

Aus dem
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

**Nachweis und Rolle von microRNAs im Seminalplasma als
Faktoren des unerfüllten Kinderwunsches**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nicoletta Nalazek

geboren am 12.02.1989 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hermann M. Behre
2. PD Dr. Anne Navarrete-Santos
3. PD Dr. Undraga Schagdursurengin (Gießen)

01.12.2015

06.09.2016

REFERAT:

Zielstellung: MicroRNAs sind kleine (21-25 Nukleotide), nichtkodierende RNAs endogenen Ursprungs, die intrazellulär die Translation verschiedener Gene regulieren. Ziel dieser Arbeit war es, das Vorliegen einer Assoziation zwischen der microRNA-Expression im Seminalplasma und abnormalen Ejakulatparametern zu untersuchen.

Material und Methoden: Das Kollektiv (n=94) setzte sich aus sechs verschiedenen Gruppen zusammen, die nach den Kriterien der WHO von 2012 klassifiziert wurden: Normozoospermie (n=50), Azoospermie (n=7), Oligozoospermie (n=11), Asthenozoospermie (n=13), OAT (n=8) und Oligoasthenozoospermie (n=5). Im ersten Schritt erfolgte eine microRNA-Array-Untersuchung von drei verschiedenen Männern (diagnostiziert mit Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie), um einen Überblick über das microRNA-Expressionsprofil im Seminalplasma in Bezug auf das Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms zu erhalten. Im zweiten Schritt wurde die Expression dreier Kandidaten-microRNAs - miR-143 (Prostata-spezifisch), miR-210 (Hypoxie-assoziiert) und miR-375 (Androgen-reguliert) - mittels quantitativer real-time-PCR (qRT-PCR) am gesamten Kollektiv vermessen und deren Expression zu klinischen Spermienvariablen wie Konzentration, Motilität und Morphologie korreliert.

Ergebnisse: Die makroskopische Auswertung der microRNA-Arrays ergab unterschiedliche Expressionsintensitäten bei Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie für die selektierten Kandidaten-microRNAs miR-143, miR-210 und miR-375. In den folgenden qRT-PCR-Analysen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dysregulierter microRNA-Expression zu klinischen Parametern wie Spermienkonzentration, Samenqualität, progressiver Spermienmotilität und Morphologie gefunden werden. Für die miR-375-Expression in Korrelation zum Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms war ein Trend zur Signifikanz zu erkennen ($p=0,06$).

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnten wir makroskopische Unterschiede in der microRNA-Array-Expression bei Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms zeigen. Bei der quantitativen Messung der microRNA-Expression im gesamten Kollektiv waren nichtsignifikante Unterschiede in der Expression der miR-143, miR-210 und miR-375 zu erkennen. Es sind weitere Studien zur Analyse der Rolle der microRNA-Expression im Seminalplasma und deren Zusammenhang mit männlicher Infertilität notwendig.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Ungewollte Kinderlosigkeit	1
1.2 Männliche Infertilität	2
1.3 Spermien und Seminalplasma	3
1.3.1 Spermatogenese	4
1.4 MicroRNAs	5
1.4.1 Allgemeine Grundlagen	5
1.4.2 Biogenese	6
1.4.3 MicroRNA-Expressionsalterationen bei männlicher Infertilität – Stand der Forschung	7
2. ZIELSTELLUNG	9
3. MATERIAL UND METHODIK	10
3.1 Untersuchungskollektiv	10
3.2 Ejakulatanalyse	11
3.3 Spermien-separation vom Seminalplasma	12
3.4 Materialien	12
3.4.1 Chemikalien	12
3.4.2 Kits, Taq-Man-microRNA-Assays und Arrays	13
3.4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
3.5 RNA-Präparation	14
3.5.1 RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)	14
3.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	15
3.6 Qualitative microRNA-Expressionsanalysen	15
3.6.1 MicroRNA-Array-Expressionsprofile	15
3.6.2 Annealing der microRNA mit dem Oligo-Mix	16
3.6.3 Selektion der microRNA/oligo-Hybridstränge	16
3.6.4 Ligation der microRNA-oligos	16
3.6.5 T7 RNA-Transkription des ligierten Moleküls	16

3.6.6 Prähybridisierung und Hybridisierung	17
3.6.7 Detektion	17
3.7 Quantitative microRNA-Expressionsanalysen	18
3.7.1 cDNA-Synthese.....	18
3.7.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	19
3.8 Statistik	19
4. ERGEBNISSE.....	21
4.1 Untersuchungskollektiv.....	21
4.2 MicroRNA-Arrays	22
4.2.1 Venn-Diagramm	24
4.2.2 Makroskopische Analyse der microRNA-Array-Expressionsprofile	25
4.3 Quantitative Analyse der microRNA-Expression.....	27
4.3.1 MicroRNA-Expression beim normwertigen und abnormalen Spermogramm.....	27
4.3.2 MicroRNA-Expression und Spermienkonzentration	29
4.3.3 MicroRNA-Expression bei Azoospermie, schwerer und leichter Oligozoospermie und Normozoospermie	30
4.3.4 MicroRNA-Expression und progressive Spermienmotilität.....	31
4.3.5 MicroRNA-Expression und Morphologie	32
4.3.6 MicroRNA-Expression bei unterschiedlicher Samenqualität	34
5. DISKUSSION.....	36
5.1 Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs	36
5.2 Analyse der microRNA-Array-Untersuchung	36
5.3 Analyse der Expression der miR-143, miR-210, miR-375 im Seminalplasma	38
5.3.1 MiR-143.....	38
5.3.2 MiR-210.....	39
5.3.3 MiR-375.....	42
5.4 Ergebnisse der microRNA-Expression mittels qRT-PCR in Bezug auf andere Studien.....	43
5.5 Abschließende Betrachtungen.....	45
5.6 Ausblick.....	46

6. ZUSAMMENFASSUNG	48
7. LITERATURVERZEICHNIS	49
THESEN	55
Tabellarischer Lebenslauf	A
Selbständigkeitserklärung	B
Erklärung über frühere Promotionsversuche	B
Danksagung	C

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

A: Azoospermie

Abb.: Abbildung

Bp: Basenpaare

bzw.: beziehungsweise

ca.: circa

DNA: Desoxyribonukleinsäure

d.h.: das heißt

cDNA: komplementäre DNA

°C: Grad Celsius

D.I.R.: Deutsches IVF-Register

engl.: englisch

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

FSH: Follikelstimulierendes Hormon

g: Gramm

GnRH: Gonadotropin Releasing-Hormon

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor-1 α)

ICSI: intrazytoplasmatische Spermieninjektion

IVF: In-vitro-Fertilisation

IM: Immotilität

LH: luteinisierendes Hormon

LHRH: luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon

KI: Konfidenzintervall

M: molar

max.: maximal

min: Minuten

mind.: mindestens

Mio.: Million

miR: microRNA

ml: Milliliter

µl: Mikroliter

mM: millimolar

N: Normozoospermie

nm: Nanometer

NP: nichtprogressive Motilität

O: Oligozoospermie

OD: optical depth (optische Dichte)

p: statistische probability (Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert)

PCR: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PR: progressive Motilität

qRT-PCR: quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR)

PSA: Prostata-spezifisches Antigen

pVHL: Von-Hippel-Lindau-Protein

RNA: Ribonukleinsäure

mRNA: messenger RNA (Boten-RNA)

OAT: Oligoasthenoteratozoospermie

ROS: reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)

rRNA: ribosomale RNA

s.: siehe

s: Sekunde

sRNA: small RNA

Tab.: Tabelle

tRNA: Transfer-RNA

U: Unit

u.a.: unter anderem

U/min: Umdrehungen pro Minute

v.a.: vor allen/alle

WHO: World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

z.B.: zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Ungewollte Kinderlosigkeit

Laut Definition der WHO liegt eine Infertilität vor, wenn bei einem Paar nach 12 Monaten trotz regelmäßigem, ungeschützten Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt (WHO, 2012). Es wird geschätzt, dass 10-15% aller Paare weltweit ungewollt kinderlos sind (WHO, 2012). In ca. der Hälfte der Fälle liegt die Ursache der Kinderlosigkeit beim Mann (Nieschlag, 2009). Insgesamt liegt zudem in etwa 35% der Fälle die Ursache bei beiden Partnern (Schill et al., 2000).

