

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Reproduktionsgenetik
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann –

Strukturierte Literaturrecherche für männliche Infertilität und Anwendung auf genomweite Daten
zur Identifikation neuer Kandidatengene

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Claus, Christian Gerhard
aus Datteln

2021

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller
1. Berichterstatter Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann Priv.-
2. Berichterstatter Doz. Dr. rer. nat. Nina Neuhaus
Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Reproduktionsgenetik
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann –
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. F. Tüttelmann
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Nina Neuhaus

Zusammenfassung

Erstellung einer Gen-Datenbank zur männlichen Infertilität und Anwendung auf genomweite Daten zur Identifikation neuer Kandidatengene
von Claus, Christian Gerhard

Die männliche Infertilität kann Folge von Mutationen im Genom eines betroffenen Individuums sein. Dabei ist es für die Stellung einer gesicherten Diagnose und adäquaten Therapie unerlässlich, diejenigen Gene zu kennen, deren Inaktivierung einen Mann infertil werden lassen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deswegen neue Kandidatengene der männlichen Infertilität detektiert werden. Gleichzeitig sollte die Annahme überprüft werden, nach der infertile Männer mehr pathologische Varianten jener Gene aufweisen als Fertile. Dafür wurden zwei Datenbanken erstellt, die eine Vielzahl von Genen umfassen, deren Einfluss auf den Erhalt der männlichen Fertilität wahrscheinlich ist. Insgesamt wurden 911 Gene und das Vorkommen der jeweiligen Varianten in einem Patientengut von 50 Patienten untersucht. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl relevanter Varianten und Ausprägung der männlichen Infertilität konnte nicht nachgewiesen werden. Mit dem Gen *CCNA1* konnte nach einem mehrstufigen Filterungsprozess in beiden Datenbanken ein mögliches Kandidatengen der männlichen Infertilität detektiert werden, welches in beiden Datenbanken der einzige gemeinsame Vertreter der potentiell relevantesten Gene war.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2021

Erklärung

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

*Strukturierte Literaturrecherche für männliche Infertilität
und Anwendung auf genomweite Daten zur Identifikation neuer Kandidatengene*

im
Institut für Reproduktionsgenetik
unter der Anleitung von
Herrn Univ.-Prof. Dr. med. F. 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.

Bergkamen, den

Christian Gerhard Claus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Männliche Infertilität	7
1.2	Spermatogenese und Spermienmorphologie	7
1.2.1	Funktionelle Organisation des Hodens	7
1.2.2	Spermatogenese	8
1.2.3	Spermienmorphologie	10
1.2.4	Physiologie der Fertilisation	11
1.3	Störungen der Spermatogenese	11
1.3.1	Ejakulatanalyse	13
1.3.2	Hodenbiopsie	14
1.3.3	Spermatogenese-arrest	14
1.3.4	Sertoli-Cell-Only-Syndrom	14
1.4	Genetische Ursache von Spermatogenesestörungen	15
1.5	Männliche Infertilität im Mausmodell	16
1.6	Konservierte Keimzell-Gene	17
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Erstellung einer Datenbank zur Genfunktion und Bewertung	19
3.2	Transfer in eine Datenbank	20
3.3	Filterungsprozess	20
3.4	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	24
4.1	K.O.-Maus-Gene	24
4.2	Konservierte Keimzell-Gene	28
4.3	Vergleich beider Gen-Listen	30
5	Diskussion	33
6	Literatur	37
	Tabellenverzeichnis	40
	Abbildungsverzeichnis	41
	Danksagung	42
	Lebenslauf	43

1 Einleitung

1.1 Männliche Infertilität

Infertilität beschreibt den Zustand, in dem bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr innerhalb eines Jahres keine Schwangerschaft herbeigeführt werden kann (Nieschlag, 2009). Die Ursachen hierfür können dabei auf Seiten der Frau oder des Mannes liegen. Außerdem kann die Unfruchtbarkeit auch durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren auf Seiten des Mannes und auf Seiten der Frau zustande kommen (Nieschlag, 2009).

Es wird vermutet, dass in bis zu der Hälfte der Fälle die Ursache der Unfruchtbarkeit des Paares auf Seiten des Mannes liegt. Schätzungsweise sind 15% der deutschen Paare im reproduktionsfähigen Alter von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen (Bruckert, 1991; Juul, 1999). Jedoch wurden bei Studien, die die Prävalenz der Infertilität bestimmen, ausgeprägte regionale Schwankungen innerhalb Deutschlands festgestellt (Juul, 1999).

Störungen der männlichen Fertilität können durch verschiedenen Ursachen hervorgerufen werden und vielseitig lokalisiert sein. Beispielsweise können Fehlfunktionen in übergeordneten Zentren wie dem Hypothalamus oder der Hypophyse die Fertilität des Mannes herabsetzen. Aber auch Störungen der Samenablage durch erektile Dysfunktion sowie genetisch bedingte Syndrome wie das Klinefelter-Syndrom, die Obstruktion der ableitenden Samenwege oder eine veränderte Spermienmorphologie sind bekannte Ursachen für männliche Infertilität (Tüttelmann & Nieschlag, 2009).

1.2 Spermatogenese und Spermienmorphologie

Das Wort Spermatogenese bezeichnet die Bildung von Spermien, also den männlichen Keimzellen, aus Stammzellen. Die Spermatogenese ist strikt an die anatomischen Gegebenheiten in den Hoden (lat. *Testes*) gekoppelt. Für das Verständnis der Spermatogenese ist daher nicht nur die Kenntnis über die verschiedenen Stufen des Prozesses, sondern auch über Wechselwirkungen der Keimzellen mit dem umliegenden Gewebe notwendig. Deshalb soll im Folgenden eine Übersicht über die funktionelle Organisation des Hodens gegeben werden.

1.2.1 Funktionelle Organisation des Hodens

Die Hoden übernehmen beim Menschen die Funktion der Produktion männlicher Keimzellen (*Gameten*), und synthetisieren und sezernieren darüber hinaus die männlichen Steroidhormone. Diese Funktionen machen den Hoden für die männliche Reproduktion unerlässlich (Weinbauer et al., 2009). Beide Aufgaben werden in räumlich voneinander getrennten Kompartimenten ausgeführt. Die Integrität beider Funktionen hat jedoch eine essentielle Bedeutung für die qualitative und quantitative Produktion männlicher Samenzellen (Weinbauer et al., 2009). Von innen nach außen sind die Hoden in ein interstitielles und tubuläres Kompartiment unterteilt. Im interstitiellen Kompartiment (Interstitium) findet die Bildung von männlichen Geschlechtshormonen statt, die unter dem Begriff der Steroidogenese zusammengefasst wird. Wichtigster Bestandteil dafür sind die Leydig-Zellen,

die das männliche Geschlechtshormon Testosteron synthetisieren und sezernieren. Daneben finden sich auch Makrophagen, Lymphozyten und Nervenfasern im Interstitium (Weinbauer et al., 2009).

Die Spermatogenese findet im tubulären Kompartiment statt. In diesem Kompartiment finden sich die Tubuli seminiferi contorti, welche die Keimzellen enthalten. Um diese Tubuli herum sind Muskelzellen (*Myozyten*) angeordnet. Sie werden auch als peritubuläre Zellen bezeichnet und besitzen die Fähigkeit spontan zu kontrahieren. Dabei werden Spermien ins Tubuluslumen freigesetzt (Weinbauer et al., 2009). An den Myozyten haften die Sertoli-Zellen, welche als Stützgerüst des Keimepithels bezeichnet werden. Der Prozess der Spermienreifung, von Keimzelle zum Spermium, läuft entlang dieser Zellen ab. Die Keimzelle hat während der gesamten Reifung engen funktionellen Kontakt zu den Sertoli-Zellen (Weinbauer et al., 2009).

Darüber hinaus bilden die Sertoli-Zellen über Tight Junctions die Blut-Hoden-Schranke. Diese ist essentiell für den Erhalt des Flüssigkeitsdrucks innerhalb der Tubuli. Dieser Druck hält das Lumen der Tubuli aufrecht. Zudem erfüllt sie eine Schutzfunktion für die haploiden Keimzellen, die ansonsten von Zellen des Immunsystems als fremdartig erkannt und beseitigt werden würden (Weinbauer et al., 2009). Haploid bedeutet, dass der Chromosomensatz einfach vorliegt. Im Gegensatz zu den Keimzellen sind die meisten übrigen Zellen des Körpers diploid, besitzen also einen doppelten Chromosomensatz. Eine schematische Darstellung der funktionellen Organisation des Hodens findet sich in Abb. 1.1.

1.2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese ist in vier Phasen gegliedert. In chronologischer Reihenfolge laufen die mitotische Proliferation der Spermatogonien, die meiotische Reifeteilung von Spermatozyten, die Differenzierung von Spermatisden zu Spermien und die Freisetzung von Spermien ab (Bergmann, 2005).

Die Spermatogenese findet in den Tubuli seminiferi contorti des tubulären Kompartiments der Testes statt. Die ringförmigen Tubuli sind von einer Basallamina umgeben, an die sich innen die Sertoli-Zellen anschließen. Die Sertoli-Zellen reichen von der Basallamina bis in das Lumen, welches sich in der Mitte der Tubuli hinein befindet. Zwischen den Zellkörpern der Sertoli-Zellen liegen die Keimzellen (Spermatogonien) (Bergmann, 2005). Die Spermatogonien sind die Stammzellen der Keimzellen und der Ursprung der Spermatogenese. Die Spermatogonien teilen sich während ihrer Reifung mehrfach und treten dann in die erste Reifeteilung, die Meiose I, ein. Das Resultat der Spermatogenese sind fruchtbare Spermien. Die Spermatogenese verläuft in der Richtung von basal nach adluminal, sodass ein entwickeltes Spermium (Spermatozoon) aus dem Keimepithel ins Tubuluslumen freigesetzt werden kann (Bergmann, 2005). Als Keimepithel wird der Verbund von Sertoli-Zellen bezeichnet. Die ersten drei von vier Phasen der Spermatogenese verlaufen innerhalb des Keimepithels ab. Anfangs liegen die Spermatogonien basal den Sertoli-Zellen an. Es wird zwischen Spermatogonien vom Typ A und Spermatogonien vom Typ B unterschieden.

Die Spermatogonien vom Typ A werden wiederum unterteilt in Ad(ark)-Spermatogonien und Ap(ale)-Spermatogonien. Zellen des Ad-Typs werden als testikuläre Stammzellen angesehen (Ehmcke et al., 2006). Sie treten auf einen Reiz hin in die Mitose (Zellteilung) ein. Die Ap-

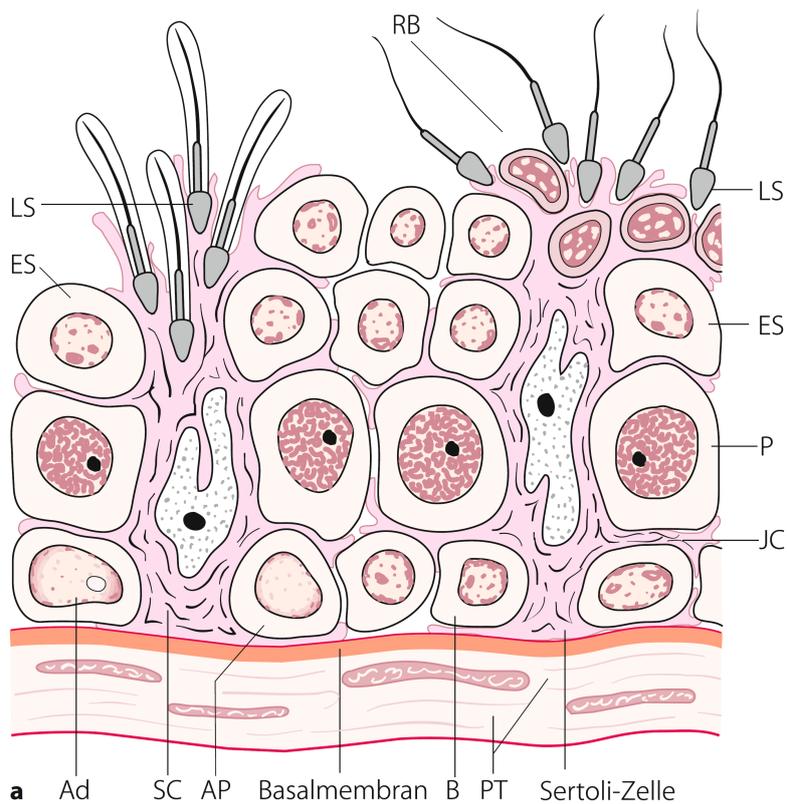


Abbildung 1.1: Aufbau des keimtragenden Epithels beim Mann. Die Tubuluswand ist mehrschichtig und besteht aus peritubulären Zellen, verbunden mit einer Basallamina. RB = Residualkörper, LS = späte und elongierte Spermatiden, P = Spermatozyten, Ad = A-dark-Spermatogonien (testikuläre Stammzellen), Ap = A-pale-Spermatogonien, B = B-Spermatogonien, SC = Sertoli-Zellen, PT = peritubuläre Zellen, JC = Kontaktstellen zwischen den Sertoli-Zellen (Blut-Hoden-Schranke). Abbildung aus Ross und Reith (1985).

Spermatogonien teilen sich konstitutiv mitotisch, wodurch zwei Tochterzellen entstehen. Eine von beiden verbleibt als Ap-Spermatogonie. Die andere tritt als Zelle vom Typ B in die Reifeteilung (Meiose) ein. Spermatogonien besitzen einen diploiden Chromosomensatz ($2n2C$), jedes Chromosom ist hier zweifach vorhanden (Weinbauer et al., 2009).

Die Meiose wird in zwei Vorgänge unterteilt, die als Meiose I und Meiose II bezeichnet werden. Zu Beginn der Meiose I wird der Chromosomensatz verdoppelt ($2n4C$). Die Keimzellen werden nun als Spermatozyten bezeichnet. In der darauffolgenden ersten Reifeteilung teilt sich die primäre Spermatozyte in zwei sekundäre Spermatozyten, welche nun einen haploiden Chromosomensatz aufweisen ($1n2C$). Diese teilen sich wiederum in der zweiten Reifeteilung zu Spermatischen ($1n1C$) (Bergmann, 2005). Die Produktion von Keimzellen ist in Abb. 1.2 schematisch dargestellt.

