer wurde bei 110 V und 80mA für eine Stunde angeschlossen.

Die Auswertung erfolgte unter einer UV-Lampe.

3.2.2.3 Gel-Extraktionen

Mit Hilfe eines Skalpell wurden die Banden des PCR-Produkts bei den entsprechenden Basenpaaren aus dem Gel ausgeschnitten. Die Basenpaar-Längen für die Primer sind:

P1a-rev: 1200 bp

P1b-rev: 1900 bp

P3a-rev: 1890 bp

P3b-rev: 2000 bp

Die Gelstücke wurden in Tubes überführt und jeweils 600 µl QG Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Tubes bei 50°C und 600 Umdrehungen /Minute für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert, so dass sich eine homogene Flüssigkeit bildete.

Die Proben wurden gevortext und 200 µl Isopropanol zugegeben und erneut gevortext. 700 µl der Lösung wurden auf eine Säule gegeben und bei 10.000 U/Min für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA befand sich anschließend im Filter. Die Säule wurde mit 500 µl QG Puffer gespült und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgt eine zweimalige Waschung inklusive Zentrifugation mit je 350 µl PE-Puffer. Zum Schluss wurde trocken zentrifugiert und sobald der Filter an der Luft getrocknet war, wurden 20 µl H₂O auf den Filter gegeben. Bei der letzten Zentrifugation war die DNA im Wasser gelöst aus dem Filter in das Tube zentrifugiert worden. Die gewonnene DNA wurde in Tubes bei -20 °C gelagert.

Im weiteren Verlauf war die Klonierung in zwei verschiedene Vektoren geplant. Als erstes wurde die gewonnene DNA in den Vektor pCR 2.1 kloniert. Danach fand eine Umklonierung in den Vektor PGI 4 statt. Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte zur Herstellung eines Vektors erläutert werden.

3.2.2.4 Ligation

Die DNA sollte in den Vektor pCR 2.1 ligiert werden. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz benötigt:

Menge	Substanz
6,5 µl	H ₂ O
1,5 µl	Buffer T4 DNA Ligase
2,0 µl	T4 DNA Ligase
1,0 µl	pcR2.1 Vektor
4,0 µl	DNA- Fragment
15 µl	Reaktionsansatz

Die Proben wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert.

3.2.2.5 Transformationen

Um die PCR- Produkte klonieren zu können war eine Transformation in transformationskompetente TOP10 E.coli –Zellen nötig. Auf der sterilen Werkbank wurden die TOP 10 E.coli Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Plasmids (DNA-Fragment in Xho I Vektor ligiert) gemischt. Der Ansatz wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Membran der Bakterien zu schädigen, erfuhren die Zellen für genau 30 Sekunden einen Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurde der Ansatz sofort 5 Minuten auf Eis inkubiert. Als Nährmedium speziell für transformierte Bakterienzellen diente das SOC- Medium, von dem 250 µl zugegeben wurden. Der Ansatz wurde unter leichtem horizontalem Schütteln (200 U/Minute) bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Auf Agar-Platten wurden jeweils 40 µl x-Gal zur Selektion ausplattiert und 50 µl des Transfektionsansatzes zugegeben. Das Prinzip von X-Gal beruht darauf, dass die Klonierungsstelle im Bereich des lacZ⁻- Gens liegt, welches bei erfolgreicher Ligation inaktiviert wird und somit eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Das intakte lacZ⁻-Gen ist in der Lage, einen Farbstoff umzuwandeln und somit entstehen blaue Kolonien. War die Ligation in den Vektor erfolgreich, dann wurde gleichzeitig das lacZ⁻-Gen zerstört und die Blaufärbung kann nicht mehr stattfinden. Daraus lässt sich schließen, dass bei den weißen Kolonien eine Ligation stattgefunden hat.

Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass Kolonien wachsen konnten.

3.2.2.6 Kolonien picken

Mit Hilfe eines Zahnstochers wurden die weißen Kolonien von der Platte gepickt und in ein Falcon Röhrchen mit 10 ml LB- Medium gegeben. Zusätzlich wurde ein Abstrich auf einer Agarplatte angefertigt. Das LB-Medium ist ein Nährmedium, in dem die Kolonien nun über Nacht bei 37°C und unter Schütteln, wachsen. Die Abstrichplatten wurden ebenfalls bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2.7 Plasmidisolation

Die klonierte DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits wieder aus den Vektoren isoliert. Die Falcon Röhrchen wurden für 10 Minuten bei 300 U/Minute zentrifugiert, so dass sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Buffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 250µl Buffer P2 zugegeben und invertiert, bis sich eine homogene, blaue Lösung bildete. Nach Zugabe von 350µl N3 und sofortigem Invertieren wurden die Proteine und die DNA ausgefällt und die Lösung wurde trüb. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 U/Minute konnte der so gewonnene Überstand durch Dekantieren in ein neues Tube überführt werden und für weitere 60 Sekunden bei 13. 000 U /Minute zentrifugiert werden. Der nächste Schritt diente der Reinigung der DNA, es wurden auf die Säule 750µl PE-Puffer gegeben und erneut für 60 Sekunden bei 13.000 U/Minute zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte eine trockene Zentrifugation. Die gereinigte DNA wurde mittels 30µl RNase freiem Wasser aus der Säule gelöst.

Die Messung der DNA erfolgte analog zur Messung der RNA.

3.2.2.8 Restriktionsverdau+ PGI4 Restriktionsverdau

Es wurde mit dem Restriktionsenzym Xho I ein Restriktionsverdau angesetzt, um die Plasmide an der für Xho I spezifischen Schnittstelle zu schneiden.

Reaktionsansatz:

Menge	Substanz
9,5 µl	H ₂ O
1,5 µl	Puffer R
2,0 µl	Xho I
2,0 µl	Vektor PGL4
15 µl	Reaktionsansatz

Die Proben wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten die bereits beschriebenen Methoden analog zur Herstellung des PGL4 Vektors.

3.2.2.9 Luciferase-Reporter-Messungen zur Promoteranalyse

Es wurden jeweils 5000 Zellen/well der SAOS-2-Zelllinie (humane Osteosarkomzelllinie) in eine weiße 96-well-Platte eingestreut und in RPMI-1640-Medium für 24 h bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Adhärenz der Zellen überprüft und die jeweiligen pGL4-Vektoren mit den Piwi-like 1 und 3-Promotorbereichen unter Verwendung von Effectene Transfektionsreagenz in die Zellen transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gewechselt und verschiedene Konzentrationen an Testosteron (5 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, jeweils in DMSO gelöst) und Dihydrotestosteron (1 nM, 5 nM, 10 nM und 30 nM, jeweils in DMSO gelöst) zugegeben. Nach weiteren 16 h wurde das Medium mit Firefly-Luciferase-Substrat versetzt und nach 15 Minuten die Chemilumineszenz im Plattenreader Genios (Tecan) bestimmt. Alle Experimente wurden als Dreifachversuche durchgeführt.

3.2.3 Statistische Analysen

Die Beschreibung der Studienkohorte wurde mittels Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, USA) angefertigt. Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Programms SPSS 19.0 (IBM, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die mRNA-Expressionsdaten für Piwi-like 1 und Piwi-like 3 wurden mittels bivariater Korrelationen nach Spearman-Rho zu im Verhältnis zu anderen metrischen Spermienparametern (Karenz, Motilität der Spermien, Spermienkonzentration und -gesamtzahl, Spermienmorphologie oder Vitalität) analysiert. Weiterhin wurden nicht-parametrische Korrelationstests nach Mann-Whitney und Student's t-Tests durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die Piwi-like-Genfamilie ist eine vor allem in Keimbahnstammzellen exprimierte Subklasse der Argonaute-Proteine, die eine Rolle beim post-transkriptionellen Gen-Silencing und der Suppression von retrotransponiblen Elementen spielt. In der vorliegenden Arbeit sollte die mRNA-Expression von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 in humanen ejakulierten Spermatozoen untersucht werden. In der sich anschließenden statistischen Analyse wurde das Level der Expression von Piwi-like1 und Piwi-like 3 bezüglich der Korrelation mit Auffälligkeiten der Variablen des SpermioGRAMMS untersucht.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand in der Herstellung eines pGI4 Vektors mit Promotorregionen von Piwi-like1 und Piwi-like 3.

4.1 Beschreibung der Kohorte

Im ersten Teil soll das für diese Arbeit verwendete Patientengut beschrieben werden. Die Probanden wurden im Rahmen der Kinderwunschsprechstunde des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie rekrutiert und stellten eine Ejakulatprobe sowie eine Blutprobe für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Prüfung vorgelegt und positiv begutachtet (Votum vom 14.04.2010).

Die untersuchte Kohorte setzte sich aus 47 Probanden mit einer oder mehreren Variablen ihres SpermioGRAMMS außerhalb des Referenzbereichs (WHO Handbuch zur Ejakulatbeurteilung 2010) und 50 Probanden mit unauffälligen SpermioGRAMMEN zusammen. Somit ergab sich eine Verteilung von 47 Probanden in der Fallgruppe und 50 Probanden in der Kontrollgruppe.

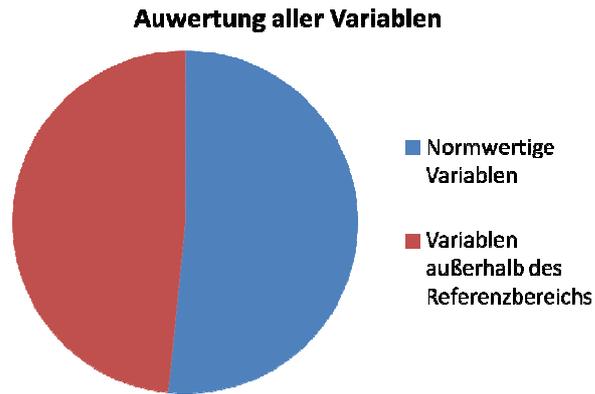


Abb.7 : Verteilung der Probanden bezüglich Fall- und Kontrollgruppe

Hinsichtlich des Alters der Probanden bei Probeabgabe zeigte sich ein homogenes Kollektiv. Der Altersdurchschnitt der Probanden lag bei 30,8 Jahre, der Median lag bei 30 Jahren. In der Altersgruppe 21-25 nahmen 22 Probanden teil, die größte Altersgruppe stellte mit 29 Teilnehmern die Gruppe der 26-30-jährigen dar. Die Altersgruppe von 31-35 beinhaltete 25 Probanden und bei den über 35-jährigen nahmen 21 Probanden teil. Der jüngste Proband war 22 Jahre alt, der älteste 49 Jahre.

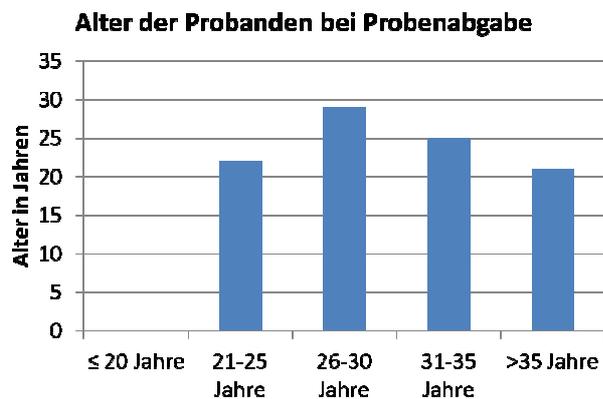


Abb.8 : Übersicht über das Alter der Probanden bei Probeabgabe

Betrachtet man die Kohorte hinsichtlich der einzelnen Variablen, so ergeben sich folgende Daten. Nach den aktuellen Kriterien der WHO gilt ein Anteil an progressiv motilen Spermien unter 32% als auffällig, dies zeigte sich bei insgesamt 23 Probanden, wobei davon 10 Probanden die Diagnose Asthenozoospermie erhielten, 5 Probanden wurden mit Oligoasthenozoospermie diagnostiziert und 8 Spermigramme zeigten eine Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom). Da Probanden mit der Diagnose Azoospermie hinsichtlich der Motilität nicht beurteilt werden können, wurde dies mit „nicht beurteilbar“ berücksichtigt.

