

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Reproduktionsgenetik

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann -

Mutation im *ATRX*-Gen als mögliche genetische Ursache männlicher Infertilität  
aufgrund eines Meiose-Arrestes in den männlichen Keimzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Gleim, Greta

aus Kassel

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Gromoll

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Reproduktionsgenetik

- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. F. Tüttelmann -

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. F. Tüttelmann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Gromoll

## **Zusammenfassung**

Mutation im *ATRX*-Gen als mögliche genetische Ursache männlicher Infertilität  
aufgrund eines Meiose-Arrestes in den männlichen Keimzellen  
von Greta Gleim

Das *ATRX*-Gen kann bei Sequenzveränderungen zum *ATRX*-Syndrom führen, welches neben starken geistigen und körperlichen Beeinträchtigungen auch das Symptom der männlichen Infertilität beinhaltet. Bei einer dieser Arbeit vorausgegangenem *whole exome sequencing* (WES) konnte das *ATRX*-Gen aufgrund von zwei Sequenzveränderungen als ein potentieller Kandidat für männliche Infertilität detektiert werden. Die Hypothese der milden Mutation des *ATRX*-Gens mit alleiniger Ausprägung des Symptoms der männlichen Infertilität wurde an einem Patientenkollektiv von 27 Patienten mit beidseitigem vollständigen Meiosearrest versucht zu bestätigen. Dabei wurde anhand von DNA-Proben das *ATRX*-Gen mittels PCR amplifiziert, sequenziert und analysiert sowie mit einer Kontrollgruppe (n=189) und der Datenbank gnomAD verglichen. Zusätzlich zu den zwei bereits zuvor bekannten Sequenzveränderungen konnten 17 weitere detektiert werden. Insgesamt befanden sich drei Sequenzveränderungen innerhalb der Exone, wovon keines mithilfe der computergestützten Analyse mit einer Infertilität in Zusammenhang gebracht werden konnte. Die 16 weiteren Sequenzveränderungen befanden sich alle außerhalb des kodierenden Bereiches mit keinerlei Einfluss auf den Spleißprozess. Der Vergleich der detektierten Häufigkeiten mit der Kontrollgruppe und der gnomAD Datenbank erbrachte keine Auffälligkeiten. Ein Zusammenhang zwischen Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen mit Folge eines vollständigen Meiosearrestes und somit männlicher Infertilität konnte damit nicht bestätigt werden oder nur in seltenen Fällen.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2021

## Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Mutation im *ATRX*-Gen als mögliche genetische Ursache männlicher Infertilität  
aufgrund eines Meiose-Arrestes in den männlichen Keimzellen

im

Institut für Reproduktionsgenetik

unter der Anleitung von:

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Frank Tüttelmann

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Essen, den 09.01.2021

Greta Gleim

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Männliche Infertilität .....	1
1.2	Spermatogenese .....	2
1.3	Azoospermie .....	4
1.4	Genetisch induzierte Infertilität .....	5
1.5	Diagnostik der männlichen Infertilität .....	6
1.6	ATRX-Syndrom .....	7
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1	Material .....	11
2.1.1	Chemikalien .....	11
2.1.2	Kits .....	11
2.1.3	Enzyme .....	11
2.1.4	Längenstandards .....	12
2.1.5	Verbrauchswaren .....	12
2.1.6	Puffer und Stammlösungen .....	12
2.1.7	Geräte .....	13
2.2	Herkunft verwendeter Patientenproben .....	13
2.3	Methoden .....	14
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	14
2.3.2	Agarosegelelektrophorese .....	17
2.3.3	Enzymatische Aufreinigung des PCR-Produktes .....	18
2.3.4	DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	19
2.3.5	Aufreinigung des Sequenzierungs-Produktes mittels Sephadex-Platten .....	20
2.3.6	Auswertung der Sequenzergebnisse .....	21
2.4	Primersequenzen .....	21
2.5	Statistische Auswertung .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1	Sequenzveränderungen .....	26
3.2	Bewertung Sequenzveränderung .....	29
3.3	Statistische Überprüfung .....	29
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>32</b>
4.1	Das ATRX-Gen .....	33
4.2	Sequenzveränderungen im ATRX-Gen .....	34
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>43</b>

<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>45</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>46</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Männliche Infertilität

Unter Infertilität versteht man das Ausbleiben einer Schwangerschaft innerhalb eines Jahres regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehrs. Hierbei kann die primäre von der sekundären Infertilität unterschieden werden. Die primäre Infertilität beschreibt das vollkommene Ausbleiben einer Schwangerschaft, während bei der sekundären Infertilität bereits eine Schwangerschaft erfolgt ist und weitere ausbleiben (E. Nieschlag, 2009).

Bei etwa 10-15% der Paare im reproduktionsfähigen Alter bleibt eine Schwangerschaft innerhalb dieses Zeitraumes aus. Bei circa der Hälfte dieser Fälle liegt die Ursache oder zumindest eine Mitursache beim Mann (Tüttelmann, 2011). Weltweit und ebenfalls innerhalb Deutschlands sind starke regionale Schwankungen dieses Wertes zu finden (Juil et al., 1999).

Die Ursachen der Infertilität bestehen aus einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren und können von hoher Diversität sein. So können Fehler in übergeordneten Zentren, den Testes selbst oder in posttestikulären Strukturen zu finden sein. Als Einflussfaktoren müssen neben allgemeinen und systemischen Erkrankungen, Umweltfaktoren, psychische Faktoren und Anomalien der Sexualorgane sowie auch genetische Komponenten genannt werden, die auf den oben genannten Ebenen in den Prozess der Fertilität eingreifen können (Tüttelmann & Nieschlag, 2009). Untersuchungen zeigten, dass eine genetische Komponente bei männlicher Infertilität eine entscheidende Rolle spielt (Tüttelmann, 2011). Spezielle Familienuntersuchungen belegen, dass innerhalb des Verwandtenkreises eines infertilen Mannes überproportional viele Männer mit ebenfalls unerfülltem Kinderwunsch vorhanden sind (Meschede et al., 2000). Die Wahrscheinlichkeit für eine genetische Ursache steigt mit abnehmender Spermienzahl. Bei etwa jedem 20. bis 25. Mann einer unselektierten infertilen Gruppe kann eine genetische Ursache diagnostiziert werden, reduziert man diese Gruppe auf Personen ohne nachweisbare Spermien im Ejakulat (Azoospermie) erhöht sich diese Zahl

sogar auf jede 5. Person (Tüttelmann et al., 2011). Folglich ist mit abnehmender Spermienzahl im Ejakulat eine Untersuchung auf genetische Ursachen sinnvoll.

Genetische Ursachen der männlichen Infertilität können sowohl chromosomale Aberrationen, Y-chromosomale Mikrodeletionen als auch Sequenzvarianten in verschiedenen Genen sein (Tüttelmann et al., 2018). Chromosomale Veränderungen können sowohl Autosome als auch Gonosome betreffen. Bekannte Beispiele sind das Klinefelter-Syndrom (47,XXY), strukturelle Chromosomenveränderungen (z.B. Translokationen) und Mikrodeletionen der AZF-Region im Y-Chromosom (Behre et al., 2015). Ein bekannter Gendefekt wird im *CF*-Gen bei Patienten mit einer CBAVD (Congenitale Bilaterale Aplasie des Vas deferens) gefunden, mit Folge einer Fehlbildung der Wolff-Gänge und daraus resultierender obstruktiven Azoospermie (s. Kapitel 1.3 Azoospermie) (Tüttelmann, 2010). Demgegenüber sind in den letzten Jahren zunehmend Publikationen über Sequenzvarianten in Genen zu finden, die mit der Spermatogenese in Verbindung gebracht werden und die Keimzellbildung in verschiedenen Stadien der Meiose regulieren. Neben diesen genetischen Faktoren, die über einen Defekt in der Meiose zu einer verminderten Spermienzahl führen, finden sich auch zunehmend mehr Publikationen zu genetischen Veränderungen, die zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung der Spermien führen (Tüttelmann et al., 2018).

## **1.2 Spermatogenese**

Die Spermatogenese läuft innerhalb des Epithels der Samenkanälchen, der *Tubuli seminiferi*, ab. Dabei differenzieren sich Keimzellen von basal nach luminal des keimtragenden Epithels zu reifen Spermien. Diese Reifung lässt sich grundsätzlich in unterschiedliche Phasen gliedern. Primär findet eine Vermehrung der Keimzellen (Mitose) statt, danach erfolgt eine meiotische Reifeteilung und anschließender Spermio-genese. Abschließend erfolgt die Spermiation, bei der die reifen Spermien in das Lumen des Samenkanals abgegeben werden (Weinbauer et al., 2009). Dieser Prozess der Spermatogenese ist der Abbildung 1-1 schematisch zu entnehmen.

Die Proliferation der Keimzellen beginnt mit den basal liegenden Spermatogonien mit diploiden Chromosomensatz ( $2n2C$ ), das heißt in der Zelle liegt ein doppelter Chromo-

somensatz mit jeweils nur einem Chromatid vor (Bergmann, 2005). Diese Spermatogonien lassen sich in Typ A und Typ B unterscheiden, während sich Typ A weiterhin in Ad(ark) und Ap(ale) differenzieren lässt (Weinbauer et al., 2009). Die Ad-Spermatogonien stellen eine Art testikuläre Stammzellpopulation dar (Ehmcke et al., 2006). Eine Ap-Spermatogonie teilt sich wieder in eine A-Spermatogonie, die weiter mitotisch aktiv ist, und in eine B-Spermatogonie, die sowohl mitotisch aktiv als auch weiter in den Prozess der Meiose übergehen kann. B-Spermatogonien, die ihre letzte mitotische Teilung durchgeführt haben, bleiben vorerst miteinander verbunden (Bergmann, 2005).

Die Meiose beginnt mit der Verdopplung der DNA, bei der zunächst primäre Spermatozyten mit jeweils zwei Chromatiden je Chromosom ( $2n4C$ ) entstehen. Anschließend erfolgt die erste Reifeteilung, bei der aus einer primären Spermatozyte zwei sekundäre Spermatozyten hervorgehen. Hierbei werden die homologen Chromosomen, nicht jedoch die Chromatiden getrennt ( $1n2C$ ). Bei der folgenden zweiten Reifeteilung teilen sich nun auch die Chromatiden auf jeweils zwei Tochterzellen auf, sodass Spermatisden mit haploiden Chromosomensatz entstehen ( $1n1C$ ).

Bei der sich anschließenden Spermiogenese erfolgt die Reifung und Differenzierung der runden Spermatisden, wie die Entwicklung des Akrosom, des Spermienkopfes und

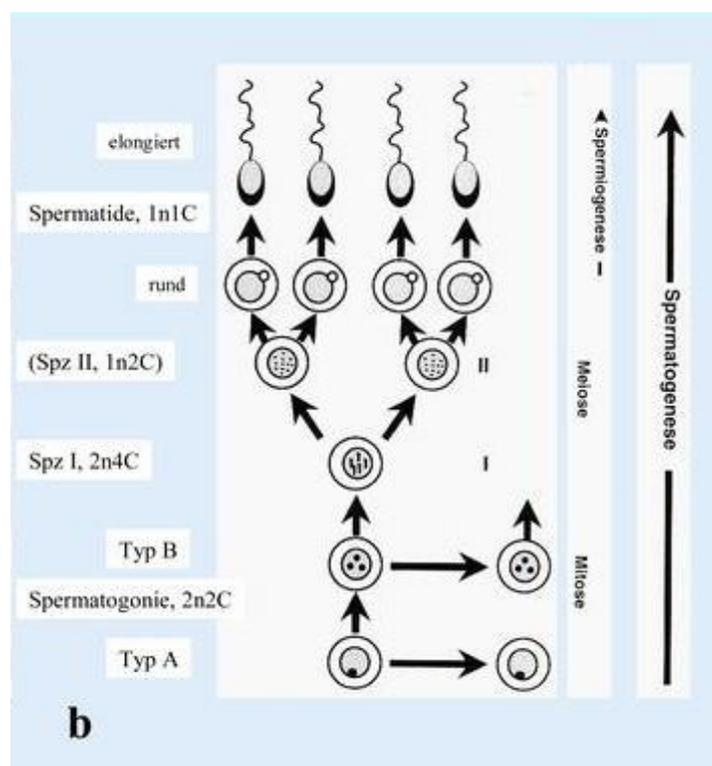


Abbildung 1-1 | Schema der Spermatogenese nach Bergmann (2005)

der Geißel, sowie der Abschnürung von Zytoplasma, auch Residualkörper genannt. Werden die gereiften Spermatiden bei der Spermiation abschließend in das Tubuluslumen entlassen, werden sie als Spermatozoen bezeichnet (Bergmann, 2005). Ab dem Stadium der runden Spermatide ist bei Ausbleiben einer Spermiation eine Befruchtung durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) nach TESE (testikulärer Spermienextraktion) möglich (Weinbauer et al., 2009).