Häufig ist die Diagnose Infertilität für die Betroffenen ein großer Einschnitt im Leben und kann den Verlust eines Lebensplans bedeuten. Es können Gefühle der Angst, Wut, Trauer, Scham, Hilflosigkeit, aber auch Hass und Neid auf Paare mit Kindern entstehen. Für die Paarbeziehung kann ein unerfüllter Kinderwunsch sehr belastend sein, häufig auch, weil die „Schuldfrage“ im Raum steht oder weil der Wunsch nach einem Kind unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Wenn ein Paar sich für eine Kinderwunschbehandlung entscheidet, ist diese geprägt von Phasen des Hoffens und Bangens und endet mit großer Enttäuschung bei nicht eingetretener Schwangerschaft.

Die mediale Berichterstattung über die Fortschritte in der Reproduktionsmedizin lässt in der breiten Öffentlichkeit den Eindruck entstehen, dass sich niemand mit einem dauerhaften unerfüllten Kinderwunsch abfinden muss. Im Deutschen IVF-Register (D.I.R) werden fast alle Paare erfasst, die sich in einem deutschen Zentrum einer künstlichen Befruchtung unterzogen haben. 2012 wurden insgesamt 71.251 Behandlungszyklen in Deutschland durchgeführt, davon insgesamt 51.958 ICSI- und IVF-Zyklen (Blumenauer et al., 2014). Die Erfolgswahrscheinlichkeit einer künstlichen Befruchtung, kombiniert aus allen ICSI- und IVF-Zyklen, lag bei 29,62% (Blumenauer et al., 2014). Die Baby-Take-Home-Rate, definiert als die Anzahl der Geburten pro Anzahl der durchgeführten Behandlungen in Prozent, betrug 19,29% (Blumenauer et al., 2014), das bedeutet, nur knapp jeder fünfte Behandlungsversuch mit ICSI/IVF führt zur Geburt eines Kindes. Aus diesem Grund sind in der Regel mehrere Behandlungszyklen notwendig.

Ein unerfüllter Kinderwunsch ist in zunehmendem Maße auch ein gesellschaftliches Problem. Durch längere Ausbildungszeiten und persönlichen Lebensstil wird der Kinderwunsch in spätere Phasen des reproduktiven Alters aufgeschoben. Die damit verbundene nachlassende Fertilität sorgt für eine wachsende Nachfrage an assistierten

reproduktiven Behandlungen. Das spiegeln auch die Daten des Deutschen IVF-Registers wider: Das Durchschnittsalter von Männern, die sich mit ihrer Partnerin in Kinderwunschbehandlung begeben, ist seit 1997 kontinuierlich angestiegen (Blumenauer et al., 2014). Im Jahre 2013 waren die Männer im Mittel 38,6 Jahre alt (Blumenauer et al., 2014). Bei Frauen zeigt sich ein ähnlicher Trend; sie waren durchschnittlich 35,2 Jahre alt (Blumenauer et al., 2014). Zusätzlich kommen mehrere Studien zu dem Ergebnis, dass sich die Samenqualität in den industrialisierten Ländern seit den letzten Jahrzehnten verschlechtert hat (Skakkebaek et al., 2006; Pacey, 2012; Yadav und Kotaja, 2014).

In diesem Zusammenhang besteht großes Interesse an der Erforschung der Grundlagen der männlichen Infertilität sowie potentiellen Ansätzen zur Verbesserung der reproduktionsmedizinischen Diagnostik.

1.2 Männliche Infertilität

Ungefähr 7% aller Männer sind von Infertilität betroffen (Nieschlag, 2009). Die Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen sind vielfältig und auf verschiedenen Ebenen lokalisiert. Man unterscheidet u.a. endokrine Störungen, Testeschäden und posttestikuläre Störungen, die zur reduzierten Samenqualität führen (Pacey, 2012). Aber auch Lebensstilfaktoren wie z.B. Rauchen und Übergewicht können negative Auswirkungen auf die Fertilität haben (Pacey, 2012). Bei ca. 10% der Männer kann keine Ursache für ihre Infertilität gefunden werden, sodass man von einer idiopathischen Infertilität spricht (Nieschlag, 2009).

Bei der Diagnostik männlicher Reproduktionsstörungen wird ein stufenweises Vorgehen empfohlen. Nach ausführlicher Anamnese und körperlicher Untersuchung erfolgen laborchemische Tests und ein Spermiogramm. Die Auswertung erfolgt seit über 40 Jahren nach den Kriterien der WHO, basierend auf Parametern wie Ejakulatvolumen, pH, Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie (WHO, 2012). Zur Beurteilung der Fertilität eines Mannes nimmt das Spermiogramm den größten Stellenwert ein (Nieschlag, 2009). Häufig gehen männliche Fertilitätsstörungen mit einem abnormalen Spermiogramm einher, jedoch kann kein Rückschluss auf die zugrunde liegende Ursache getroffen werden (Nieschlag, 2009; WHO 2012). Eine präzise Unterscheidung zwischen fertilen und infertilen Männern mittels Spermiogramm ist aber nicht immer ohne Einschränkungen möglich, da zwischen diesen beiden Gruppen ein überlappender Bereich existiert (Guzick et al., 2001; Garrido et al., 2008; Natali und Turek, 2011). Auch

eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Schwangerschaft mittels Spermogramm ist nur bedingt möglich (Nieschlag, 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum jetzigen Zeitpunkt verlässliche Marker auf molekularer Ebene zur Diagnostik von männlicher Infertilität rar sind (Guzick et al., 2001; Garrido et al., 2008). Es besteht also zusätzlich zum Spermogramm ein Bedarf an nichtinvasiven, aussagekräftigen Markern, um die Diagnostik männlicher Infertilität zu ergänzen.

1.3 Spermien und Seminalplasma

Das Spermium (Spermatozoon) ist eine motile männliche Keimzelle, die ca. 55-60 µm lang ist und aus einem Kopf, einem Mittelstück und dem Schwanz besteht. Im Kopf befindet sich der haploide Chromosomensatz, aufsitzend findet sich das kappenartige Akrosom. Im Mittelstück sind die Mitochondrien lokalisiert, die die nötige Energie für die Fortbewegung des Spermiums zur Eizelle liefern. Der bewegliche Schwanz ermöglicht die Fortbewegung des Spermiums. Die Bildung der Spermien, auch Spermatogenese genannt, dauert beim Menschen ca. 75 Tage und läuft über mehrere Entwicklungsstufen (Cooke und Saunders, 2002). Die Passage der Spermien vom Hoden in den Nebenhoden dauert zusätzlich 12 Tage (Bergmann, 2005). Die Spermatogenese wird im nächsten Abschnitt (1.3.1) genauer beschrieben.

Das Ejakulat setzt sich aus den Spermien und dem Seminalplasma, in das die Spermien eingebettet sind, zusammen. Das Seminalplasma ist ein Sekret, das von den akzessorischen Drüsen des männlichen Geschlechtstraktes sowie auch im Hoden und Nebenhoden sezerniert wird. Zu den akzessorischen Drüsen gehören die Prostata, die paarige Samenblase und die Bulbourethraldrüsen. Diese steuern ca. 90% des Ejakulatvolumens bei, während Sekrete aus dem Hoden und Nebenhoden die restlichen 10% ausmachen (Hu et al., 2014). Das Seminalplasma spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung der Spermien und ist zugleich ein wichtiges Transportmedium (Cooper und Yeung, 2009). Das Seminalplasma ist ein komplexes Gemisch, das u.a. Fructose, Glycerophosphocholin, Cholesterin, Phospholipide, Prostaglandine, Proteasen, Prostata-spezifisches Antigen (PSA), saure Phosphatase, Lymphozyten, Ascorbinsäure, Zink und Urat enthält (Cooper und Yeung, 2009; Aitken und De Luliis, 2010; Gupta et al., 2011).