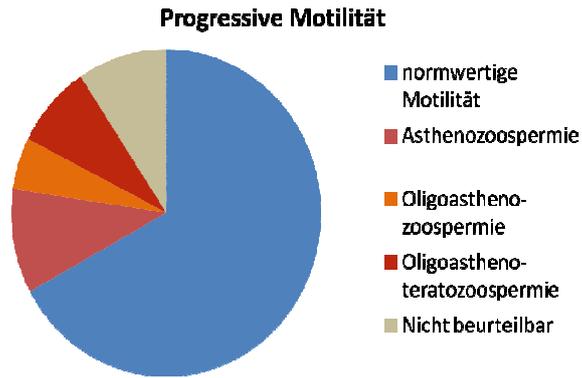


Abb. 9 : Verteilung der Probanden hinsichtlich der Variable progressive Motilität

Bei der Auswertung der Daten zur Anzahl der Spermien pro ml Ejakulat zeigten sich 9 Probanden mit einer Azoospermie und 15 Probanden mit einer Oligozoospermie. Auch die bereits genannten 8 Probanden mit OAT-Syndrom und die 5 Probanden mit Oligoasthenozoospermie wurden aufgrund ihrer Spermienanzahl von weniger als 15×10^6 / ml Ejakulat berücksichtigt.

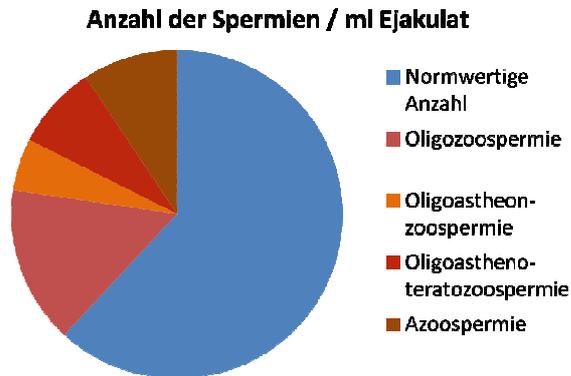


Abb.10: Verteilung der Probanden hinsichtlich der Variable Anzahl der Spermien/ ml Ejakulat

Betrachtet man die Kohorte in Bezug auf die Morphologie, so wurden bei insgesamt 14 Probanden weniger als 4% der Spermien in Normalform vorgefunden. Davon zeigte sich bei 6 Probanden lediglich eine Teratozoospermie, während 8 Probanden mit dem OAT-Syndrom diagnostiziert wurden. Die Probanden mit Azoospermie wurden in die Gruppe „nicht beurteilbar“ zusammengefasst, da keine Aussage über die Morphologie zu treffen ist.

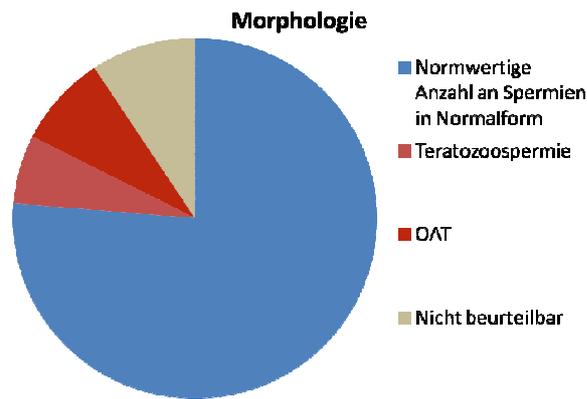


Abb. 11: Verteilung der Probanden hinsichtlich der Morphologie

Eine weitere untersuchte Variable war die Vitalität der Spermien. Ein vitaler Spermienanteil unter 58% gilt als pathologisch und wurde im Rahmen der Auswertung erfasst. Die Vitalität bei den 9 Probanden mit Azoospermie wurde unter „nicht beurteilbar“ vereinigt.

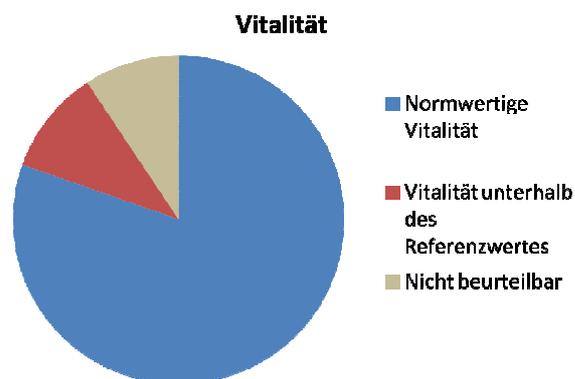


Abb. 12: Verteilung der Probanden hinsichtlich Vitalität

Die Diagnose Hypospermie, also ein Ejakulatvolumen unter 1,5 ml, wurde bei 12 Probanden gestellt, die anderen 85 Probanden zeigten normwertige Volumina, wobei kein oberer Referenzwert zur Beurteilung herangezogen wurde. Auffälligkeiten bezüglich Farbe des Ejakulats fanden sich bei 5 Proben, die Konsistenz des Ejakulats war bei 21 Probanden als auffällig eingestuft worden. Der pH-Werte zeigten sich lediglich bei 2 Probanden unterhalb des Referenzwertes von 7,2.

Die beschriebene Probandenkohorte bildet die Basis für die folgende Isolation von Gesamt-RNA und die quantitative Messung der mRNA-Expression von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 in

ejakulierten Spermatozoen sowie die statistische Korrelation zu klinischen Daten und dem Spermogrammvariablen der Probanden.

4.2 Ergebnisse der experimentellen Arbeit

4.2.1 Ergebnisse der RNA-Isolation

Die Messung der mRNA-Expression von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 wurde mittels quantitativer real-time PCR aus der Gesamt-RNA der ejakulierten Spermien durchgeführt. Aus allen Proben wurde mittels der beschriebenen Trizol-Methode RNA isoliert. Im Mittel wurde eine Konzentration von 351,23 $\mu\text{g/ml}$ gemessen, der Median lag bei 240,5 $\mu\text{g/ml}$, bei relativ großer Spannweite der Messwerte. Die am niedrigsten gemessene Konzentration war 10 $\mu\text{g/ml}$, die maximale Konzentration lag bei 3764 $\mu\text{g/ml}$. Der R-Wert (Absorption_{260nm}/Absorption_{280 nm}) lag durchschnittlich bei 1,41, der Median bei 1,32.

Im folgenden Diagramm wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit bei der Darstellung der einzelne Konzentrationswert von 3764 $\mu\text{g/ml}$ nicht berücksichtigt, in die statistische Berechnung wurde der Wert aber berücksichtigt.

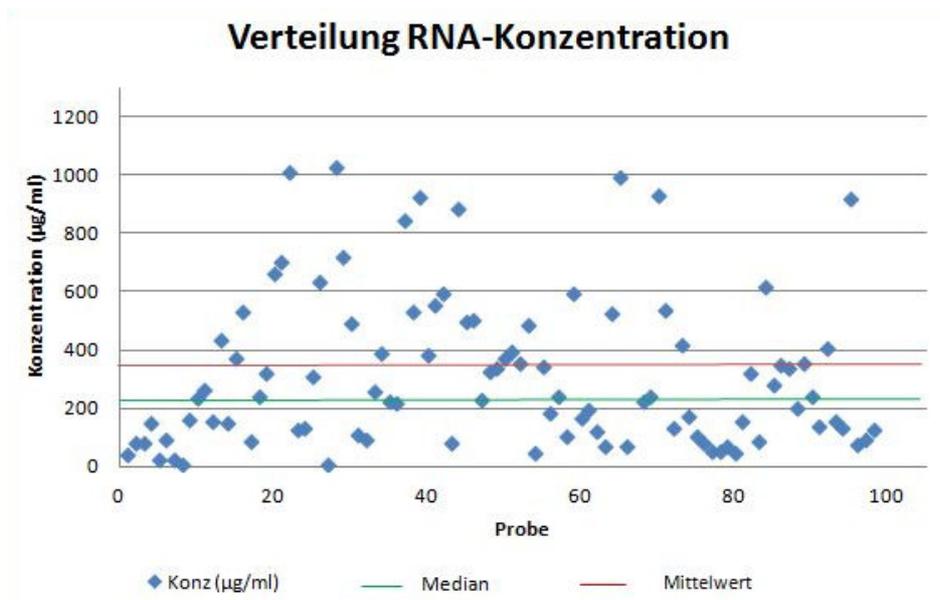


Abb. 13: Verteilung der RNA-Konzentrationen

4.2.2 Ergebnisse der quantitativen real-time PCR

Anhand des Ct-Werts, dem Threshold cycle, kann der Übergang des Produktumsatzes in die logarithmische Phase quantifiziert werden. Das bedeutet, je weniger Produkt bei der Reaktion vorhanden ist, desto später erfolgt der Übergang in die logarithmische Phase, was sich in einem höheren Ct-Wert widerspiegelt. Mit Hilfe der Real-time PCR kann der Ct-Wert erfasst werden, da hier erstmalig die Fluoreszenz exponentiell über den Hintergrund ansteigt. Für PIWI 1 konnten in insgesamt 94 Proben ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, wobei sich der Mittelwert der Ct-Werte bei 34,1 und der Median bei 33,8 befand. Als maximaler Wert wurde 40,3 und als minimaler Wert 24,2 registriert.

Für PIWI 3 konnten lediglich 4 Ct-Werte registriert werden mit Mittelwert von 40,0 und einer Spannweite der Werte von 37,2 bis 42,2.

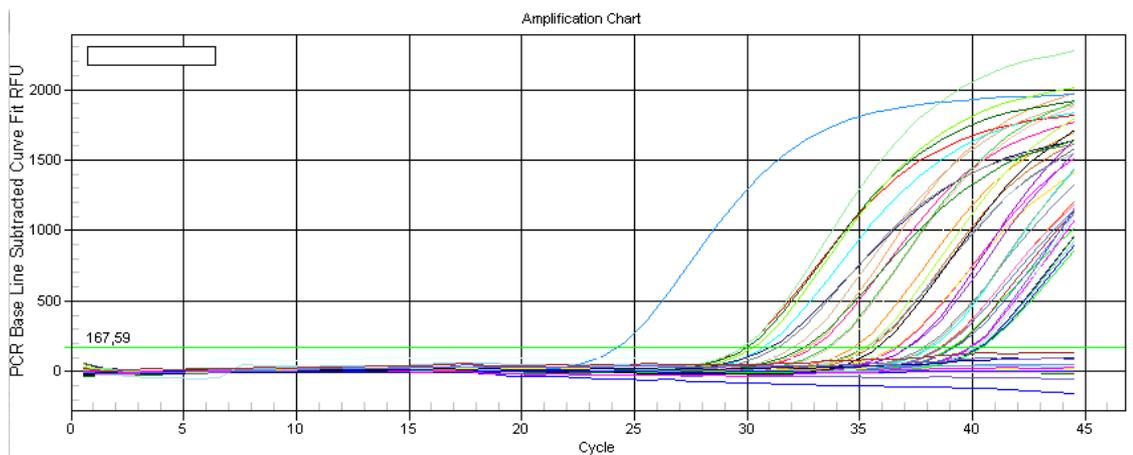


Abb. 14: Realtime-PCR mit Threshold-Cycle von Piwi-like 1

4.3 Ergebnisse der statistischen Analysen

4.3.1 Ergebnisse der nichtparametrischen Korrelationen

Um das Ausmaß bzw. die Qualität der Korrelation zweier Parameter zu untersuchen, wurde im Rahmen einer bivariaten Korrelationsanalyse der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit Hilfe von SPSS bestimmt.