### 1.3 Azoospermie

Die Azoospermie beschreibt ein vollständiges Fehlen von Spermien im männlichen Ejakulat. Etwa 10-15% der Männer infertiler Paare sind hiervon betroffen (Tüttelmann, 2010). Die Diagnose Azoospermie kann bei Männern mittels einer Hodenbiopsie gesichert werden, welche gleichzeitig zur Entnahme von Spermatozoen, falls vorhanden, genutzt wird. Diese Spermatozoen können zur assistierten Reproduktion (ART) genutzt werden (Tüttelmann et al., 2018).

Die Azoospermie wird in eine obstruktive und nichtobstruktive Azoospermie unterteilt. Bei der obstruktiven Azoospermie liegt ein Verschluss der Samenwege vor, sodass zwar Spermien gebildet werden, diese aber nicht ins Ejakulat abgegeben werden können. Die nichtobstruktive Azoospermie hingegen beruht ursächlich auf einer Spermatogenesestörung und stellt sich auf histologischer Ebene in verschiedenen Formen dar. Eine Form ist die „*mixed atrophy*“ oder auch „bunte“ Atrophie, bei der innerhalb benachbarter Tubuli verschiedene Stadien von Spermatogenesedefekten zu finden sind. Sie beruht auf einem Differenzierungsdefizit der Sertoli-Zellen (Bergmann, 2005). Weiterhin sind histologische Bilder von einem Arrest der Spermatogenese, zumeist innerhalb des Stadiums der runden Spermatiden oder in Form eines Meiose-Arrestes im Stadium der Spermatozyte zu finden (Tüttelmann et al., 2018). Das dritte histologische Bild ist das „*Sertoli cell-only Syndrom*“ (SCOS), bei der in den Tubuli keine Stammzellen zu finden sind (Nieschlag et al., 2009).

Diese histologischen Bilder machen es möglich, bei einer ausbleibenden Schwangerschaft mit der Ursache auf Seiten des Mannes eine Klassifizierung durchzuführen, eine kausale Diagnose stellt dies jedoch nicht dar (Tüttelmann et al., 2018).

#### 1.4 Genetisch induzierte Infertilität

Bei nur etwa 28% der unselektierten infertilen Männer kann eine kausale Diagnose zugeordnet werden. Bei den zumeist wenig angelegten epidemiologischen Studien wurden Chemo- oder Radiotherapien sowie allgemeine bzw. systemische Erkrankungen und Testosteronabusus als Ursache angeführt. Einzig 4% können auf kausale genetischen Ursachen zurückgeführt werden (Tüttelmann et al., 2018). Dabei ist jedoch anzunehmen, dass für bis zu der Hälfte der Fälle eine genetische Ursache vorhanden sein sollte (Lee et al., 2011). Beispielsweise kann bei circa 20% der infertilen Männer mit obstruktiver Azoospermie eine Chromosomenstörung nachgewiesen werden (O'Flynn O'Brien et al., 2010).

Eine der häufigsten bei infertilen Männern auftretenden kongenitalen Chromosomenaberration stellt das Klinefelter Syndrom mit 1-2 von 1000 männlichen Neugeborenen dar. Männer mit einem Klinefelter-Syndrom zeigen in der Regel ein zusätzliches X-Chromosom (47,XXY), wobei auch Mosaikzustände mit einer normalen Zelllinie möglich sind, wie auch das Vorliegen von weiteren zusätzlichen X-Chromosomen. Typischerweise geht dieses Syndrom mit einer Azoospermie und Testosteronmangel einher (Nieschlag et al., 2014). Y-chromosomale Mikrodeletionen der AZF-Loci führen zu einer Azoo- oder hochgradigen Oligzoospermie (Ferlin et al., 2007). Weiterhin bekannt sind Mutationen im CFTR-Gen welche zu einer Mukoviszidose führen, aber auch in 95% der Fälle mit einer obstruktiven Azoospermie einhergehen (Ludwig et al., 2004). Eine Mutation in Genen, die für die Migration und Funktion von *Gonadotropin-Releasing-Hormon* (GnRH), dessen Neuronen oder deren Zielrezeptoren zuständig sind, ist bei Patienten mit kongenitalem Hypogonatotropen Hypogonadismus zu finden (Boehm et al., 2015).

Als genetische Ursache sollten weiterhin Störungen in der Androgenfunktion, syndromale Formen, welche Infertilität als ein (Teil-)Symptom beinhalten, und spezifische Spermiendefekte wie Globozoospermie und Zilienstrukturdefekte genannt werden (Tüttelmann et al., 2018). Weiterhin konnten bereits einige Gene, wie beispielsweise *TEX11* (Yatsenko et al., 2015), *DMRT1* (Tewes et al., 2014) und *NR5A1* (Bashamboo et

al., 2010; Röpke et al., 2013) ermittelt werden, die mit unterschiedlichen Formen der männlichen Infertilität in Verbindung gebracht werden.

### **1.5 Diagnostik der männlichen Infertilität**

Da bei Ausbleiben einer Schwangerschaft die Ursachen sowohl auf Seiten des Mannes als auch der Frau zu finden sind, ist eine interdisziplinäre Betreuung der Paare zu empfehlen. Diesbezüglich wurde im Jahr 2019 die erste deutsche Leitlinie zur Beratung, diagnostischer Abklärung und Behandlung von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch beschlossen (DGGG et al., 2019). Diese Leitlinie empfiehlt eine gleichzeitige andrologische und gynäkologische Diagnostik und beinhaltet eine (Paar-)Anamnese, körperliche Untersuchungen, Ejakulatanalyse, Erhebung des somatischen Befundes mittels Skrotalsonographie, endokrinologischer Analytik (Hormonstatus von FSH, LH, Testosteron) und gegebenenfalls eine genetische Diagnostik.

Die Ejakulatanalyse erfolgt mittels standardisierten Verfahren nach WHO-Richtlinien (World Health Organization [WHO], 2010). Ihre Ergebnisse in Form von Beschreibung der Anzahl, Aussehen und Mobilität der vorgefundenen Spermien stellt jedoch keine ursächliche Diagnose dar, sondern ist die Voraussetzung für weiterführende Diagnostik (Ochsendorf & Weberschock, 2019).

Bei einer Oligozoospermie mit einer Spermienkonzentration  $<5$  Mio/ml und einer nichtobstruktiven Azoospermie sollte nach Ausschluss anderer Ursachen eine genetische Untersuchung auf eine AZF-Mikrodeletion und eine Chromosomenanalyse erfolgen. Bei begründetem Verdacht kann ebenfalls eine molekulargenetische Analyse weiterer Gene erfolgen. Bei Patienten mit einer obstruktiven Azoospermie sollte eine Untersuchung des CFTR-Gens erfolgen, Patienten mit hypergonadotropem Hypogonadismus sollten eine Chromosomenanalyse erhalten (DGGG et al., 2019).

Eine Hodenbiopsie (Testikuläre Spermienextraktion, TESE) kann bei Patienten mit Azoospermie durchgeführt werden, da dadurch eine diagnostische Aussage getroffen werden kann, an welcher Stelle die Spermatogenese gestört ist und ob eventuell vorhandene Spermien zur künstlichen Befruchtung (ART) entnehmbar sind.

## 1.6 ATRX-Syndrom

Das ATRX-Syndrom (Alpha-Thalassämie, mentale Retardierung, X-Chromosomal) ist eine seltene, auf dem X-Chromosom lokalisierte Erkrankung männlicher Patienten. Betroffene Patienten zeigen eine große Bandbreite an klinischen Symptomen, eingeschlossen geistiger Entwicklungsstörungen, verschiedene Formen von fazialen und skelettalen Fehlbildungen, milde Formen von Alpha-Thalassämie, Veränderungen der Genitalien, Mikrozephalie und einem Kleinwuchs (Stevenson, 2020).

Zu einer schweren Entwicklungsstörung, die in 95% der Fälle auftritt, werden auch weniger stark betroffene Patienten beschrieben, bei denen jedoch ebenfalls das Sprachvermögen eingeschränkt bleibt. Patienten mit einem ATRX-Syndrom zeigen eine empathische Bindung zu Bezugspersonen bis hin zu einem autistischen Verhalten. Das faziale Erscheinungsbild wird besonders durch eine Hypotonie und einen auffälligen Mund mit zeltartiger Oberlippe charakterisiert. Anomalien der Genitalien führen dazu, dass männliche ATRX-Patienten in der Regel infertil sind (Gibbons, 2006). Eine Alpha-Thalassämie ist bei etwa 75% der Fälle vorhanden, zumeist jedoch in einer milden Form, die keinerlei Behandlung benötigt (Stevenson, 2020). Weitere Auffälligkeiten können skelettale Fehlbildungen, Mikrozephalie, Kleinwuchs, Krampfanfälle, Herzfehler sowie urogenitale Fehlbildungen sein (Gibbons, 2006).

Das ATRX-Syndrom wird durch Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen verursacht (Gibbons et al., 1995). Das *ATRX*-Gen liegt in der chromosomal Region Xq21.1, erstreckt sich über eine genomische Länge von 300kb und beinhaltet 36 Exone (Pickets et al., 1996). Es kodiert mindestens zwei alternativ gespleißte ca. 10,5kb große mRNA Transkripte (NM\_138270, NM\_000489), welche sich an ihrem 5'Ende unterscheiden und zu zwei unterschiedlichen Proteinen mit einer Größe von 265kDa bzw. 280kDa führen. Ein weiteres Transkript von ca. 7kb Größe stellt eine Isoform dar, welches durch einen Spleißfehler im Intron 11 entsteht und ein verkürztes Protein mit einer Größe von 200kDa kodiert. Die Funktion dieses Transkripts ist nicht abschließend geklärt (Garrick et al., 2004).

Das ATRX-Protein ist ein nukleares Protein und gehört zu der SNF2-Familie, deren Mitglieder Domänen mit einer Helikase- und ATPase-Funktion beinhalten.

Das Protein besitzt zwei stark konservierte Domänen, eine ADD (ATRX, DNTM3, DNTM3L)-Domäne im N-terminalen und eine SNF2-Helikase-Domäne im C-terminalen Bereich des ATRX-Proteins. Die ADD-Domäne ist gekennzeichnet durch einen cysteinereichen Bereich, der ein Zinkfinger-Motiv bildet und als Transkriptionsfaktor wirkt (Argentaro et al., 2007; Otani et al., 2009).

SNF2-Helikase-Domänen besitzen vielfältige zelluläre Funktionen, insbesondere die Regulation der Transkription, Kontrolle des Zellzykluses, DNA-Reparatur und Separierung der Chromosomen während der Mitose. Es wird vermutet, dass das ATRX-Protein diese Prozesse durch Remodellierung von Chromatin erleichtert (Pickets et al., 1996; Xie et al., 1999).

Aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs erkranken in der Regel nur Männer mit einem 46,XY-Karyotyp an einem ATRX-Syndrom. Sequenzvarianten im *ATRX*-Gen können neu entstanden (*de novo*) oder von Müttern übertragen worden sein. Frauen können Konduktorinnen der Erkrankung sein und sind in der Regel klinisch nicht betroffen.

Bei Versuchen mit knock-out Mäusen, bei denen das *ATRX*-Gen deaktiviert wurde, stellte sich aufgrund eines Defekts in der Bildung des Trophoblasten eine Letalität in der frühen Embryogenese ein. Das *ATRX*-Gen ist somit für die frühe Entwicklung notwendig (Garrick et al., 2006). Das Protein lagert sich in heterochromatischen Bereichen an und führt somit zu einer Beeinflussung des Methylierungsmusters (Gibbons, 2006).