Vor der Ejakulation sezernieren die Bulbourethraldrüsen ein klares Sekret zur Neutralisation der Harnröhre. Während der Ejakulation kommt es zur Vermengung der

spermienhaltigen Nebenhodensekrete mit den Sekreten der akzessorischen Drüsen (Cooper und Yeung, 2009).

1.3.1 Spermatogenese

Das primäre männliche Geschlechtsorgan besteht aus dem Hoden (Testis) und dem Nebenhoden (Epididymis). Der Hoden ist der Ort der Spermien- und Hormonproduktion. Die Reifung und Lagerung der Spermatozoen findet im Nebenhoden statt, wobei die Spermatozoen sich durch die zahlreichen Ductuli efferentes bewegen, die Hoden mit Nebenhoden verbinden.

Im Hoden unterscheidet man Leydig- und Sertolizellen. Leydigzellen dienen der Hormonproduktion und befinden sich im Interstitium. Sertolizellen sind in den Samenkanälchen untereinander mit Tight-Junctions verbunden und bilden die Blut-Hoden-Schranke; zusätzlich dienen sie der Versorgung und Reifung der Keimzellen (Bergmann, 2005).

Die Spermatogenese läuft kontinuierlich ab und ist ein komplexer, streng regulierter Prozess (Okada et al., 2008). Dabei befinden sich die Spermatogonien an der Wand der Samenkanälchen und wandern während ihrer Reifung schraubenförmig ins Lumen (Cooke und Saunders, 2002). Die Entwicklung von der primären Keimzelle bis hin zum reifen Spermium kann in drei Stadien unterteilt werden (Bergmann, 2005):

- 1) Mitotische Proliferation und Differenzierung von Spermatogonien
- 2) Meiotische Teilung der Spermatozyten
- 3) Differenzierung der haploiden Spermatozoen zu den Spermien (Spermiogenese)

Aus einer Spermatogonie mit diploiden Chromosomensatz entstehen nach der ersten mitotischen und zweiten meiotischen Teilung vier Spermatozoen mit einem haploiden Chromosomensatz (Bergmann, 2005). Im Nebenhoden erlangen die Spermatozoen ihre volle Bewegungs- und Befruchtungsfähigkeit durch Differenzierungsprozesse, die als Spermiogenese zusammengefasst werden (Bergmann, 2005).

Die Spermatogenese wird hormonell über die Hypothalamus-Hypophysenachse gesteuert. Aus dem Hypothalamus wird Gonadotropin Releasing-Hormon (GnRH) und luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) pulsatil freigesetzt. Auf diesen Reiz hin folgt die Freisetzung von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) aus der Hypophyse. FSH wirkt auf die Sertoli-Zellen und fördert die Keimzellentwicklung. LH stimuliert die Androgenproduktion (insbesondere Testosteron)

in den Leydig-Zellen. Testosteron hemmt seinerseits über einen negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung von LH und FSH. Die Produktion von FSH kann ebenfalls über Inhibin, welches von den Sertoli-Zellen produziert wird, gehemmt werden (Übersicht in Weinbauer et al., 2009; Cooke und Saunders, 2002).

Testosteron ist ein Steroidhormon mit vielfältigen Funktionen. Es führt u.a. zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der Gonadenfunktion, zur Ausbildung von sekundären männlichen Geschlechtsmerkmalen und zur Entwicklung des Muskel-Skelett-Apparats (Weinbauer et al., 2009). Testosteron vermittelt seine Wirkung auf die Keimzellentwicklung indirekt über Androgenrezeptoren, die an den Sertolizellen lokalisiert sind (Gelman, 2002).

1.4 MicroRNAs

1.4.1 Allgemeine Grundlagen

Man unterscheidet zwischen kodierenden RNAs (mRNA) und nichtkodierenden RNAs. Die nichtkodierenden RNAs werden u.a. in ribosomale RNAs (rRNA), Transfer-RNAs (tRNA) und small RNAs (sRNA) eingeteilt. MicroRNAs werden zur Gruppe der sRNAs gezählt.

MicroRNAs sind kleine (21-25 Nukleotide), nichtkodierende RNAs endogenen Ursprungs, die intrazellulär die Translation verschiedener Gene regulieren (Filipowicz et al., 2005). Es wird geschätzt, dass bis zu 30% aller humanen Gene von microRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2003; Filipowicz et al., 2008). Über 2000 microRNAs in unterschiedlichen Graden der Konservierung konnten im Menschen identifiziert werden (Griffiths-Jones, 2004). Sie sind in unzähligen Spezies hochkonserviert und an der Steuerung verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Stressantwort (z.B. bei Hypoxie, Azidose, DNA-schädigende Agenzien) und Apoptose beteiligt und sorgen somit indirekt für eine Veränderung des zellulären Phänotyps (Bartel, 2004; He und Hannon, 2004; Cortez et al., 2011). Eine Veränderung der endogenen microRNA-Konzentration konnte bisher mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert werden. Es ist z.B. möglich nicht nur einzelne Zelltypen anhand ihres microRNA-Expressionsprofils zu identifizieren, sondern auch Tumorentitäten und Tumorstadien voneinander abzugrenzen (Camps et al., 2008; Cortez et al., 2011; Greither et al., 2012).

Zum Vorliegen von zirkulierenden microRNAs im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten existieren momentan zwei Theorien: Einerseits wird davon ausgegangen, dass die an RISC-Proteine gebundenen microRNAs durch Apoptose aus lysierten Zellen freigesetzt werden. Diese bleiben aufgrund der Bindung über lange Zeit stabil, sind aber biologisch inaktiv (Arroyo et al., 2011). Andererseits existiert die Hypothese, dass microRNAs mittels Exozytose ins Serum sekretiert werden. Die exosomal gebundenen microRNAs könnten dann von anderen Zellen aufgenommen werden und deren zellulären Phänotyp unterschiedlich stark beeinflussen. Damit könnten microRNAs theoretisch hormonähnliche Funktionen erfüllen (Cortez et al., 2011).

1.4.2 Biogenese

Die für die microRNAs kodierenden Gene können entweder als eigenständiges Gen mit einem eigenem Promoter vorliegen (monocistronisch) oder als sogenanntes Cluster mit anderen microRNAs von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert werden (polycistronisch) oder in einem Intron eines proteinkodierenden Gens, mit welchem sie zusammen transkribiert werden (intronisch), lokalisiert sein (Filipowicz et al., 2005, 2008).

Die Transkription einer microRNA erfolgt im Zellkern mittels RNA-Polymerase II bzw. III. Das dabei entstandene Transkript wird als pri-microRNA (*primary microRNA*) bezeichnet; ist ca. 1000 Bp lang und besitzt am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz und am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe. Die pri-microRNA bildet eine Haarnadelstruktur (engl. *stem-loop*) aus (Übersicht in He und Hannon, 2004; Filipowicz et al., 2008).

Im nächsten Schritt wird die pri-microRNA durch den Mikroprozessorkomplex enzymatisch gespalten; dabei entsteht die pre-microRNA (*precursor microRNA*; 60-70 Bp). Der Mikroprozessorkomplex setzt sich aus einer Endonuklease der RNase III-Superfamilie, auch Drosha genannt und einem Co-Faktor DGCR8 (engl. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) zusammen. Im nächsten Schritt wird die pre-microRNA mittels Exportin 5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (Übersicht in He und Hannon, 2004; Filipowicz et al., 2008).

Dort erfolgt die Bindung der pre-microRNA an eine weitere Endonuklease der RNase III-Superfamilie, namens Dicer. Dicer entfernt die Haarnadelstruktur der pre-microRNA und es entsteht ein 21-25 Bp langer microRNA:microRNA-Duplex. Im nächsten Schritt wird der Doppelstrang von einer Helikase entwunden. Der Strang, dessen 5'-Ende am

thermodynamisch weniger stabilen Ende liegt, wird zur reifen microRNA prozessiert, während der Gegenstrang abgebaut wird (Übersicht in He und Hannon, 2004; Filipowicz et al., 2008).