Die Korrelation der Piwi-like 1-Expression zeigte sich lediglich bezüglich des Prozentsatzes an vitalen Spermien als signifikant (p-Wert = 0,022; n =57). Betrachtet man die Korrelation mit der Motilität, so konnte weder eine Signifikanz bei dem Prozentsatz progressiver Spermien (p-Wert =0,74; n =97), dem Prozentsatz nichtprogressiven Spermien (p-Wert = 0,421; n =97) noch bei dem Prozentsatz immotiler Spermien (p-Wert = 0,304; n =97) verzeichnet werden. Auch weder die Spermienanzahl/ml (p-Wert= 0,408; n=97) noch die Gesamtspermienanzahl (p-Wert = 0,388; n =97) korrelierte auf signifikante Weise. Ebenso verhielt es sich für den Prozentsatz morphologisch normaler Spermien (p-Wert = 0,524; n =88), das Ejakulatvolumen (p-Wert = 0,456; n = 97) und die Karenzzeit (p-Wert = 0,986; n =71).

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse für PIWI 1:

Tab. 4 : Übersicht zur Korrelation von PIWI1-Expression mit Spermioogrammvariablen

Parameter	Korrelationskoeffizient r_s	p-Wert	Anzahl n
Progressive Motilität	-0,034	0,740	97
Nichtprogressive Motilität	-0,083	0,421	97
Immotil	0,105	0,304	97
Spermienanzahl/ml	0,085	0,408	97
Gesamtanzahl	0,089	0,388	97
Vitalität	-0,302	0,022	57
Morphologie	-0,69	0,524	88
Karenz	-0,002	0,986	71
Volumen	0,077	0,456	97

Bei der Betrachtung der mRNA-Expression von PIWI3 korrelierte keine der Spermioogrammvariablen signifikant zu dieser. Im Einzelnen zeigte sich dies für den Prozentsatz der progressiv motilen Spermien (p-Wert = 0,98; n =97), den Prozentsatz der nichtprogressiv motilen Spermien (p-Wert = 0,221; n =97) und den Prozentsatz der immotilen Spermien (p-

Wert = 0,985; n =97). Auch bezüglich der Spermienanzahl/ml (p-Wert = 0,952; n =97) und Gesamtpermienanzahl (p-Wert = 0,865; n =97) konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Gleiches galt für den Prozentsatz der vitalen Spermien (p-Wert =0,757; n =57), den Prozentsatz der morphologisch normalen Spermien (p-Wert = 0,480; n =88), das Ejakulatvolumen (p-Wert = 0,890; n =97) und die Karenzzeit des Probanden vor Spermienabgabe (p-Wert = 0,278; n =71).

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse für PIWI 3:

Tab. 5 : Übersicht zur Korrelation von PIWI3-Expression mit

Parameter	Korrelationskoeffizient r_s	p-Wert	Anzahl n
Progressive Motilität	0,050	0,980	97
Nichtprogressive Motilität	0,125	0,221	97
Immotil	0,005	0,985	97
Spermienanzahl/ml	0,006	0,952	97
Gesamtanzahl	-0,018	0,865	97
Vitalität	0,042	0,757	57
Morphologie	0,076	0,480	88
Karenz	-0,131	0,278	71
Volumen	0,014	0,890	97

4.3.2 Ergebnisse beim Mittelwertvergleich

Mit Hilfe des Mann-Whitney Test wurden die Mittelwerte der PIWI1 bzw. PIWI3 Expression mit den Mittelwerten von Spermioogrammvariablen ins Verhältnis gesetzt.

Hinsichtlich der Mittelwertvergleiche konnte für die Piwi-like 1 mRNA-Expression weder für den Prozentsatz der progressiv motilen Spermien (p-Wert =0,626; n =88), die Spermienanzahl/ml (p-Wert = 0,687; n =36); die Gesamtpermienanzahl (p-Wert = 0,961; n=27), den Prozentsatz der vitalen Spermien (p-Wert =0,275; n =53), den Prozentsatz der morphologisch normalen Spermien (p-Wert = 0,612; n =88) noch für das Ejakulatvolumen (p-Wert = 0,524; n =97) eine signifikante Korrelation verzeichnet werden.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse für PIWI1:

Tab.6: Mittelwertvergleich von PIWI1-Expression mit Spermogrammvariablen

Parameter	p-Wert	Anzahl n
Progressive Motilität	0,626	88
Spermienanzahl/ml	0,687	36
Gesamtanzahl	0,961	27
Vitalität	0,275	53
Morphologie	0,612	88
Volumen	0,524	97

Die Mittelwertvergleiche für die PIWI3-Expression mit Spermogrammvariablen zeigte eine Signifikanz bezüglich des Volumens (p-Wert=0,037; n=97). Für die weiteren Variablen progressive Motilität (p-Wert=0,707; n=88), Spermienanzahl/ml (p-Wert=0,480; n=36); Gesamtanzahl (p-Wert= 0,165; n=27), Vitalität (p-Wert=0,766; n=53) und Morphologie(p-Wert=0,376; n=97) zeigten sich keinerlei Signifikanzen.

Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis für PIWI3:

Tab.7: Mittelwertvergleich von PIWI3-Expression mit Spermogrammvariablen

Parameter	p-Wert	Anzahl n
Progressive Motilität	0,707	88
Spermienanzahl/ml	0,480	36
Gesamtanzahl	0,165	27
Vitalität	0,766	53
Morphologie	0,376	88
Volumen	0,037	97

Die Expression von PIWI-like 1 wurde mit Hilfe des Medians in zwei Gruppen eingeteilt. Diejenigen Proben, die mit ihrer Expressionsrate unterhalb des Medians lagen, wurden zur Gruppe *Niedrige PIWI1 Expression*, die Proben oberhalb des Medians in die Gruppe *Erhöhte PIWI1 Expression* eingeteilt.

Anhand einer Kreuztabelle wurde das Niveau der Expression von PIWI 1 mit der Diagnose pathologische progressive Motilität bzw. normwertige progressive Motilität ins Verhältnis gesetzt. Dadurch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau und der progressiven Motilität (Pearson-Signifikanz: p-Wert= 0,04; Exakter Test nach Fisher: p-Wert= 0,034 (1-seitige Signifikanz) und P-Wert= 0,053 (2-seitige Signifikanz).

Insgesamt konnte bei 43 Proben eine niedrige Expression von PIWI 1 nachgewiesen werden. Davon zeigte sich bei 7 Proben (16,3%) eine Asthenozoospermie und bei 36 Proben (83,7%) eine normwertige progressive Spermienmotilität. Bei der Betrachtung des Kollektivs

hinsichtlich der progressiven Motilität zeigten sich somit bei 30,4 % der Probanden mit Asthenozoospermie eine niedrige PIWI1 Expression. Bei den Patienten mit normwertiger progressiver Motilität zeigten 55,4% ein niedriges Expressionsniveau von PIWI1.

Bei 45 Proben zeigte sich eine erhöhte Expression von PIWI1, wovon 16 Proben (35,6%) eine Asthenozoospermie aufwiesen und 29 Proben (64,4%) eine normwertige progressive Spermienmotilität zeigten. Auf die Variable progressive Motilität bezogen zeigte sich somit bei 69,6% der Probanden mit Asthenozoospermie eine erhöhte PIWI1 Expression, wohingegen sich bei den Probanden mit normwertiger progressiver Motilität 44,6 % eine PIWI 1 Expression mit erhöhtem Niveau aufwiesen.

Die folgende Tabelle zeigt die Kreuztabelle:

Tab. 8: Kreuztabelle hinsichtlich Expressionsniveau und Diagnose progressive Motilität

Expressionsniveau von PIWI1		Pathologische progressive Motilität	Normwertige progressive Motilität	Gesamt
<i>Niedrige Expression</i>	Anzahl	7	36	43
	Erwartete Anzahl	11,2	31,8	43,0
	Anteil innerhalb der Gruppe niedrige Expression in %	16,3	83,7	100
	Anteil innerhalb der Diagnose progressive Motilität in %	30,4	55,4	48,9
	Anteil an der Gesamtanzahl in %	8,0	40,9	48,9
Expressionsniveau von PIWI1		Pathologische progressive Motilität	Normwertige progressive Motilität	Gesamt
<i>Erhöhte Expression</i>	Anzahl	16	29	45
	Erwartete Anzahl	11,8	33,2	45,0
	Anteil innerhalb der Gruppe erhöhte Expression in %	35,6	64,4	100
	Anteil innerhalb der Diagnose progressive Motilität in %	69,6	44,6	51,1

	Anteil an der Gesamtanzahl in %	18,2	33,0	51,1
<i>Gesamte Expression</i>	Anzahl	23	65	88
	Erwartete Anzahl	23,0	65,0	88,0
	Anteil für beide Gruppen in %	26,1	73,9	100,0
	Anteil innerhalb der Diagnose progressive Motilität in %	100	100	100
	Anteil an der Gesamtanzahl in %	26,1	73,9	100

Die Nullhypothese lautet: Es gibt keinen Zusammenhang zwischen der Expression von PIWI1 und der progressiven Spermienmotilität. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test wurde überprüft, inwiefern die Nullhypothese zutrifft. Aufgrund der statistischen Analyse kann die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen werden ($p = 0,04$). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von PIWI1 und dem Prozentsatz von progressiv motilen Spermien.

Tab. 9: Ergebnisse Chi-Quadrat Pearson und Exakter Test nach Fisher

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,232	1	0,040		
Exakter Test nach Fisher				0,053	0,034

Aus Gründen der Übersicht wurde bei der Boxplotanalyse auf die Darstellung maximaler Ausreißer verzichtet, selbstverständlich gingen diese Werte in die statistische Berechnung ein. Es zeigte sich, dass bei einem Prozentsatz der progressiv motilen Spermien außerhalb des Referenzbereiches ($< 32\%$) der Median der PIWI1-Expression mit 1,736 höher lag, als der Median mit 0,7556 bei unauffälliger progressiver Motilität.

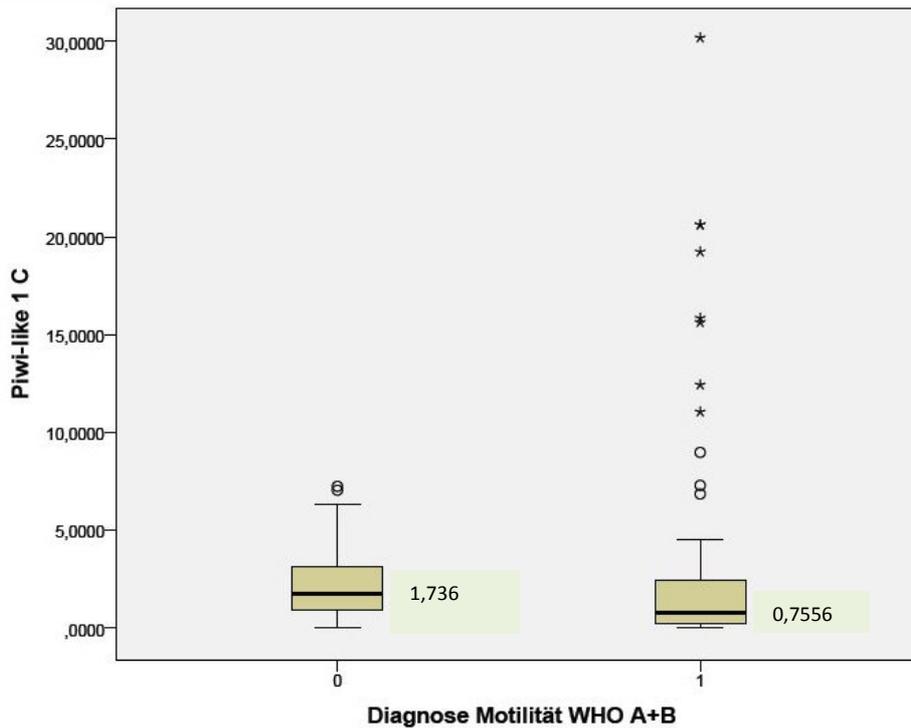


Abb. 15: Boxplotanalyse zur Expression von PIWI1 und der progressiven Motilität

Die Frage, ob anhand der PIWI-Expression auf die progressive Motilität geschlossen werden kann wurde mit Hilfe der ROC-Kurve analysiert. Als Area under the Curve (AUC) zeigte sich eine Fläche von 0,608. Das 95% Konfidenzintervall betrug 0,477 bis 0,739. Die Signifikanz lag bei $p = 0,125$.