Die Mehrheit der krankheitsverursachenden Varianten im *ATRX*-Gen sind Punktmutationen, die zu einem Austausch von Aminosäuren im ATRX-Protein (*missense* Mutation) führen. 50-60% dieser Varianten sind in der ADD-Domäne, eine weitere gehäufte Stelle ist die SNF2-Helikase-Domäne (Gibbons, 2006; Gibbons & Higgs, 2000). Patienten mit einer pathogenen Variante innerhalb der ADD-Domäne zeigen dabei eine schwerere Ausprägung der geistigen Behinderung und der urogenitalen Fehlbildungen als Patienten mit einer Sequenzveränderung in der SNF2-Domäne (Badens et al., 2006).

80% der ATRX-Patienten mit pathogenen Sequenzvarianten im *ATRX*-Gen zeigen genitale Veränderungen. Diese können von milden Krankheitsbildern wie ein Kryptorchismus bis zu schweren Krankheitsbildern wie Hypospadie, Mikropenis und mehr-

deutigen Genitalien bis hin zu normalen weiblichen Genitalien führen. Die am stärksten betroffenen Kinder, welche klinisch unter den Begriff des männlichen Pseudohermaphroditen fallen, sind zumeist betroffen mit einer Verkürzung des C-Terminus des Proteins (Tang et al., 2011). Histologische Analysen der Hoden eines ATRX-Patienten zeigten eine reduzierte Anzahl an Tubuli seminiferi begrenzt von Sertoli-Zellen. Leydig-Zellen konnten zwischen den Tubulusstrukturen nachgewiesen werden, bei völligem Fehlen von Keimzellen (Ion et al., 1996). Histologische Untersuchungen des Hodens eines anderen ATRX-Patienten wiesen den Verlust des interstitiellen Stromas, aber in einem Teil des Hodens auch noch eine geringe Anzahl an Spermatogonien auf (Wilkie et al., 1990). Die urogenitalen Veränderungen bei Patienten mit einem ATRX-Syndrom lassen darauf schließen, dass das ATRX-Protein recht früh in der Embryogenese einen Einfluss auf die männlichen Geschlechtsentwicklung ausübt. Das ATRX-Protein konnte bei Erwachsenen im Hoden nachgewiesen werden, speziell findet eine Expression in somatischen Zellen, wie Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und peritubuläre Myoidzellen, sowie in Keimzellen, wie den Spermatogonien und frühen Spermatozyten, statt (Tang et al., 2011).

Die Beziehung zwischen Alpha-Thalassämie und ATRX Mutation ist unklar, bekannt ist jedoch, dass Patienten mit der gleichen Mutation unterschiedliche Ausprägungen von Alpha-Thalassämien besitzen, sodass vermutlich noch andere genetische Faktoren den Effekt des ATRX-Proteins auf die Alpha-Globin Expression beeinflussen (Gibbons, 2006).

Eine *nonsense*-Sequenzveränderung in Exon 2 an Position (p.Arg37Ter) im Protein ist eine bekannte pathogene Variante, welche in einem allgemein schwächer ausgeprägten Phänotyp mündet (Basehore et al., 2015).

Die Prävalenz des ATRX-Syndroms ist unklar. Mehr als 200 Fälle sind aufgrund genetischer Tests bekannt, eine höhere Dunkelziffer ist aber durchaus denkbar aufgrund möglicher nicht getesteter Individuen mit mildereren Symptomen (Stevenson, 2020).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit einem ATRX-Syndrom, welches durch pathogene Veränderungen im *ATRX*-Gen verursacht wird, zeigen einen sehr variablen Phänotyp, unter anderem mit urogenitalen Fehlbildungen, die zu einer Infertilität führen.

Im Vorfeld wurde, stellvertretend durch Herrn Prof. Dr. Frank Tüttelmann und Herrn Dr. Albrecht Röpke, ein *whole exome sequencing* (WES) bei acht Patienten mit Meiosearrest durchgeführt, bei dem das *ATRX*-Gen bei zwei Patienten als potenzielles Kandidatengen detektiert wurde. Hierbei wurden zwei Sequenzveränderungen (c.2720G>A und c.5579A>G) innerhalb des proteinkodierenden Bereiches des Gens entdeckt.

Daraufhin wurde die Hypothese gestellt, dass Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen, die nur eine milde Auswirkung auf die Funktionalität des ARTX-Proteins haben, möglicherweise zu männlicher Infertilität führen können, ohne weitere Symptome des *ATRX*-Syndroms auszubilden. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, infertile Männer mit einem idiopathischen Meiosearrest auf eine Sequenzveränderung im *ATRX*-Gen hin zu untersuchen. Das Patientenkollektiv der untersuchten Patienten besitzt einen beidseitigen vollständigen Meiosearrest. Die Hodenbiopsie weist keine Keimzellen späteren Stadiums als Spermatozyten in den *Tubuli seminiferi* auf.

Bei der Sequenzanalyse der untersuchten Meiosearrestpatienten sollen die zuvor bei der WES detektierten Sequenzveränderungen, wenn möglich, bestätigt und zusätzliche Varianten bei weiteren Patienten nachgewiesen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien und deren Hersteller aufgelistet.

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2-1 | Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Bioline, Luckenwalde
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Bioline, Luckenwalde
Orange G	Applichem, Darmstadt
Sephadex	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
TE-Puffer (1x)	Promega, Fitchburg, USA
Tris-Base	Affymetrix USB, Cleveland, USA
Wasser HPLC-Grade	Applichem, Darmstadt

#### 2.1.2 Kits

Tabelle 2-2 | Verwendete Kits mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
Bio Taq-DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA

#### 2.1.3 Enzyme

Tabelle 2-3 | Verwendete Enzyme mit Herstellerangaben.

Enzym	Hersteller
ExoSAP-IT Enzyme	Affymetrix USB, Cleveland, USA

### 2.1.4 Längenstandards

Tabelle 2-4 | Verwendeter Längenstandard.

Längenstandard	Hersteller
100bp DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### 2.1.5 Verbrauchswaren

Tabelle 2-5 | Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangaben.

Verbrauchsware	Hersteller
Adhesive PCR Sealing Foil Sheets	Thermo Scientific, UK
Adhesive PCR Film	Peqlab, Erlangen
Combitips advanced 0,2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Biosphere Filtertips	Biosphere Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Biosphere Sarstedt, Nürnbrecht
Fast 96 Detection Plate	Thermo Sicientific, UK
Multiscreen 96 Well Plate	Millipore, Carrigtwohill, Irland
Quali-PCR-Platte 96 Well	Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Tube Strips 0,2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe Lock Tubes 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.1.6 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 2-6 | Verwendete Puffer und Stammlösungen mit Herstellerangaben.

Lösung	Hersteller
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung:	0,01 mg/ml Ethidiumbromid ad Aqua dest.
Ethidiumbromid-Stammlösung:	0,1 mg/ml Ethidiumbromid ad Aqua dest.
Gelladepuffer Orange G:	35 ml Aqua dest. 15ml Glycerol 100% 100mg Orange G
100bp DNA-Längenstandard:	100µl DNA-Ladder 600µl TAE-Puffer 1x
TAE-Puffer (50x):	50mM EDTA 2M Tris-Base (pH 8) 1M Essigsäure
1x TAE	20ml 50x TAE-Puffer 980ml Aqua dest.

### 2.1.7 Geräte

Tabelle 2-7 | Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.

Gerät	Hersteller
AlamutVisual Software	Interactive Biosoftware, Rouen, France
Gelelektrophoresekammer EasyPhor	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Geldokumentationssystem IX Imager	Intas GmbH, Göttingen
Magnetrührer HI 300N	HANNA Instruments, Vöhringen
Mikrowelle R941	Sharp, London, UK
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multiscreen Column Loader	Millipore, Darmstadt
Pipette 0,1-2,5µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 8-Kanal Reasearch Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Spannungsgeber Power Pac 300	BioRad, Hercules USA
Thermocycler T-Advanced	Biometra, Göttingen
Thermocycler T-Professional	Biometra, Göttingen
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer Vortex Genie-2	Scientific-Industries, Bohemia USA
Vortexer VWR 444-1372	VWR, Darmstadt
(Präzisions-)Waage EW 1500-2M	Kern & Sohn, Balingen
Zentrifuge Pico 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Zentrifuge Sigma 2-16K	Sigma, Taufkirchen
Zentrifuge Sprout TM	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

### 2.2 Herkunft verwendeter Patientenproben

Zum Nachweis einer Sequenzveränderung im *ATRX*-Gen wurde ein Kollektiv von 27 Patienten mit einem Meiosearrest untersucht. In der Hodenbiopsie dieser Patienten wurden in allen *Tubuli seminiferi* ausschließlich Keimzellen bis zum Spermatozytenstadium nachgewiesen. Im Ejakulat waren keine Spermien feststellbar.

Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Kollektiv von 189 männlichen Patienten untersucht, bei dem nachweislich keine Störung der Spermatogenese und Fertilität vorhanden ist. Die DNA-Proben wurden vom Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Münster, Abteilung für Klinische und Operative Andrologie (Chefärztin Frau Prof. Dr. med. Sabine Kliesch), zur Verfügung gestellt. Eine Einwilli-

gungserklärung der Patienten über das Einverständnis der Verwendung ihrer DNA als Probenmaterial liegt ebenso vor wie ein positives Votum der Ethikkommission.

## **2.3 Methoden**

Die Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik Münster, mit der die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, beschäftigt sich unter anderem in verschiedenen Forschungsprojekten mit der genetischen Ursache männlicher Infertilität.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich „*whole-genome*“ amplifizierte DNA-Proben eingesetzt, damit ausreichend Material für die verschiedenen Projektaufgaben der Arbeitsgruppe zur Verfügung steht. Sollte eine Auffälligkeit mit pathogenem Einfluss bei der Sequenzanalyse vorgefunden werden, ist dieser Befund an der Original-DNA zu verifizieren.

### **2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Das Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) besteht in der Vervielfältigung (Amplifikation) eines definierten DNA-Abschnitts, dem sogenannten Template. Dieses Template kann durch spezielle Primer, die die zu amplifizierende DNA-Sequenz eingrenzen, einer DNA-Polymerase und dNTPs amplifiziert werden. Durch die Amplifizierung des Templates steht für die anschließende DNA-Sequenzierung genügend sequenzspezifisches Material zur Verfügung.

Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie die einzelnen Exone und die angrenzenden Intronbereiche des *ATRX*-Gens (Transkript-Nummer nach GRCh37(hg19): NM\_000489.4) einschließen. Somit war für jedes Exon ein spezifisches Primerpaar für die Amplifizierung vorhanden. Eine Ausnahme bildete das Exon 9, welches für die Sequenzierung in einem Experiment zu groß war. Exon 9 wurde daher in sieben überlappende PCR-Formate unterteilt (s. Kapitel 2.4).

Die eingesetzte Taq- Polymerase ist hitzestabil mit einem Aktivitätsoptimum bei 72°C. Der Vorgang der PCR beinhaltet drei aufeinanderfolgende Schritte, die in mehreren Reaktionszyklen hintereinander wiederholt werden (Tabelle 2-2). Als Erstes erfolgte die Denaturierung. Dabei wurde der DNA-Doppelstrang bei 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Der anschließende Schritt umfasste das Anlagern (Annealing) der Primer

an den jeweiligen komplementären DNA-Strang. Abschließend folgte die Elongation, bei der die eingesetzte DNA-Polymerase ausgehend von dem 3'OH-Ende der Primer, einen neuen DNA-Strang synthetisierte. Mit jedem Zyklus verdoppelten sich damit die Anzahl der DNA-Stränge. Für eine optimale Amplifikation des Templates wurde vor den Zyklen eine initiale Denaturierung und nach dem Durchlaufen der Zyklen eine finale Elongation gestellt. In Tabelle 2-2 sind die Inkubationszeiten und Temperaturen der einzelnen PCR-Schritte aufgelistet. Für jedes PCR-Format wurde die spezifische Annealingtemperatur bestimmt (Tabelle 2-3).

**Tabelle 2-8 | Programmzyklus für die PCR.**

Schritt	Bezeichnung	Zeit	Temperatur	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	300sek	95°C	33x
2	Denaturierung	30sek	95°C	
3	Annealing	30sek	60°C/58°C/62°C	
4	Elongation	45sek	72°C	
5	Finale Elongation	600sek	72°C	

Für die PCR wurden neben der Patienten DNA (Template) die entsprechenden exon-spezifischen *forward* und *reverse* Primer, ein dNTP-Mix, bestehend aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphate, und der Taq-Polymerase eingesetzt. Für die volle Aktivität der Polymerase wurden noch ein spezieller Reaktionspuffer und MgCl<sub>2</sub> benötigt. Bei einigen Amplifikationen wurde zusätzlich 10% DMSO hinzugefügt (Tabelle 2-3).