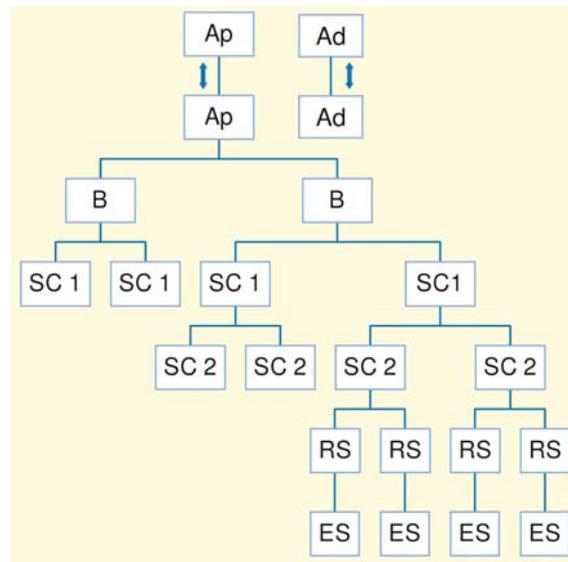


Abbildung 1.2: Keimzellentwicklung des Mannes. Ad = A-dark-Spermatogonien (testikuläre Stammzellen), Ap = A-pale-Spermatogonien, B = B-Spermatogonien, SC1 = primäre Spermatozyte, SC2 = sekundäre Spermatozyte, RS = runde Spermatische, ES = elongierte Spermatische. Abbildung nach Weinbauer et al. (2009).

Spermatischen sind zunächst runde Zellen, die sich nicht weiter teilen. In der dritten Phase der Spermatogenese bilden die Spermatischen einen Kopf und einen Schwanz (*Flagellum*) aus. Außerdem kondensiert der Zellkern und die Spermatischen werden länglich. Zudem wird ein Teil des Zytoplasmas als Residualkörper abgestoßen. Aus diesen Prozessen resultiert ein Spermatozoon (Spermium), welches durch Kontraktion der Myozyten ins Tubuluslumen gelangt. Dieser Vorgang wird als Spermiation bezeichnet. Aus einer Ap-Spermatogonie können so nach Durchlaufen der mitotischen und meiotischen Teilungsphasen sechzehn elongierte Spermien entstehen. Mit Hilfe der Maßnahmen der assistierten Reproduktion kann bereits durch ein rundes Spermatic eine Schwangerschaft zu induziert werden (Weinbauer et al., 2009).

1.2.3 Spermienmorphologie

Das Spermium ist nach der Spermatogenese ca. 60μ lang und kann mikroskopisch in einen Kopf (*Caput*), Mittelstück und Schwanz unterteilt werden. Dem Kopf sitzt das Akrosom auf. Dies ist eine Zellorganelle, welches zelleigenes oder auch zellfremdes Material verdauen kann. Das Akrosom

wird benötigt, um die Schutzhüllen einer Eizelle zu durchdringen. Der Kopf des Spermiums enthält zudem den Zellkern. Der Schwanz enthält das Axonem, eine Mikrotubuli-Struktur (s.u.) und gliedert sich in Hals, Mittel-, Haupt- und Endstück. Das Mittelstück ist von einer Vielzahl von Mitochondrien umgeben (Schünke et al., 2012). Der Aufbau eines Spermiums wird durch die elektronenmikroskopische Darstellung verdeutlicht (Abb. 1.3).

Voraussetzung für die Motilität des Spermiums ist der Spermienschwanz mit seinem integrierten Axonem. Dieses besteht aus einem zentralen Mikrotubuli-Paar, um das neun weitere Mikrotubuli-Paare kreisförmig angeordnet sind. Untereinander sind diese Paare durch das Protein Nexin verbunden. Die Bindung jedes Mikrotubuli-Paares zum zentralen Mikrotubuli-Paar wird mittels Radialspeichen gewährleistet (Cooper & Yeung, 2009).

Die Bewegung des Flagellums wird durch Dyneinarme ermöglicht. Dabei handelt es sich um spezifische Motorproteine, die durch ATPase-Aktivität eine Biegung des Flagellums und eine damit verbundene vorwärtsgerichtete Bewegung des Spermiums ermöglichen (Cooper & Yeung, 2009). Die Mitochondrien fungieren bei diesem Prozess als Energiespender. Durch oxidative Phosphorylierung von Produkten der Atmungskette können sie die benötigte Energie bereitstellen (Yeung et al., 1996). Die Atmungskette ist ein Prozess, der innerhalb der Mitochondrien abläuft. Das Resultat ist Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP).

1.2.4 Physiologie der Fertilisation

Während der Spermienwanderung durch den weiblichen Genitaltrakt durchlaufen die Spermien den Vorgang der Kapazitation, einen physiologischen Reifungsprozess, ohne den die Befruchtung der Eizelle unmöglich ist. Dabei geraten sie in den Zustand der sog. hyperaktiven Motilität. Dies befähigt sie dazu, im späteren Verlauf die Eihüllen der Eizelle (Oozyte) zu durchstoßen und die Akrosomenreaktion zu induzieren (Cooper & Yeung, 2009). Hierbei fusionieren Akrosom- und Spermienmembran. Die Penetration der Eizelle wird so ermöglicht.

Bei Kontakt eines Spermiums mit der Oozyte wird die äußerste Eihülle (*Cumulus oophorus*) durchdrungen. Die Akrosomenreaktion wird ausgelöst durch die Berührung des Spermienkopfes der unter der Eihülle liegenden Zona pellucida. Dabei wird eine Zellorganelle, das Lysosom, aktiv. Es kann zellfremdes Material zersetzen. Diese Reaktion ist nicht nur für die weitere Penetration der Zona pellucida, sondern auch für die Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle verantwortlich (Cooper & Yeung, 2009).

1.3 Störungen der Spermatogenese

Bei infertilen Männern finden sich häufig sowohl Veränderungen der Spermienzahl als auch ihrer Spermienmorphologie. Im Rahmen der Routinediagnostik wird zunächst eine Ejakulatanalyse durchgeführt.

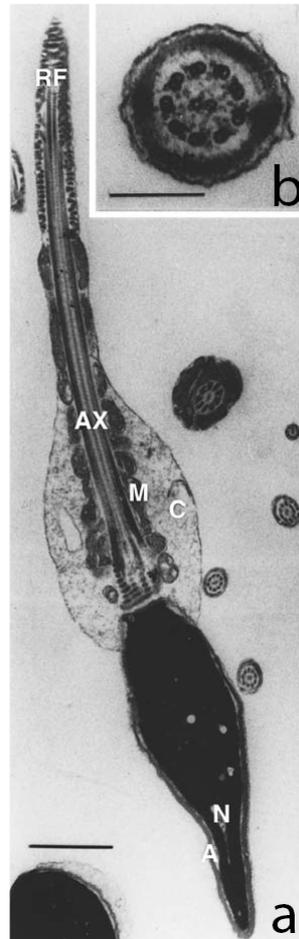


Abbildung 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen Spermiums. **a** Längsschnitt eines Spermiums, Spermienkopf mit Nukleus (N) und Akrosom (A), Mittelstück mit Mitochondrien (M) und Zytoplasma (C), Hauptstück mit Axonem (AX) und Ringfasern (RF), Balken = 1 μm . **b** Querschnitt durch Hauptstück zeigt Axonem mit zentralem Mikrotubulipaar und neun umgebenden Doppeltubuli, Balken = 0,2 μm . Abbildung nach Neugebauer et al. (1990).

1.3.1 Ejakulatanalyse

Mittels der Ejakulatanalyse werden Spermien im Hinblick auf ihre Anzahl, Form und Beweglichkeit analysiert. Sie sollte von der Gewinnung des Ejakulats bis zur Analyse standardisiert nach den Kriterien der WHO durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Männer zu gewährleisten (Nieschlag et al., 2012).

Analysiert werden unter anderem die Spermienzahl, die Morphologie der Spermien, die Spermienmotilität, das Volumen des Ejakulats sowie sein pH-Wert. Die unteren Grenzen der Referenzwerte für Ejakulatparameter sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Untere Referenzwerte der Ejakulatparameter nach World Health Organization (2010).

Parameter (Einheit)	Unterer Grenzwert
Volumen Samenflüssigkeit (ml)	1,5
Gesamtzahl ($\times 10^6$)	39
Spermienkonzentration ($\times \frac{10^6}{\text{ml}}$)	15
Gesamtmortalität (progressiv und nichtprogressiv, %)	40
Progressive Mortalität (%)	32
Vitalität (lebende Spermatozoen, %)	58
Spermienmorphologie (normale Formen, %)	4

Die Ejakulatparameter Gesamtspermienzahl bzw. Spermienkonzentration, Spermienmotilität und Spermienmorphologie sind im Hinblick auf die Nomenklatur von pathologischen Befunden von besonderer Bedeutung. Die Normozoospermie ist der Ausdruck einer regelrecht ablaufenden Spermatogenese, die Werte der drei aufgeführten Parameter liegen im Referenzbereich. Eine Verringerung der Gesamtzahl (bzw. Spermienkonzentration) unterhalb des Referenzwertes von 39 Mio Spermien (bzw. unter 15 Mio/ml) wird als Oligozoospermie bezeichnet. Das komplette Fehlen von Spermien wird Azoospermie genannt.

Wenn der Anteil progressiv motiler Spermien weniger als 32% beträgt, liegt eine Asthenozoospermie vor. Unter Teratozoospermie wird das vermehrte Vorkommen abnorm geformter Spermien verstanden, wobei der Anteil normal geformter Spermien weniger als 4% beträgt (Nieschlag et al., 2012). Meist findet sich bei infertilen Patienten eine Abweichung in allen drei genannten Ejakulatparametern. Die Kombination wird als Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom) zusammengefasst.

Bis dato konnten verschiedene Ursachen für das OAT-Syndrom identifiziert werden, die unterschiedlich kategorisiert werden können. Unter den primären Störungen des Hodens werden genetische Ursachen, Maldescensus, Orchitis (z.B. durch Mumps-Viren), Durchblutungsstörungen, physikalische Ursachen (z.B. Variokozele, Trauma), Intoxikationen und Stress zusammengefasst. Unter dem Begriff extratestikulären Störungen werden Erkrankungen wie Adnexitis, Epididymitis, sowie Transport- und Entleerungsstörungen zusammengefasst. Mit bis zu 50% und damit am häufigsten wird jedoch das sogenannte „idiopathische“ OAT-Syndrom diagnostiziert. In diesen Fällen bleibt die Ursache unklar (Kaufmann et al., 2010).

1.3.2 Hodenbiopsie

Eine Hodenbiopsie kann zu diagnostischen Zwecken bei infertilen Männern mit Azoospermie, normalem Hodenvolumen und gewöhnlichem FSH-Spiegel durchgeführt werden, um zwischen einer obstruktiven und einer nicht-obstruktiven Azoospermie (NOA) zu unterscheiden. Für die Patienten steht jedoch der therapeutische Nutzen im Vordergrund. 50–60% der Patienten mit Azoospermie weisen Hodentubuli auf, in denen Spermien vorhanden sind. Mittels Biopsie kann ein Gewebestück entnommen werden, aus dem Spermien gewonnen werden. Durch eine In-vitro-Fertilisation (IVF) oder eine Intraplasmatische Spermieninjektion (ICSI) kann dann eine Eizelle befruchtet werden (Dohle et al., 2005).

Die Biopsie des Hodengewebes lässt darüber hinaus unter anderem auch die Untersuchung auf zellulärer Ebene zu. Hiermit lassen sich beispielsweise Zustände wie der Spermatogenese-arrest oder die Aplasie, also das vollständige Fehlen, der Keimzellen diagnostizieren.

1.3.3 Spermatogenese-arrest

Eine spezielle Form der Spermatogenesestörung ist der Spermatogenese-arrest. Hierbei ist die Ausreifung der Spermatogonien zu reifen Spermien unterbrochen. Dies kann auf verschiedenen Stufen der Spermatogenese, wie der Stufe der Spermatogonien, der primären und sekundären Spermatozyten und der runden Spermiden geschehen. Es handelt sich hierbei um einen charakteristischen histopathologischen Phänotyp, also um ein spezifisches Erscheinungsbild (Nieschlag et al., 2009). Die Häufigkeit dieses Phänotyps wird bei infertilen Männern mit 4–30% angegeben (Nieschlag et al., 2009).

Bei einem Teil der Patienten, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, wurde ein Arrest auf der Stufe der primären Spermatozyten diagnostiziert. Hierbei handelt es sich um eine Störung während der ersten meiotischen Reifeteilung. Deswegen wird diese Form des Spermatogenese-arrests auch als Meiose-arrest bezeichnet. Bei diesem Phänotyp wird weiter zwischen einer vollständigen und teilweisen Ausprägung differenziert.

Beim vollständigen Spermatogenese-arrest ist der Patient azoosperm, d.h. es finden sich keine Spermien im Ejakulat. Ist der Arrest partiell, kann eine Oligo-Asthenoteratozoospermie unterschiedlichen Schweregrades vorliegen (Nieschlag et al., 2009). Allerdings gibt es Unstimmigkeiten in der Literatur im Hinblick auf die Nomenklatur des Meiose-arrests. Die Abkürzung „MA“ für Meiose-arrest findet in der Literatur auch Verwendung für „maturation arrest“. In dieser Arbeit sollen Patienten des Krankheitsbildes eines Meiose-arrests mit MeiA gekennzeichnet werden.

1.3.4 Sertoli-Cell-Only-Syndrom

Die Keimzellaplasie, auch Sertoli-Cell-Only Phänotyp (SCO) genannt, ist ein weiteres charakteristisches histologisches Erscheinungsbild. Bei der totalen Germinalzellaplasie weisen die Tubuli im histologischen Schnitt keine Keimzellen auf, es sind nur Sertoli-Zellen zu erkennen (Nieschlag et al., 2009). Es ist die häufigste Ursache der nicht-obstruktiven Azoospermie (NOA), dem kompletten Fehlen von Spermien im Ejakulat (Nieschlag et al., 2009). Beim fokalen SCOS-Syndrom sind in

einem Teil der Tubuli Keimzellen zu finden, auch wenn hier die Spermatogenese oft qualitativ und quantitativ eingeschränkt ist. Das fokale SCO wird häufiger diagnostiziert als die vollständige Ausprägung (Nieschlag et al., 2009).