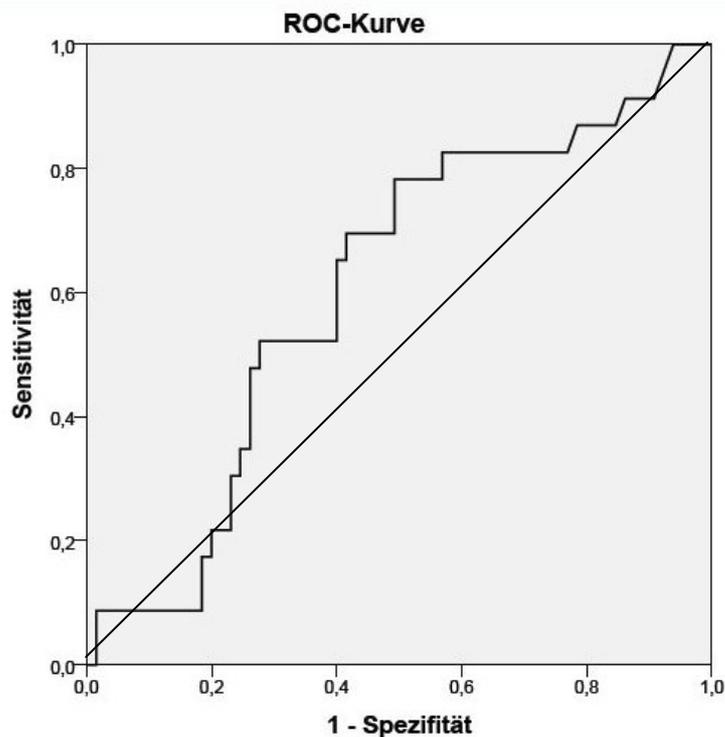


Abb. 16: ROC-Kurve zur Beurteilung der Güte von PIWI1 –Expression als Vorhersagewert

4.4 Generierung von Luciferase-Reporter-Konstrukten und Promotoranalysen

In in-vitro Versuchen sollte die Induzierbarkeit des Piwi-like 1 und des Piwi-like 3-Promoters durch Testosteron und Dihydrotestosteron mittels eines Luciferase-Vektors (pGL4-Vektor) analysiert werden. Dazu wurden spezifische Primer designt, die verschieden große Bereiche der putativen Piwi-like 1 und Piwi-like 3 Promotorbereiche überspannten. Mittels dieser Primer sollten Amplifikationsprodukte generiert werden, die durch angehängte XhoI-Restriktionssites eine Klonierung in den pGL4-Luciferase-Vektor ermöglichen sollten.

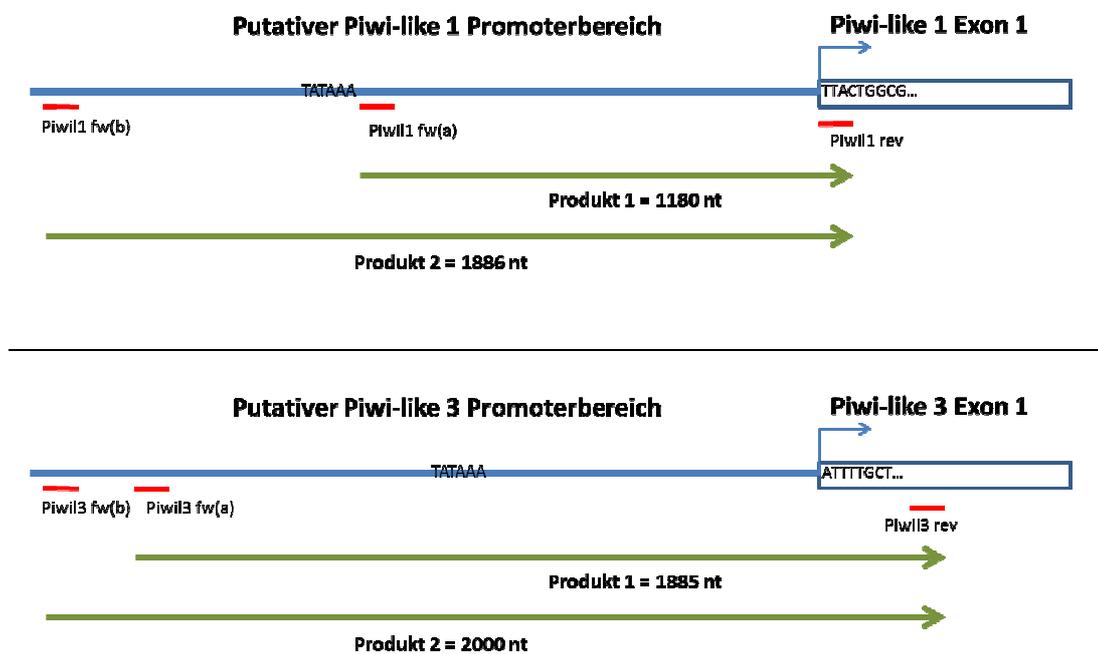


Abb. 17 Schematische Übersicht über die zu amplifizierenden Bereiche in den putativen Promotorbereichen von Piwi-like 1 und Piwi-like 3. Die verwendeten Primer sind rot gekennzeichnet, es wurden je zwei Produkte amplifiziert.

Die mit Hilfe der PCR amplifizierte DNA freiwilliger Spender wurde mittels Gelelektrophorese entsprechend nach ihrer Basenpaarlänge aufgetrennt. Anhand des mitgeführten Markers konnten die Banden ihren entsprechenden Primern zugeordnet werden (P1a-rev: 1200 bp; P1b-rev: 1900 bp; P3a-rev: 1890 bp; P3b-rev: 2000 bp). In der folgenden Abbildung ist die Fotografie eines Gels unter der UV-Lampe zu sehen.

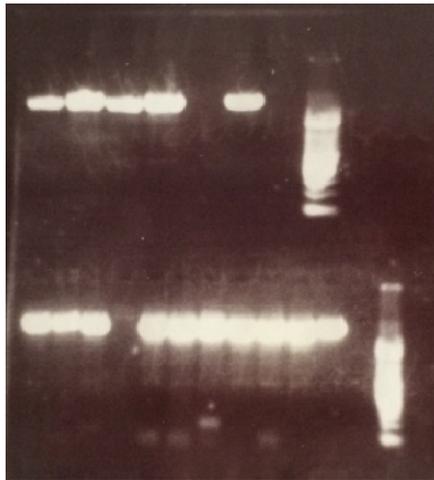


Abb. 18: Aufnahme einer Gelelektrophorese mit Marker

Mithilfe eines im Internet frei zugänglichen Analysealgorithmus (ConSite <http://consite.genereg.net/>; letzter Abruf Oktober 2014) wurden die Promotorbereiche von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 auf putative Bindestellen für den Androgenrezeptor analysiert.

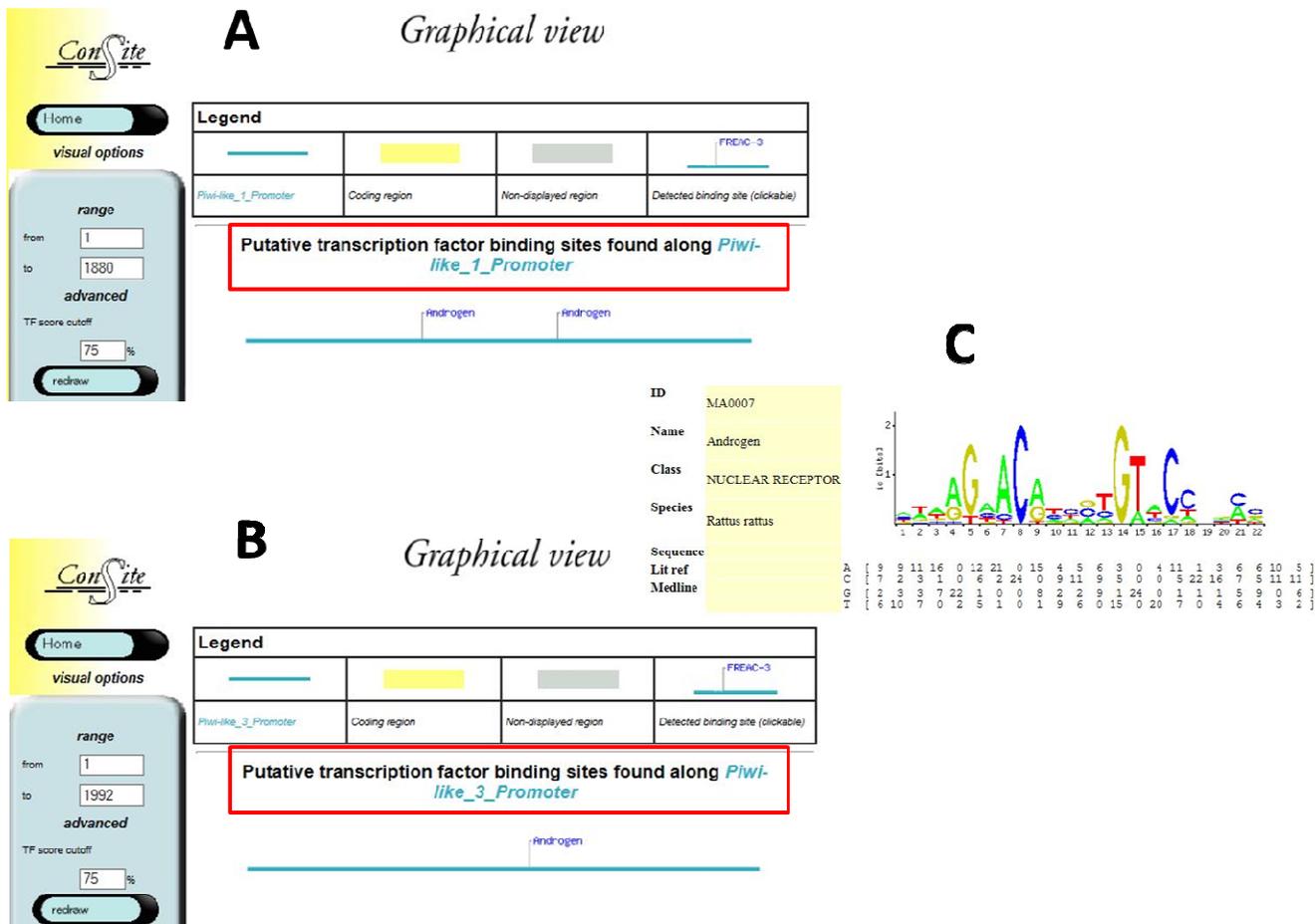


Abb. 19: in-silico-Analyse putativer Transkriptionsfaktorbindestellen für den Androgenrezeptor im Piwi-like1 (A) und Piwi-like 3 (B)-Promotorbereich. In Teilabbildung C ist die vom Analyse-Algorithmus ConSite zugrundegelegte Bindesequenz für den Androgenrezeptor dargestellt. (Quelle: www.consite.genereg.net)

Es konnten in-silico mehrere putative Bindestellen für den Androgenrezeptor innerhalb der jeweiligen Amplifikate (Piwi-like 1a und b; Piwi-like 3a und b) identifiziert werden. Der Piwi-like 1-Promoterbereich wies 2 Bindestellen auf (an Position 657 mit einem Score von 9,106 und an Position 1160 mit einem Score von 7,267), der Piwi-like 3-Promoterbereich 1 Bindestelle (an Position 1097 mit einem Score von 7,066).