**Tabelle 2-9 | Zuordnung Annealing-Temperatur und DMSO-Zusatz.**

<b>Exon</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>+/- DMSO im Mastermix</b>	<b>Exon</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>+/- DMSO im Mastermix</b>
1	60°C	-	16	60°C	-
2	60°C	-	17	60°C	-
3	60°C	+	18	60°C	-
4	60°C	-	19	60°C	-
5	60°C	+	20	60°C	-
6	60°C	-	21	62°C	-
7	60°C	-	22	62°C	-
8	60°C	-	23	58°C	-
9.1	60°C	-	24	60°C	-
9.2	60°C	-	25	60°C	-
9.3	60°C	+	26	60°C	-
9.4	60°C	-	27	60°C	-
9.5	60°C	+	28	60°C	-
9.6	60°C	+	29	60°C	-
9.7	60°C	-	30	60°C	-
10	60°C	-	31	60°C	-
11	60°C	-	32	60°C	-
12	60°C	-	33	58°C	-
13	60°C	-	34	60°C	-
14	62°C	-	35	60°C	-
15	58°C	-			

Für die Erstellung eines Mastermixes wurden die einzelnen Bestandteile der PCR mit der Anzahl der Patientenproben und der des Leerwertes multipliziert und entsprechend der Tabelle 2-4 in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt, gemischt und zentrifugiert. Pro Vertiefung einer 96-Well PCR-Platte wurde jeweils 18µl des Mastermix sowie 2µl der Patientenprobe pipettiert. Anschließend wurde die PCR-Platte mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und im Thermocycler das benötigte PCR-Programm mit der spezifischen Annealing-Temperatur gestartet. Nach der PCR wurden die generierten PCR-Produkte im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 2-10 | Mastermix für die PCR.

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge	
	Mastermix ohne DMSO	Mastermix mit DMSO
Primer forward (5pmol/μl)	1μl	1μl
Primer reverse (5pmol/μl)	1μl	1μl
PCR-Reaktionspuffer (10x)	2μl	2μl
dNTP-Mix (2,5mM)	1,6μl	1,6μl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6μl	1,6μl
Taq-DNA Polymerase (5U/μl)	0,1μl	0,1μl
H <sub>2</sub> O	12μl	10μl
DMSO		2μl

### 2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese kann überprüft werden, ob während der PCR ein PCR-Produkt entstanden ist. Wäre dies nicht der Fall, würde die Gelelektrophorese keine Bande anzeigen und die PCR müsste wiederholt werden. Zusätzlich wird in der Agarosegelelektrophorese kontrolliert, ob das entstandene PCR-Produkt der erwarteten Größe entspricht. Mehrere Banden pro Spur weisen auf unspezifische PCR-Produkte und die PCR sollte bei anderen Temperaturen optimiert werden.

Bei der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach Größe und Ladung aufgetrennt und durch Zugabe eines Farbstoffes sichtbar gemacht. Hierbei wanderten die PCR-Produkte der verschiedenen Exone, jeweils ihrer Größe entsprechend, durch das Agarosegel.

Zur Herstellung eines 1,8%-igen Agarosegels wurden 6,3g Agarose mit 350ml 1xTAE-Puffer vermischt und in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis die gesamte Agarose gelöst war. Anschließend wurde das Gemisch unter ständigem Rühren bis auf ca. 60°C abgekühlt und 60μl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die flüssige Agarosesuspension wurde in eine Gelkammer umgefüllt und Kämme zur Herstellung der Geltaschen wurden eingehängt.

Nach der Polymerisierung der Agarose wurde das Agarosegel in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophorosekammer gelegt. In die erste Proben tasche wurde immer ein Gemisch aus 4μl Orange-G Ladepuffer und 6,5μl 100bp DNA-Längenstandard pipetiert, um die Größen der PCR-Produkte zu bestimmen. In die restlichen Proben taschen

wurde ein Gemisch aus 4µl Orange-G Ladepuffer und 6,5µl PCR-Produkt der jeweiligen Patientenproben pipettiert. Dabei war exakt die Reihenfolge der Patientenproben und des Leerwertes einzuhalten, die zuvor auf dem PCR-Protokoll hinterlegt wurde.

Abschließend wurde eine Spannung von 120 Volt an die Gelkammer angelegt, sodass die PCR-Produkte durch das Gel von der Kathode zur Anode wanderten. Die Lauffront wurde durch die Färbung des Orange-G sichtbar gemacht, und nach ca. 2/3 der Laufstrecke konnte die Elektrophorese gestoppt werden.

Zur Detektierung der Banden der einzelnen PCR-Produkte wurde das Agarose-Gel auf die Glasplatte eines UV-Transilluminators gelegt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Durch eine Kamera wurde das Gelbild aufgenommen und mittels eines PC-Programmes „Intas GDS“ dokumentiert.

Mithilfe des 100bp DNA-Längenstandards wurde die PCR überprüft - wenn ein deutliches PCR-Produkt von der richtigen Größe zu erkennen ist, kann die PCR-Reaktion als erfolgreich gewertet werden und das PCR-Produkt für die Sequenzierung eingesetzt werden.

### **2.3.3 Enzymatische Aufreinigung des PCR-Produktes**

Da nach der PCR-Reaktion nicht alle zur Verfügung gestellten Nukleotide und Primer verbraucht wurden, mussten diese aus dem PCR-Produkt entfernt werden, um eine Störung der Sequenzierungsreaktion zu vermeiden.

Das eingesetzte Exo-Sap Gemisch enthält zwei Enzyme: die Exonuklease I, welches die freien Primer in ihre einzelnen Nukleotide zerlegt, und die Shrimp Alkaline Phosphatase, welches die freien Nukleotide desphosphoriert und somit für eine Amplifikation unbrauchbar macht.

Für diese enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte wurden 6µl des PCR-Produktes zu jeweils 1,8µl Exo-Sap Enzymgemisch in eine neue PCR-Platte pipettiert, versiegelt und kurz zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte in einer PCR-Maschine für 15min bei 37°C. Anschließend wurden die Enzyme durch eine Inkubation von 15min bei 80°C inaktiviert. Bis zur eigentlichen Sequenzierungsreaktion wurden die Proben im Kühlschrank gelagert.

### 2.3.4 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Das Ziel der Sequenzierung ist die Bestimmung der Basenreihenfolge des zuvor bei der PCR amplifizierten Templates. Grundsätzlich wird wie bei der PCR das doppelsträngige PCR-Produkt denaturiert, ein Primer angelagert und mittels einer Polymerase elongiert. Zusätzlich wird das Produkt am Ende nochmals denaturiert, sodass es am Ende als Einzelstrang vorliegt.

Bei der Sequenzierung nach Sanger werden Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) eingesetzt, die kein freies 3'OH-Ende besitzen. Beim Einbau eines ddNTPs kann aufgrund des fehlenden 3'OH-Endes kein weiteres Nukleotid angehängt werden und es kommt zum sogenannten Kettenabbruch. Am Ende entstehen somit Fragmente unterschiedlicher Größe. Jede Größe steht für eine Stelle in der Basenreihenfolge und kann anhand des letzten ddNTPs und eines gebundenen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes detektiert und somit einer spezifischen Base zugeordnet werden.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurden durch den Mastermix die ddNTPs der vier Basen gleichzeitig hinzugegeben. Bei der Elektrophorese konnten die gekoppelten Farbstoffe unterschieden werden und auf Grundlage der zeitlichen Abfolge der einzelnen Fluoreszenzsignale die Sequenz des PCR-Produktes ermittelt werden.

Entsprechend Tabelle 2-4 wurden für die Sequenzierungsreaktion ein Primer des jeweiligen zu sequenzierenden Exons, Sequenz-Puffer, BigDye und H<sub>2</sub>O zusammengefügt, in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und die durch die aufgereinigten PCR-Produkte der jeweiligen Patientenprobe hinzugefügt.

**Tabelle 2-11 | Mastermix für die Sequenzierungsreaktion.**

<b>Reagenzien (Konzentration)</b>	<b>Menge</b>
PCR-Produkt nach Exo-Sap Reinigung	2µl
Primer forward oder reverse (5pmol/µl)	2µl
Seq. Puffer (5x)	2µl
BigDye Terminator	0,5µl
H <sub>2</sub> O	3,5µl

Anschließend wurde die Platte versiegelt, kurz zentrifugiert, in der PCR-Maschine inkubiert und abschließend zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank gelagert. Die Programmzyklen für die Sequenzierungsreaktion sind der Tabelle 2-5 zu entnehmen.

**Tabelle 2-12 | Programmzyklus für die Sequenzierung.**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1. Denaturierung	120sek	96°C	25x
2. Annealing	5sek	50°C	
3. Elongation	120sek	60°C	
4. Denaturierung	10sek	94°C	

### 2.3.5 Aufreinigung des Sequenzierungs-Produktes mittels Sephadex-Platten

Bevor die bei der Sequenzierung entstandenen Fragmente analysiert werden konnten, mussten die nicht verbrauchten Substrate (nichteingebaute dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und Primer) von den Sequenzierungsprodukten getrennt und entfernt werden. Diese Auftrennung wurde mittels einer Chromatographie durchgeführt. Bei der Chromatographie mittels des Sephadex-Gels werden die Moleküle entsprechend ihrer Größe getrennt. Kleine Moleküle, wie freie Nukleotide und unverbrauchte Substrate, diffundieren in die Poren der Gelmatrix ein und brauchen länger, um das Gel zu durchlaufen, als große Moleküle, wie die Sequenz-Fragmente, die um die Poren herumfließen. Bei der Zentrifugation durchlaufen somit die DNA-Fragmente das Gel, während die nichteingebauten Nukleotide und Primer zurückgehalten werden.

Dazu wurde Sephadex Pulver auf eine MultiScreen Column Loader Platte gegeben und in die Vertiefungen gestrichen. Anschließend wurde darüber eine 96-well MultiScreen Platte gelegt und beides gedreht, sodass das Sephadex-Pulver aus der Formplatte in die einzelnen Vertiefungen der MultiScreen Platte fiel. Anschließend wurde in jede Vertiefung der MultiScreen Platte 300µl HPLC-gereinigtes Wasser gefüllt, das Ganze mittels einer Alufolie abgedeckt und mindestens 3h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Abschließend wurde das überschüssige Wasser abzentrifugiert und die fertige Sephadex-Platte auf einer *Fast 96 Detection Plate* positioniert.

Die Sequenzierungsprodukte wurden mit je 20µl HPCL-Wasser verdünnt und komplett auf die Sephadex-Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte nochmals zentrifugiert, sodass in der *Fast 96 Detection Plate* die abzentrifugierte, aufgereinigte Sequenzierungsreaktion aufgefangen wurde. Diese Platte wurde abschließend mit einer Adhe-

sive PCR Sealing Foil Sheet abgedeckt und zur Detektierung der Basenfolge ins Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster gegeben.

### **2.3.6 Auswertung der Sequenzergebnisse**

Die Auftrennung der Sequenz-Produkte nach ihrer Größe und die Bestimmung der Basenreihenfolge fand im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster statt. Dort wurden mittels Kapillarelektrophorese durch den ABI 3730 DNA Analyzer die Sequenz-Produkte aufgetrennt und das Ergebnis als Elektropherogramm (ABI-Datei) und als Textfrequenz (Seq-Datei) an das Institut für Humangenetik zurückgeschickt. Die Auswertung der Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit dem Programm Codon Code Alligner, wobei die Basenreihenfolge der PCR-Produkte mit einer im Programm hinterlegten Referenzsequenz entsprechend der Transkript-Nummer: NM\_000489.4 verglichen wurde. Bei etwaigen Abweichungen wurden diese durch das Programm AlamutVisual (Version 2.15, 2020) auf klinische Relevanz überprüft.

Bei mehrfach auftretenden gleichen Sequenzveränderungen im Kollektiv der Patienten mit einem Meiosearrest, deren Überprüfung zunächst keine klinische Relevanz brachte, wurde mittels eines Chi-Quadrat Tests deren Häufigkeit in ihrem Auftreten mit den Kontrollpatienten überprüft. Mittels des Testes kann eine Aussage darüber getroffen, ob diese Sequenzveränderung gegebenenfalls signifikant häufiger bei den Patienten auftritt als in einer gesunden Vergleichsgruppe.