1.4 Genetische Ursache von Spermatogenesestörungen

Die histologische Bestimmung der Ursache der Infertilität kann durch eine Hodenbiopsie erbracht werden. Jedoch bleibt der eigentliche Grund für die Störung unklar (Tüttelmann et al., 2018). Eine genaue Ursache der Störung ist schwer zu identifizieren. Zum einen wird diese Schwierigkeit durch die verschiedenen Kompartimente des Hodens, dem Interstitium und den *tubuli seminiferi* hervorgerufen. Zum anderen ist die Spermatogenese einer der komplexesten Prozesse von Zelldifferenzierung im menschlichen Körper. Dies wird durch die Anzahl der daran beteiligten Gene verdeutlicht. Die Spermatogenese wird von bis zu 2000 Genen gesteuert, von denen 600–900 allein bei Männern exprimiert werden (Chalmel et al., 2012; Matzuk & Lamb, 2008; Yan, 2009). Die genauen genetischen Hintergründe der Spermatogenese sind deswegen bislang kaum verstanden, rücken aber schon seit Jahren in den Fokus der Forschung (Tüttelmann et al., 2018).

Zurzeit kann eine genaue Diagnose bei ca. 28% der infertilen Männer gestellt werden (Punab et al., 2017). Ungefähr 10% der männlichen Infertilitätsfälle sind auf Chemo- und Strahlentherapie infolge einer Krebserkrankung zurückzuführen. Weitere 14% der Fälle lassen sich durch chronische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes erklären (Tüttelmann et al., 2018).

Eine Diagnose mit genetischem Hintergrund kann zurzeit nur bei 4% der Patienten gestellt werden. Strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, wie das Klinefelter-Syndrom, zählen zu dieser Gruppe. Das Klinefelter-Syndrom zeichnet sich durch die Chromosomenformel (Karyotyp) 47,XXY aus. Hiervon betroffene Männer weisen ein überzähliges X-Chromosom auf. Mikrodeletionen der Azoospermie-Faktor-Regionen (AZF) auf dem langen Arm des Y-Chromosoms führen zu hochgradiger Oligozoo – oder Azoospermie. Mutationen des *CFTR*-Gens können eine obstruktive Azoospermie verursachen (Tüttelmann et al., 2018).

Die genetische Diagnostik hat sich bei infertilen Männern in den letzten 20 Jahren kaum weiterentwickelt. Routinemäßig wird eine Untersuchung hinsichtlich einer Chromosomenstörung und Y-chromosomaler AZF-Deletion durchgeführt. Beides zusammen liefert bei 4% der infertilen Männer und bei 20% der Männer mit Azoospermie eine kausale genetische Ursache. Gensequenzierungen werden meist nur bei Patienten mit obstruktiver Azoospermie oder beim seltenen Krankheitsbild des hypogonadotropem Hypogonadismus durchgeführt (Tüttelmann et al., 2018). Eine einheitliche genetische Diagnostik bei infertilen Männern ließ sich jedoch bis heute nicht etablieren. Es gelang bislang nur in sehr wenigen Fällen, Kandidatengen eine essentielle Rolle für die Entstehung männlicher Infertilität nachzuweisen (Behre et al., 2015; Kosova et al., 2012). In letzter Zeit haben sich durch technische Neuerungen neue Untersuchungsmethoden wie die sog. Array-CGH-Analyse ergeben. Hiermit lassen sich Zugewinne und Verluste genomischer Bereiche mit einer Auflösung von mehr als 100kb nachweisen.

Mit der Array-CGH-Analyse konnte bei Männern mit Oligo- und Azoospermie eine Anhäufung von copy-number variants (CNVs) vor allem auf den Geschlechtschromosomen nachgewiesen

werden (Tüttelmann et al., 2011). CNVs sind Variationen des Erbguts, die zu einer abweichenden Länge eines Chromosomenabschnitts und der dort lokalisierten Gene führen. Es werden Zugewinne (Duplikationen) und Verluste (Deletionen) unterschieden.

Lopes et al. (2013) beobachteten, dass bei infertilen Männern eine erhöhte Anzahl von seltenen CNVs vorkommt. In dieser Studie wurde das genomweite Vorkommen von CNVs in bestimmten Patientengruppen analysiert. Hierdurch sollten weitere, bisher unbekannte genetische Ursachen von Spermatogenesestörungen identifiziert werden.

Erste Untersuchungen wurden an einem Patientenkollektiv vorgenommen, welches in drei Gruppen unterteilt wurde. Die erste Gruppe enthielt 35 Männer mit idiopathischer NOA. Die zweite Gruppe enthielt 48 Männer mit ausgeprägter Oligozoospermie. Die dritte Gruppe repräsentierte die Kontrollgruppe mit 62 fertilen Patienten. Keiner der Männer wies eine AZF-Deletion des Y-Chromosoms auf. Ein Vergleich der Gruppen im Hinblick auf das Gesamtvorkommen von CNV ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede (Lopes et al., 2013).

Beschränkte man sich bei der Analyse jedoch auf CNVs mit einem Vorkommen in Kontrollpopulationen von weniger als 5%, ließen sich statistisch signifikante Unterschiede nachweisen.

Die Männer mit Azoo- und Oligozoospermie (Gruppe 1 und 2) wiesen demnach doppelt so viele CNV auf, wie Männer der Kontrollgruppe. Untersuchte man darüber hinaus die selteneren größeren CNV mit mehr als 100 Kilobasen, war der Unterschied umso signifikanter (Lopes et al., 2013).

Im Gegensatz zu CNV, die einen größeren Chromosomenabschnitt abdecken können, stellen single nucleotide variants (SNV) die Variation eines einzelnen Basenpaares dar. Die Häufung von Varianten von bestimmten Genen kann, genauso wie eine Häufung von CNV, statistisch erfasst werden. Ob im Genom infertiler Patienten auch signifikant häufiger SNV vorkommen, wurde bislang nicht untersucht.

1.5 Männliche Infertilität im Mausmodell

Dieser Arbeit liegt ein Review von Matzuk und Lamb (2008) zugrunde, welches als Basis zur Erstellung einer Datenbank mit relevanten Genen der männlichen Infertilität dient. Die Übersichtsarbeit ist eine Zusammenfassung bereits bestehender Studien, in denen genetische Ursachen männlicher Infertilität ermittelt wurden. Dies geschah durch die gezielte Inaktivierung einzelner Gene in Mauslinien (knock-out Maus, K.O.-Maus). Durch den Phänotyp dieser Mäuse lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens ziehen. Dem Review liegt der Leitgedanke zugrunde, dass das Verständnis der molekularen Kontrolle der Reproduktion mit der Erstellung von Mausmodellen effektiver als beim Menschen untersucht werden kann. Aus dem Review geht eine Auflistung von Genen hervor, die in Versuchen mit Mäusen als relevant für die Fertilität identifiziert wurde. Für die Erstellung der ersten Datenbank wurden 328 dieser Gene recherchiert. Das Review von 2008 ist eine umfassende Übersichtsarbeit, die ein großes Portfolio von möglicherweise relevanten Genen des männlichen Reproduktionsprozesses enthält.

1.6 Konservierte Keimzell-Gene

Zu vergleichenden Zwecken und Ausweitung der Analyse wurde eine zweite Gen-Liste der Medizinischen Fakultät der Universität von Lissabon zur Verfügung gestellt. Der Auswahl dieser Gene liegt die Hypothese zu Grunde, dass die drei fundamentalen Eigenschaften von Spermienzellen, die sich in Differenzierung, Fähigkeit zur Befruchtung und Weitergabe von Erbmateriale aufteilen, durch ein evolutionär konserviertes, also lang erhalten gebliebenes Genprogramm ermöglicht werden. Dieser Hypothese folgend, wurden Spermienzellen von unterschiedlichen Spezies isoliert und die Genexpression analysiert. Folgende Spezies wurden dabei analysiert:

- Mensch
- Insekt (*drosophila melanogaster*)
- Moos (*physcomitrella patens*)
- Blütenpflanze (*arabidopsis thaliana*)

Aufgrund der großen artspezifischen Differenzen sollten nur die fundamentalsten Aspekte der Zellidentität und -funktion gemeinsam sein. Aus der Schnittmenge dieser Gene und anschließender Dezimierung um Gene, die der allgemeinen Zellfunktion dienen, konnten 609 evolutionär konservierte humane Gene identifiziert werden. Sie definieren möglicherweise das genetische Programm der Spermienzellen (unveröffentlichte Daten von Navarro-Costa).

2 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollte die Anzahl von SNV im Genom infertiler Männer statistisch erfasst werden. Dabei waren die Kandidatengene aus einer umfassenden Studie zur Infertilität vorgegeben. Es sollte die Hypothese überprüft werden, nach der sich das Vorkommen von SNV im Genom infertiler Männer statistisch signifikant von fertilen Männern unterscheidet. Die notwendigen Whole-Exome-Sequenz-Daten (WES) wurden durch die Datenbank des humangenetischen Instituts des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt.

Als Grundlage dieser Arbeit sollte zunächst eine Liste von Genen erstellt werden, die bislang im Zusammenhang mit männlicher Infertilität beschrieben wurden. Die WES-Daten wurden dann durch die Datenbank im Hinblick auf das Vorkommen von SNV in diesen Genen untersucht. In den sich anschließenden Filterungsschritten sollten Kandidatengene identifiziert werden, die für männliche Infertilität ursächlich sind.

3 Material und Methoden

3.1 Erstellung einer Datenbank zur Genfunktion und Bewertung

Auf Grundlage der im Review von Matzuk und Lamb (2008)) gelisteten Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Liste von Genen erstellt, die an der Spermatogenese in Mäusen beteiligt sind. Dabei wurde zu jedem gelisteten Gen eine Recherche via PubMed-Datenbank durchgeführt. Um die Bedeutung eines Gens für den männlichen Reproduktionsprozess zu ermitteln und eine transparente Übersicht zu ermöglichen, wurden mehrere Parameter festgelegt, auf die hin das Gen untersucht wurde. So wurde neben dem Namen des jeweiligen Gens auch die Funktion, der Zelltyp, in dem das Gen hauptsächlich exprimiert wird, und die Spermatogenesestufe, in der eine Beeinflussung durch das codierte Protein erfolgt, erfasst. Zudem wurde für jede Studie mindestens eine PubMed ID (PMID) der zugrundeliegenden Publikation hinterlegt und eine Bewertung hinzugefügt.

Die Mehrheit der gelisteten Gene besitzt mehrere Synonyme. Verwendet wurde für die Datenbank das Gensymbol, das im Review von Matzuk und Lamb (2008) aufgelistet ist. Ein Vergleich der Gene des Reviews mit der Datenbank ist aufgrund dieser Vereinheitlichung gewährleistet. Die Funktion des Gens wurde im Rahmen der Recherche beschrieben und hinterlegt.

Ein Gen dieser Liste nimmt meist nicht nur eine spezifische Funktion im Reproduktionsprozess der Maus ein, sondern erfüllt verschiedene Aufgaben im Organismus. In dieser Arbeit wird jedoch ausschließlich der reproduktive Aspekt der Genfunktion in den Fokus genommen.

Eine ausführliche Beschreibung der Genfunktion und der experimentelle Aufbau zur Erforschung dieser kann für das jeweilige Gen aus dem Artikel entnommen werden. Zudem ist jeder Artikel, dessen PMID der Liste zu entnehmen ist, gespeichert worden und im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Münster (UKM) hinterlegt. Für das Verständnis der Funktion des Genprodukts ist die Angabe der Zellen sinnvoll, die das Gen exprimieren. Hier wird zwischen den Keimzellen und somatischen Zellen der Testes unterschieden. Insbesondere wurde zwischen den somatischen Leydig- und Sertoli-Zellen differenziert. Für die Relevanz des Gens ist darüber hinaus entscheidend, auf welcher Stufe der Spermatogenese das Gen hauptsächlich exprimiert wird. Differenziert wird hier zwischen den verschiedenen Zelltypen der Spermatogenese: Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen und reifen Spermien.

Zudem wurde jedes Gen im Rahmen der Erstellung der Gen-Liste bewertet. Die Bewertung umfasst die Werte von 1 bis 3 und veranschaulicht die Relevanz des jeweiligen Gens für den Reproduktionsprozess. Ein Gen wird mit dem Score 1 bewertet, wenn es für den erfolgreichen Ablauf der Reproduktion nicht benötigt wird, eine Inaktivierung des Gens hat klinisch folglich keine Auswirkungen auf die Reproduktion der Maus.

Unter Score 2 fallen Gene, deren Funktion relevanter als die der Gene mit dem Score 1 zu bewerten ist. Eine Inaktivierung führt bei der Maus zu klinisch erkennbaren Beeinträchtigungen der Fertilität. Dies kann sich beispielsweise in einer reduzierten Spermienzahl oder -motilität manifestieren, was die Fruchtbarkeit der Maus aber gegebenenfalls nur geringfügig beeinträchtigt. Unter diese mittlere Bewertungsstufe fallen auch Gene, deren Inaktivierung eine erhebliche Einschränkung des

natürlichen Fortpflanzungspotentials bewirken. Vorausgesetzt ist hierbei die Bedingung, dass die Befruchtung einer Eizelle mit den Spermien der betroffenen Maus zumindest *in vitro* induziert werden kann. Gene, deren Inaktivierung eine so erhebliche Störung der Reproduktion in der männlichen Maus verursacht, dass diese infertil wird, wurden mit dem Score 3 versehen. Bei diesen Genen kann auch *in vitro* keine Schwangerschaft induziert werden.

Im Rahmen dieser Recherche konnten aus den im Review von Matzuk und Lamb (2008) aufgelisteten Genen insgesamt 328 Gene für die erste Gen-Liste erfasst werden. Für sie ergibt sich eine hohe Evidenz im Hinblick auf ihre Funktion im Reproduktionsprozess männlicher Mäuse. Die anfänglich erstellte Gen-Liste umfasst 328 Gene der Reproduktion von männlichen Mäusen. Um im Folgenden die Relevanz dieser Gene für den Menschen beurteilen zu können, musste die Gen-Liste der K.O.-Maus-Gene in eine Liste für menschliche Gene übersetzt werden. Dies geschah durch bioinformatische Analysen mithilfe des R Paktes *biomaRt* (Durinck et al., 2017; Durinck et al., 2005; Durinck et al., 2009). Die Gen-Liste der humanen Homologe umfasst 321 Gene. Sieben Gene gingen nicht in die anschließende Analyse ein, da sie kein Pendant im Menschen aufwiesen.