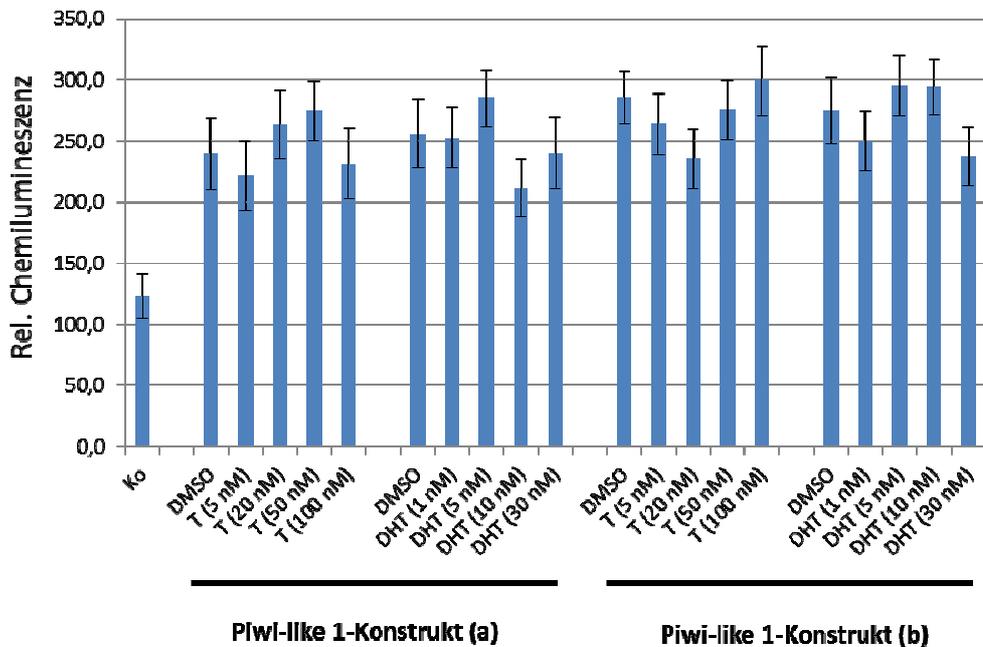


Abb. 20: Luciferase-Reporter-Assays zur Promoteranalyse von Piwi-like 1. Es wurden die beiden Konstrukte Piwi-like 1(a) (1180 nt) und Piwi-like 1(b) (1886 nt) getestet. Auf der Ordinate ist die relative Chemilumineszenz angegeben. Alle Experimente wurden in Dreifachversuchen (n = 3) durchgeführt. Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen wurde ein Student's t-Test genutzt.

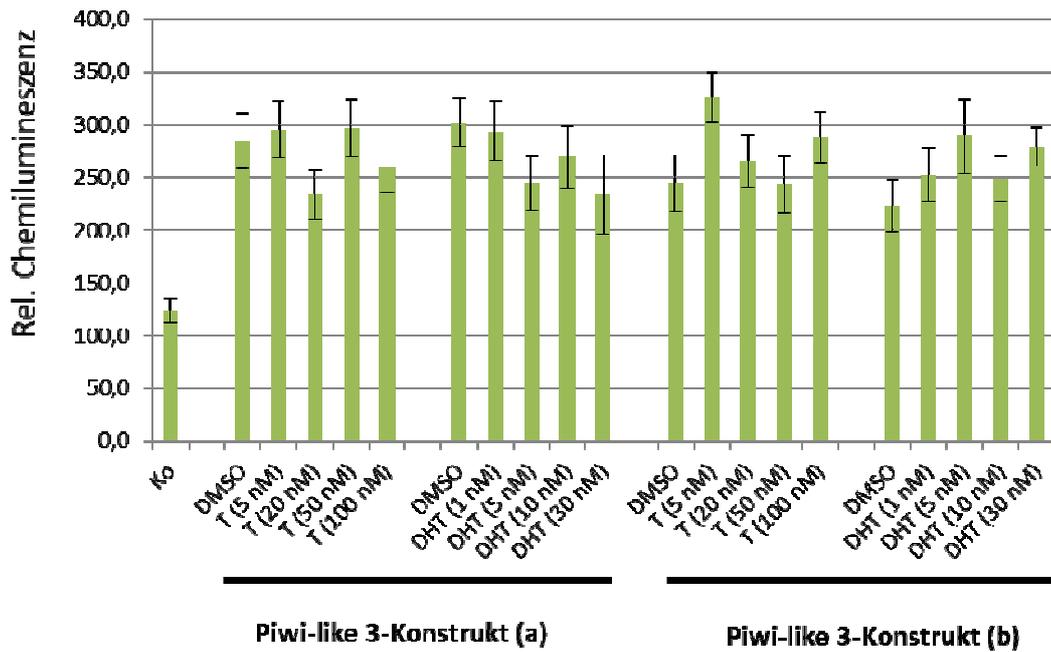


Abb. 21: Luciferase-Reporter-Assays zur Promoteranalyse von Piwi-like 3. Es wurden die beiden Konstrukte Piwi-like 3(a) (1885 nt) und Piwi-like 3(b) (2000 nt) getestet. Auf der Ordinate ist die relative Chemilumineszenz angegeben. Alle Experimente wurden in Dreifachversuchen ($n = 3$) durchgeführt. Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen wurde ein Student's t-Test genutzt.

Mittels Luciferase-Reporter-Assays wurde die Induzierbarkeit der Piwi-like 1 und 3-Promoterregionen durch Testosteron oder Dihydrotestosteron in Konzentrationsbereichen von 5 – 100 nM (Testosteron) bzw. 1 – 30 nM (Dihydrotestosteron) mit Hilfe der Inkubation mit einem Firefly-Luciferase-Substrat bestimmt. Es ergaben sich dabei relative Chemilumineszenz-Werte, die im Schwankungsbereich der als Kontrolle mitgeführten Proben, die nur mit DMSO behandelt war, lagen. Es konnte keine statistisch signifikante Induktion festgestellt werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Proteine Piwi-like 1 und Piwi-like 3, als Subfamilie der Argonauteproteine, auf die Spermatogenese und somit die Fertilität zu untersuchen. Das mRNA-Expressionsniveau von Piwi-like 1 und Piwi-like 3 im Ejakulat von fertilen und infertilen Probanden wurde in Bezug auf verschiedene Spermogrammvariablen analysiert.

Vor allen Dingen in Studien an der Maus konnte bisher gezeigt werden, dass PIWI eine Rolle in der Keimzellentwicklung spielt. Eine wesentliche Bedeutung wird der Kontrolle der Transposons, also nichtkodierenden Sequenzen, zugeschrieben. Diese nichtkodierenden DNA-Sequenzen können generell in zwei Gruppen kategorisiert werden. Zu der Gruppe der Tandem Repeats zählen die Major-, Minor- und Mikrosatelliten. Die zweite Gruppe leitet sich von den transponiblen Elementen ab. Transponible Elemente können wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden, je nach Mechanismus der Transposition. Klasse I Retrotransposons benötigen ein RNA-Transkript als Zwischenprodukt und funktionieren nach dem "Kopieren und Einfügen" Mechanismus. Die Klasse II DNA-Transposons schneiden direkt, nach dem so genannten "Schneiden und Einfügen" Mechanismus (Bao und Yan 2012).

Eine durch Transposons induzierte Mutation der Keimbahn wird an die nächste Generation vererbt und so erhält die Mutation eine transgenerationale Bedeutung. Daher muss die Aktivität der mobilen Elemente unter strikter Kontrolle der Verteidigungssysteme der Zelle stehen, um die Integrität und Funktion des Genoms zu wahren. In der Tat haben die meisten eukaryoten Organismen einen effektiven Mechanismus entwickelt, um mobile DNA Elemente kontrollieren zu können (Bao und Yan 2012).

Während der Keimzellentwicklung findet eine epigenetische Reprogrammierung statt. Diese beinhaltet eine progressive Methylierung der Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln der primordialen Keimbahnstammzelle (PGC). Außerdem kommt es zu DNA-Methylierungen der fetalen (Pro)Spermatogonien. Dieser epigenetische Prozess definiert das genetische Programm der folgenden Generation und betrifft auch die Sequenzen von Transposons. Genauer gesagt verlieren die Transposons während der CpG-Methylierung der PGC ihr Silencing und sind so aktiviert und in den folgenden Prospermatogonien nachweisbar. Falls der Abwehrmechanismus der Zelle nicht greift, ist die Konsequenz für die genetische Information fatal insofern, dass entweder genomische Mutationen an die nächste Generation vererbt werden, oder die Keimbahnstammzellen größtenteils zerstört werden, was zur Sterilität führt.

Mit Hilfe von Piwi-Proteinen können die Transposons durch DNA -Methylierungen stillgelegt und somit kontrolliert werden. Auf diese Weise kann eine ordnungsgemäße postnatale Spermatogenese sicher gestellt werden. Bei *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Piwi mit dem Verlust der Selbsterneuerungsfunktion der Stammzellen der Keimbahn einhergeht (Chuma und Nakano 2013).

Das Humane Homologe von Piwi und Aub wird Hiwi genannt und konnte erstmals aus einer cDNA Datenbank des Hodens isoliert werden. Seither wird angenommen, dass die Piwi-Proteine auch bei der Spermatogenese des Menschen bzw. Säugetieren eine wichtige Rolle spielen (Bak et al. 2011). Es gibt drei Piwi-Homologe bei der Maus. Bei Piwi-like 1 bzw. Miwi-null Mäusen zeigte sich, dass die Spermatogenese nicht vollständig ablaufen kann, sondern auf der Stufe der runden Spermatiden stehen bleibt. Es zeigte sich des Weiteren eine signifikante Abnahme der Stammzellteilungsrate (Bak et al. 2011).

Die Klonierung und funktionelle Analyse von Miwi als murines Homolog von Piwi-like 1 zeigte, dass Miwi ein testisspezifisches Gen ist, welches für ein zytoplasmatisches Protein kodiert. Dieses Protein wird hauptsächlich in Spermatozyten und runden Spermatiden exprimiert. Miwi ist im midpachytänem Stadium der Spermatozyten und runden Spermatiden während der Phasen V-VII dauerhaft vorhanden. In den diplotänen Stadien gewinnt Miwi wieder an Bedeutung und gilt als ein Schlüsselregulator der Spermiogenese.

Die Expression von Mili, dem Homologen von Piwi-like 2, konnte bis in den pachytänen Spermatozyten nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von Miwi vom midpachytänem Stadium bis zu den elongierten Spermatiden stattfindet. Mili wird also in einem früheren Stadium als Miwi exprimiert, mit einer kleinen Überlappung im midpachytänem Stadium. Miwi-like 2 wird während der frühen Prophase der Meiose I exprimiert (Bak et al. 2011).

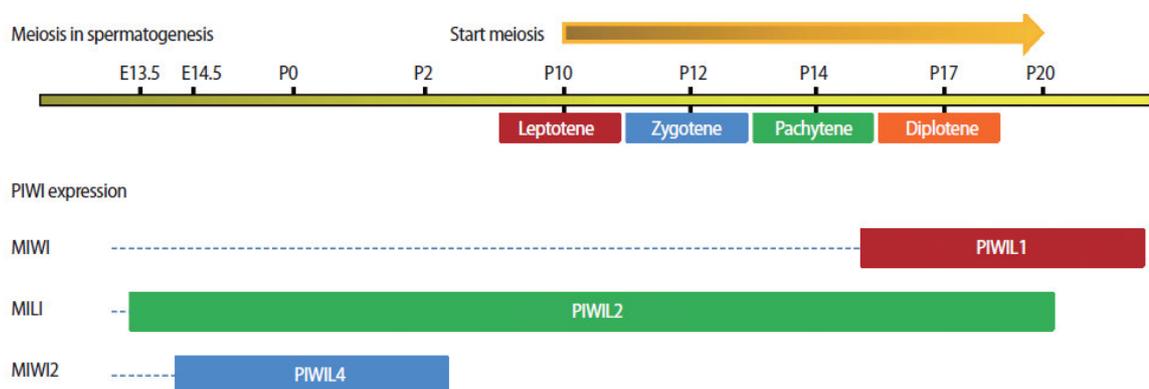


Abb.22: Darstellung der PIWI-Protein Expression während der Meiose der Spermatogenese (Bak et al. 2011)

Betrachtet man die Expression der Proteine nach Lebensalter können auch hier Unterschiede ausgemacht werden. Die meisten Prozesse finden im adulten Hoden statt, jedoch gibt es eine kritische Phase, die epigenetische Reprogrammierung der Keimbahn, diese findet in den fetalen Prospermatogonien statt. Die Reprogrammierung umfasst die Entfernung der biparentalen epigenetischen Information, die seit Beginn der embryonalen Entwicklung der Keimzelle existiert hat.