### **2.4 Primersequenzen**

Für die Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Exone des *ATRX*-Gens wurden Primer gewählt, die ca. 100 Basen von den Exomgrenzen entfernt im Intron liegen. Damit sollte erreicht werden, dass in der Sequenzierungsreaktionen die Exon-/Introngrenzen gut analysierbar waren. Das Exon 9 musste aufgrund der Größe in 7 PCR-Formate unterteilt werden, da in einer einzelnen Sequenzierungsreaktion methodisch bedingt nur PCR-Produkte bis zu einer Größe von ca. 750-800bp untersucht werden können. Die einzelnen Formate für das Exon 9 überlappen, damit eine komplette Sequenzanalyse des gesamten Exon 9 sichergestellt wird. Die Primersequenzen für

jedes PCR-Format (Exon) sowie die erwartete Größe des PCR-Produktes sind in Tabelle 2-6 aufgelistet.

**Tabelle 2-13 | Verwendete Primer für die Amplifikation des *ATRX*-Gens.**

<b>Exon</b>	<b>Forward-Primer</b>	<b>Reverse-Primer</b>	<b>Größe des PCR-Produktes in bp</b>
1	caaagaaggtgaatttccgtagc	taccccgaaaccttctcac	500
2	ctgcctcacaaggctcaag	cagtcaacattcactagccattc	699
3	aggaggggttagtatgcaaaagg	gtaaaccactgaagtgaaccacaac	450
4	ggaaacctggcagtaaatgag	ctgcctcataggcattcaac	613
5	agaatgcgtatgccttggtc	atttgaaactaaagccccttg	601
6	gggttgaggctttctgtttg	atagccactgaaggcaaagg	603
7	ttgccaaggtgtcatgtg	ttcaaacacaccaagctctcc	656
8	attgtcagatgggcactttg	ttccttctttcaggaaactg	675
9.1	gaaaggttgctcttttcataaaaacc	ggagttcatgttggtgtgg	677
9.2	gatgattcctgttctggctctg	atgtcttctggaactgaggaagg	590
9.3	ggagaaaaacctgtgctttgg	ttctgtcggctgcctcaag	672
9.4	ttaaagggtgctgattgtcaggaag	tgatttgccttttagtatcaaaatc	593
9.5	gcaggatgagtcacagttcttctc	tcagttcccttttctgctctgct	745
9.6	caagcatctcaaaacaaaacat	ctcagaactttcctcagcatcag	653
9.7	aaatattccatgaaagaagatggttg	tcttccaatggcagcataaaaa	579
10	acgaaggttattgtggcaag	aaaaattactgcagttacatagcaac	682
11	ggttaaaacatggttttctagttgtt	gcactatcacgccagctact	528
12	cctgataacaccaatgataccaaa	gctgctcactacagccttga	586
13	ttcggttggtcatcattgg	tcctacaatttccccgtaac	772
14	ctggaatatccattttgaacctattg	aaattggctgatttactatgagaag	595
15	ttctaaaggttttcagcatgtttctt	aatagaaataaattaaggctgggtgtg	526
16	caactggatctgtgagaactcg	taaaggcaggggaattgtgg	582
17	tcccctgttctatgtttgtg	tgttgccatacctgaaacc	617
18	agggacattctgtggagacc	tgaggacgtttcacagttgc	641
19	gaatttgagaagtggcaagag	ctcagcaaataaattctgaacagc	613
20	aactcagaggacctgactacc	aatcattaagacttctgatactcttgc	664
21	tggttagattaatggaccacttg	ttttaaaagttgaatgcagcag	685
22	gctcacttggaatgtgattgc	aagggcattattcatatgtgctg	621
23	cctgtgcatattttgttacttaatgc	gtcaaaggatataggggaattctcag	675
24	agaattcccctatacctttgacc	tcattgtcactgccacttcc	668
25	cagtatggatgaatttatagcctcag	accttcccccaaataccag	608
26	ttggcatctccttcttcc	ccaaggaaataagttcaagttgc	639

27	tgaagagtcagccctccaac	aacaatttcaacaacaaagactgc	692
28	ttaaggattctaatacaaggaaacc	agccctataatggaagactatacaac	685
29	tagtgcccctagctgtaccc	agccaaaactgacttctgctg	680
30	gcaacacttgaatgcattttg	tgtggcataaaatagtgtttcag	684
31	ggtggaagaccttgaaatctg	tggcttcccactcatttctc	683
32	ccccattctgtggaattatc	tattccaagcgagtcagc	628
33	aatgcccaatattatgaaataaatg	gtaaaattgctgggttacgg	634
34	ttggcacaagagagaaatgg	tccatttaggtagctgttg	651
35	tggcctgtgaatgccatc	ctaggcaacatcactgacaaatg	634

## 2.5 Statistische Auswertung

Durch die statistische Auswertung sollte überprüft werden, ob eine Sequenzveränderung innerhalb des Patientenkollektivs signifikant häufiger im Vergleich zu Kontrollgruppen auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die detektierten Sequenzveränderung innerhalb der Patientengruppe (Meiosearrestgruppe MeiA) mit einem gesunden Kontrollpatientenkollektiv (KOP) von 189 Patienten mit Normozoospermie, von Seiten des Centrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt und der online Datenbank gnomAD (*genome aggregation database*) verglichen.

Zunächst wurde für jede detektierte Sequenzveränderung im Patientenkollektiv der  $\chi^2$ -Tests mit den Häufigkeiten der Kontrollpatientengruppe und den Häufigkeiten von gnomAD durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Verteilungen unabhängig sind. Anschließend muss der resultierende  $p$ -Wert, der den Signifikanzgrad angibt, korrigiert werden, da die vorausgegangene Hypothese, ob sich der Vergleich von den jeweils beiden Gruppen (MeiA zu KOP/gnomAD) unterscheidet, von vielen Tests überprüft wird. Dabei wurde in diesem Fall die *false discovery rate correction* (FDR) nach Benjamini und Hochberg (1995) genutzt. Ein Ergebnis ist hierbei statistisch signifikant, wenn  $p_{\text{adj}} < 0.05$  ist. Der  $p$ -Wert gibt nun eine Aussage darüber, ob das Ergebnis signifikant unterschiedlich ist, nicht jedoch wie groß dieser Unterschied ist. Diese Aussage wird über die Effektstärke getroffen. Bei Kreuztabellen des hier verwendeten Typus sollte Cramers  $V$  (Cramer, 1946) genutzt werden.  $V$  schwankt zwischen 0 und 1 und

kann nach Cohen (1988) grob wie folgt eingeteilt werden: Werte um 0.1, 0.3 und  $\geq 0.5$  sind ungefähr klein, mittel und groß.

Alle Analysen wurden in R (R Core Team, 2020) mit RStudio (R Studio Team, 2020) durchgeführt. Die  $\chi^2$ -Tests wurden mit dem Paket „rstatix“ (Kassambra, 2020) berechnet, die Effektstärke Cramers  $V$  mit dem Paket „rcompanion“ (Mangiafico, 2020). Abbildungen wurden mit „ggplot2“ aus dem „tidyverse“ (Wickham et al., 2019) erstellt, Tabellen mit dem Paket „gt“ (Iannone et al., 2020).

### 3 Ergebnisse

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Frank Tüttemann und Herrn Dr. Albrecht Röpke ein *whole exome sequencing* (WES) von acht Patienten mit Meiosearrest durchgeführt. Hierbei wird das Exom, der proteinkodierende Bereich fast aller Gene, sequenziert und analysiert. Bei dieser Exomsequenzierung ist das *ATRX*-Gen als Kandidatengen für männliche Infertilität aufgrund von zwei Sequenzveränderungen aufgefallen, den Sequenzveränderungen c.2720G>A im Exon 9 und c.5579A>G im Exon 23. Diese detektierten Sequenzveränderungen im Elektropherogramm sind den Abbildungen 2 und 3 zu entnehmen.

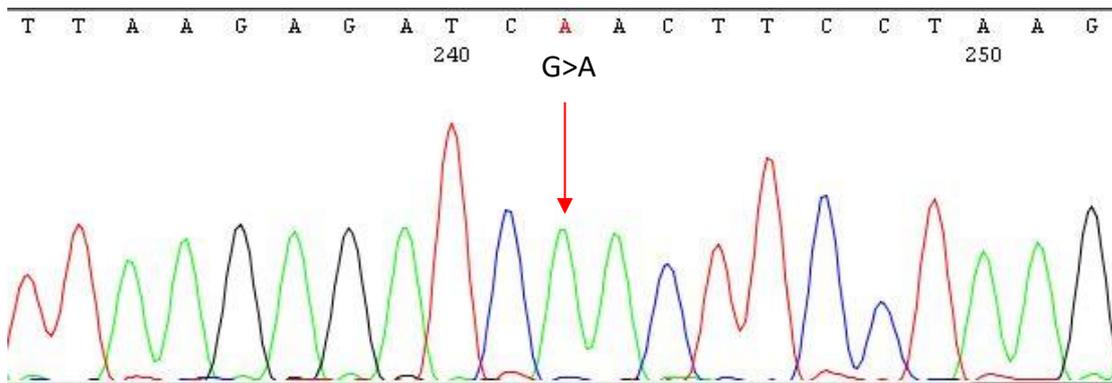


Abbildung 2 | Elektropherogramm der Sequenzveränderung c.2720G>A

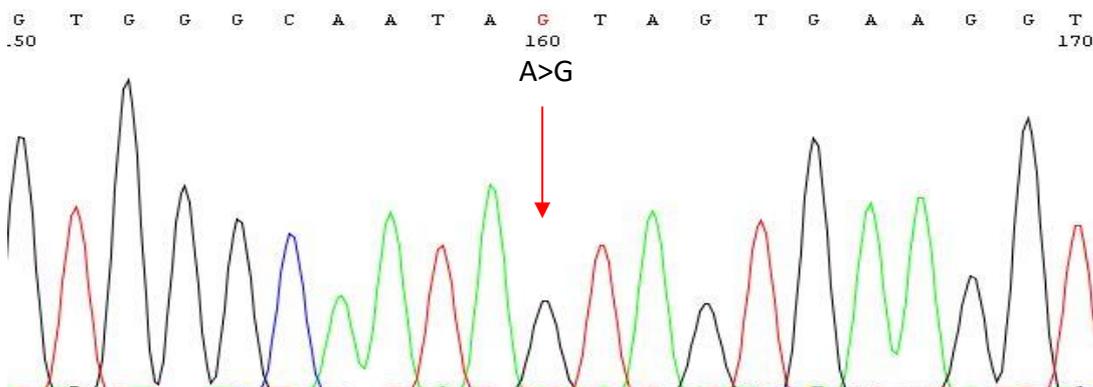


Abbildung 3 | Elektropherogramm der Sequenzveränderung c.5579A>G

Die Sequenzveränderungen stellen je eine *missense* Mutation dar, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Die Vermutung, dass das *ATRX*-Gen ein potentielles Kandidatengen für männliche Infertilität sein könnte, wurde durch das klinische Bild des *ATRX*-Syndrom gegeben. Dieses Syndrom, verursacht durch Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen, beinhaltet unter anderem urogenitale Fehlbildungen, durch die eine Infertilität bei den betroffenen rein männlichen Patienten resultiert.

Ziel dieser Arbeit war es, das bestehende Patientenkollektiv von 27 Patienten mit einem Meiosearrest hinsichtlich einer Sequenzveränderung im *ATRX*-Gen zu untersuchen. Zusätzlich sollten nachgewiesene Sequenzveränderungen hinsichtlich funktioneller Auswirkungen auf die Funktion des *ATRX*-Proteins mittels Computerprogramme analysiert werden.

Dafür wurde jedes Exon mit einem eigenen PCR-Ansatz amplifiziert. Exon 9 wurde aufgrund seiner Größe in 7 Teilstücke unterteilt, mit jeweils spezifischen internen Primern. Das entsprechende PCR-Produkt wurde anschließend im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster sequenziert. Mit dem Programm Codon Code Alligner wurde die detektierte DNA-Sequenz mit einer Referenzsequenz verglichen und bei Abweichung durch das Programm Alamut Visual auf klinische Relevanz überprüft. Die Analyse umfasste die kodierenden Exone und die angrenzenden Intronbereiche.

Zusätzlich wurden die Sequenzen von 189 Kontrollpatienten mit Normozoospermie überprüft.