3.2 Transfer in eine Datenbank

Die nun erstellten Gen-Homolog-Listen fungierten im Folgenden als Filter, um aus den vorliegenden WES-Daten von insgesamt 50 Patienten alle Varianten zu selektieren. Diese Daten wurden durch das Institut für Humangenetik der Uniklinik Münster zur Verfügung gestellt. Sie enthalten Informationen von infertilen Männern und einer fertilen Kontrollgruppe, die im Rahmen vorheriger Forschungsprojekte vom Institut erfasst wurden. In ihnen sind alle detektierten Varianten dieser Gene gelistet.

Alle Varianten wurden annotiert, also mit umfangreichen Informationen versehen. Für jede Variante ist die genaue Position auf dem jeweiligen Chromosom enthalten, die Auswirkung einer Mutation auf die Funktion des jeweiligen Gens und auch die Häufigkeit in ausgewählten externen Datenbanken angegeben. Zudem enthält sie Informationen über das Vorkommen jeder Variante in insgesamt 50 Patienten, von denen 36 zum Phänotyp des SCO-Syndroms, 8 zum Phänotyp des Meiosearrests und 6 zu einer fertilen Kontrollgruppe gehören.

Die Gen-Liste der hochkonservierten Gene, welche durch Paulo Navarro-Costa zur Verfügung gestellt wurde, enthielt insgesamt 609 humane Gene. Auch sie wurden einem Filterungsprozess unterzogen.

3.3 Filterungsprozess

Bei der Suche nach neuen Kandidatengenen der männlichen Infertilität sollte die Variantenzahl auf ein handhabbares Maß reduziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Filterungsprozess in mehreren Stufen etabliert. Dabei sollte auf jeder Stufe statistisch analysiert werden, ob infertile Männer durchschnittlich mehr seltene Varianten in ihrem Genom aufweisen als Fertile.

Im ersten Schritt des Filterungsprozesses wurden diejenigen Varianten aussortiert, die aller Voraussicht nach einen geringen Einfluss auf die Funktion des jeweiligen Gens haben. Darunter fallen

sogenannte „synonyme Varianten“, auch „stille Mutationen“ genannt, bei denen zwar eine Base der DNA-Sequenz ausgetauscht wird, dies aber nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins führt.

Aussortiert wurden zudem Varianten, in denen zusätzlich ein Basentriplett in Folge einer Mutation auftritt, wodurch eine zusätzliche Aminosäure in die Aminosäuresequenz des Proteins eingebaut wird.

Im nächsten Schritt wurde die Häufigkeit des Vorkommens der Variante in bestimmten Populationen laut ExAC-Datenbank bestimmt. Dabei wurde nach der Minor Allele Frequency (MAF) gefiltert. Die MAF ist der Quotient aus der Häufigkeit, mit der diese Variante in der Population detektiert wurde, und der verdoppelten Anzahl der Personen dieser Population. Die Verdopplung wird vorgenommen da alle autosomalen Allele im Menschen doppelt vorkommen. Die MAF errechnet sich nach der Formel

$$\text{MAF} = \frac{n_{\text{Varianten}}}{n_{\text{Individuen}} \cdot 2} \quad (3.1)$$

Das Exome Aggregation Consortium (ExAC) ist eine Organisation, die Daten aus einer Vielzahl von Sequenzierungsprojekten sammelt und sie der Öffentlichkeit zur Verfügung stellt. Die Website umfasst die Daten von nicht-verwandten Individuen, die an verschiedenen populationsgenetischen Studien teilgenommen haben.

Zudem wurde die Häufigkeit des Vorkommens jeder Variante im 1000-Genome-Project untersucht. Im Rahmen dieses Projekts wurde im Zeitraum von 2008 bis 2015 ein großer humane Variationen-Katalog erstellt. Berücksichtigt wurden hierbei europäische Daten, die sich aus den Regionen um Zentraleuropa, Finnland, Großbritannien, Toskana (Italien) und Spanien zusammensetzen.

Der Filter für die Häufigkeit des Vorkommens einer Variante in beiden Datenbanken wurde auf bis zu 1% festgelegt. Dieses Vorgehen beruhte auf der Annahme, dass potentiell pathogene, also krankheitsrelevante Varianten, selten sind. Dieser Annahme liegt die Vorstellung zugrunde, dass pathogene Varianten, die die Fertilität einschränken, ein Selektionsnachteil sind.

Im dritten Schritt des Filterungsprozesses wurde das Resultat der Mutation der jeweiligen Variante berücksichtigt. Hieraus lässt sich ein Maß für die Beeinträchtigung der Proteinfunktion ableiten. Stufe 4 des Filterungsprozesses umfasst demnach zwei Varianten-Gruppen, wobei eine Gruppe die Missense-Fraktion, eine andere die Nonsense-Fraktion umfasst. Varianten der Missense-Fraktion enthalten eine Missense-, oder auch nicht-synonyme Varianten, bei denen für eine andere Aminosäure codiert wird. Die Folge einer solchen Variante lässt sich nur schwer abschätzen. Es ist ebenfalls möglich, dass sie keine Auswirkungen auf die Proteinfunktion hat. Die zweite Gruppe umfasst die Nonsense- Fraktion, also solche Varianten, bei denen die Variante einen vorzeitigen Stopp der Erstellung der Aminosäuresequenzierung bewirkt. Splicesite-Mutationen sind in dieser Fraktion auch vertreten. Sie resultieren möglicherweise in einem falschen Zusammenbau der RNA. Diese Fraktion korreliert am ehesten mit einer deutlichen Funktionseinschränkung des codierten Proteins. Jedoch kann auch in dieser Gruppe nicht ganz ausgeschlossen werden, dass eine Mutation keinen Effekt hat, da auch Bereiche eines Gens durch eine Mutation betroffen sein können, die keine Proteine codieren. Nicht alle selektierten Varianten können eindeutig in eine der beiden Gruppen zugeordnet werden. Diese Varianten sind unter der Fraktion „Sonstige“ zusammengefasst und sollen

aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, ursächlich für die männliche Infertilität zu sein, im weiteren Verlauf unberücksichtigt bleiben.

Im nächsten Filterungsschritt wurde das Vorkommen der Varianten in einer Kontrollgruppe berücksichtigt. Da Mitglieder der Kontrollgruppe phänotypisch gesund, also fertil sind, ist eine in dieser Gruppe auftretende Variante wahrscheinlich nicht ursächlich für die Infertilität. Ein rezessiver Erbgang würde das Vorkommen zweier Varianten voraussetzen und sollte deswegen keine Rolle spielen. Abb. 3.1 gibt einen Überblick über den Filterungsprozess.

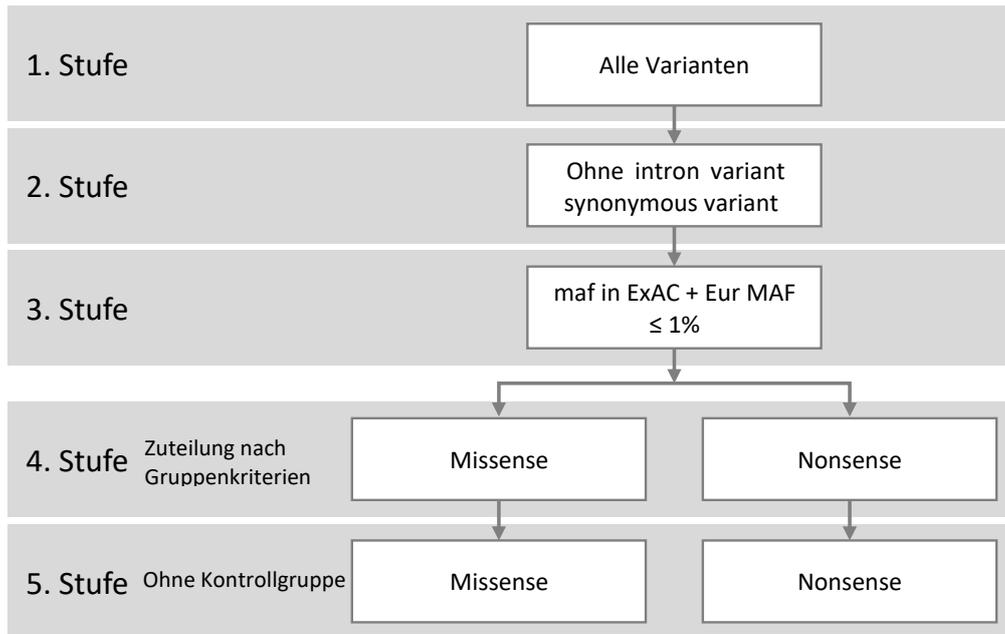


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Filterungsprozesses.

Da in der statistischen Analyse das Vorkommen von Varianten in den jeweiligen Patientengruppen berechnet und verglichen werden sollte, wurde erfasst, wie oft eine Variante in einem Patienten durchschnittlich vorkommt. Bei heterozygotem Vorkommen ist sie einmal, bei Homozygotie zweimal vertreten. Handelt es sich um eine Variante eines X-chromosomal vererbten Gens, ist der Patient bei Vorkommen hemizygoter Träger, wobei die Variante insgesamt auf einem Allel vorliegt. Die Anzahl der Varianten wird in der jeweiligen Patientengruppe (SCOS, MeiA, Kontrolle) durch die Personenzahl dividiert, woraus sich die durchschnittliche Anzahl von Varianten pro Person in der jeweiligen Patientengruppe ergibt

$$\bar{x}_{\text{Varianten}} = \frac{n_{\text{Varianten}}}{n_{\text{Personen}}} \quad (3.2)$$

3.4 Statistische Auswertung

Um die Hypothese zu überprüfen, nach der sich die durchschnittliche Anzahl pathologischer Varianten zwischen den jeweiligen Patientengruppen auf den unterschiedlichen Filterstufen unterscheidet, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Zwischensubjektfaktor Gruppenzugehörigkeit durchgeführt.

Der Zwischensubjektfaktor weist die drei Faktorstufen (Kontrollgruppe, SCOS und MeiA) auf. Bei einer Varianzanalyse wird die Gesamtvarianz in die Varianz zwischen den Faktorstufen und die Varianz innerhalb der Faktorstufen zerlegt. Je größer der Einfluss des vorher definierten Faktors, desto größer ist die Varianz zwischen den Faktorstufen. Dabei soll die Varianz innerhalb der Faktorstufen gering sein, da sich die Werte innerhalb einer Faktorstufe bei einem gegebenen Einfluss ähnlicher sein sollten als zwischen den Faktorstufen.

Die Varianz zwischen den Faktorstufen berechnet sich aus der quadrierten Differenz des jeweiligen Stufen-Mittelwerts X_i einer Stufe i vom Gesamtmittelwert $X..$, multipliziert mit der Anzahl der in der Stufe i enthaltenen Beobachtungen n_i , also

$$\sum_i n_i (X_{i.} - X_{..})^2 \quad (3.3)$$

Die Varianz innerhalb der Faktorstufen berechnet sich als die quadrierte Differenz jeder Beobachtung j innerhalb einer Stufe i vom Stufen-Mittelwert der Stufe i , also

$$\sum_{i,j} (X_{ij} - X_{i.})^2 \quad (3.4)$$

Diese Varianzen werden anhand ihrer Freiheitsgrade standardisiert und zueinander ins Verhältnis gesetzt (dividiert). Die Freiheitsgrade der Varianz zwischen den k Stufen errechnen sich aus $k - 1$ und die Freiheitsgrade der Varianz innerhalb der Stufen aus $n - k$, wobei n die Anzahl der Beobachtungen ist. Die sich daraus ergebende Teststatistik ist somit

$$F = \frac{\frac{\sum_i n_i (X_{i.} - X_{..})^2}{k-1}}{\frac{\sum_{i,j} (X_{ij} - X_{i.})^2}{n-k}} \quad (3.5)$$

Diese Teststatistik folgt unter der Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Gruppen) annähernd einer F -Verteilung mit $k - 1$ und $n - k$ Freiheitsgraden. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses, wenn der zur Teststatistik gehörende p -Wert also unter das α -Niveau fällt, entscheidet man sich für die Alternativhypothese, dass sich mindestens eine Faktorstufe im Mittel von den übrigen Faktorstufen unterscheidet. Welche Faktorstufen sich konkret voneinander unterscheiden, wird mit post-hoc-Tests ermittelt (Field, 2018).

Das α -Niveau betrug standardmäßig 0,05. Voraussetzung für eine Varianzanalyse ist die Varianzhomogenität, welche mit dem Levene-Test (Levene, 1960) überprüft wurde. Bei etwaigen statistisch signifikanten Ergebnissen der Varianzanalyse wurde als post-hoc-Test der GT2 (Generalized Tukey 2) nach Hochberg (1974, 1975) angewendet, weil dieser im Vergleich zu anderen post-hoc-Tests bei ungleich verteilten Gruppengrößen, die hier vorliegen, robustere Ergebnisse liefert. Post-hoc-Power-Analysen wurden mit G*Power (Faul et al., 2007) durchgeführt. Die gewünschte statistische Power ($1 - \beta$) wurde standardmäßig auf 0,80 festgelegt. Alle inferenzstatistischen Analysen wurden mit IBM SPSS (Version 25) ausgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 K.O.-Maus-Gene

Zunächst wurden die Ergebnisse des Filterungsprozesses betrachtet. Auf Stufe eins gingen 6799 Varianten in den Filterungsprozess und die statistische Analyse ein. Nach dem ersten Filterschritt, dem Eliminieren von Synonymen („stillen“) und Intron-Varianten, verringerte sich die Anzahl auf 1700 Varianten. Im zweiten Schritt wurden häufige Varianten aussortiert. Als häufige Varianten wurden Varianten mit einer Allelfrequenz von über 1% in den Datenbanken ExAC und Eur_MAF definiert. Die Menge der Varianten wurde dadurch etwa halbiert, 813 verblieben für die Analyse. Nach Aufteilung der Varianten in eine Missense- und eine Nonsense-Gruppe fielen 384 Varianten aus der Analyse raus, da sie den Gruppenkriterien nicht entsprachen. In der Missense-Gruppe gingen 412 Varianten, in der Nonsense-Gruppe 17 Varianten in die Analyse ein. Ohne die Varianten, welche auch in der Kontrollgruppe vorkamen, verblieben auf Stufe fünf des Filterungsprozesses 339 Varianten innerhalb der Missense- und 14 Varianten innerhalb der Nonsense-Gruppe. Abb. 4.1 skizziert die Ergebnisse des Filterungsprozesses.