Wie bereits beschrieben, wird während der Keimzellentwicklung als erstes Piwi-like 2/Mili exprimiert, gefolgt von Piwi-like 4 /Miwi-like 2. Die Expression von Piwi-like 2/Mili wird in den Gonozyten aktiviert und ist mit der epigenetischen Reprogrammierung des Genoms assoziiert. Piwi-like 4 /Miwi 2 wird in fetalen Prospermatogonien während der denovo DNA-Methylierung exprimiert, kann aber direkt nach der Geburt nicht mehr detektiert werden. Piwi-like 2 /Mili wird weiterhin im adulten Hoden während der kompletten Meiose und in geringem Maße in den frühen runden Spermatozyten exprimiert. Die Expression von Piwi-like 1 /Miwi wurde zuerst in pachytänen Spermatozyten entdeckt, sie ist aber auch in runden Spermatozyten zu verzeichnen (Bortvin 2013).

In Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Mili-null als auch Miwi-like2 - null Mäuse steril sind aufgrund der beeinträchtigten Spermatogenese in der pachytänen Phase. Miwi-like 2 defiziente Mäuse zeigen einen Defekt in der Meiose in der frühen Prophase von Meiose I und einen Verlust der Stammzellen. Mili und Miwi sind zytoplasmatische Proteine, wohingegen Miwi-like2 im Kern gefunden wird und nur für eine kurze Zeit der Meiose exprimiert wird. Interessanterweise wird Miwi-like2 bei Mili-Knockout Mäusen im Zytoplasma gefunden. Bei den Miwi-like2 Knockout Mäusen findet sich Mili weiterhin im Zytoplasma, was daraufhin weist, dass Mili für die Lokalisation von Miwi-like2 im Kern verantwortlich ist (Bak et al. 2011). Es ist bekannt, dass nicht nur die Piwi-Proteine eine essentielle Rolle für die Fertilität spielen, sondern auch der Verlust von Komponenten des piRNA-Silencing Systems führt für gewöhnlich zur Sterilität (Yakushev et al. 2013).

PIRNAs werden in den männlichen Keimzellen exprimiert, teilweise in den pachytänen Spermatozyten und runden Spermatozyten. Zusätzlich wurde kürzlich in Erwägung gezogen, dass kleine nichtkodierende RNAs als Vorläufer von piRNAs fungieren und vornehmlich in pachytänen Spermatozyten exprimiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass piRNAs als Partner von Piwi-Proteinen, die Entwicklung von meiotischen und postmeiotischen männlichen Keimzellen zumindest teilweise regulieren (Bak et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es eine signifikante Korrelation bezüglich dem Prozentsatz an vitalen Spermien und dem Expressionsniveau von Piwi-like 1 gibt. Es zeigte sich eine negative Korrelation, also je niedriger die Expression von Piwi-like 1 war, desto höher war der Prozentsatz an vitalen Spermien im Ejakulat (Korrelationskoeffizient $r = -0,302$; p -Wert = $0,022$). Ebenso verhielt es sich umgekehrt mit den Ejakulatproben, bei denen der Prozentsatz an vitalen Spermien unterhalb des Referenzbereichs ($< 58\%$) war, diese zeigten eine signifikant höhere Expressionen von Piwi-like 1.

Für die Expression der Piwi-Proteine geht man davon aus, dass nach Abschluss der Spermiogenese auch die Expression von Piwi nachlässt. Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Expression von Piwi bei Probanden mit einem geringen Prozentsatz an vitalen Spermien kann am ehesten im Sinne einer Reifungsstörung diskutiert werden. So könnte es sein, dass die Spermiogenese noch nicht vollständig abgeschlossen werden konnte und aus diesem Grund das Expressionsniveau der Piwi-Proteine noch erhöht ist, während dadurch qualitative Mängel bei den ejakulierten Spermien resultieren, da es noch nicht zur vollständigen Reifung gekommen ist.

Als weiteres wichtiges Ergebnis konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Level der mRNA-Expression von Piwi-like 1 mit dem Prozentsatz an progressiven Spermien signifikant korreliert. Nachdem das Expressionsniveau von Piwi-like 1 anhand des Medians in die zwei Gruppen „Erhöhte Expression“ und „Erniedrigte Expression“ eingeteilt wurde, konnte mit Hilfe einer Kreuztabelle die Progressive Spermienmotilität gegenüber gestellt werden. Hier zeigte sich, dass die Gruppe „Erhöhte Expression“ signifikant mehr Probanden mit einem Prozentsatz an progressiv motilen Spermien unterhalb des Referenzwerts ($< 32\%$) aufwies ($p = 0,04$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson). In der durchgeführten Boxplotanalyse konnte gezeigt werden, dass der Median der Piwi-like 1 Expression bei den Probanden mit unauffälliger progressiver Spermienmotilität signifikant niedriger war ($0,76$) als der Median der Probandengruppe ($1,74$) mit progressiver Spermienmotilität unterhalb des Referenzwerts. Auch diese Beobachtung lässt sich mit der Hypothese der Reifungsstörung in Einklang bringen. Eine unvollständig abgelaufene Spermatogenese führt zur Einschränkungen in der Motilität der Spermien. Gerade die progressive Spermienmotilität korreliert mit der Schwangerschaftsrate, so dass diese Variable des SpermioGRAMMS einen hohen prädiktiven Wert hat (Nieschlag et al. 2012, S. 24).

Für eine unvollständige Spermatogenese sprechen neben der erhöhten Expression von Piwi-like 1 auch die Detektion von mRNA der Stammzellgene Nanog und Oct 4. Bei einer vollständigen Reifung müssten sowohl die Stammzellgene, als auch Piwi-like 1 niedriger oder nicht mehr exprimiert werden. Oct4 gilt als ein Marker für undifferenzierte Zellen und auch

Nanog spielt gerade in der Selbsterneuerung von Stammzellen eine wichtige Rolle (Looijenga et al. 2003), (Zhang et al. 2006).

Um die Vorhersagekraft der Piwi-like 1 Expression als Marker für eine gestörte Motilität zu analysieren, wurde eine ROC-Kurve angefertigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression als Marker nicht verlässlich genug ist (Signifikanz = 0,125; Area under the Curve = 0,608), sondern allenfalls eine Tendenz angeben kann.

Im Mann-Whitney Test konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von Piwi-like 3 einen signifikanten Zusammenhang zum Ejakulatvolumen hat. Allerdings zeigten nur wenige Proben überhaupt eine Expression von Piwi-like 3, so dass der Zusammenhang der Expression mit dem Ejakulatvolumen aufgrund der niedrigen Fallzahl als eher unsicher angesehen werden muss.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 97 Ejakulatproben hinsichtlich ihres Genexpressionsniveaus von Piwi-like1 und Piwi-like3 untersucht. Die Piwi-Proteine sind Teil der Argonaute-Proteinfamilie und spielen für die Selbsterneuerung und Teilung der Keimbahnstammzellen eine wichtige Rolle. Des Weiteren sind sie gemeinsam mit den piRNAs für den korrekten Ablauf der Spermatogenese von Bedeutung.

Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vor allen Dingen das Protein Piwi-like 1 für die progressive Motilität der Spermien mitverantwortlich ist. So korrelierte eine erhöhte Expression von Piwi-like 1 mit einem erniedrigten Anteil an progressiv motilen Spermien (p -Wert = 0,04). Auf die Variable progressive Motilität bezogen zeigte sich somit bei 69,6% der Probanden mit Asthenozoospermie eine erhöhte PIWI1 Expression, wohingegen sich bei den Probanden mit normwertiger progressiver Motilität 44,6 % eine PIWI 1 Expression mit erhöhtem Niveau aufwiesen.

Als weitere Variable, die einen signifikanten Zusammenhang mit der Genexpression von Piwi-like 1 aufwies, stellte sich der Anteil an vitalen Spermien im Ejakulat heraus (Korrelationskoeffizient $r = -0,302$; p -Wert = 0,022). Es zeigte sich auch hier, dass ein erhöhter Anteil an vitalen Spermien mit einer geringeren Genexpression von Piwi-like1 assoziiert war. Ebenso verhielt es sich umgekehrt mit den Ejakulatproben, bei denen der Prozentsatz an vitalen Spermien unterhalb des Referenzbereichs ($< 58\%$) war, diese zeigten eine signifikant höhere Expressionen von Piwi-like 1.

Für die übrigen Variablen im Spermogramm konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der Expressionsrate hergestellt werden. Ein fraglicher Zusammenhang konnte noch bezüglich der Genexpression von Piwi-like 3 und dem Ejakulatvolumen vermerkt werden (p -Wert = 0,037). Aufgrund der geringen Proben, bei denen überhaupt eine Expression von Piwi-like 3 verzeichnet werden konnte, ist der Zusammenhang jedoch fraglich.

Allerdings konnte anhand einer ROC-Kurven Analyse gezeigt werden, dass die Expressionsrate von Piwi-like 1 nicht als Marker für Fertilität bzw. Subfertilität gesehen werden kann, sondern allenfalls eine Tendenz angeben kann.

7. Literaturverzeichnis

- Ammar; Sidhu; Wilkins (2012): Male infertility: the role of imaging in diagnosis and management. In: *British Journal of Radiology* 85 (1), S. 59-68
- Aravin; Hannon; Brennecke (2007): The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. In: *Science* 318 (5851), S. 761–764.
- Bak; Yoon; Choi (2011): Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. In: *Clin Exp Reprod Med* 38 (2), S. 61.
- Bao; Yan (2012): Male germline control of transposable elements. In: *Biol. Reprod.* 86 (5), S. 162, 1-14.
- Bergmann (2005): Anatomie und Physiologie der männlichen Geschlechtsorgane. Spermatogenese. In: Bretzel Weidner Schill (Hg.): MännerMedizin. In der allgemeinmedizinischen und internistischen Praxis. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer, S. 39–45.
- Bernstein; Denli; Hannon (2001): The rest is silence. In: *RNA* 7 (11), S. 1509–1521.
- Beutel (1999): Psychosomatic aspects in the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. In: *Andrologia* 31 Suppl 1, S. 37–44.
- Bortvin (2013): PIWI-interacting RNAs (piRNAs) - a mouse testis perspective. In: *Biochemistry Mosc.* 78 (6), S. 592–602.
- Bortz; Lienert (2003): Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben ; mit 91 Tabellen. 2. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Bühl; Zöfel (2000): SPSS Version 10. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows ; [Analysen anhand von Fallstudien ; mit dem Modul Tables ; neu: ordinale Regression]. 7. Aufl. München, Boston [u.a.]: Addison-Wesley (Scientific computing).
- Carmell; Xuan; Zhang; Hannon (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. In: *Genes Dev.* 16 (21), S. 2733–2742.