### **3.1 Sequenzveränderungen**

Bei der Untersuchung der DNA-Sequenzen der 27 Meiosearrestpatienten mittels des Programmes Codon Code Alligner wurden 19 Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen detektiert. Im Kollektiv der 189 Kontrollpatienten fanden sich 12 Veränderungen, die auch bei den Meiosearrestpatienten zu finden waren. Sieben Veränderungen im *ATRX*-Gen wurden ausschließlich bei den Patienten mit Meiosearrest gefunden. Der Tabelle 3-1 sind die detektierten Sequenzveränderungen der Patienten mit ihrer Häufigkeit zu entnehmen, analog dazu sind die gefundenen Häufigkeiten im Kontrollpatientenkollektiv dokumentiert. Nicht bei allen Meiosearrestpatienten und Kontrollpatienten ist je-

des Template gleich gut durch die PCR amplifiziert worden, sodass die anschließende Sequenzanalyse nicht sicher oder gar nicht durchgeführt werden konnte. Diese nicht auswertbaren Sequenzabschnitte wurden aus der Auswertung ausgenommen, so dass nicht bei jedem Sequenzabschnitt alle 27 Meiosearrestpatienten bzw. die 189 Kontrollpatienten zur Analyse zur Verfügung standen. Die jeweilige Anzahl an ablesbaren Sequenzabschnitten sind ebenfalls der Tabelle 3-1 zu entnehmen.

**Tabelle 3-1 | Häufigkeiten der Sequenzveränderung des MeiA Patientenkollektivs und des Kontrollkollektivs**

Sequenzveränderung	Proteinveränderung	Häufigkeit Meiosearrestpatienten (%)	Häufigkeit Kontrollpatienten (%)
c.133+130G>T		1/25 (4%)	1/167 (0.6%)
c.370+35G>A		1/27 (3.7%)	6/176 (3.4%)
c.595-36T>C		11/26 (42.3%)	39/183 (21.3%)
c.2720G>A	p.Arg907Gln	1/27 (3.7%)	/
c.2785C>G	p.Gln929Glu	7/21 (33.3%)	48/187 (25.7%)
c.3736+61_3736+62del		2/27 (7.4%)	15/187 (8.0%)
c.3943+143A>G		12/27 (44.4%)	49/179 (27.4%)
c.4121-248A>G		2/27 (7.4%)	4/178 (2.3%)
c.5134+41A<T		1/26 (3.8%)	2/188 (1.1%)
c.5272+105A<G		3/27 (11.1%)	3/189 (1.6%)
c.5579A>G	p.Asn1859Ser	1/26 (3.8%)	2/188 (1.1%)
c.5787-24G>T		1/26 (3.8%)	/
c.5956+36G>A		1/26 (3.8%)	/
c.6110+81C<T		1/25 (4%)	9/181 (4.2%)
c.6217+68T>C		1/27 (3.7%)	/
c.6217+244G<A		3/27 (11.1%)	4/181 (2.2%)
c.6700-242dup		1/26 (3.8%)	/
c.6849+30_6849+35dup		1/26 (3.8%)	/
c.6976-202A>C		1/27 (3.7%)	/

/: nicht nachgewiesen

Einzig die Sequenzveränderungen c.2720G>A, c.2785C>G und c.5579A>G befinden sich im kodierenden Bereich des *ATRX*-Gens, alle weiteren 16 Veränderungen wurden in nichtkodierenden Regionen gefunden. Die meisten Sequenzveränderungen bestehen aus einem Austausch eines einzelnen Nukleotids, nur die Sequenzveränderung

c.3736+61\_3736+62del wird durch eine Deletion und die Sequenzveränderungen c.6700-242dup und c.6849+30\_6849+35dup durch eine Duplikation verursacht.

Der Tabelle 3-2 sind die Häufigkeiten der detektierten Sequenzveränderungen des Meiosearrestpatientenkollektivs im Vergleich mit der Datenbanken gnomAD (Version 2.1, 2018) zu entnehmen. Diese Datenbank ist eine Zusammenführung aus diversen Exom und Genom Projekten weltweit und stellt momentan die größte humane Datenbank für Genvarianten dar.

**Tabelle 3-2 | Häufigkeiten der Sequenzveränderungen des Patientenkollektivs und gnomAD**

<b>Sequenz- veränderung</b>	<b>dbSNP</b>	<b>Häufigkeit gnomAD</b>	<b>Häufigkeit Meio- searrest-Patienten</b>
c.133+130G>T	rs781876737	10/7768 (0.13%)	1/25 (4%)
c.370+35G>A	rs45494097	1184/72173 (1.64%)	1/27 (3.7%)
c.595-36T>C	rs35268552	27194/70963 (38.32%)	11/26 (42.3%)
c.2720G>A	rs143413618	45/75021 (0.06%)	1/27 (3.7%)
c.2785C>G	rs3088074	28924/74909 (38.61%)	7/21 (33.3%)
c.3736+61_3736 +62del	rs45577534	260/7999 (3.25%)	2/27 (7.4%)
c.3943+143A>G	rs5912227	3695/7709 (47.93%)	12/27 (44.4%)
c.4121-248A>G	rs3761508	309/7915 (3.9%)	2/27 (7.4%)
c.5134+41A<T	rs45471991	471/74521 (0.63%)	1/26 (3.8%)
c.5272+105A<G	rs45450695	266/8051 (3.3%)	3/27 (11.1%)
c.5579A>G	rs45439799	539/75773 (0.71%)	1/26 (3.8%)
c.5787-24G>T	rs45608236	725/74390 (0.97%)	1/26 (3.8%)
c.5956+36G>A	rs112761215	2/74551 (0.002%)	1/26 (3.8%)
c.6110+81C<T	rs45612438	228/7997 (2.85%)	1/25 (4%)
c.6217+68T>C	/	/	1/27 (3.7%)
c.6217+244G<A	rs45526440	323/7800 (4.14%)	3/27 (11.1%)
c.6700-242dup	/	/	1/26 (3.8%)
c.6849+30_6849 +35dup	rs782533994	32/74364 (0.04%)	1/26 (3.8%)
c.6976-202A>C	rs3027526	33/7921 (0.42%)	1/27 (3.7%)

/: nicht nachgewiesen

### 3.2 Bewertung Sequenzveränderung

Die Bewertung der Sequenzveränderungen erfolgte mittels des Programms AlamutVisual und ihrer Position innerhalb oder außerhalb des Exons und dessen Konsequenz. Zusätzlich muss eine Häufung der gleichen Sequenzveränderungen im untersuchten Patientenkollektiv mit der Häufigkeit in Kontrollgruppen verglichen werden.

Die Sequenzveränderung c.2720G>A (innerhalb Exon 9), c.2785C>G (innerhalb Exon 9) und c.5579A>G (innerhalb Exon 23) wurden mittels AlamutVisual auf deren Auswirkung analysiert. Diese Veränderungen führen zu einem Austausch einer Aminosäure: die Sequenzveränderung c.2720G>A führt zu einem Austausch von Arginin zu Glutamin, c.2785C>G zu einem Austausch von Glutamin zu Glutaminsäure und c.5579A>G zu einem Austausch von Asparaginsäure zu Serin. Alle weiteren detektierten Sequenzveränderungen liegen in den nichtkodierenden Bereichen des *ATRX*-Gens und führen folglich zu keinem Austausch der Aminosäure im Protein. Diese Sequenzveränderungen wurden auch mittels des Programms AlamutVisual auf ihre Pathogenität überprüft. Keine dieser gefundenen Sequenzveränderungen scheinen jedoch eine verändernde Auswirkung auf den Spleißprozess zu haben.

### 3.3 Statistische Überprüfung

Der Vergleich des Auftretens der Sequenzveränderungen in ihrer Häufigkeit erfolgte jeweils zwischen der Gruppe des Patientenkollektivs mit den Kontrollpatienten und des Patientenkollektivs mit der gnomAD Datenbank.

Zwischen der Gruppe des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe ließen sich für alle detektierten Sequenzveränderungen, zu denen in beiden Gruppen Daten vorhanden waren, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen finden (Tabelle 3-3).

**Tabelle 3-3 | Vergleich der relativen Häufigkeiten der Sequenzveränderungen zwischen der Patientengruppe (MeiA) und der Kontrollgruppe (KOP)**

<b>Sequenzveränderung</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b><i>p</i><sub>adj</sub></b>	<b><i>V</i></b>
c.133+130G>T	194	2.33	0.258	0.516	0.11
c.370+35G>A	210	0.01	1.000	1.000	0.01
c.595-36T>C	259	3.01	0.116	0.464	0.11
c.2785C>G	263	0.32	0.622	0.829	0.03
c.3736+61_3736+62del	231	0.01	1.000	1.000	0.01
c.3943+143A>G	267	1.63	0.215	0.516	0.08
c.4121-248A>G	211	2.00	0.197	0.516	0.10
c.5134+41A<T	217	1.22	0.328	0.523	0.07
c.5272+105A<G	222	7.02	0.032	0.384	0.18
c.5579A<G	217	1.22	0.349	0.523	0.07
c.6110+81C<T	216	0.04	1.000	1.000	0.01
c.6217+244G<A	215	5.03	0.066	0.396	0.15

Für den Vergleich der Patientengruppe (MeiA) mit der Datenbank gnomAD, auch hier nur für die Sequenzveränderungen, zu denen für beide Gruppen Daten vorlagen, findet sich nur für die Sequenzveränderung c.5956+36G>A ein signifikanter Unterschied im Auftreten ihrer Häufigkeiten (Tabelle 3-4).

**Tabelle 3-4 | Vergleich der relativen Häufigkeiten der Sequenzveränderungen zwischen der Patientengruppe (MeiA) und der Datenbank gnomAD**

<b>Sequenzveränderung</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>	<b><i>p</i><sub>adj</sub></b>	<b><i>V</i></b>
c.133+130G>T	7804	25.44	0.032	0.134	0.06
c.370+35G>A	73385	0.68	0.357	0.506	0.00
c.595-36T>C	98194	0.08	0.847	0.930	0.00
c.2720G>A	75094	56.38	0.019	0.108	0.03
c.2785C>G	103861	0.11	0.835	0.930	0.00
c.3736+61_3736+62del	8288	1.33	0.242	0.374	0.01
c.3943+143A>G	11443	0.05	0.875	0.930	0.00
c.4121-248A>G	8253	0.79	0.616	0.806	0.01
c.5134+41A<T	75019	4.08	0.152	0.315	0.01
c.5272+105A<G	8347	4.43	0.072	0.246	0.02
c.5579A<G	76339	3.45	0.167	0.315	0.01
c.5787-24G>T	75142	2.12	0.247	0.382	0.01
c.5956+36G>A	74580	919.11	0.002	0.042	0.11
c.6110+81C<T	8251	0.11	1.000	1.000	0.00
c.6217+244G<A	8153	2.83	0.127	0.308	0.02
c.6849+30_6849+35dup	74423	81.61	0.009	0.081	0.03
c.6976-202A>C	7982	6.55	0.112	0.308	0.03

## 4 Diskussion

Bei ca. 10-15% der Paare im reproduktionsfähigen Alter bleibt eine Schwangerschaft innerhalb eines Jahres aus. Bei circa der Hälfte der Fälle liegt eine Mitursache auf Seiten des Mannes vor. Erwiesenermaßen spielen Genmutationen in Hinblick auf männliche Infertilität eine entscheidende Rolle (Tüttelmann, 2011).

Auf der Suche nach potenziellen Kandidatengen für männliche Infertilität fiel während einer *whole-exome* Sequenzierung (WES) von acht Patienten mit einem Meiosearrest das *ATRX*-Gen auf. Das *ATRX*-Gen, welches bei pathogenen Mutationen zur phänotypischen Ausprägung des *ATRX*-Syndroms führt, ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. In der Regel erkranken nur männliche Patienten mit Veränderungen im *ATRX*-Gen an einem *ATRX*-Syndrom. Dieses Syndrom wird u.a. mit einer männlichen Infertilität in Verbindung gebracht. Daher stellte das *ATRX*-Gen ein interessantes Kandidatengen dar.

Es konnten im Vorfeld dieser Arbeit, stellvertretend durch Herrn Prof. Dr. Frank Tüttelmann und Dr. Albrecht Röpke, zwei Sequenzveränderungen im proteinkodierenden Bereich des *ATRX*-Gens detektiert und analysiert werden. Die detektierte Sequenzveränderung c.2720G>A in Exon 9 ist eine Transition, das heißt eine Purinbase, in diesem Fall Guanin, wurde durch eine andere Purinbase, hier Adenin, ausgetauscht. Durch den Austausch dieser Base entsteht eine *missense* Mutation, sodass die Aminosäuresequenz des *ATRX*-Proteins durch den Einbau der Aminosäure Glutamin anstelle von Arginin an der Position p.(Arg907Gln) verändert wurde.