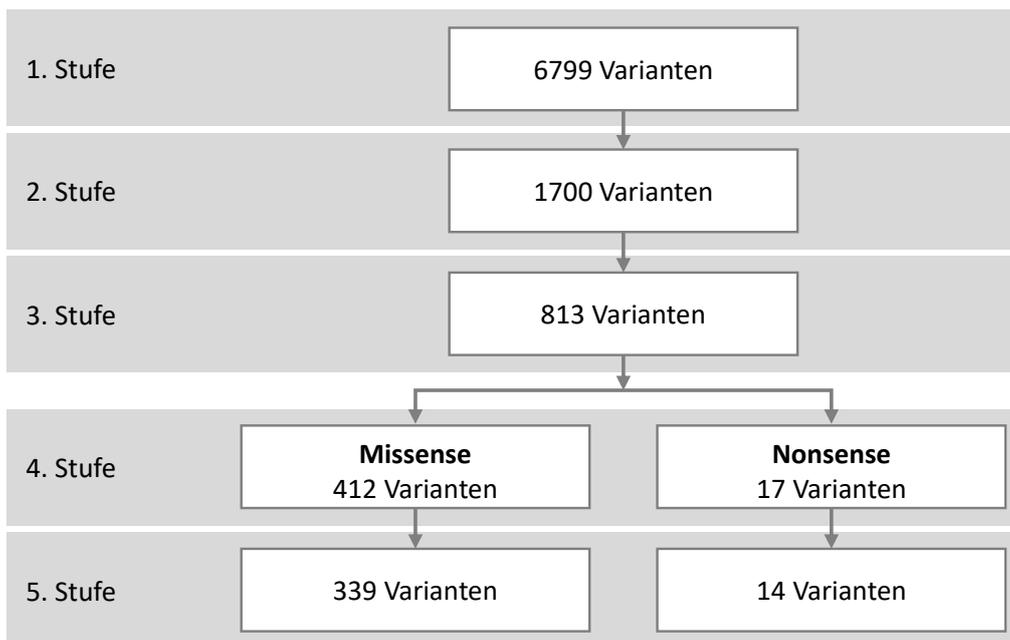


Abbildung 1 | Ergebnis des Filterungsprozesses der K.O.-Maus-Gene
Abbildung 4.1: Ergebnis des Filterungsprozesses der K.O.-Maus-Gene.

Als Ergebnis des Filterungsprozesses ließen sich nach fünf Filterstufen 14 Varianten von insgesamt 12 Genen finden, welche die potenziell relevantesten Gene aus der K.O.-Maus-Gen-Lise umfassten. Sie sind nachfolgend aufgelistet. In den Genen *ADAM2* und *LRP8* konnten jeweils zwei Varianten detektiert werden.

Der Levene-Test auf Homogenität der Varianzen war für alle Filterstufen nicht signifikant, womit die Voraussetzungen einer Varianzanalyse gegeben sind. Im Hinblick darauf ließen sich bei den

Maus-Genen auf den ersten drei Filterstufen signifikante Unterschiede feststellen. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Varianzanalyse innerhalb der K.O.-Maus-Gene dargestellt.

Tabelle 4.1: Varianzanalysen pro Stufe innerhalb der Maus-Gene.

	ANOVA		post-hoc Test	Power ($1 - \beta$)
	F^a	p		
Stufe 1	19,07	< 0,001**	K > S > M	≈ 0,99
Stufe 2	14,63	< 0,001**	K = S > M	≈ 0,99
Stufe 3	23,09	< 0,001**	K = S > M	≈ 0,99
Stufe 4 - missense	0,96	0,390	–	≈ 0,22 ($n = 150$)
Stufe 4 - truncating	1,56	0,220	–	≈ 0,33 ($n = 240$)

ANOVA = einfaktorielle Varianzanalyse, K = Kontrollgruppe, S = SCOS, M = MeiA
^a mit 2 und 47 Freiheitsgraden, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

In der ersten Stufe der ungefilterten Varianten, zeigten sich nach Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, $F(2,47) = 19,07, p < 0,01$. Post hoc ließen sich zwischen allen drei Gruppen signifikante Unterschiede feststellen, wobei die Gruppe der Kontrollpatienten mit durchschnittlich 2080 Varianten pro Person die meisten Varianten aufwies. Mit durchschnittlich 1963 Varianten pro Person ließen sich in der Gruppe der SCOS-Patienten weniger Varianten detektieren. Die Gruppe der MeiA-Patienten trug im Durchschnitt mit 1778 Varianten die wenigsten Varianten pro Person (Abb. 4.2).

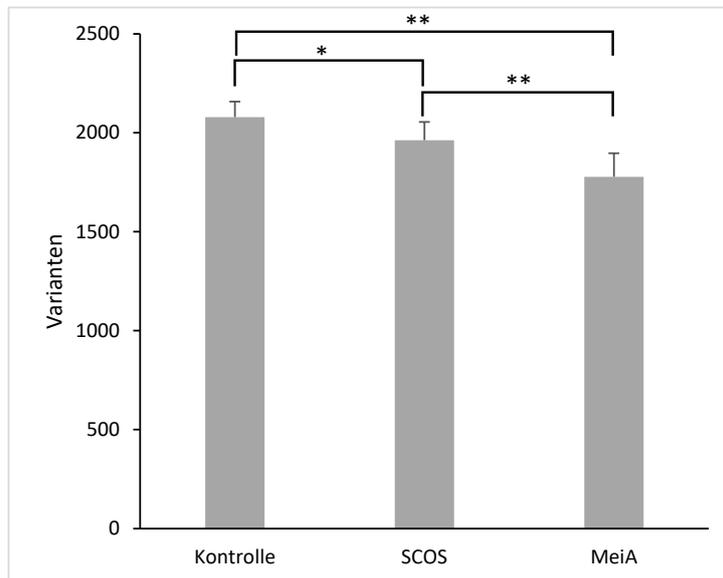


Abbildung 4.2: Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 1 der K.O.-Maus-Gene. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

In der zweiten Stufe zeigte sich nach der Varianzanalyse ebenfalls ein signifikanter Unterschied, $F(2,47) = 14,63, p < 0,01$. Post hoc wurde deutlich, dass die Gruppe der MeiA-Patienten mit 397 durchschnittlichen vorhandenen Varianten erneut die wenigsten Varianten pro Person aufwies. Die durchschnittliche Anzahl von Varianten war gegenüber denen der Kontroll- und SCOS-

Patientengruppe signifikant unterschiedlich. Die Anzahl der Varianten der SCOS-Gruppe, mit 453 Varianten pro Person, und die der Kontroll-Gruppe mit 438 Varianten pro Person, unterschieden sich dagegen nicht signifikant (Abb. 4.3).

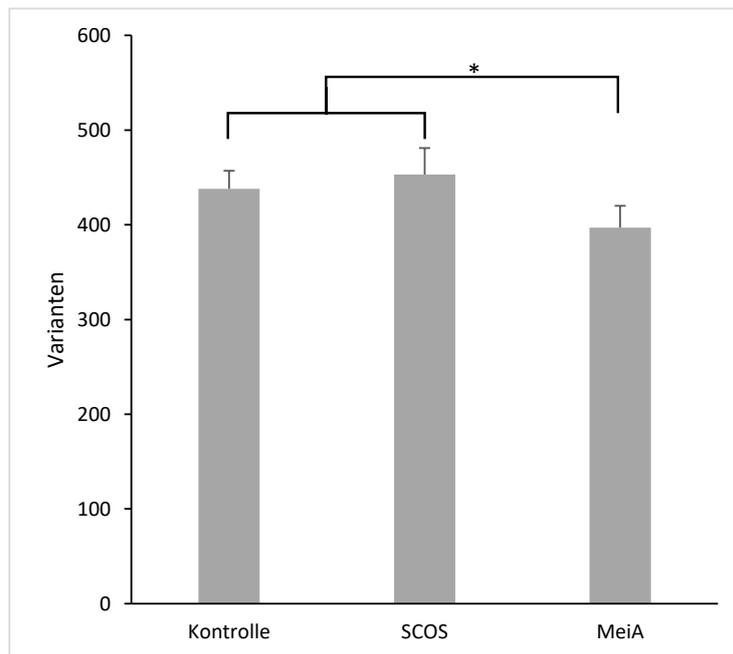


Abbildung 4.3: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 2 der K.O.-Maus-Gene. * $p < 0,05$.

Auch die dritte Filterstufe wies statistisch signifikante Unterschiede auf, $F(2,47) = 23,09$, $p < 0,01$. Post hoc zeigte sich auch hier, dass sich die MeiA-Gruppe mit der kleinsten durchschnittlichen Anzahl von 53 Varianten pro Patient signifikant von den anderen beiden Gruppen unterschied. Die durchschnittliche Anzahl von Varianten pro Person war innerhalb der SCOS-Gruppe mit 75 erneut am höchsten und unterschied sich nicht signifikant von den durchschnittlich 70 Variationen der Kontrollgruppe (Abb. 4.4).

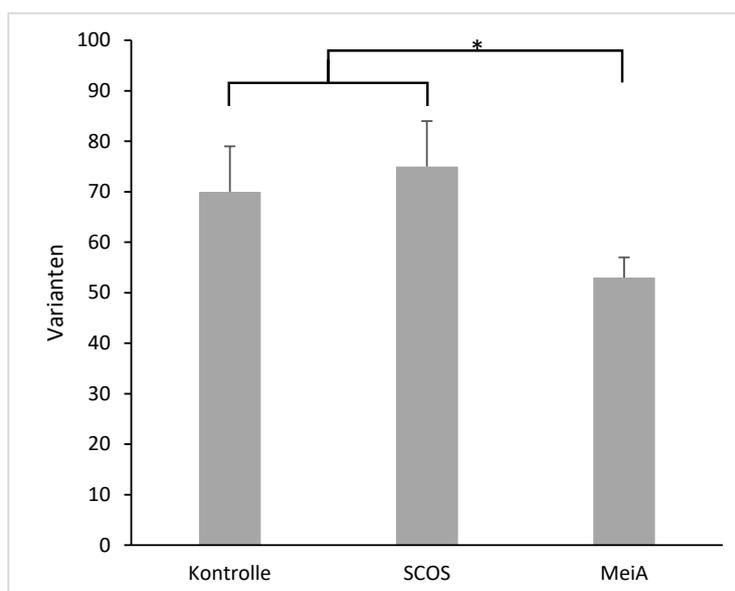


Abbildung 4.4: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 3 der K.O.-Maus-Gene. * $p < 0,01$.

Die drei Patienten-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Anzahl der Nonsense-Varianten, $F(2,47) = 1,56$, $p = 0,220$. Mit durchschnittlich 2,67 Varianten pro Person wies die Kontrollgruppe allerdings die wenigsten Varianten auf. In der SCOS-Gruppe waren durchschnittlich 3,28 Varianten pro Person vorhanden, mit 3,5 Varianten pro Person im Durchschnitt waren es bei den MeiA-Patienten die meisten (Abb. 4.5).

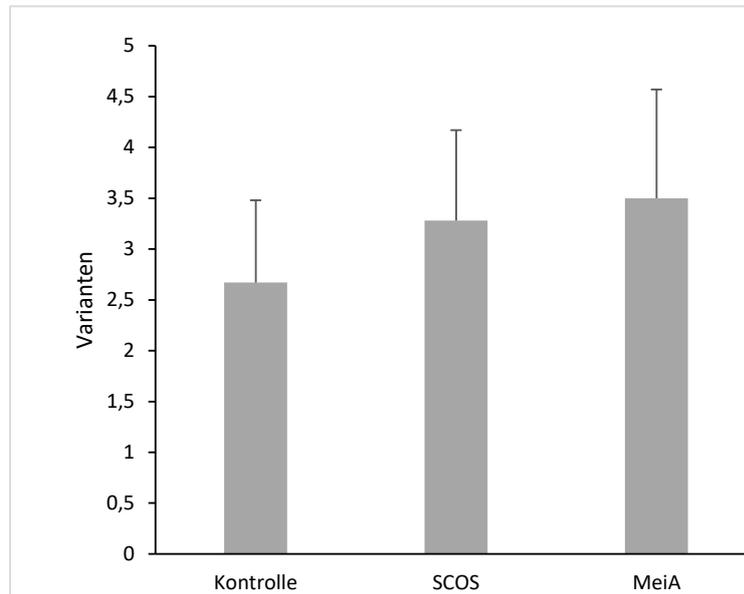


Abbildung 4.5: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 4 der K.O.-Maus-Gene, innerhalb der truncating-Gruppe.

Innerhalb der Missense-Gruppe waren ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede auszumachen, $F(2,47) = 0,96$, $p = 0,390$. Die Kontrollgruppe wies die meisten Varianten auf (28), gefolgt von den SCOS- und MeiA-Gruppe mit jeweils 25 Varianten pro Person (Abb. 4.6).

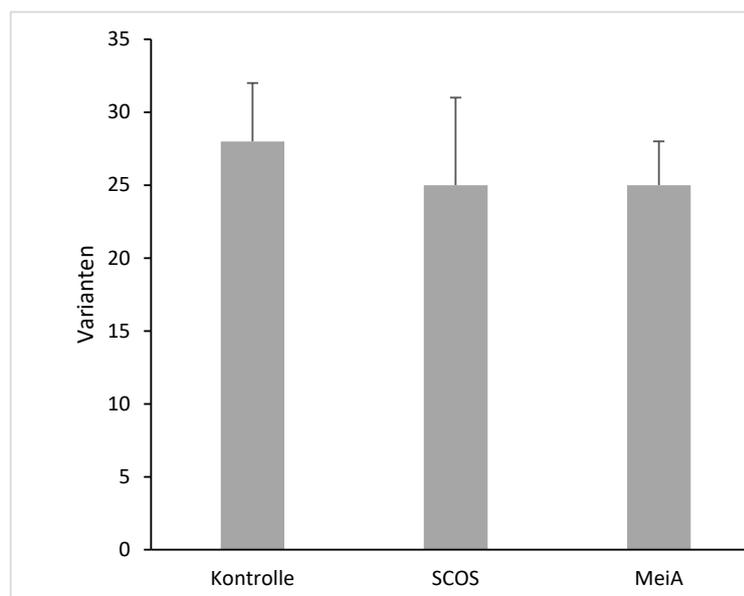


Abbildung 4.6: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 5 der K.O.-Maus-Gene, innerhalb der missense-Gruppe.