- Carthew (2001): Gene silencing by double-stranded RNA. In: *Current Opinion in Cell Biology* 2001 (13), S. 244–248, zuletzt geprüft am 23.01.2014.
- Centola (2012): Determination of male infertility: is the 2010 WHO reference range helpful or confusing? In: *Fertility and Sterility* 98(6), S. 1416-1417
- Cerutti; Mian; Bateman (2000): Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. In: *Trends Biochem. Sci.* 25 (10), S. 481–482.
- Chuma; Nakano (2013): piRNA and spermatogenesis in mice. In: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368 (1609), S. 20110338.
- Cox; Chao; Baker; Chang; Qiao; Lin (1998): A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. In: *Genes Dev.* 12 (23), S. 3715–3727.
- Deng; Lin (2002): miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. In: *Dev. Cell* 2 (6), S. 819–830.
- Deng; Wang; Choy; Du; Chen; Wang et al. (2014): Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. In: *Gene* 538(2), S. 217-227
- Denschlag; Keck (2009): Diagnostik und Therapie des unerfüllten Kinderwunsches. 2. Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED Verl (UNI-MED Science).
- Faehnle; Joshua-Tor (2007): Argonautes confront new small RNAs. In: *Curr Opin Chem Biol* 11 (5), S. 569–577.
- Frost; Hamra; Richardson; Qi; Bassel-Duby; Olson (2010): MOV10L1 is necessary for protection of spermatocytes against retrotransposons by Piwi-interacting RNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (26), S. 11847–11852.
- Gomes; Nolasco; Soares (2013): Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. In: *Int J Mol Sci* 14 (8), S. 16010–16039.
- Grochola; Greither; Taubert; Möller; Knippschild; Udelnow et al. (2008): The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. In: *Br. J. Cancer* 99 (7), S. 1083–1088.
- Gu; Ji; Shi; Long; Xia; Song et al. (2010): Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. In: *Human Reproduction* 25 (12), S. 2955–2961.

Haag; Hanhart (2012): Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2012/13. 6. Aufl. Hg. v. Markus Müller. Breisach am Rhein: Med. Verl.- und Informationsdienste.

He; Kokkinaki; Pant; Gallicano; Dym (2009): Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. In: *Reproduction* 137 (6), S. 901–911.

Henkel (1998): Ejakulat. In: Krause und Aumüller (Hg.): Andrologie. Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. 3. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke, S. 26–34.

Heyn; Ferreira; Bassas; Bonache; Sayols; Sandoval et al. (2012): Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. In: *PLoS ONE* 7 (10), S. e47892.

Keramat; Masoomi; Mousavi; Poorolajal; Shobeiri; Hazavhei (2014): Quality of life and its related factors in infertile couples. In: *J Res Health Sci* 14 (1), S. 57–63.

Kocelak; Chudek; Naworska; Bąk-Sosnowska; Kotlarz; Mazurek et al. (2012): Psychological Disturbances and Quality of Life in Obese and Infertile Women and Men. In: *International Journal of Endocrinology* 2012, S. 1–14.

Krause; Aumüller (Hg.) (1998): Andrologie. Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. 3. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke.

Kuramochi-Miyagawa; Kimura; Ijiri; Isobe; Asada; Fujita et al. (2004): Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. In: *Development* 131 (4), S. 839–849.

Lewis; Burge; Bartel (2005): Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. In: *Cell* 120 (1), S. 15–20.

Li; Roy; Dong; Bolcun-Filas; Wang; Han et al. (2013): An ancient transcription factor initiates the burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. In: *Mol. Cell* 50 (1), S. 67–81.

Li; Wang; Wan; Liu; Liu; Zhang et al. (2012): Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of microRNAs and piRNAs in the human epididymis. In: *Gene* 497 (2), S. 330–335.

Looijenga; Stoop; Leeuw, Hubert; Gouveia Brazao; Gillis; van Roozendaal et al. (2003): POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. In: *Cancer Res.* 63 (9), S. 2244–2250.

- Lüllmann-Rauch (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme (Taschenlehrbuch).
- Luteijn; Ketting (2013): PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. In: *Nat. Rev. Genet.* 14 (8), S. 523–534.
- Masoumi; Poorolajal; Keramat; Moosavi (2013): Prevalence of Depression among Infertile Couples in Iran: A Meta-Analysis Study. In: *Iran. J. Public Health* 42 (5), S. 458–466.
- Meister (2013): Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. In: *Nat. Rev. Genet.* 14 (7), S. 447–459.
- Mirkovic-Hösle; Förstemann (2014): Transposon Defense by Endo-siRNAs, piRNAs and Somatic piRNAs in *Drosophila*: Contributions of Loqs-PD and R2D2. In: *PLoS ONE* 9 (1), S. e84994.
- Montgomery; Rim; Zhang; Downen; Phillips; Fischer et al. (2012): PIWI Associated siRNAs and piRNAs Specifically Require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog henn-1. In: *PLoS Genet* 8 (4), S. e1002616.
- Müller; Hanhart (2012): Andrologie-Sterilität-Sterilisation. In: Haag und Hanhart: Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2012/13. 6. Aufl. Hg. v. Müller. Breisach am Rhein: Med. Verl.- und Informationsdienste, S. 394–403.
- Müller; Hassel (2012): Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen. Ein einführendes Lehrbuch. 5. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Murray; James; McGeady; Reed; Kuang; Nangia (2012): The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. In: *Fertility and Sterility* 98(6), S. 1428-1431
- Nachtigall; Becker; Wozny (1992): The effects of gender-specific diagnosis on men's and women's response to infertility. In: *Fertil. Steril.* 57 (1), S. 113–121.
- Nieschlag; Schlatt; Behre; Kliesch (Hg.) (2012): WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates. 5. Aufl. Berlin: Springer.

- Nieschlag (2009): Einleitung. Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: Nieschlag, Behre und Nieschlag (Hg.): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, S. 3–12.
- Nieschlag; Behre; Nieschlag (Hg.) (2009): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.
- Niwa; Miyazaki; Smith (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. In: *Nat. Genet.* 24 (4), S. 372–376.
- Oberpenning; Muthny; Oberpenning (2009): Psyche und Sexualität. Psychologie der Fertilitätsstörungen. In: Nieschlag, Behre und Nieschlag (Hg.): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, S. 535–552.
- Olovnikov; Kalmykova (2013): piRNA clusters as a main source of small RNAs in the animal germline. In: *Biochemistry Mosc.* 78 (6), S. 572–584.
- Peters; Meister (2006): Kleine nicht-kodierende RNAs als Regulatoren der Genexpression. Regulatorische RNAs. In: *Biospektrum* 2006 (06), S. 615–618.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Reproductive Endocrinology and Infertility; The American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama (2008): Optimizing natural fertility (2008). In: *Fertility and Sterility* 90 (5), S. S1.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion (2012). In: *Fertility and Sterility* 98 (2), S. 294–301.
- Revonta; Raitanen; Sihvo; Koponen; Klemetti; Männistö; Luoto (2010): Health and life style among infertile men and women. In: *Sexual & Reproductive Healthcare* 1 (3), S. 91–98.
- Schill; Bretzel; Weidner (Hg.) (2005): MännerMedizin. In der allgemeinmedizinischen und internistischen Praxis. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Shahid (2009): Depression in infertile couples. In: *J Coll Physicians Surg Pak* 19 (6), S. 395–396.
- Tournaye; Cohlen (2012): Management of male-factor infertility. In: *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 26 (6), S. 769–775.

- Weinbauer; Luetjens; Simoni ; Nieschlag (2009): Physiologie der Hodenfunktion. Funktionelle Organisation der Hoden. In: Nieschlag, Behre und Nieschlag (Hg.): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, S. 16–61.
- Wilson; Doudna (2013): Molecular mechanisms of RNA interference. In: *Annu Rev Biophys* 42, S. 217–239.
- Wirtberg; Möller; Hogström; Tronstad; Lalos (2007): Life 20 years after unsuccessful infertility treatment. In: *Hum. Reprod.* 22 (2), S. 598–604.
- Wischmann; Korge; Scherg; Strowitzki; Verres (2012): A 10-year follow-up study of psychosocial factors affecting couples after infertility treatment. In: *Human Reproduction* 27 (11), S. 3226–3232.
- Wokalek; Wetterauer; Heite (op. 1995): Das männliche Genitale -Anatomie und Funktion. In: Wokalek, Wetterauer und Heite (Hg.): Männerheilkunde - Andrologie. Einführung in die Krankheiten und Funktionsstörungen des männlichen Genitale. Stuttgart [etc.]: Gustav Fischer (UTB für Wissenschaft. Grosse Reihe), S. 1–19.
- Wokalek; Wetterauer; Heite (Hg.) (op. 1995): Männerheilkunde - Andrologie. Einführung in die Krankheiten und Funktionsstörungen des männlichen Genitale. Stuttgart [etc.]: Gustav Fischer (UTB für Wissenschaft. Grosse Reihe).
- World Health Organization (WHO), Human reproduction programme:
<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/> Zuletzt geprüft am 28.02.2015, 19:15 Uhr
- Xu; Hu; Wang; Chen; Yang; Zhu et al. (2012): Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. In: *Journal of Proteomics* 75 (17), S. 5426–5436.
- Yadav; Kotaja (2014): Small RNAs in spermatogenesis. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 382 (1), S. 498–508.
- Yakushev; Sokolova; Gvozdev; Klenov (2013): Multifunctionality of PIWI proteins in control of germline stem cell fate. In: *Biochemistry Mosc.* 78 (6), S. 585–591.
- Yamamoto; Watanabe; Hoki; Shirane; Li; Ichiiyanagi et al. (2013): Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus. In: *Genome Res.* 23 (2), S. 292–299.

Zhang; Stojkovic; Przyborski; Cooke; Armstrong; Lako; Stojkovic (2006): Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. In: *Stem Cells* 24 (12), S. 2669–2676.

8. Thesen

1. Die in der Arbeit untersuchten Proteine Piwi-like 1 und Piwi-like 3 spielen eine essentielle Rolle in der Regulation der Spermatogenese und damit der Fortpflanzungsfähigkeit des Individuums. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte diese in tierexperimentellen Studien aufgestellte These auch am Menschen untersucht werden.
2. Der Anteil an progressiv motilen Spermien im Ejakulat korreliert signifikant mit dem mRNA-Expressionsniveau von Piwi-like 1. So ist eine erhöhte Expression von Piwi-like 1 mit einem niedrigeren Anteil an progressiv motilen Spermien assoziiert.
3. Der Anteil an vitalen Spermien im Ejakulat korreliert indirekt signifikant mit der Expressionsrate von Piwi-like 1. Dies lässt eine unvollständig abgelaufene Spermio-genese vermuten, so dass nur ein verringerter Anteil reifer bzw. vitaler und progressiv motiler Spermien entstehen kann.
4. In den statistischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate von Piwi-like 1 jedoch nicht als signifikanter Marker für eine eingeschränkte Fertilität angesehen werden kann, sondern allenfalls tendenziell assoziiert ist.
5. Es konnte kein weiterer signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Piwi-like1 und den restlichen Spermio-grammvariablen gefunden werden. Untersuchungen an höheren Fallzahlen könnten allerdings weitere Zusammenhänge aufzeigen.

9. Anhang

- I) Votum der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Durchführung der Studie

- II) Information und Einverständniserklärung der Studienteilnehmer

- III) Curriculum vitae

- IV) Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

- V) Danksagung

EINGEGANGEN 22. April 2010



MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT
HALLE-WITTENBERG

Medizinische Fakultät
Ethik-Kommission

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)

Herrn Prof. Dr. H. M. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und
Andrologie
Klinikum der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Ernst-Grube-Straße 40
06097 Halle

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen

Datum

hm-bü

19.04.2010

Postanschrift:
06097 Halle (Saale)

**Analyse der molekularen Faktoren männlicher Unfruchtbarkeit in
Blut, Samen und Hodengewebsproben**

Hausanschrift:
Magdeburger Straße 8
06112 Halle (Saale)

Sehr geehrter Herr Professor Behre,

die Ethik-Kommission hat Ihren Antrag vom 12.04.2010 zur oben
genannten Studie am 14.04.2010 in Ihrem Beisein beraten.