Die zweite detektierte Sequenzveränderung c.5579A>G in Exon 23 ist ebenfalls eine Transition einer Purinbase durch eine andere Purinbase, hier Adenin zu Guanin, mit der Folge einer *missense* Mutation, die zu einem Austausch der Aminosäure Asparaginsäure zu Serin an der Position p.(Asn1860Ser) führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, dass Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen möglicherweise nur eine milde Konsequenz auf die Funktionalität des *ATRX*-Proteins haben und somit zu einer milden Klinik führen. Patienten mit einer Sequenzveränderung im *ATRX*-Gen sollen dieser Hypothese folgend kein ausge-

prägtes ATRX-Syndrom besitzen, sondern nur das klinische Merkmal der männlichen Infertilität. Die grundsätzliche Hypothese einer milden Mutation im *ATRX*-Gen mit Folge eines milden Phänotyps wird gestützt durch die von Basehore et. al. gefunden Variante in Exon 2 des *ATRX*-Gens (Basehore et al., 2015), bei der durch eine *nonsense*-Mutation eine milder Phänotyp des ATRX-Syndroms entsteht.

Bei insgesamt 27 Meiosearrestpatienten wurde das *ATRX*-Gen sequenziert und untersucht, um die bereits detektierten Sequenzveränderungen zu bestätigen und bei weiteren Patienten zu detektieren. Im Ergebnis sollte nicht nur eine Häufung von potenziell pathogenen Sequenzveränderungen, welche bereits durch die WES aufgezeigt wurden, detektiert werden, sondern gegebenenfalls auch weitere Sequenzveränderungen, die zu der Klinik der männlichen Infertilität führen können.

#### **4.1 Das ATRX-Gen**

Das *ATRX*-Gen ist ein auf dem X-Chromosom gelegenes Gen. Eine Mutation im *ATRX*-Gen kann zum sogenannten ATRX-Syndrom führen. Aufgrund des X-chromosomalen Erbganges und der daraus folgenden Hemizygotie sind nur männliche Individuen von der Klinik einer Mutation betroffen, während Frauen Konduktorinnen darstellen und die Genveränderungen vererben können.

Das ATRX-Syndrom ist eine Erkrankung mit seltener Prävalenz und zeigt eine relativ große Bandbreite an klinischen Symptomen wie geistige Entwicklungsstörungen, verschiedene Formen von fazialen und skelettalen Fehlbildungen, Formen von Alpha-Thalässemie, Mikrozephalie, kleiner Statur und Veränderungen der Genitalien (Stevenson, 2020). 80% der beim Menschen vorkommenden Mutationen im *ATRX*-Gen führen zu einer Veränderung der männlichen Genitalien, deren klinisches Erscheinungsbild sehr divers sein kann und zu einer männlichen Infertilität führen kann (Tang et al., 2011). Histologische Analysen der Testis dieser Patienten weisen ebenfalls unterschiedlich starke Veränderungen auf, von völligem Fehlen der Keimzellen (Ion et al., 1996) bis zu wenigen in einzelnen Teilen des Hodens vorhandene Spermatogonien (Wilkie et al., 1990). Eine Expression des *ATRX*-Gens konnte in somatischen Zellen und Keimzellen des Hodens bei Menschen und Ratten nachgewiesen werden, das ATRX-

Protein spielt somit eine entscheidende Rolle während der Spermatogenese und der testikulären Entwicklung (Tang et al., 2011).

#### **4.2 Sequenzveränderungen im *ATRX*-Gen**

Um die Hypothese der Sequenzvariante mit milden phänotypischen Konsequenzen zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Sequenzanalyse des kodierenden Bereichs des *ATRX*-Gens von 27 Meiosearrestpatienten durchgeführt. Die detektierten Sequenzveränderungen wurden mittels des Programms Alamut Visual bewertet und mögliche Vorhersagen zu ihren funktionellen Konsequenzen getroffen. Weiterhin wurde bei 189 Kontrollpatienten mit Normozoospermie eine Sequenzierung des *ATRX*-Gens durchgeführt.

Grundsätzlich können die Sequenzveränderungen auf unterschiedliche Arten bewertet werden. Das Programm AlamutVisual stellt eine Verknüpfung von einzelnen Vorhersageprogrammen (SIFT, PolyPhen und MutationTaster) dar, die aufgrund von speziellen Algorithmen eine mögliche Auswirkung auf die Funktionalität des entsprechenden Proteins gibt, aus dem man eine Vorhersage zur klinischen Interpretation treffen kann. Ebenfalls kann über dieses Programm auf verschiedene online Datenbanken, wie gnomAd, zurückgegriffen werden. Grundsätzlich muss bei der Bewertung der Sequenzveränderungen beachtet werden, ob diese innerhalb des proteinkodierenden Bereiches (Exon) oder außerhalb dessen im Intron liegen. Veränderungen innerhalb der proteinkodierenden Bereiche der Exone können zum Austausch einer Aminosäure und somit zu einer Veränderung in der Struktur des Proteins oder zu einem vorzeitigem Abbruch der Proteinsynthese (durch ein vorzeitiges Stopp-Codon aufgrund einer nonsense-Mutation oder einer Deletion bzw. Insertion) führen. Veränderungen innerhalb der Introns können möglicherweise eine Auswirkung auf den Spleißprozess haben. Hier muss die Lage der Sequenzvariante beachtet werden. Zudem kann über das Alamut-Programm die zu untersuchende Variante mit öffentlichen Datenbanken wie gnomAD verglichen werden.

Zu den beiden bei der WES zuvor detektierten Sequenzveränderungen c.2720G>A und c.5579A>G konnte eine weitere Sequenzveränderung, innerhalb eines Exons liegend und zu einem Aminosäureaustausch führend, detektiert werden. Eine Sequenzverän-

derung im Exon 9 führt an der Nukleotidposition 2785 zu einem Austausch von Cytosin zu Guanin (c.2785C>G), ist somit ein Austausch einer Pyrimidinbase mit einer Purinbase und führt zum Austausch der Aminosäure in Glutaminsäure statt Glutamin.

Diese drei Sequenzveränderungen c.2720G>A, c.2785C>G und c.5579A>G wurden durch das Programm Alamut Visual auf ihre voraussichtlichen klinischen Auswirkungen überprüft. Der Austausch der Aminosäuren in den Veränderungen c.2720G>A und c.2785C>G bleibt laut Vorhersageprogramm ohne funktionelle Folgen. Für die Sequenzveränderung c.2720G>A bewertet das dafür von AlamutVisual herangezogene Vorhersageprogramm SIFT den Austausch als *tolerated*, PolyPhen als *benigne* und MutationTaster als *polymorphism*. Eine herangezogene Datenbank ClinVar dokumentiert eine Veröffentlichung seitens des Instituts *Ambry Genetics*, welche den Austausch als *likely benign* zusammenfasst, eine Veröffentlichung des Instituts *Invitae* trifft ebenfalls die Vorhersage eines benignen Austausches. Aufgrund eines nur geringen physikalisch-chemischen Unterschiedes der ausgetauschten Aminosäuren führt diese Veränderung vermutlich zu keiner klinischen Auswirkung.

Die Sequenzveränderung c.2785C>G wird von dem Programm SIFT als *tolerated*, von MutationTaster als *polymorphism* und von PolyPhen als *benign* eingestuft. Auch die herangezogene Datenbank ClinVar stuft die Veränderung als *benign* ein. Auch hier führt der nur geringe physiochemikalische Unterschied der ausgetauschten Aminosäure zu vermutlich keiner funktionelle Konsequenz.

Bei der Veränderung c.5579A>G ist das Vorhersageprogramm AlamutVisual diverser. Die Auswirkungen werden von *benign* bis *pathogenic* beschrieben. Das Programm SIFT bewertet die Sequenzveränderung als *tolerated*, PolyPhen als *benigne* und das Programm MutationTaster als *polymorphism*. Die herangezogenen Veröffentlichungen mittels ClinVar führten zu unterschiedlichen Ergebnissen von *likely benign* bis *pathogenic*. Die ausgetauschten Aminosäuren besitzen grundsätzlich aber ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. Der Aminosäurenaustausch befindet sich in einer Protein-Domäne, die SNF-2 verbunden ist. Diese Sequenzveränderung wurde bei den untersuchten Meiosearrestpatienten nur bei einem einzigen Patienten detektiert; in unserem Kontrollpatientenkollektiv, welches keinerlei Zeichen von Infertilität aufweist,

konnte die Sequenzveränderung ebenfalls zweimal gefunden werden. Eine klinische Auswirkung dieser Veränderung erscheint also recht unwahrscheinlich und es scheint sich somit um eine polymorphe *Single Nucleotide Variant* zu handeln.

Alle weiteren Veränderungen wurden außerhalb der Exone detektiert und führen laut AlamutVisual zu keiner pathogenen Auswirkung auf den Spleißprozess. Zusätzlich wurden viele der detektierten Sequenzveränderungen ebenfalls bei den gesunden Kontrollpatienten gefunden. Nur die Sequenzveränderungen c.6217+68T>C und c.6700-242dup konnten nur bei den Meiosearrestpatienten gefunden werden und wurden weder bei den Kontrollpatienten noch der gnomAD Datenbank registriert. Diese Sequenzveränderungen liegen außerhalb der Exonsequenzen und somit im nicht-kodierenden Bereich und haben laut Vorhersageprogramm vermutlich keinen Einfluss auf den Spleißprozess und wurden jeweils nur einmal pro Sequenzveränderung detektiert.

Der statistische Vergleich der Häufigkeiten der detektierten Sequenzveränderung bei den Meiosearrestpatienten mit der Kontrollgruppe zeigte, dass keine der Sequenzveränderung signifikant häufiger im erkrankten Patientenkollektiv auftrat. Im statistischen Vergleich der Häufigkeiten der Meiosearrestpatienten mit der Datenbank gnomAD konnte lediglich für die Sequenzveränderung c.5956+36G>A ein signifikant häufigeres Auftreten in der Patientengruppe dokumentiert werden mit  $p_{adj}=0.042$ . Mit dem Wert  $V = 0.11$  ist somit die Häufung signifikant, besitzt aber nur eine sehr geringe Effektstärke. Dieses Resultat eines signifikanten Wertes lässt sich vermutlich anhand der untersuchten Gruppengrößen erklären. Während bei der Patientengruppe 26 Patientenproben untersucht werden konnten, wobei einmal die Sequenzveränderung detektiert wurde, greift die gnomAD Datenbank auf 74551 Sequenzanalysen zurück, wovon lediglich zwei Mal die Sequenzveränderung auffiel. Aufgrund der stark unterschiedlich großen Vergleichsgruppen und der geringen Detektionshäufigkeit darf der zunächst signifikante Wert mit von vornherein nur einer sehr geringen Effektstärke nicht als solcher betrachtet werden.

Grundsätzlich muss bei einer Patientengruppe mit einer Größe von 27 Probanden solch eine statistische Auswertung bewertet werden. Aufgrund der Größe der Proban-

dengruppe können leicht Werte in die eine oder andere Richtung verfälscht werden, sodass signifikante oder nicht signifikante Werte entstehen. Auch die Festlegung des  $p$ -Wertes kann zu einer Fehleinschätzung der Häufigkeit führen.