4.2 Konservierte Keimzell-Gene

Auch die Keimzell-Gene, die die essentiellen Funktionen der Spermatogenese darstellen sollten, wurden der Filterung und statistischen Analyse unterzogen. Zunächst wurde der Fokus erneut auf die Ergebnisse des Filterungsprozesses gelegt, dieses Mal innerhalb der konservierten Keimzell-Gene. In 609 Genen gingen insgesamt 12833 Varianten in den Filterungsprozess und die anschließende statistische Analyse ein. Im ersten Filterungsschritt wurden insgesamt 9714 Varianten aussortiert, woraus 3119 Varianten resultierten, welche auf Stufe zwei des Prozesses verblieben. Im zweiten Schritt wurden häufige Varianten aussortiert. Als häufige Varianten wurden Varianten mit einer Allelfrequenz von über 1% in den Datenbanken ExAC und Eur_MAF definiert. Die Menge der Varianten wurde dadurch etwa halbiert, auf 1465. Auf Stufe vier des Prozesses verblieben innerhalb der Missense-Gruppe 694 und innerhalb der Nonsense- Gruppe 63 Varianten. 708 Varianten konnten aufgrund der zugrundeliegenden Gruppenkriterien in keine der beiden Gruppen zugeordnet werden. Nach den fünf Stufen des Filterungsprozesses verblieben 563 Varianten in der Missense- und 46 Varianten in der Nonsense-Gruppe. Die Ergebnisse des Filterungsprozesses sind in Abb. 4.7 dargestellt.

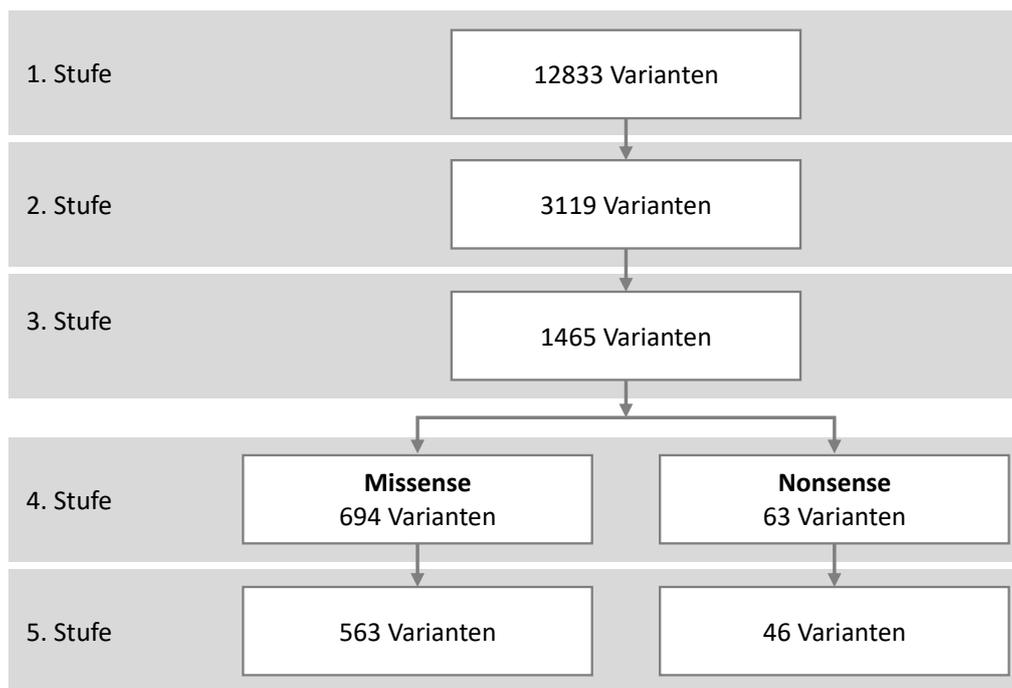


Abbildung 4.7: Ergebnis des Filterungsprozesses innerhalb der konservierten Keimzell-Gene.

Als Ergebnis des Filterungsprozesses ließen sich auf höchster Filterstufe 46 Varianten in insgesamt 37 Genen finden, welche die potentiell relevantesten Gene innerhalb der Gen-Liste der konservierten Keimzell-Gene darstellen (*ABCG2, ABHD1, ANKRD36, ATP8B3, CCNA1, CCT6B, DHRS9, EFHB, FMO2, FOXO6, FOXP2, IQCA1, KXD1, LYST, MMP10, MYO10, NOTCH4, PABPC1, RAB14, RABL6, RP11, RSPH10B2, SCAND1, SGSM2, SIRT2, SMYD3, STAG3, SYNRG, TBL3, TDRD9, TIMELESS, UBA7, VPS13B, WDR27, ZNF544, ZNF639, ZNF74*). Dabei wies *ANKRD36* zwei Varianten auf, *FOXO6* fünf Varianten, *NOTCH4* drei Varianten, *PABPC1* und *VPS13B* jeweils zwei

Varianten.

Der Levene-Test auf Homogenität der Varianzen war, ausgenommen der ersten Filterstufe, nicht signifikant, womit die Voraussetzungen für eine Varianzanalyse gegeben waren. Aufgrund der Signifikanz auf erster Filterstufe ($p = 0,022$), wurde hier der Welch-Test (Welch, 1947) durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle 4.2 werden die Ergebnisse der Varianzanalyse innerhalb der konservierten Keimzell-Gene dargestellt.

Tabelle 4.2: Varianzanalyse pro Stufe innerhalb der Keimzell-Gene.

	ANOVA			
	F^a	p	post-hoc Test	Power ($1 - \beta$)
Stufe 1	30,78 ^b	< 0,001**	K > S = M	≈ 0,99
Stufe 2	9,52	< 0,001**	K = S > M	≈ 0,98
Stufe 3	5,67	0,006*	K = S > M	≈ 0,86
Stufe 4 - missense	2,41	0,101	–	≈ 0,49 ($n = 99$)
Stufe 4 - truncating	3,20	0,050	–	≈ 0,61 ($n = 75$)

ANOVA = einfaktorielle Varianzanalyse, K = Kontrollgruppe, S = SCOS, M = MeiA

^a mit 2 und 47 Freiheitsgraden, ^b Welchs F mit 2 und 14,72 Freiheitsgraden

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Der Welch-Test wies auf erster Filterstufe signifikante Unterschiede nach, Welchs $F(2, 14,72) = 30,78$, $p < 0,01$. Der post-hoc Test belegte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe mit einer durchschnittlichen Variantenanzahl von 4170 und den übrigen Gruppen. Die SCOS-Gruppe (3905 Varianten) und die MeiA-Gruppe (3698 Varianten) unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl der detektierten Varianten nicht signifikant voneinander (Abb. 4.8).

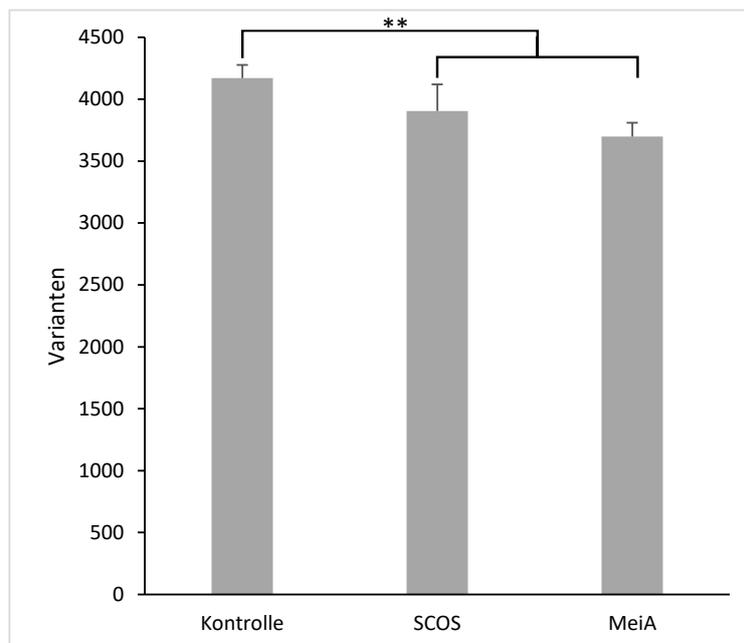


Abbildung 4.8: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 1 der konservierten Keimzell-Gene. ** $p < 0,01$

Auf der zweiten Filterstufe, nach dem Herausfiltern von intronischen und synonymen Varianten, ließen sich durch Varianzanalyse signifikante Unterschiede nachweisen, $F(2,47) = 9,52, p < 0,001$. Diese ließen sich post hoc zwischen der MeiA-Gruppe mit 809 Varianten und den anderen Gruppen belegen. Die Kontrollgruppe wies mit 877 zwar die meisten Varianten auf, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der SCOS-Gruppe mit 850 Varianten (Abb. 4.9).

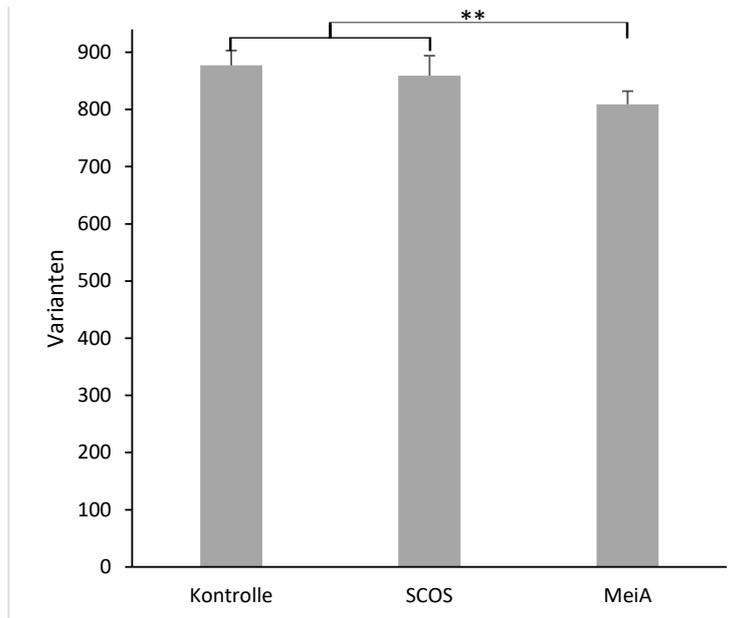


Abbildung 4.9: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 2 konservierten Keimzell-Genen. ** $p < 0,001$, $p < 0,01$

Signifikante Unterschiede ließen sich auf der dritten Filterstufe nachweisen, $F(2,47) = 5,67, p < 0,01$. Post hoc unterschied sich die MeiA-Gruppe (129 Varianten) erneut signifikant von den anderen Gruppen. Auch hier wies die Kontrollgruppe mit 153 die meisten Varianten auf, unterschied sich allerdings nicht signifikant von der SCOS-Gruppe, welche durchschnittlich 147 Varianten pro Person aufzeigte (Abb. 4.10).

Innerhalb der Gruppe der Nonsense-Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen gefunden werden, $F(2,47) = 3,20, p = 0,05$. Mit durchschnittlich 6,67 Varianten pro Person ließen sich innerhalb der Kontrollgruppe die meisten Varianten nachweisen, gefolgt von der SCOS-Gruppe (3,97 Varianten) und der MeiA-Gruppe mit 2,75 Varianten (Abb. 4.11).

Hinsichtlich der Anzahl der Missense-Varianten ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Patienten-Gruppen nachweisen, $F(2,47) = 2,41, p = 0,10$. Auch hier wies die Kontrollgruppe die meisten Varianten pro Person auf (55 Varianten). Die MeiA-Gruppe (47 Varianten) wies hinter der SCOS-Gruppe (49 Varianten) die wenigsten Varianten pro Person auf (Abb. 4.12).

4.3 Vergleich beider Gen-Listen

Durch Addition beider Gen-Listen wurde ein Genspektrum von insgesamt 911 Genen erfasst. Von diesen waren 19 Gene in beiden Listen vertreten, was Abb. 4.13 verdeutlicht.

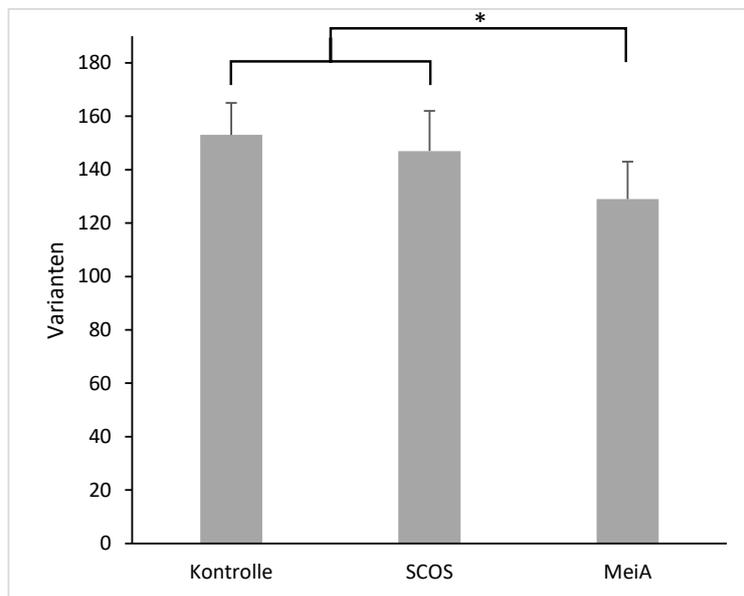


Abbildung 4.10: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 3 der konservierten Keimzell-Gene. * $p < 0,05$.
* $p < 0,01$

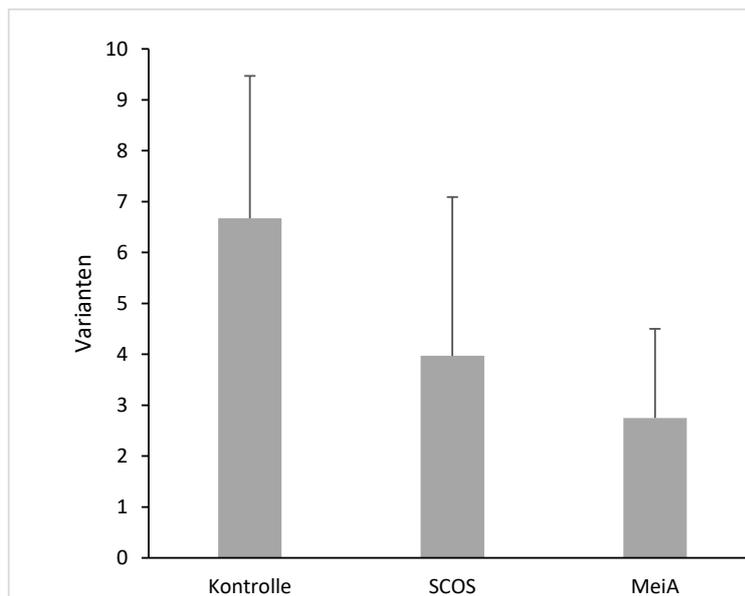


Abbildung 4.11: Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 4 der konservierten Keimzell-Gene, innerhalb der Nonsense-Gruppe.