Anschließend wird die microRNA in den *RNA-induced silencing Complex* (RISC) inkorporiert, der die Interaktion zwischen microRNA und Ziel-mRNA vermittelt. Dabei erfolgt die Erkennung der Ziel-mRNA durch die microRNA in den meisten derzeit bekannten Fällen durch die Bindung von microRNAs an eine komplementäre Sequenz im 3' UTR-Sequenz der Ziel-mRNA. Der Grad der Komplementarität zwischen der *seed*-Sequenz der microRNA, die von Nukleotid 2-8 der microRNA reicht, zur 3' UTR-Sequenz der mRNA bestimmt die weitere Prozessierung der mRNA: So führt eine partielle Komplementarität zu einer translationalen Repression (engl. *translational repression*), während eine perfekte Übereinstimmung das Zerschneiden der mRNA (engl. *mRNA cleavage*) zur Folge hat (Übersicht in Bartel, 2004; Cortez et al., 2011; Fabian und Sonenberg, 2012).

1.4.3 MicroRNA-Expressionsalterationen bei männlicher Infertilität – Stand der Forschung

MicroRNAs sind sehr stabil und kommen reichlich in verschiedenen Körperflüssigkeiten vor (Bartel, 2004; Wu et al., 2013). In forensischen Untersuchungen konnten microRNAs u.a. im Blut und Serum, Speichel, Urin, Menstrualblut und Ejakulat nachgewiesen werden (Michael et al., 2010; Wang et al., 2011). In der Arbeit einer chinesischen Arbeitsgruppe wurden erstmals auch microRNA-Expressionsprofile im Seminalplasma von fertilen und infertilen Männern angelegt (Wang et al., 2011).

Die Expression der microRNAs ist von der Zellart und der Differenzierung des Gewebes abhängig (Bartel, 2004; Krek et al., 2005). Jede microRNA kann verschiedene mRNAs regulieren und umgekehrt kann auch jede einzelne mRNA von verschiedene microRNAs reguliert werden, sodass microRNAs als Biomarker für physiologische und pathologische Zustände verwendet werden können (Krek et al., 2005; Michael et al., 2010).

Während der Spermatogenese spielt die posttranskriptionelle Genregulation durch microRNAs eine essentielle Rolle (Braun, 1998; Yan et al., 2007; Okada et al., 2008). Mehrere Studien konnten eine Dysregulation der microRNA-Expression bei idiopathischer männlicher Infertilität belegen und lassen die Vermutung zu, dass eine Assoziation zwischen männlicher Infertilität und der microRNA-Expression im

Seminalplasma bestehen könnte (Abu-Halima et al., 2013). Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Datenlage bezüglich der microRNA-Expression im Ejakulat und ihrer Assoziation zu abnormalen Ejakulatparametern schwach.

2. ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorliegen einer Assoziation zwischen der microRNA-Expression im Seminalplasma und abnormalen Ejakulatparametern zu untersuchen. Die Ejakulatanalyse erfolgte nach den Kriterien der WHO von 2012.

Es erfolgte sowohl eine qualitative Analyse mittels microRNA-Arrays sowie eine quantitative Analyse mittels qRT-PCR. Dafür wurde im ersten Schritt das Seminalplasma von drei verschiedenen Männern (diagnostiziert mit Normozoospermie, Oligozoospermie oder Azoospermie) zur Erstellung eines microRNA-Expressionsprofil verwendet und in Bezug zum Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms gesetzt.

Im zweiten Schritt wurden nach ausführlicher Literaturrecherche drei interessante Kandidaten-microRNAs selektiert und mittels qRT-PCR an einem Kollektiv von 94 Seminalplasma-Proben vermessen und in Verbindung zu den klassischen Spermienvariablen gesetzt. Dabei wurde die Expression der miR-143 (Prostata-spezifisch), miR-210 (Hypoxie-assoziiert) und miR-375 (Androgen-reguliert) vermessen, weil eine Assoziation mit abnormalen Ejakulatparametern als wahrscheinlich angenommen wurde. Als Referenz wurde die miR-93 verwendet.

In der Arbeit sollte folgenden Fragen nachgegangen werden:

- (1) Unterscheidet sich die qualitative Expression der microRNAs im Seminalplasma bei Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie in der microRNA-Array-Untersuchung?
- (2) Unterscheidet sich die quantitative microRNA-Expression zwischen normwertigen und abnormalen Spermioграмmen?
- (3) Bestehen Unterschiede in der qualitativen microRNA-Expression und der quantitativen qRT-PCR?
- (4) Gibt es eine Assoziation zwischen der Höhe der microRNA-Expression und der Spermienkonzentration sowie der progressiven Spermienmotilität oder Morphologie?
- (5) Lässt sich eine Aussage über Zusammenhänge zwischen der microRNA-Expression und dem Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms machen?

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Untersuchungskollektiv

Die Ejakulatproben wurden zuvor im Rahmen des durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befürworteten Forschungsvorhabens "Analyse der molekularen Faktoren männlicher Infertilität in Ejakulat- und Blutproben" gesammelt. Insgesamt wurden 94 Ejakulatproben aus einem Zeitraum vom 1. September 2010 bis 30. November 2011 ausgewertet. Pro Mann lag genau eine Probe vor; weitere Nachuntersuchungen fanden nicht statt.

52 Proben stammen von Patienten des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die sich mit Ihrer Partnerin bereits in einer Kinderwunschbehandlung befanden. Bei den Patienten erfolgte zuvor eine komplette andrologische Diagnostik.

42 Proben stammen von freiwilligen Probanden. Bei einem Teil dieser Probanden konnte die Fertilität nicht sicher bestimmt werden, da die Männer zu dem Zeitpunkt noch keine Kinder gezeugt bzw. keinen Kinderwunsch hatten. Eine genetische Diagnostik der Probanden erfolgte nicht. Die weiter unten genannten Ausschlusskriterien wurden in der Anamnese erfragt.

Personen mit bekannter Infertilität aufgrund von Kryptorchismus, Mumps, Varikozele, Hydrozele, retrograder Ejakulation, erektiler Dysfunktion, chromosomalen Abnormitäten oder Mikrodeletionen am Y-Chromosom wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3.2 Ejakulatanalyse

Die Ejakulatanalyse erfolgte nach den Kriterien der WHO von 2012 (WHO, 2012).

Tab. 1: Untere Grenzen der Referenzwerte (5%-Perzentilen und ihre 95%-Konfidenzintervalle) für Ejakulatparameter nach den Kriterien der WHO von 2012

Parameter (Einheit)	Unterer Grenzwert
Volumen der Samenflüssigkeit (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Gesamtspermienzahl (10 ⁶ pro Ejakulat)	39 (33-46)
Spermienkonzentration (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Gesamtmotilität (%)	40 (38-42)
Progressive Motilität (%)	32 (31-34)
Vitalität (%) (Eosintest)	58 (55-63)
Normalform (%)	4 (3,0-4,0)

Nach WHO erfolgt die Klassifizierung der Spermienmotilität in progressive Motilität (PR), nichtprogressive Motilität (NP) und Immotilität (IM). Dabei meint die progressive Motilität Spermien, die sich linear oder im großen Bogen aktiv vorwärtsbewegen, ohne die Geschwindigkeit zu berücksichtigen. Die nichtprogressive Motilität definiert alle anderen Muster der Spermienmotilität ohne Progression, z.B. Schwimmen in kleinen Kreisen, Schwanzbewegungen, die den Kopf nicht fortbewegen, oder wenn nur Schwanzbeweglichkeit beobachtet werden kann. Bei Immotilität ist keine Beweglichkeit zu sehen. Die Gesamtmotilität ist die Summe aus progressiver und nichtprogressiver Motilität (WHO, 2012).