Geschäftsstelle:
Tel 0345 557-4476
Fax 0345 557-4477
E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de
Internet: www.medizin.uni-halle.de/

Sie hatten folgende Unterlagen eingereicht:

- Antrag vom 09.04.2010 mit Darstellung des Forschungsvorhabens,
- Patienteninformation Version 1.0 vom 09.04.2010,
- Einwilligungserklärung Version 1.0 vom 09.04.2010.

Bankverbindung:
Deutsche Bundesbank,
Filiale Magdeburg
Konto: 80001530
BLZ: 81000000

Die Ethik-Kommission hat keine Bedenken gegen die Durchführung der
Studie.

IBAN:
DE3781000000080001530
BIC:
MARKDEF1810

Mit freundlichen Grüßen

Steuernummer: 111/144/02550
(Finanzamt Halle-Nord)

Prof. Dr. med. Josef N. Neumann
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

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

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

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

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

Universitätsklinikum Halle (Saale) | Postfach | 06097 Halle (Saale)

Zentrum für**Reproduktionsmedizin****und Andrologie (ZRA)****Direktor:****Univ.-Prof. Dr. med.****Hermann M. Behre**

Hausanschrift:

Ernst-Grube-Straße 40

06120 Halle

Sekretariat:

Tel.: (0345) 557 4782

Fax: (0345) 557 4788

ZRA@medizin.uni-halle.de

Patienteninformation

zur Einwilligung in die wissenschaftliche Verwendung von Blut- und Ejakulatproben und der damit zusammenhängenden

personenbezogenen Daten zu Forschungszwecken

Titel der Studie:

„Analyse der molekularen Faktoren männlicher Infertilität in Ejakulat- und Blutproben“

Sehr geehrte Patient,

bei Ihnen wurde die Diagnose einer Unfruchtbarkeit gestellt. Unser Forschungsprojekt verfolgt das Ziel, neue molekulare Faktoren männlicher Unfruchtbarkeit aus Blut- und Ejakulatproben zu finden.

Eine Gruppe von Proteinen, die möglicherweise mit Unfruchtbarkeit zusammenhängen, sind die Piwi-Proteine. Es handelt sich dabei um eine Familie von Eiweißkörpern, die eine Rolle bei der Erhaltung von Keimzellen spielen. Es wird vermutet, dass die Spermien nicht richtig ausreifen, wenn diese Proteine ihre Funktion nicht ausüben können. Ob das der Fall ist und welche Mechanismen diesem Funktionsverlust unterliegen, wollen wir in dieser Studie untersuchen.

Wir möchten hierzu wissenschaftliche Untersuchungen an einer Blutprobe und einer Ejakulatprobe von Ihnen durchführen. Da zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht feststeht, welche Untersuchungen abgesehen von den oben genannten Untersuchungen stattfinden werden, können wir Sie heute hierüber nicht detaillierter informieren. Wir werden aber alle zusätzlichen zukünftigen Untersuchungen an Ihrer Ejakulat- und Blutprobe der zuständigen Ethik-Kommission zur Bewertung vorlegen. Die gesamte klinische Studie wird mehrere Jahre dauern (mindestens 4 Jahre).

Ambulanz
Reproduktionsmedizin:

Tel.: (0345) 557 3332

Fax: (0345) 557 2490

Ambulanz Andrologie:

Tel.: (0345) 557 4783

Fax: (0345) 557 4788

Die Untersuchungen haben keinen Einfluss auf Ihre jetzige ärztliche Betreuung und Therapie. Sie haben also durch die Teilnahme an der Studie keinen erkennbaren Vorteil. Wir hoffen, dass es in Zukunft mit den Ergebnissen der Studie möglich ist, anderen betroffenen Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch gezielter zu helfen. Da die Blutprobe von ca. 10 ml sowie die Ejakulatprobe anlässlich einer aus anderen Gründen erforderlichen Probennahme gewonnen werden, haben Sie durch die Teilnahme an der Studie auch kein erkennbares Risiko oder einen Nachteil. Eine Patientenversicherung für die Studie wird nicht abgeschlossen. Eine kommerzielle Nutzung der Proben wird ausgeschlossen.

Die Blutproben werden nach der Entnahme in die zellulären Bestandteile und das Serum aufgetrennt und tiefgefroren gelagert. Im Serum werden die Konzentration und Aktivität verschiedener Marker untersucht, die im Zusammenhang mit Unfruchtbarkeit stehen können. Aus den zellulären Bestandteilen der Blutprobe wird Erbmateriale (DNA und RNA) isoliert, gelagert und auf mögliche Faktoren einer Unfruchtbarkeit untersucht.

Die Spermien aus der Ejakulatprobe werden zum Zwecke der Untersuchung innerhalb einiger Tage aufgeschlossen, d.h. sie können dann nicht mehr für die Befruchtung einer Eizelle eingesetzt werden. Die einzelnen Spermienbestandteile, die isoliert werden (DNA, RNA, Proteine), können ebenfalls nicht mehr zur Befruchtung eingesetzt werden.

Die Blut- und Ejakulatproben und die aus ihnen gewonnenen Bestandteile gehen in das Eigentum des Universitätsklinikums Halle über und werden dort, solange Ihr Einverständnis besteht, bis zu 20 Jahren gelagert. Eine Weitergabe an Dritte erfolgt nur ohne Möglichkeit der Zuordnung zu Ihrer Person und ebenfalls nur nach zustimmender Bewertung der Ethik-Kommission.

Seit Juni 2013 besteht ein gemeinsames Forschungsprojekt mit dem Institut für Anthropologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Im Rahmen dieser Kooperation wird auch ein Teil der DNA aus Ihrer Probe in Mainz analysiert. Es werden Spermien-bezogene Gene untersucht, die in Verbindung mit der Fruchtbarkeit stehen, aber aktuell keinen Bezug zu anderen Krankheiten aufweisen. Bei neuen gesundheitsrelevanten Befunden aus den genetischen Untersuchungen haben Sie aber als Patient das Recht auf Wissen bzw. Nicht-Wissen und können auf Wunsch im Rahmen einer humangenetischen Beratung über den Befund aufgeklärt werden.

Falls Sie Ihr Einverständnis zurückziehen, werden die Proben und die damit gewonnenen Daten vernichtet. Wir möchten darauf hinweisen, dass Sie Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen können, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile für Ihre weitere medizinische Versorgung eintreten.

Es ist geplant, die Ergebnisse der Untersuchungen zu veröffentlichen und so der Allgemeinheit zugänglich zu machen, wobei eine Rückverfolgung auf Ihre Person sicher ausgeschlossen ist. Eine Vernichtung der dann rein anonymen Daten ist dann nicht mehr möglich.

Der Studienleiter der Studie ist:

Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre
Direktor des Zentrums für
Reproduktionsmedizin und Andrologie
Universitätsklinikum Halle (Saale)
Ernst-Grube-Str. 40
06120 Halle
Tel. 0345-557-4782 Fax 0345-557-4788

**Einverständniserklärung für Gewinnung und die wissenschaftliche Verwendung
meiner Blutprobe und meiner damit zusammenhängenden personenbezogenen
Daten zu Forschungszwecken**

Titel der Studie:

**„Analyse der molekularen Faktoren männlicher Infertilität
in Ejakulat- und Blutproben“**

Ich, _____

Vorname und Name des Patienten (in Druckbuchstaben), Geburtsdatum

wurde von _____
Vorname und Name der/s aufklärenden Ärztin/Arztes (in Druckbuchstaben)

über Wesen und Bedeutung der Studie „Analyse der molekularen Faktoren männlicher Infertilität in Ejakulat- und Blutproben“ eingehend aufgeklärt. Der Zweck der Untersuchung wurde mir erläutert. Ich habe die Patienteninformation und Einverständniserklärung gelesen. Ich fühle mich ausreichend informiert und habe verstanden, worum es geht. Meine Ärztin/mein Arzt hat mir Gelegenheit gegeben, weitere Fragen zu stellen.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass die Einwilligung zur Studie freiwillig ist. Ich wurde ebenfalls aufgeklärt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir dadurch Nachteile für meine weitere medizinische Versorgung entstehen. In diesem Fall werden meine Ejakulat- und Blutproben und die für die Studie erhobenen Daten, soweit noch möglich, vernichtet.

Hiermit erkläre ich mich freiwillig bereit, eine Blutprobe und eine Ejakulatprobe für die Analyse molekularer Faktoren der Unfruchtbarkeit und meine damit

zusammenhängenden personenbezogenen Daten für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

Mir ist bekannt, dass für diese Studie meine personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, in pseudonymisierter Form niedergeschrieben, elektronisch erfasst, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Pseudonymisiert bedeutet, dass für die Identifizierung der Proben und Daten keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und / oder Buchstabencode; eine Zuordnung der pseudonymisierten Daten und Proben auf meine Person ist nur durch eine Referenzliste möglich, die räumlich getrennt von den Forschungsbereichen aufbewahrt wird und ausschließlich dem Studienleiter Prof. Dr. H. M. Behre zugänglich ist. Alle Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Die Bestimmungen der Datenschutzgesetze des Bundes und des Landes Sachsen-Anhalt werden eingehalten.

An der pseudonymisierten Blutprobe werden zusammen mit den pseudonymisierten personenbezogenen Daten wissenschaftliche Untersuchungen zum Thema Unfruchtbarkeit durchgeführt.

Ich bin mit einer Weitergabe meiner pseudonymisierten Proben und Daten an andere Forschungseinrichtungen einverstanden, soweit dies aus wissenschaftlichen Gründen sinnvoll erscheint und eine zustimmende Bewertung der Ethikkommission vorliegt. Ich wurde darüber informiert, dass die wissenschaftliche Auswertung meiner Daten ausschließlich pseudonymisiert erfolgt. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass ich über die Ergebnisse der Untersuchungen meiner Proben ohne meine ausdrückliche Bitte nicht informiert werde.

Eine Kopie / ein Exemplar der Patientinneninformation und der unterschriebenen Einverständniserklärung habe ich erhalten.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten

Ort, Datum
Arztes

Unterschrift der aufklärenden Ärztin/des aufklärenden

Curriculum vitae

Carina Möisinger

***17.01.1988 in Coburg**

Jahnstraße 11a | 40215 Düsseldorf

carinamoesinger@googlemail.com

0176 638 36 128

Berufsausbildung

Mai 2014 bis heute

Beginn der Facharztausbildung in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Leverkusen

November 2013

Erfolgreich bestandener Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Erhalt der Approbation als Ärztin

August 2012 | Juli 2013

Praktisches Jahr

1. Tertial: Gynäkologie

Universitätsklinikum Kröllwitz | Ernst-Grube-Straße 40, 06120 Halle (Saale),

Deutschland

2. Tertial: Chirurgie

Diakoniekrankenhaus Halle (Saale) | Mühlweg 7, 06114 Halle (Saale), Deutschland

3. Tertial: Innere Medizin

Spital Wattwil | Steig 1, 9630 Wattwil, Schweiz

Seit 2010

Promotion im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

September 2009

Erfolgreich bestandener Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seit 2007

Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

1998-2007

Gymnasium Ernestinum Coburg

1994-1998

Grundschule Coburg-Neuses

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Düsseldorf, den 01.06.2015

Carina Möisinger

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre und Herrn Dr. rer. nat. T. Greither herzlich bedanken, für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie sämtlicher Materialien. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. rer. nat. T. Greither danken, für seine umfassende Unterstützung, kompetente Beratung und Betreuung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) für die freundliche Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dipl.-Biol. M. Kraus, der mich bei der Einarbeitung in die Laborarbeit sehr unterstützt hat. Danke auch an Frau Constanze Kloß, für die Anfertigung der Spermioграмme.

Des Weiteren möchte ich allen Spendern danken, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Für die Unterstützung und aufmunternden Worte danke ich meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinem Freund Marc-Aurel Freimuth und meiner Schwester Kerstin.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Weg immer sehr unterstützt haben.