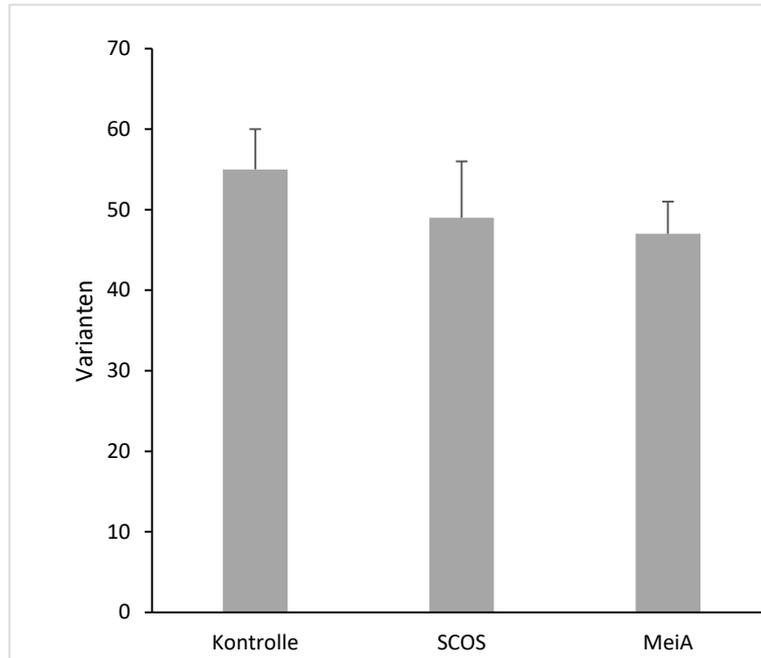


Abbildung 4.12: Mittlere Varianten pro Gen auf Stufe der konservierten Keimzell-Gene innerhalb der Wissens-Gruppe.

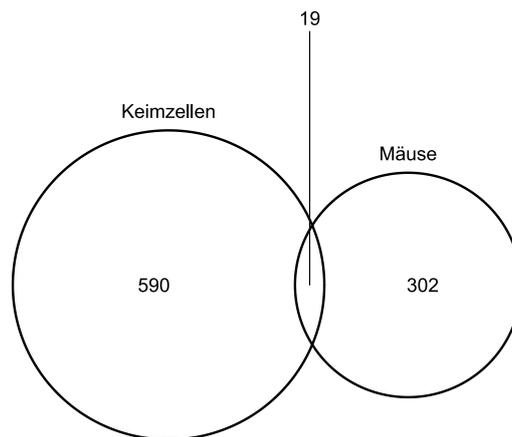


Abbildung 4.13: Schnittmenge der Gene der konservierten Keimzell- und K.O.-Maus-Gene.

5 Diskussion

Männliche Infertilität, also die Unfähigkeit des Mannes, ein Kind zu zeugen, ist ein häufiges Problem von Paaren mit einem hohen Leidensdruck. Männliche Infertilität kann viele Ursachen haben. Unter anderem kann es durch Mutationen bestimmter Gene hervorgerufen werden. Die Funktion dieser Gene, die für die Fertilität essentiell sind, wird durch Mutationen eingeschränkt.

Um eine kausale Diagnose stellen zu können, ist es wichtig, bei der Untersuchung möglichst umfassende Analysen zu betreiben. Das Screening eines Patienten hinsichtlich aller seiner Gene wäre nicht sinnvoll. Es ist zu umfangreich und zu teuer. Vor allem ist das Verständnis über die Funktion einer Großzahl von Genen noch unbekannt. Deswegen ist es sinnvoll, entlang bekannter Anomalien zu suchen. Beispiele dafür sind Aberrationen wie CFTR-Deletionen oder das Klinefelter-Syndrom.

Anders ist es im Falle eines einzelnen Gendefekts, welcher nur einen sehr kleinen Abschnitt des jeweiligen Gens betrifft. Die Suche gestaltet sich hier ungleich schwieriger. Es ist demnach sinnvoll, bei Untersuchungen eines Patienten bereits bekannte Kandidatengene zu untersuchen. Durch ein Screening hinsichtlich möglicher Mutationen, die zu einer Funktionseinschränkung des Gens führen, kann in einigen Fällen eine gesicherte Diagnose erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *TEX11*. Mutationen dieses Gens führen beim Mann zu einem Meiose-Arrest und Azoospermie, also dem Fehlen von Spermien (Yatsenko et al., 2015). Bei der Untersuchung eines infertilen Mannes kann gezielt dieses Gen analysiert werden.

Langfristig sollen weitere Gene detektiert werden, die mit männlicher Infertilität assoziiert sind. Hierdurch können infertile Männer zukünftig untersucht und im Falle des Nachweises einer sicher krankheitsrelevanten Mutation besser beraten werden. Dies ermöglicht u.a. die Entscheidung darüber, ob eine testikuläre Spermienextraktion (TESE) versucht werden soll. Wenn bereits eine Mutation nachgewiesen wurde, die dazu führt, dass es unwahrscheinlich erscheint hierbei Spermien für eine künstliche Befruchtung zu gewinnen, können unnötige chirurgische Eingriffe vermieden werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war eine statistische Analyse von ausgewählten Genen in einem Patientenkollektiv von 50 infertilen Patienten, um weitere Gene zu detektieren, die mit männlicher Infertilität assoziiert sind. Darüber hinaus sollte durch diese Arbeit untersucht werden, ob sich im Erbgut infertiler Männer häufiger SNVs finden als im Vergleich zu gesunden Männern. In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass das Genom infertiler Männer auf den Geschlechtschromosomen instabiler war als das fertiler Männer. Es war also vermehrt von Mutationen betroffen. Zugrunde lag die Analyse der Anzahl von CNVs, also den Variationen des Erbguts, die zu einer abweichenden Länge eines Chromosomenabschnitts führen. Es wurde vermutet, dass dies auch auf SNVs zutrifft, also Einzelbasen-Varianten. Ein vermehrtes Auftreten bei infertilen Männern spräche auch hier für eine höhere Mutationsrate. Das Genom wäre instabiler. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei Gene aller Chromosomen untersucht. Für diese Arbeit wurde eine Vorauswahl aus potentiell relevanten Genen getroffen, welche auf einer Literaturrecherche basierte. Insbesondere wurden hierbei Gene berücksichtigt, deren komplettes Ausschalten (knock-out; KO) bei Mäusen zu Unfruchtbarkeit führt.

Durch Übertragung in homologe humane Gene sollte der Einfluss der Genhomologe auf den Menschen untersucht werden. Am Ende der Analyse standen 12 Gene, deren Einfluss auf die männliche Infertilität bislang nicht gesichert ist. Hierunter fand sich beispielsweise das Gen BRCA2. Pathogene Varianten dieses Gens sind in erster Linie für Eierstockkrebs bei Frauen und Brustkrebs bei Männern und Frauen verantwortlich. Darüber hinaus zeigte sich, dass 26 der 36 SCOS-Patienten und drei der 8 MeiA-Patienten keine Varianten dieser 12 Gene aufwiesen. Sollte die Infertilität dieser Männer durch eine monogene Ursache bedingt sein, so konnte sie durch diese Analyse nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der konservierten Keimzell-Gene lieferte ähnliche Ergebnisse. Nach allen Filterungsschritten verblieben 37 Gene mit insgesamt 47 Varianten. Allerdings konnten bei 15 der 36 SCOS-Patienten und vier der 8 MeiA-Patienten keine SNVs nachgewiesen werden. Insgesamt wiesen 34% der Patienten eine Variante in einem Gen der K.O.-Maus-Genliste auf. 57% der Patienten konnte eine Variante der konservierten Keimzell-Gene zugeordnet werden. Bei den übrigen Patienten, bei denen keine Variante in einem Gen einer der beiden Listen nachgewiesen werden konnte, bleibt eine monogene Ursache zwar nicht weniger unwahrscheinlich, jedoch kann sie durch die zugrundeliegenden Gene nicht erklärt werden. Käme bei ihnen eine einzelne pathogene Variante als Ursache ihrer Infertilität in Frage, wurden diese Varianten nach allen Filterschritten nicht erfasst. Für einen solchen Fall lassen sich mehrere Gründe anführen. Zum einen könnte dies durch die Vorauswahl der zu untersuchenden Gene bedingt sein. Die Liste aus dem Review von Matzuk und Lamb (2008) umfasste eine Auswahl an Genen, deren Funktion allein bei Mäusen untersucht wurde. Die Auswirkungen der Mutationen der jeweiligen Genhomologe beim Menschen wurden nicht untersucht. Der Fokus lag ausschließlich auf der Fertilität bei Mäusen. Dieser Überlegung lag der Gedanke zugrunde, nach dem der Prozess der Spermatogenese in der Maus ähnlich zum Prozess des Menschen ist.

Im Vergleich dazu folgte die Erstellung der konservierten Keimzell-Genliste einer festen Systematik. Hier wurde durch vergleichende und eliminierende Schritte, die dem Prozess vorangingen, eine Schnittmenge von Genen erfasst, die in vier sehr unterschiedlichen Arten von Lebewesen für den Prozess der Spermatogenese verantwortlich sind.

Dass eine Vorauswahl der Gene durch diesen systematischen Ansatz eventuell erfolgreicher war, zeigte sich in der höheren Trefferquote der Varianten für alle Patienten. Sie lag bei ca. 57%. Im Vergleich dazu schien die Vorauswahl durch K.O.-Maus-Gene weniger erfolgversprechend zu sein. Nur einem Drittel (ca. 34%) der Patienten konnte eine Variante dieser Gene zugeordnet werden.

Wie unterschiedlich die Vorauswahl beider Listen war, zeigte sich zudem in der großen Bandbreite der insgesamt 911 Gene. Eine Überschneidung gab es nur in 19 Fällen. Am Ende des Filterungsprozesses standen insgesamt 59 Gene bzw. 60 Varianten dieser Gene. Auch hier war die Schnittmenge gering. Der einzige gemeinsame Treffer war eine Variante des Gens *CCNA1*. Das durch dieses Gen codierte Protein, ermöglicht die Meiose von Keimzellen in der Maus durch Regulation des M-Phase-Promoting-Factor (Wolgemuth et al., 2004).

Erstaunlicherweise waren lediglich 19 Gene sowohl in der K.O.-Maus-Genliste als auch in der konservierten Keimzell-Genliste enthalten. Dies ließe den Schluss zu, dass die Fertilität des Menschen und der Maus durch grundsätzlich unterschiedliche Gene gesteuert wird. Eine Vergleich-

barkeit beider Organismen im Hinblick auf die Fertilität und Spermatogenese ist jedoch durchaus anzunehmen. Nicht zuletzt stützten sich Matzuk und Lamb (2008) auf weitgehende genetische Gemeinsamkeiten des Reproduktionsprozesses zwischen Mensch und Maus. Sie begründeten damit den Nutzen von Mausmodellen zur Erforschung menschlicher Kandidatengene.

Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl an Varianten nach der Filterung könnte die Systematik des Filterungsprozesses selbst sein. Möglicherweise wurden relevante pathogene Varianten, die männliche Infertilität hervorrufen, verfrüht aussortiert. Sie wiesen nicht die vorher festgelegten Merkmale auf. Es erscheint möglich, dass einige der Patienten krankheitsursächliche Varianten in einem der untersuchten Gene aufweisen, die nicht den Filterkriterien entsprachen.

Möglich ist auch, dass pathogene Varianten überhaupt nicht in die Analyse eingingen. Durch den Vergleich beider Genlisten wurde deutlich, dass 911 Gene erfasst wurden, von denen eine Rolle im Reproduktionsprozess des Mannes angenommen wird. Derzeit wird vermutet, dass ca. 2000 Gene am Reproduktionsprozess des Mannes beteiligt sind (Tüttelmann et al., 2018). Durch die Analysen dieser Arbeit wurden ca. 40% dieser Gene untersucht.

Es scheint wahrscheinlich, dass auch die übrigen 60% der Gene, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden, krankheitsrelevante Varianten aufweisen. Auf der höchsten Filterstufe der konservierten Keimzell-Gene ließen sich dennoch mehrere zu Beginn dieser Dissertation noch unbekannte Kandidatengene finden. So ist das Gen *CCNA1* im Verdacht, ein Kandidatengene zu sein. Darüber hinaus sind zwei Gene zu finden, die aktuell als Gene, welche möglicherweise mit männlicher Infertilität assoziiert sind, angesehen werden. Zum einen wurde eine Variante im Gen *TDRD9* gefunden. Eine Mutation dieses Gens führt zu nicht-obstruktiver Azoospermie und Infertilität (Arafat et al., 2017). Zum anderen wurde eine Variante des Gens *STAG3* gefunden (van der Bijl et al., 2019). Das durch dieses Gen codierte Protein stellt sicher, dass sich die Chromatiden während der Meiose richtig verbinden und aneinander haften bleiben (Llano et al., 2014). Diese drei Gene machen 8% der Gene aus, welche nach allen Filterstufen der konservierten Keimzell-Gene verblieben. Weitergehende Untersuchungen der übrigen Gene könnten zukünftig zeigen, ob sich weitere Kandidatengene unter den verbleibenden 92% befinden.