Tab. 2: Nomenklatur zur Beurteilung der Ejakulatparameter bzw. Samenqualität nach den Kriterien der WHO von 2012

Asthenozoospermie	<32% progressiv-motile (PR) Spermien
Azoospermie	keine Spermien im Ejakulat nachweisbar
Normozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) von Spermien im Ejakulat sowie Prozentanteil von progressiv-motilen Spermien (PR) und morphologisch normalen Spermien gleich oder über des jeweiligen Referenzwertes

Oligoasthenozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) und progressive Motilität (PR) eingeschränkt
Oligoasthenoteratozoospermie (= OAT)	Gesamtzahl (oder Konzentration), progressive Motilität (PR) und Morphologie (< 4% Normalformen) eingeschränkt
Oligozoospermie	Gesamtzahl (oder Konzentration) (< 15 Mio. Spermien/ml) eingeschränkt
Teratozoospermie	verminderter Anteil morphologisch normaler Spermatozoen (<4% normale Formen)

3.3 Spermien-separation vom Seminalplasma

Im nächsten Schritt erfolgte die Abtrennung der Spermien vom Seminalplasma bei 4000 U/min für 10 min. Die anschließenden Versuche wurden ausschließlich mit dem Seminalplasma durchgeführt. Bei 10 Proben erfolgte zur Sicherheit der mikroskopische Ausschluss von Spermien.

3.4 Materialien

3.4.1 Chemikalien

Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleotid-Mix 10 mM	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Ethanol (96% und 70%)	Merck (Darmstadt)
Entwickler (Kodak)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Fixierer (Kodak)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Trizol-Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Wasser für die Molekularbiologie (RNase-frei)	Roth (Karlsruhe)

3.4.2 Kits, Taq-Man-microRNA-Assays und Arrays

HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
Human Apoptosis-Associated miRNA Array	Signosis (Kalifornien, USA)
Human MicroRNA Array I - IV	Signosis (Kalifornien, USA)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
RNase-Free DNase Set	Quiagen (Hilden)
TaqMan microRNA Assays	Applied Biosystems (Darmstadt)
Hsa-miR-143	Part-Number: 4427975/ ID 000466
Hsa-miR-210	Part-Number: 4427975/ ID 000512
Hsa-miR-375	Part-Number: 4427975/ ID 000564
Hsa-miR-93	Part-Number: 4427975/ ID 000432

3.4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Kern (Balingen-Frommern)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank IG750	Jouan (Unterhaching)
Einweghandschuhe	Sempermed (Wien)
Einweg-Plastik-Artikel (Pipetten, Wägeschälchen)	Greiner (Frickenhausen)
Greiner/Falconröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Hybridisierungssofen	UVP (Cambridge, UK)
iCycler™ Thermal Cycler (real-time-cycler)	Bio-Rad (München)
Magnetic Stand	Ambion (Texas, USA)

Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Pipetboy (automatische Pipette)	IBS IntegraBiosciences (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
qRT-PCR-Gefäße/Deckel	Peqlab (Erlangen)
Reaktionsgefäße	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Rollenmischgerät	Kisker (Steinfurt)
Röntgenfilme CL-XPosure Film	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Röntgenfilmkammer	Roth (Karlsruhe)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Spitzenbox	Greiner (Frickenhausen)
Sprout™ Tischzentrifuge	Kisker (Steinfurt)
UVette® routine pack (Küvetten)	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Mixer	StarLab (Ahrensburg)
Zentrifuge CR4 22	Jouan (Unterhaching)
Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)

3.5 RNA-Präparation

3.5.1 RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) laut Herstellerprotokoll. Dazu wurden 200 µl Seminalplasma für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und das Dekantat in 1 ml Trizol aufgenommen und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und vorsichtig per Hand gemischt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 12 000 U/min zentrifugiert und die wässrige Oberphase in ein frisches Gefäß pipettiert. Der Oberphase wurden 70 µl einer DNase Lösung zugefügt und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde der Ansatz gevortext und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch mit 12 000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet mit eisgekühltem 96%igen Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Wiederholung des Waschschrilles mit 70%igem Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in 25 µl RNase-freiem H₂O aufgelöst. Die Lagerung erfolgte kurzzeitig bei -20°C und langfristig bei -80°C.

3.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie wurde die RNA-Probe 1:50 mit Wasser (RNase-frei) verdünnt. Die Referenzlösung bestand aus 2 µl RNase-freiem Wasser und 98 µl Aqua-bidest gemischt. Die Messung der gewonnenen RNA-Menge erfolgte bei einer Absorption von 260 und 280 nm. Die mögliche Proteinkontamination errechnet sich aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ und OD₂₈₀. Der Wert stellt einen Indikator für den Reinheitsgrad der RNA-Probe dar und sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

3.6 Qualitative microRNA-Expressionsanalysen

Um einen Überblick über die microRNA-Expression im Seminalplasma zu erhalten, erfolgte eine microRNA-Array-Untersuchung von drei verschiedenen Proben mit je einmal Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie zur Erstellung eines Expressionsprofils.

3.6.1 MicroRNA-Array-Expressionsprofile

Die microRNA-Arrays basieren auf dem Prinzip von Membran-gekoppelten Sonden. Insgesamt wurden 244 verschiedene microRNAs im Seminalplasma mittels Human microRNA Arrays I-IV und Human Apoptosis-Associated microRNA (Signosis, Kalifornien, USA) untersucht. Die Durchführung der Schritte erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

3.6.2 Annealing der microRNA mit dem Oligo-Mix

Der Reaktionssatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

5	µg	Gesamt-RNA
5	µl	Oligo mix I
1	µl	Array Detection Oligo
20	µl	Annealing Puffer
x	µl	ddH ₂ O
<hr/>		
40	µl	Gesamtvolumen

Der microRNA/Oligo-Hybridmix wurde anschließend bei 72 °C für 5 min und bei 53 °C für weitere 90 min inkubiert.

3.6.3 Selektion der microRNA/oligo-Hybridstränge

5 µl Beads wurden mit 100 µl Annealing-Puffer gewaschen und daraufhin mit 40 µl Bead-Binding-Puffer und 40 µl microRNA/Oligo-Hybridmix vermengt. Nach der Inkubation bei 37 °C für 30 min wurde der Ansatz für 30 s auf eine Magnetplatte platziert und der Puffer abgenommen. Danach wurden die Beads zweimal mit 100 µl Bead-Wasch-Puffer gereinigt.

3.6.4 Ligation der microRNA-oligos

Die Beads wurden mit 50 µl Ligations-Puffer resuspendiert und für 30 s auf die Magnetplatte gestellt. Nach Abnehmen des Ligations-Puffers wurden die Beads erneut mit 20 µl Ligations-Puffer und 2 µl Ligase gemischt und bei 37 °C für 90 min inkubiert.

3.6.5 T7 RNA-Transkription des ligierten Moleküls

Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit 100 µl Bead-Wasch-Puffer gereinigt und für 30 s auf die Magnetplatte platziert und der Puffer abpipettiert. Die Resuspension der Beads erfolgte mit 20 µl Extension-Mix.

Für die Inkubation wurde folgendes Programm gewählt:

1. 94°C 2 min
2. 54°C 1 min
3. 72°C 90 s
4. 94°C 30 s

Anschließend wurde der Ansatz für 30 s auf die Magnetplatte gestellt und 20 µl Extension-Mix wieder abgenommen und in ein neues Gefäß transferiert. Es wurden 20 µl Labeling-Mix und 1 µl T7-RNA-Polymerase hinzugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert.

3.6.6 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Arraymembran wurde in einem Röhrchen platziert und mit dH₂O angefeuchtet. Anschließend wurde warmer Hybridisations-Puffer hinzugegeben und die Membran bei 42°C für 60 min inkubiert.

Nach Dekantieren des Hybridisations-Puffers wurde die Membran bei 42°C über Nacht mit 4 µl Hybridisations-Puffer und dem zuvor hergestellten Ansatz hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran mit 20 ml Hybridisations-Wasch-Puffer gereinigt und bei 42°C für 20 min inkubiert.

3.6.7 Detektion

Im folgenden Schritt wurde die Membran in eine leere Spitzenbox transferiert und mit 10 ml Detektions-Wasch-Puffer abgespült. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 15 ml Blocking-Puffer inkubiert. Es wurde eine Mischung aus 15 µl Streptavidin-HRP-Konjugat und 1 ml Blocking-Puffer hinzugefügt und die Membran für weitere 45 min inkubiert. Danach wurde die Membran für je 10 min mit je 15 ml Detektions-Wasch-Puffer gereinigt und im Anschluss auf eine Detektionsfolie platziert. Die Inkubation erfolgte mit je 500 µl Substrat A und B für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Detektion der microRNA-Spots wurde ein Film für mehrere Sekunden auf die Membran aufgelegt und anschließend mit der Entwicklersubstanz inkubiert. Danach wurde der Film gewässert und fixiert.