Zusammenfassend wurden bei der Analyse des *ATRX*-Gens von Meiosearrestpatienten 19 Sequenzveränderungen detektiert, deren Auswirkungen auf das klinische Bild männlicher Infertilität nicht bestätigt werden konnte. Somit ist vermutlich kein Zusammenhang zwischen einer Mutation innerhalb des *ATRX*-Gens und eines Meiosearrestes und somit männlicher Infertilität vorhanden. Die Hypothese einer milden Mutation innerhalb des *ATRX*-Gens mit Folge einer milden Klinik des *ATRX*-Syndroms konnte nicht oder nur ganz selten bestätigt werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Argentaro, A., Yang, J.-C., Chapman, L., Kowalczyk, M. S., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Neuhaus, D. & Rhodes, D. (2007). Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(29), 11939–11944.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704057104>
- Badens, C., Lacoste, C., Philip, N., Martini, N., Courrier, S., Giuliano, F., Verloes, A., Munnich, A., Leheup, B., Burglen, L., Odent, S., van Esch, H. & Levy, N. (2006). Mutations in PHD-like domain of the ATRX gene correlate with severe psychomotor impairment and severe urogenital abnormalities in patients with ATRX syndrome. *Clinical genetics*, *70*(1), 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00641.x>
- Basehore, M. J., Michaelson-Cohen, R., Levy-Lahad, E., Sismani, C., Bird, L. M., Friez, M. J., Walsh, T., Abidi, F., Holloway, L., Skinner, C., McGee, S., Alexandrou, A., Syrrou, M., Patsalis, P. C., Raymond, G., Wang, T., Schwartz, C. E., King, M.-C. & Stevenson, R. E. (2015). Alpha-thalassemia intellectual disability: variable phenotypic expression among males with a recurrent nonsense mutation - c.109CT (p.R37X). *Clinical genetics*, *87*(5), 461–466.  
<https://doi.org/10.1111/cge.12420>
- Bashamboo, A., Ferraz-de-Souza, B., Lourenço, D., Lin, L., Sebire, N. J., Montjean, D., Bignon-Topalovic, J., Mandelbaum, J., Siffroi, J.-P., Christin-Maitre, S., Radhakrishna, U., Rouba, H., Ravel, C., Seeler, J., Achermann, J. C. & McElreavey, K. (2010). Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet*, *87*(4), 505–512.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.009>
- Behre, H. M., Bergmann, M., Simoni, M. & Tüttelmann, F. (2015). Endotext: primary testicular failure. In *Endotext (Internet)*.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300.
- Bergmann, M. (2005). Spermatogenese. Physiologie und Pathophysiologie [Spermatogenesis--physiology and pathophysiology]. *Der Urologe. Ausg. A*, *44*(10), 1131–1138. <https://doi.org/10.1007/s00120-005-0909-2>
- Boehm, U., Bouloux, P.-M., Dattani, M. T., Roux, N. de, Dodé, C., Dunkel, L., Dwyer, A. A., Giacobini, P., Hardelin, J.-P., Juul, A., Maghnie, M., Pitteloud, N., Prevot, V., Raivio, T., Tena-Sempere, M., Quinton, R. & Young, J. (2015). Expert consensus document: european consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology*, *11*(9), 547–564.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.112>
- DGGG, OEGGG & SGGG (Hrsg.). (2019). *Diagnostik und Therapie von einer assistierten reproduktionsmedizinischen Behandlung: AWMF-Registernummer 015/085*.

- Leitlinienklasse S2k. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-085.html> am 11.12.2019
- Ehmcke, J., Wistuba, J. & Schlatt, S. (2006). Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Human reproduction update*, 12(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk001>
- Ferlin, A., Arredi, B., Speltra, E., Cazzadore, C., Selice, R., Garolla, A., Lenzi, A. & Foresta, C. (2007). Molecular and clinical characterization of Y chromosome micro-deletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3), 762–770. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1981>
- Garrick, D., Samara, V., McDowell, T. L., Smith, A. J. H., Dobbie, L., Higgs, D. R. & Gibbons, R. J. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*, 326, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.10.026>
- Garrick, D., Sharpe, J. A., Arkell, R., Dobbie, L., Smith, A. J. H., Wood, W. G., Higgs, D. R. & Gibbons, R. J. (2006). Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS genetics*, 2(4), e58. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020058>
- Gibbons, R. J. (2006). Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis*, 1(15), 15. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-15>
- Gibbons, R. J. & Higgs, D. R. (2000). Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 97(3), 204–212. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(200023\)97:3%3C204::AID-AJMG1038%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1096-8628(200023)97:3%3C204::AID-AJMG1038%3E3.0.CO;2-X)
- Gibbons, R. J., Picketts, D. J., Villard, L. & Higgs, D. R. (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with  $\alpha$ -thalassaemia (ATR-X syndrome). *Cell*, 80(6), 837–845. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90287-2)
- Iannone, R., Cheng, J. & Schloerke, B. (2020). *gt. Easily create presentation-ready display tables* (Version 0.3.1) [Computer software].
- Ion, A., Telvi, L., Chaussain, J. L., Galacteros, F., Valayer, J., Fellous, M. & McElreavey, K. (1996). A novel mutation in the putative DNA helicase XH2 is responsible for male-to-female sex reversal associated with an atypical form of the ATR-X syndrome. *Am J Hum Genet*, 58(6), 1185–1191.
- Juul, S., Karmaus, W. & Olsen, J. (1999). Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. The European Infertility and Subfecundity Study Group. *Hum Reprod*, 14(5), 1250–1254. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.5.1250>
- Kassambra, A. (2020). *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests* (Version 0.7.0) [Computer software].
- Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A. & Agarwal, A. (2011). Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 77(3), 598–601. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.10.001>
- Ludwig, M., Gromoll, J., Hehr, U. & Wieacker, P. (2004). Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reprodukti-

- onsmedizin: Empfehlung zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren. *Journal für Reproduktionsmedizin*, 1(3), 190–193.
- Mangiafico, S. (2020). *rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation* (Version 2.4.1) [Computer software].
- Meschede, D., Lemcke, B., Behre, H. M., Geyter, C. de, Nieschlag, E. & Horst, J. (2000). Clustering of male infertility in the families of couples treated with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15(7), 1604–1608. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1604>
- Nieschlag, E., Behre, H. M. & Nieschlag, S. (Hrsg.). (2009). *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3. Aufl.). Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Nieschlag, E., Werler, S., Wistuba, J. & Zitzmann, M. (2014). New approaches to the Klinefelter syndrome. *Annales d'endocrinologie*, 75(2), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.007>
- Ochsendorf, F. & Weberschock, T. (2019). Die andrologische Basisdiagnostik – von der körperlichen Untersuchung zum Spermiogramm. *Gynäkologische Endokrinologie*, 17(4), 210–218. <https://doi.org/10.1007/s10304-019-00270-5>
- O'Flynn O'Brien, K. L., Varghese, A. C. & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>
- Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M. & Shirakawa, M. (2009). Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *Embo Rep*, 10(11), 1235–1241. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.218>
- Picketts, D. J., Higgs, D. R., Bachoo, S., Blake, D. J., Quarrell, O. W. & Gibbons, R. J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1899–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1899>
- R Core Team. (2020). *R: a language and environment for statistical computing* (Version 4.0.4) [Computer software]. Vienna, Austria.
- R Studio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R: Wax Begonia*.
- Röpke, A., Tewes, A.-C., Gromoll, J., Kliesch, S [Sabine], Wieacker, P. & Tüttelmann, F. (2013). Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *European journal of human genetics : EJHG*, 21(9), 1012–1015. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.290>
- Stevenson, R. E. (2020). Alpha-Thalassemia X-Linked Intellectual Disability Syndrome. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1449/> am 08.06.2020
- Tang, P., Argentaro, A., Pask, A. J., O'Donnell, L., Marshall-Graves, J., Familiari, M., Harley, V. R. & O'Donnell, L. (2011). Localization of the chromatin remodelling protein, ATRX in the adult testis. *Journal of Reproduction and Development*, 57(3), 317–321. <https://doi.org/10.1262/jrd.20221>

- Tewes, A.-C., Ledig, S., Tüttelmann, F., Kliesch, S [Sabine] & Wieacker, P. (2014). DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility. *Fertility and Sterility*, 102(3), 816-820.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.022>
- Tüttelmann, F. (2010). Relevante genetische Erkrankungen in der Andrologie. *Uro-News*, 14(7-8), 37–40. <https://doi.org/10.1007/BF03369551>
- Tüttelmann, F. (2011). Genetische Aspekte bei Spermatogenesestörungen. *Medizinische Genetik*, 23(2), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s11825-011-0274-z>
- Tüttelmann, F. & Nieschlag, E. (2009). Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3. Aufl., S. 89–96). Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Tüttelmann, F., Ruckert, C. & Röpke, A. (2018). Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Medizinische Genetik*, 30(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0181-7>
- Tüttelmann, F., Werny, F., Cooper, T. G., Kliesch, S [S.], Simoni, M. & Nieschlag, E. (2011). Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *International journal of andrology*, 34(4), 291–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01087.x>
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M. & Nieschlag, E. (2009). Physiologische Grundlagen. Physiologie der Hodenfunktion. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3. Aufl., S. 15–61). Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., Francois, R. & Grolemund, G. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4, 43, 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilkie, A. O., Zeitlin, H. C., Lindenbaum, R. H., Buckle, V. J., Fischel-Ghodsian, N., Chui, D. H., Gardner-Medwin, D., MacGillivray, M. H., Weatherall, D. J. & Higgs, D. R. (1990). Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassaemia/mental retardation syndromes. II. Cases without detectable abnormality of the alpha globin complex. *Am J Hum Genet*, 46(6), 1127–1140.
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.). World Health Organization.
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.-W., Okumura, K. & Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00252-8)
- Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M., Westernströer, B., Sanfilippo, J., Kurpisz, M., Rajkovic, A., Yatsenko, S. A., Kliesch, S [Sabine], Schlatt, S. & Tüttelmann, F. (2015). X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *The New England journal of medicine*, 372(22), 2097–2107. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406192>

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1   Verwendete Chemikalien.....	11
Tabelle 2-2   Verwendete Kits mit Herstellerangaben. ....	11
Tabelle 2-3   Verwendete Enzyme mit Herstellerangaben.....	11
Tabelle 2-4   Verwendeter Längenstandard. ....	12
Tabelle 2-5   Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangaben.....	12
Tabelle 2-6   Verwendete Puffer und Stammlösungen mit Herstellerangaben. ....	12
Tabelle 2-7   Verwendete Geräte mit Herstellerangaben. ....	13
Tabelle 2-8   Programmzyklus für die PCR.....	15
Tabelle 2-9   Zuordnung Annealing-Temperatur und DMSO-Zusatz.....	16
Tabelle 2-10   Mastermix für die PCR. ....	17
Tabelle 2-11   Mastermix für die Sequenzierungsreaktion. ....	19
Tabelle 2-12   Programmzyklus für die Sequenzierung. ....	20
Tabelle 2-13   Verwendete Primer für die Amplifikation des <i>ATRX</i> -Gens.....	22
Tabelle 3-1   Häufigkeiten der Sequenzveränderung des MeiA Patientenkollektivs und des Kontrollkollektivs .....	27
Tabelle 3-2   Häufigkeiten der Sequenzveränderungen des Patientenkollektivs und gnomAD.....	28
Tabelle 3-3   Vergleich der relativen Häufigkeiten der Sequenzveränderungen zwischen der Patientengruppe (MeiA) und der Kontrollgruppe (KOP) .....	30
Tabelle 3-4   Vergleich der relativen Häufigkeiten der Sequenzveränderungen zwischen der Patientengruppe (MeiA) und der Datenbank gnomAD .....	31

## **7 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1   Schema der Spermatogenese nach Bergmann (2005) .....	3
Abbildung 2   Elektropherogramm der Sequenzveränderung c.2720G>A .....	25
Abbildung 3   Elektropherogramm der Sequenzveränderung c.5579A>G .....	25

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>C</b>	Cytosin
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>G</b>	Guanin
<b>gnomAD</b>	<i>genome aggregation database</i>
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>KOP</b>	Kontrollpatienten
<b>MeiA</b>	Meiosearrest
<b>min</b>	Minuten
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>sek</b>	Sekunden
<b>U</b>	Unit
<b>WES</b>	<i>whole exome sequencing</i>
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>°C</b>	Celsius

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Tüttelmann und Herrn Dr. rer. nat. Albrecht Röpke.

Meinem Betreuer, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Tüttelmann, danke ich natürlich für das Bereitstellen des Themas, aber auch für das aufgebrachte Engagement während des Fertigungsprozesses und den fachlichen Diskurs.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Albrecht Röpke möchte ich mich ebenfalls recht herzlich bedanken, für den steten fachlichen und privaten Austausch und dem großen Interesse des Gelingens dieser Arbeit.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Centrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Münsters bedanke ich mich für das Bereitstellen des Probenmaterials.

Den Labormitarbeiterinnen des Instituts für Humangenetik danke ich für die herzliche Atmosphäre und stetige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern - danke Papa für den Rechtschreibkurs, danke Mama für die leibliche Unterstützung. Danke Christian für Alles. Danke Benedikt für die schnelle und kompetente Hilfe. Für Oma.

Vielen Dank

## 10 Lebenslauf