Die Hypothese, nach der die genetische Stabilität innerhalb der vorausgewählten Gene bei infertilen Männern instabiler ist als bei Gesunden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Kontrollgruppe mit fertilen Patienten meist die höchste Anzahl an Varianten pro Person aufwies. Ausnahmen konnten auf Stufe zwei, drei und fünf innerhalb der K.O.-Maus-Gene festgestellt werden, wobei sich die Mittelwerte der Kontrollgruppe hier nicht signifikant von der SCOS- oder MeiA-Gruppen unterscheiden. Die Mittelwerte der SCOS-Gruppe unterschieden sich in beiden Gruppen nur auf der ersten Filterstufe von denen der Kontrollen. Folglich war auf allen anderen Filterstufen kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen nachzuweisen. Auffällig ist, dass die MeiA-Patienten bis auf Stufe fünf der Analyse innerhalb der K.O.-Maus-Gene immer die niedrigste Anzahl an Varianten pro Person aufwiesen. Dies widerspricht der vorangegangenen Hypothese deutlich.

Ein möglicher Grund für diese Ergebnisse könnten die jeweils geringen Gruppengrößen sein. Darüber hinaus variieren sie stark in ihrer Gesamtzahl. Eine statistische Analyse wird umso genauer, je größer ihr Volumen ist. Bei 8 MeiA-Patienten sind Zufälle beispielsweise sehr wahrscheinlich.

Eine weitere Rolle spielt die sich stetig fortschreitende technische Entwicklung. So veränderten sich über einen langen Untersuchungszeitraum hinweg die Untersuchungsmethoden, zum Beispiel mit einem Wechsel des Enrichment-Kits. Dies wird bei der Exomsequenzierung benötigt und ermöglicht die Anreicherung bestimmter Genabschnitte, um sie im Hinblick auf das Vorkommen von Mutationen untersuchen zu können. Dies könnte vor dem Hintergrund der kleinen Gruppengrößen der MeiA- und Kontrollgruppe Auswirkungen haben.

Bei zukünftigen ähnlich gelagerten Analysen bietet es sich an, auf größere Datenbanken zurückzugreifen. So bietet etwa die Datenbank GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) eine deutlich größere Anzahl an Personendaten an, zum Beispiel über 15.000 Genom-Sequenzierungen. Dieses Kollektiv könnte in zukünftigen Untersuchungen als Kontrollgruppe dienen.

Eine weitere Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse ist die Tatsache, dass der als Auslöser männlicher Infertilität eine einzelne pathogene Variante genügt. Vor diesem Hintergrund würden diese Varianten keiner statistischen Gesetzmäßigkeit unterliegen. Diese Varianten gingen in der Menge aller Varianten unter. Die Anzahl pathogener Varianten eines einzelnen Basenpaares pro Person scheint folglich keinen Einfluss auf die Störung der Spermatogenese und der damit einhergehenden Spermienzahl zu haben.

Zusammenfassend konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Varianten der männlichen Infertilität pro Person und dem Auftreten von Spermatogenesestörungen nachgewiesen werden. Mit den Genen *CCNA1*, *TDRD9* und *STAG3* wurden Gene detektiert, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht als Kandidatengene der männlichen Infertilität galten. Ihre Rolle bei der männlichen Fertilität wurde zwischenzeitlich unabhängig von dieser Arbeit nachgewiesen (Llano et al., 2014; Wu et al., 2016; Yatsenko et al., 2015). Ein potentieller zukünftiger Ansatz könnte die genauere Analyse der verbleibenden 34 Gene auf höchster Filterstufe der konservierten Keimzellgene sein. Dies ließe sich für jedes Gen mit einer genomweiten Assoziationsstudie realisieren.

6 Literatur

- Arafat, M., Har-Vardi, I., Harlev, A., Levitas, E., Zeadna, A., Abofoul-Azab, M., Dyomin, V., Sheffield, V. C., Lunenfeld, E., Huleihel, M. & Parvari, R. (2017). Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *Journal of Medical Genetics*, 54(9), 633–639. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104514>
- Behre, H. M., Bergmann, M., Simoni, M. & Tüttelmann, F. (2015). Primary Testicular Failure. In L. J. de Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik (Hrsg.), *Endotext* (S. 2000). MDText.com, Inc.
- Bergmann, M. (2005). Spermatogenese. *Der Urologe*, 44(10), 1131–1138. <https://doi.org/10.1007/s00120-005-0909-2>
- Bruckert, E. (1991). How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrologia*, 23(3), 245–250. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1991.tb02550.x>
- Chalmel, F., Lardenois, A., Evrard, B., Mathieu, R., Feig, C., Demougin, P., Gattiker, A., Schulze, W., Jégou, B., Kirchhoff, C. & Primig, M. (2012). Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Human Reproduction*, 27(11), 3233–3248. <https://doi.org/10.1093/humrep/des301>
- Cooper, T. G. & Yeung, C. H. (2009). Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation: Natürliche Fertilisation. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie* (S. 72–86). Springer Medizin Verlag.
- Dohle, G. R., Colpi, G. M., Hargreave, T. B., Papp, G. K., Jungwirth, A. & Weidner, W. (2005). EAU guidelines on male infertility. *European Urology*, e48(5), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.06.002>
- Durinck, S., Huber, W., Davis, S., Pepin, F., Buffalo, V. S. & Smith, M. (2017). *biomaRt* (Version 3.1.2). Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.biomaRt>
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., de Moor, B., Brazma, A. & Huber, W. (2005). BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*, 21(16), 3439–3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4(8), 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>
- 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>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G. & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. 39(2), 175–191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>
- Field, A. (2018). *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics* (5. Aufl.). SAGE.
- Hochberg, Y. (1974). Some generalizations of the T-method in simultaneous inference. 4(2), 224–234.
- Hochberg, Y. (1975). An Extension of the T-Method to General Unbalanced Models of Fixed Effects. 37(3), 426–433.
- Juul, S. (1999). Regional differences in waiting time to pregnancy: Pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. *Human Reproduction*, 14(5), 1250–1254. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.5.1250>

- Kaufmann, S., van der Horst, C. & Jünemann, K.-P. (2010). Andrologie, Infertilität und erektile Dysfunktion: Fertilitätsstörungen. In R. Hautmann (Hrsg.), *Urologie* (S. 326–343). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kosova, G., Scott, N. M., Niederberger, C., Prins, G. S. & Ober, C. (2012). Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. *American journal of human genetics*, *90*(6), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.016>
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. In I. Olkin, S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow & H. B. Mann (Hrsg.), *Contributions to Probability and Statistics* (S. 278–292). Stanford University Press.
- Llano, E., Gomez-H, L., García-Tuñón, I., Sánchez-Martín, M., Caburet, S., Barbero, J. L., Schimenti, J. C., Veitia, R. A. & Pendas, A. M. (2014). STAG3 is a strong candidate gene for male infertility. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3421–3431. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu051>
- Lopes, A. M., Aston, K. I., Thompson, E., Carvalho, F., Gonçalves, J., Huang, N., Matthiesen, R., Noordam, M. J., Quintela, I., Ramu, A., Seabra, C., Wilfert, A. B., Dai, J., Downie, J. M., Fernandes, S., Guo, X., Sha, J., Amorim, A., Barros, A., . . . Conrad, D. F. (2013). Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS genetics*, *9*(3), e1003349. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003349>
- Matzuk, M. M. & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, *14*(11), 1197–1213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>
- Neugebauer, D.-C., Neuwinger, J., Jockenhövel, F. & Nieschlag, E. (1990). ‘9 + 0’ Axoneme in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally immotile spermatozoa associated with thickened sheath and short midpiece. *Human Reproduction*, *5*(8), 981–986. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137232>
- Nieschlag, E. (2009). Aufgaben und Ziele der Andrologie. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie* (S. 3–12). Springer Medizin Verlag.
- Nieschlag, E., Behre, H. M., Wieacker, P., Meschede, D., Kamischke, A. & Kliesch, S. (2009). Störungen im Bereich der Testes. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie* (S. 199–238). Springer Medizin Verlag.
- Nieschlag, E., Schlatt, S., Kliesch, S. & Behre, H. M. (2012). *WHO Laborhandbuch: Zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates* (5. Aufl.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21123-2>
- Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., Korrovits, P. & Laan, M. (2017). Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction*, *32*(1), 18–31. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew284>
- Ross, M. H. & Reith, E. J. (Hrsg.). (1985). *Histology: A text and atlas*. Harper & Row [u.a.]
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. (2012). *Prometheus LernAtlas der Anatomie* (3., überarb. und erw. Aufl.). Georg Thieme.
- Tüttelmann, F. & Nieschlag, E. (2009). Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In E. Nieschlag, H. M. Behre & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie* (S. 90–96). Springer Medizin Verlag.
- Tüttelmann, F., Ruckert, C. & Röpke, A. (2018). Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Medizinische Genetik : Mitteilungsblatt des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V.*, *30*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0181-7>
- Tüttelmann, F., Simoni, M., Kliesch, S., Ledig, S., Dworniczak, B., Wieacker, P. & Röpke, A. (2011). Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS one*, *6*(4), e19426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019426>

- van der Bijl, N., Röpke, A., Biswas, U., Wöste, M., Jessberger, R., Kliesch, S., Friedrich, C. & Tüttelmann, F. (2019). Mutations in the stromal antigen 3 (STAG3) gene cause male infertility due to meiotic arrest. *Human Reproduction*, *34*(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez204>
- 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* (S. 15–61). Springer Medizin Verlag.
- Welch, B. L. (1947). The Generalization of ‘Student’s’ Problem when Several Different Population Variances are Involved. *Biometrika*, *34*(1/2), 28. <https://doi.org/10.2307/2332510>
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen* (5. Aufl.). WHO Press.
- Wu, C., Ding, X., Tan, H., Li, H. & Xiong, C. (2016). Alterations of testis-specific promoter methylation in cell-free seminal deoxyribonucleic acid of idiopathic nonobstructive azoospermic men with different testicular phenotypes. *Fertility and Sterility*, *106*(6), 1331–1337. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.006>
- Yan, W. (2009). Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *306*(1-2), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.003>
- 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., Schlatt, S. & Tüttelmann, F. (Hrsg.). (2015). *X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406192>
- Yeung, C. H., Majumder, G. C., Rolf, C., Behre, H. M. & Cooper, T. G. (1996). The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates. *Molecular Human Reproduction*, *2*(8), 591–596. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.8.591>

Tabellenverzeichnis

1.1	Referenzwerte der Ejakulatparameter	13
4.1	Varianzanalysen pro Stufe innerhalb der Maus-Gene	25
4.2	Varianzanalyse pro Stufe innerhalb der Keimzell-Gene	29

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des keimtragenden Epithels beim Mann	9
1.2	Keimzellentwicklung des Mannes	10
1.3	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen Spermiums	12
3.1	Schematische Darstellung des Filterungsprozesses	22
4.1	Ergebnis des Filterungsprozesses der K.O.-Maus-Gene	24
4.2	Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 1 der K.O.-Maus-Gene .	25
4.3	Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 2 der K.O.-Maus-Gene .	26
4.4	Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 3 der K.O.-Maus-Gene .	26
4.5	Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 4 der K.O.-Maus-Gene .	27
4.6	Mittelwerte der Varianten pro Person innerhalb auf Stufe 5 der K.O.-Maus-Gene .	27
4.7	Ergebnis des Filterungsprozesses innerhalb der konservierten Keimzell-Gene . .	28
4.8	Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 1 der konservierten Keimzell-Gene	29
4.9	Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 2 der konservierten Keimzell-Gene	30
4.10	Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 3 der konservierten Keimzell-Gene	31
4.11	Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 4 der konservierten Keimzell-Gene	31
4.12	Mittelwerte der Varianten pro Person auf Stufe 5 der konservierten Keimzell-Gene	32
4.13	Schnittmenge der Gene der konservierten Keimzell- und K.O.-Maus-Gene	32

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an folgende Personen ausrichten: Besonders möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Tüttelmann, meinem Doktorvater, danken. Der Dank gilt nicht nur der Überlassung des Themas dieser Arbeit, sondern auch seiner vollen Unterstützung, der vielfältigen Ideengebung und freundlichen Hilfe. Die fachlichen und persönlichen Gespräche werden mir in Zukunft als bereichernd in sehr guter Erinnerung bleiben.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Albrecht Röpke für das Einbringen weiterer Ideen, den stets freundlichen, fachlichen Diskurs und hilfsbereiten Einsatzes zur Entstehung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl.-Wirt. Inf. Christian Ruckert, der den schnellen Transfer der Datenbanken ermöglichte und mir diese zur Verfügung stellte.

Herzlich danke ich Paulo Navarro-Costa, der mir die Ergebnisse seiner Forschung umfangreich zur Verfügung stellte, und darüber hinaus noch Wege und Zeit zum fachlichen Diskurs fand.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Margot Wyrwoll, die zwar erst später in das Projekt eingebunden wurde, sich aber trotzdem mit vollem Eifer einbrachte und das vorliegende Ergebnis entscheidend prägte. Danken möchte ich auch meiner Familie und Freunden, die mich unterstützt und motiviert haben.

Hervorheben möchte ich meine Brüder Benedikt und Sebastian Claus, die stets ein offenes Ohr bei Fragen zur technischen und inhaltlichen Umsetzung hatten, und sich als unentbehrliche Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit erwiesen. Ich hoffe, dass die Frage nach dem Stand meiner Dissertation bei zukünftigen Zusammenkünften nicht mehr zu Gelächter auf meine Kosten führt.

Ich danke meiner Freundin Greta Gleim, die mich in all der Zeit nicht nur wundervoll unterstützte, sondern auch ihren Vater Herbert Gleim bemühte, der mir als ehemaliger Lehrer im Fach Deutsch die Zeichensetzung unter dem Weihnachtsbaum in Kassel nahebrachte.

In stillem Gedenken danke ich meinen Großeltern Gerhard und Irmgard Beier, die meinen bisherigen Lebensweg prägten und die das Entstehen dieser Arbeit sicherlich mit Stolz erfüllt hätte.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Detlef und Gabi Claus, die mich bedingungslos unterstützen und denen ich diese Arbeit von Herzen widme.

Vielen Dank.