3.7 Quantitative microRNA-Expressionsanalysen

Die Quantifizierung der microRNA-Expression erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde eine cDNA-Synthese spezifischer microRNAs mittels stem-loop-Primer durchgeführt. Anschließend wird die hergestellte cDNA mittels qRT-PCR vermessen. Als Referenz wurde die Expression der miR-93 verwendet.

3.7.1 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der reversen Transkriptase wurde 1 μ l isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Das benötigte Volumen wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$V_{(H_2O)} = \frac{c_{RNA}(ng/\mu l)}{2 ng} - 1 \mu l$$

Der Ansatz zur cDNA-Synthese setzte sich wie folgt zusammen:

0,17	μ l	dNTPs (100 mM)
1,1	μ l	reverse Transkriptase (MuLV)
3,3	μ l	5x Puffer
0,21	μ l	RNase-Inhibitor
1,5	μ l	stem-loop-Primer (5x)
3,72	μ l	RNase-freies H ₂ O
5	μ l	verdünnte RNA-Lösung (2 ng/ μ l)
<hr/>		
15	μ l	Gesamtvolumen

Für die cDNA-Synthese wurde folgendes Programm gewählt:

1. 16°C 30 min
2. 42°C 30 min
3. 85°C 5 min
4. 4°C

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.7.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Im zweiten Schritt erfolgte die quantitative Messung der microRNA-Expression mittels qRT-PCR. Bei der qRT-PCR kann die Anzahl der neu gebildeten cDNA-Produkte in Echtzeit erfasst werden. Die eingesetzten TaqMan-Sonden beruhen auf dem Prinzip des Fluorescence resonance energy transfer (FRET). Die Sonde besitzt an einem Ende einen Reporterfarbstoff und am anderen einen Quencher. Quencher unterdrücken die Signale von fluoreszierenden Farbstoffen in ihrer Umgebung. Die Sonde bindet an einzelsträngige cDNA-Sequenzen zwischen den Primern und wird im Verlauf der PCR aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut. Dabei wird der Reporterfarbstoff freigesetzt und beginnt zu fluoreszieren. So kann der Produktverlauf gemessen werden.

Für den folgenden Reaktionsansatz wurde das HotStar-Taq-Kit (Qiagen, Hildesheim) verwendet:

9,1	µl	H ₂ O
1,5	µl	Puffer
1,2	µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,0	µl	dNTPs (100 mM)
1,0	µl	TaqMan-Primer
0,2	µl	HotStar-Taq-Polymerase
14,0	µl	Reaktionsansatz
<hr/>		
+ 1,0	µl	cDNA
<hr/>		
15	µl	Reaktionsansatz

Für die qRT-PCR wurde folgendes Programm gewählt:

1.	95°C	15 min	40 Zyklen
2.	95°C	30 s	
3.	60°C	1 min	

3.8 Statistik

Die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds einer behandelten Probe zur Kontrolle erfolgte mittels der $2^{-\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001, 2008). Dabei handelt es sich um eine relative Quantifizierung bei dem die CT-Werte der einzelnen

microRNAs auf die Expression der Referenz-microRNA (miR-93) bezogen werden. Der CT-Wert (=threshold cycle) ist der Wert, bei dem die Produktmenge einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Ein niedriger CT-Wert entspricht einer hohen Expression. Eine 100% PCR-Effizienz wurde angenommen.

$$\Delta CT = CT\text{-Wert}_{\text{Probe}} - CT\text{-Wert}_{\text{Referenz}}$$

Die Daten wurden statistisch mittels des Mann-Whitney-U-Test, Spearman-Rank und einfaktorieller ANOVA ausgewertet. Der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test wird bei nicht normal verteilten Datensätzen angewendet und vergleicht unabhängige, ungepaarte Stichproben miteinander. Bei der Auswertung von einer Variablen zwischen drei oder mehr Gruppen wurde eine einfaktorielle, parametrische ANOVA angewendet. Der Spearman-Rank-Test ist ein nichtparametrischer Test und wurde für die Korrelation zwischen zwei verschiedenen Merkmalen verwendet. Für die Messwerte unter der Nachweisbarkeitsgrenze wurde ein Wert angenommen, der die zu erwartende Verteilung abbildet, d.h. der angenommene Wert spiegelt das zu erwartende Mittel der Messwerte unter der Nachweisbarkeitsgrenze wider um ein Bias zu vermeiden. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SAS Version 9.3 (SAS Institute, Carey, NC).

Als signifikant wurden alle Werte eingestuft, die unterhalb der Signifikanzschwelle von $p < 0,05$ lagen. Ein p-Wert zwischen 0,05-0,1 zeigte einen statistischen Trend an.

4. ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungskollektiv

Das Kollektiv bestand aus insgesamt 94 Probanden und Patienten, davon 50 mit einem normwertigen Spermogramm und 44 mit einem abnormalen Spermogramm. Die Samenqualität wurde nach den Vorgaben der WHO von 2012 klassifiziert und setzt sich in dem Kollektiv wie folgt zusammen:

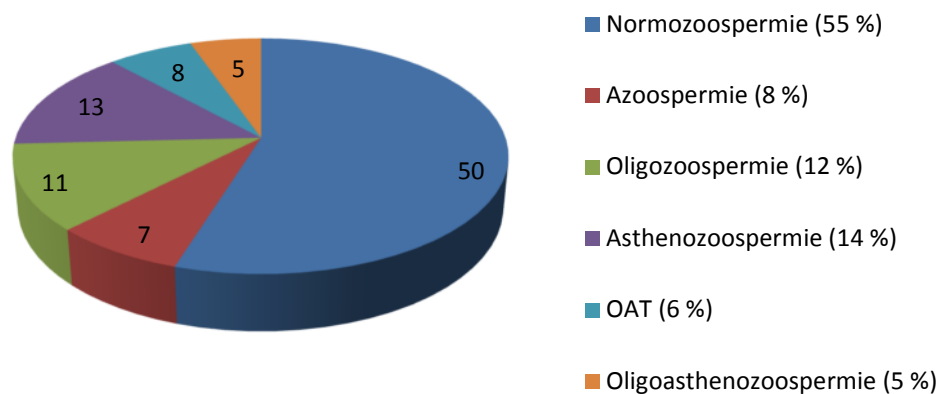


Abb. 1: Zusammensetzung des Kollektivs aufgeteilt nach den Kriterien der WHO von 2012

Tab. 3: Vergleich von klinischen Parametern zwischen den Patienten und Probanden mit normwertigem und abnormalen Spermogramm. Die Klassifikation erfolgte nach den Kriterien der WHO von 2012

Parameter	Normwertiges Spermogramm, n=50 Median (25%-75% Quantil)	Abnormales Spermogramm, n=44 Median (25%-75% Quantil)	p-Wert*
Alter [Jahre]	29 (25-33)	31,5 (28-37)	0,01**
Progressive Motilität [%]	49 (39-60)	30 (2,5-33,5)	<0,0001
Konzentration [$10^6/m$]	48,7 (17,5-97,3)	6,1 (0,1-19,7)	<0,0001
Normalform [%]	15 (8-21)	4 (2-10)	<0,0001

* Mann-Whitney U-Test

** Sensitivitätsanalyse

Das mittlere Alter der Männer mit einem normwertigen Spermogramm betrug 29 Jahre. Die progressive Motilität lag bei 49%, die Spermienkonzentration bei $48,7 \times 10^6/\text{ml}$ und der Anteil der Normalform bei 15%. Das Kollektiv mit abnormalem Spermogramm wies ein Durchschnittsalter von 31,5 Jahren auf. Die progressive Motilität lag bei 30%, die Spermienkonzentration bei $6,1 \times 10^6/\text{ml}$ und es fand sich ein Anteil von 4% der Normalform. Aufgrund eines statistisch signifikanten Altersunterschieds zwischen den beiden Gruppen ($p=0,01$; s. Tab. 3) wurden die Analysen in Form einer Sensitivitätsanalyse für das Alter der Probanden und Patienten adjustiert, da Alter die Ergebnisse als Confounder verzerren könnte. Hier zeigten sich keine relevanten Abweichungen der geschätzten Effekte von den unadjustierten Analysen; insbesondere zeigten sich keine signifikanten Beziehungen nach Adjustierung für Alter.

4.2 MicroRNA-Arrays

Im ersten Schritt erfolgte Analyse der Expression von insgesamt 244 verschiedenen microRNAs aus dem Seminalplasma von drei verschiedenen Proben mit je einmal Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie mittels fünf unterschiedlicher microRNA-Arrays. Das Ziel war einen Überblick über das microRNA-Expressionsprofil in Bezug zum Spermogramm zu erlangen und im Anschluss interessante Kandidaten-microRNAs für weitergehende Untersuchungen zu selektieren.

Tab. 4: Makroskopisches microRNA-Expressionsprofil im Seminalplasma bei je einmal Normozoospermie (N), Azoospermie (A) und Oligozoospermie (O)

miR	N	A	O
1	+	-	-
7	+	+	+
Let-7a	-	-	-
Let-7b	-	-	-
Let-7c	-	-	-
Let-7d	-	-	-
Let-7e	+	+	+
Let-7f	+	-	-
Let-7g	+	+	+
Let-7i	-	-	-
9	+	+	+
9.1.	+	+	+
10a	+	+	+
10b	+	-	-
15a	-	-	-
15b	-	-	-

miR	N	A	O
33	+	+	+
33b	+	+	+
34a	+	+	+
34b	+	+	+
34c	+	-	+
92	-	-	-
92b	-	-	-
93	+	-	-
95	+	+	-
96	+	+	+
99a	-	-	-
100	+	+	+
101	+	+	-
101.1	+	+	-
103	+	+	-
105	+	+	+

miR	N	A	O
146a	+	-	-
146b	+	-	-
147	-	-	+
148	-	-	-
148a	+	+	+
149	+	+	-
150	+	+	-
151	+	-	-
152	+	+	+
153	-	-	-
154	+	+	+
154#	+	+	+
155	+	+	+
181a	+	+	+
181b	+	-	-
181c	+	+	+

miR	N	A	O
16	+	+	+
17.3.	+	-	+
17-3p	+	+	-
17-5p	+	+	-
18a	+	-	-
18b	+	-	-
19a	+	+	+
19b	+	+	+
20a	+	-	-
21	+	+	-
22	+	-	+
23a	+	-	-
24	-	-	-
25	+	+	+
26a	-	-	-
26b	-	-	-
27a	-	-	-
27b	-	-	-
28	+	+	+
29a	-	-	-
29b	-	-	-
29c	-	-	-
30a.1	+	-	-
30a.2	-	-	-
30b	-	-	-
30c	-	-	-
30d	-	+	+
30e.3	-	+	+
30e.5	+	+	+
31	+	+	+
32	-	+	-
210	+	+	-
211	+	-	+
212	+	+	+
213	+	+	+
214	+	+	-
215	-	-	-
216	+	+	+
217	+	-	+
218	+	+	+
219	+	+	+
220	+	+	+
221	+	+	-
222	+	+	-
223	+	+	+
224	+	+	+
231	+	+	+
296	+	-	-

miR	N	A	O
106a	+	+	+
106b	+	+	+
107	-	-	-
122a	+	+	+
124a	+	-	+
125a	+	+	+
125b	-	-	+
126	+	-	+
127	-	+	-
128a	-	-	-
128b	-	-	-
130a	+	+	+
131	+	-	-
132	-	-	-
133a	+	-	-
133b	+	-	-
134	+	-	-
135a	-	-	+
135b	+	+	+
136	+	+	-
137	+	+	+
138	-	-	+
139	+	+	+
140	+	+	-
141	+	+	-
142	-	-	-
142-3p	-	+	-
142-5p	-	-	+
143	+	+	+
144	-	-	-
145	+	+	-
329	+	+	+
330	+	+	+
331	+	-	-
335	+	+	+
337	+	+	+
338	+	+	+
339	+	+	+
340	-	+	+
342	+	+	+
345	+	+	+
346	-	+	+
361	+	+	+
362	+	+	+
363	-	+	+
363#	+	+	+
365	-	+	+
367	+	+	+

miR	N	A	O
181d	+	+	+
182	+	+	+
183	+	+	+
184	+	+	+
185	-	+	-
186	-	+	-
187	-	+	+
188	+	+	+
189	+	-	+
190	-	+	+
191	-	+	-
192	+	-	+
193a	-	-	+
193b	-	-	+
194	+	+	+
195	-	-	-
196a	+	+	+
196b	+	-	-
197	+	+	+
198	+	+	-
199a	+	+	+
199a*a	-	-	-
199b	+	+	+
200a	+	-	-
200b	+	+	-
200c	+	-	-
2020	+	+	+
203	+	+	-
204	+	-	-
205	+	+	+
206	+	+	-
379	+	+	+
380-3p	+	+	+
380-5p	+	+	+
381	+	+	+
382	+	+	+
383	+	+	+
384	+	+	+
409-5p	+	+	+
410	+	+	+
411	+	+	+
412	+	+	+
422a	+	+	+
422b	+	+	+
423	+	+	+
424	+	+	+
425	+	+	+
425-5p	+	+	+

miR	N	A	O
299-3p	+	+	+
299-5p	+	+	+
301	-	-	+
302a	-	-	+
302a#	+	-	+
302b	+	+	+
302b#	+	+	+
302c	+	+	+
302c#	+	+	+
302d	+	+	+
320	+	-	+
323	+	-	-
324-3p	+	+	+
324-5p	+	+	+
325	+	+	+
326	+	+	+
328	+	+	+

miR	N	A	O
368	+	+	+
369.3.3	+	+	+
369.5.	+	+	+
369-3p	-	-	-
369-5p	-	+	-
370	+	+	+
371	+	-	+
372	+	-	-
373	+	+	+
373#	+	+	+
374	-	-	-
375	+	+	+
376a	+	+	+
376a#	-	+	+
376b	+	+	+
377	+	+	+
378	+	+	+

miR	N	A	O
429	+	+	+
432	+	+	+
432#	+	+	+
433	+	+	+
448	+	+	+
449	+	+	+
449b	+	+	+
450	+	+	+
451	+	+	+
452	+	+	+
452#	+	+	+
453	+	+	+
455	+	+	+
483	+	+	+
488	+	+	+
RNU48	+	+	+
U6	+	+	+

+ Expression detektierbar / - keine Expression detektierbar

4.2.1 Venn-Diagramm

Die Anzahl der exprimierten microRNAs in den Arrays für jede Probe wurde mit dem Venn-Diagramm dargestellt. Es beruht auf den Arbeiten von John Venn (1834-1923) und macht die graphische Darstellung verschiedener Mengen möglich. Die Schnittmengen beinhalten jeweils die Anzahl der gleich stark exprimierten microRNAs zwischen den Gruppen, während der Kreis ohne Überlappung die Anzahl der exprimierten microRNAs der spezifischen Probe enthält. Die Anzahl der gleich stark exprimierten microRNAs für alle drei Gruppen ist in der Mitte dargestellt.

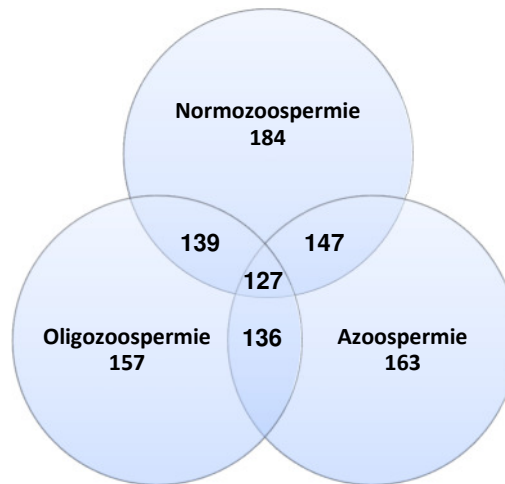


Abb. 2: Venn-Diagramm mit der Anzahl exprimierter microRNAs zwischen drei verschiedenen Männern mit je einmal Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie

Bei Normozoospermie und Oligozoospermie fanden sich 139 gemeinsam exprimierte microRNAs, zwischen Normozoospermie und Azoospermie hingegen 147. Zwischen Oligozoospermie und Azoospermie fanden sich 136 gemeinsame microRNAs. Zwischen allen drei Gruppen fanden sich 127 gemeinsam exprimierte microRNAs.

4.2.2 Makroskopische Analyse der microRNA-Array-Expressionsprofile

Makroskopisch detektieren die microRNA-Arrays eine deutliche Expression der miR-375 in allen drei Proben. Die miR-143 wird unterschiedlich stark exprimiert: Bei Normozoospermie und Azoospermie ist die Expression optisch stärker als bei Oligozoospermie. Die miR-210 lässt sich bei Normozoospermie und Oligozoospermie makroskopisch schwach detektieren, wohingegen keine Expression bei Azoospermie besteht.

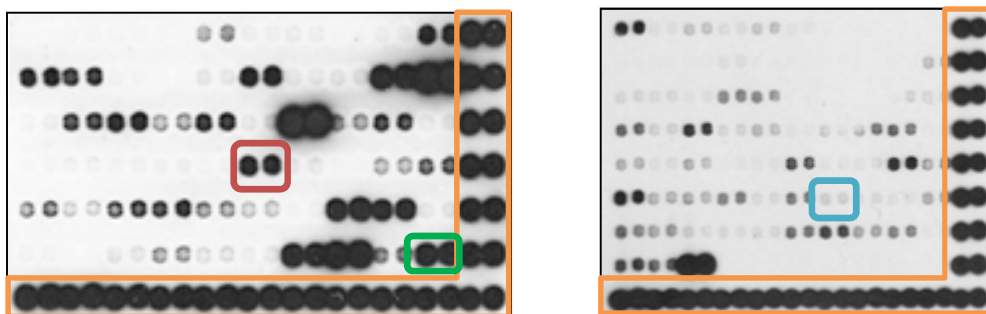


Abb. 3: MicroRNA-Expressionsprofil bei Normozoospermie

Das microRNA-Expressionsprofil detektiert makroskopisch eine deutliche Expression der **miR-375** (grün) und **miR-143** (rot) bzw. eine schwache Expression der **miR-210** (blau). Auf den microRNA-Arrays wird jede microRNA aufgrund einer Doppelbestimmung durch zwei Spots repräsentiert. Bei der unteren horizontal verlaufenden Reihe sowie den beiden senkrecht verlaufenden Reihen auf der rechten Seite handelt es sich um **Kontrollspots** (orange).

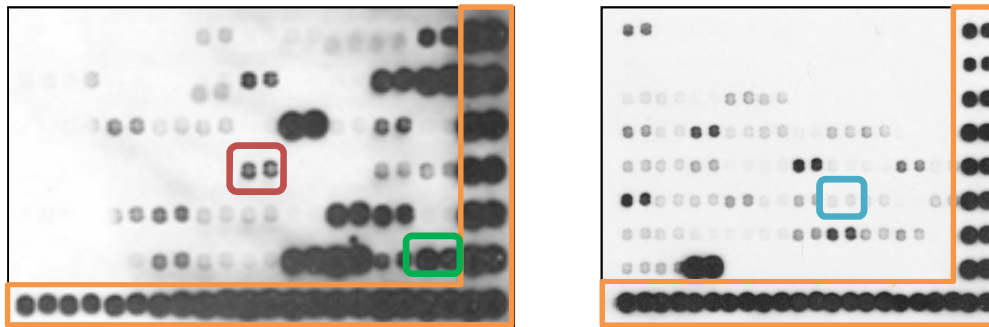


Abb. 4: MicroRNA-Expressionsprofil bei Oligozoospermie

Das microRNA-Expressionsprofil detektiert makroskopisch eine deutliche Expression der **miR-375** (grün), eine moderate Expression der **miR-143** (rot) und schwache Expression der **miR-210** (blau). Auf den microRNA-Arrays wird jede microRNA aufgrund einer Doppelbestimmung durch zwei Spots repräsentiert. Bei der unteren horizontal verlaufenden Reihe sowie den beiden senkrecht verlaufenden Reihen auf der rechten Seite handelt es sich um **Kontrollspots** (orange).

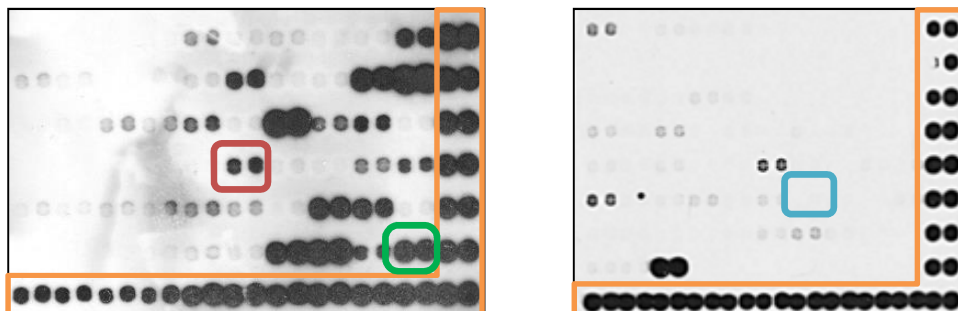


Abb. 5: MicroRNA-Expressionsprofil bei Azoospermie

Das microRNA-Expressionsprofil detektiert makroskopisch eine deutliche Expression der **miR-375** (grün) und der **miR-143** (rot) und keine Expression der **miR-210** (blau). Auf den microRNA-Arrays wird jede microRNA aufgrund einer Doppelbestimmung durch zwei Spots repräsentiert. Bei der unteren horizontal verlaufenden Reihe sowie den beiden senkrecht verlaufenden Reihen auf der rechten Seite handelt es sich um **Kontrollspots** (orange).

In Verbindung mit den oben aufgeführten Ergebnissen und nach detailliertem Literaturstudium wurden die **miR-143**, **miR-210** und **miR-375** für weitere Untersuchungen ausgewählt. Ausgewählt wurde die **miR-143** als Prostata-spezifische microRNA, die **miR-210** als Hypoxie-assoziierte microRNA in Zusammenhang mit

oxidativem Stress und die miR-375 als Androgen-regulierte microRNA. Als Referenzgen diente die konstant exprimierte miR-93.

4.3 Quantitative Analyse der microRNA-Expression

Die Expression der miR-143, miR-210 und miR-375 wurde in 94 Seminalplasma-Proben mittels qRT-PCR vermessen und die erhaltenen Ergebnisse zu klinischen Parametern der Probanden und Patienten wie z.B. Spermienkonzentration, Samenqualität, progressiver Spermienmotilität, Morphologie und Fertilitätsstatus statistisch korreliert. Der Nachweis von miR-143 gelang in 71, von miR-210 in 77 und von miR-375 in 80 von insgesamt 94 Seminalplasma-Proben. Der mediane Δ CT-Wert der miR-143 lag bei 0,0033 [0-7,88], der miR-210 bei 0,0062 [0-4,05] und der miR-375 bei 0,04 [0-132,89].

4.3.1 MicroRNA-Expression beim normwertigen und abnormalen Spermogramm

Zunächst wurden die Daten graphisch mittels Box-Plot-Analysen dargestellt, um die microRNA-Expression zwischen Männern mit normwertigen und abnormalen Spermogramm vergleichen zu können. Dieser Plot bietet die Möglichkeit, die Streuung und Verteilung der Daten zu zeigen. Hier ist zu erkennen, dass die Expression der miR-375 und miR-210 im Untersuchungskollektiv mit normwertigem Spermogramm höher sind als in der Gruppe mit abnormalem Spermogramm. Jedoch unterscheidet sich die microRNA-Expression der miR-375 ($p=0,93$) bzw. der miR-210 ($p=0,67$) nicht signifikant zwischen den Gruppen. Dahingegen ist die Expression der miR-143 beim normwertigen Spermogramm niedriger; jedoch ist auch dieser Effekt statistisch nicht signifikant ($p=0,36$).

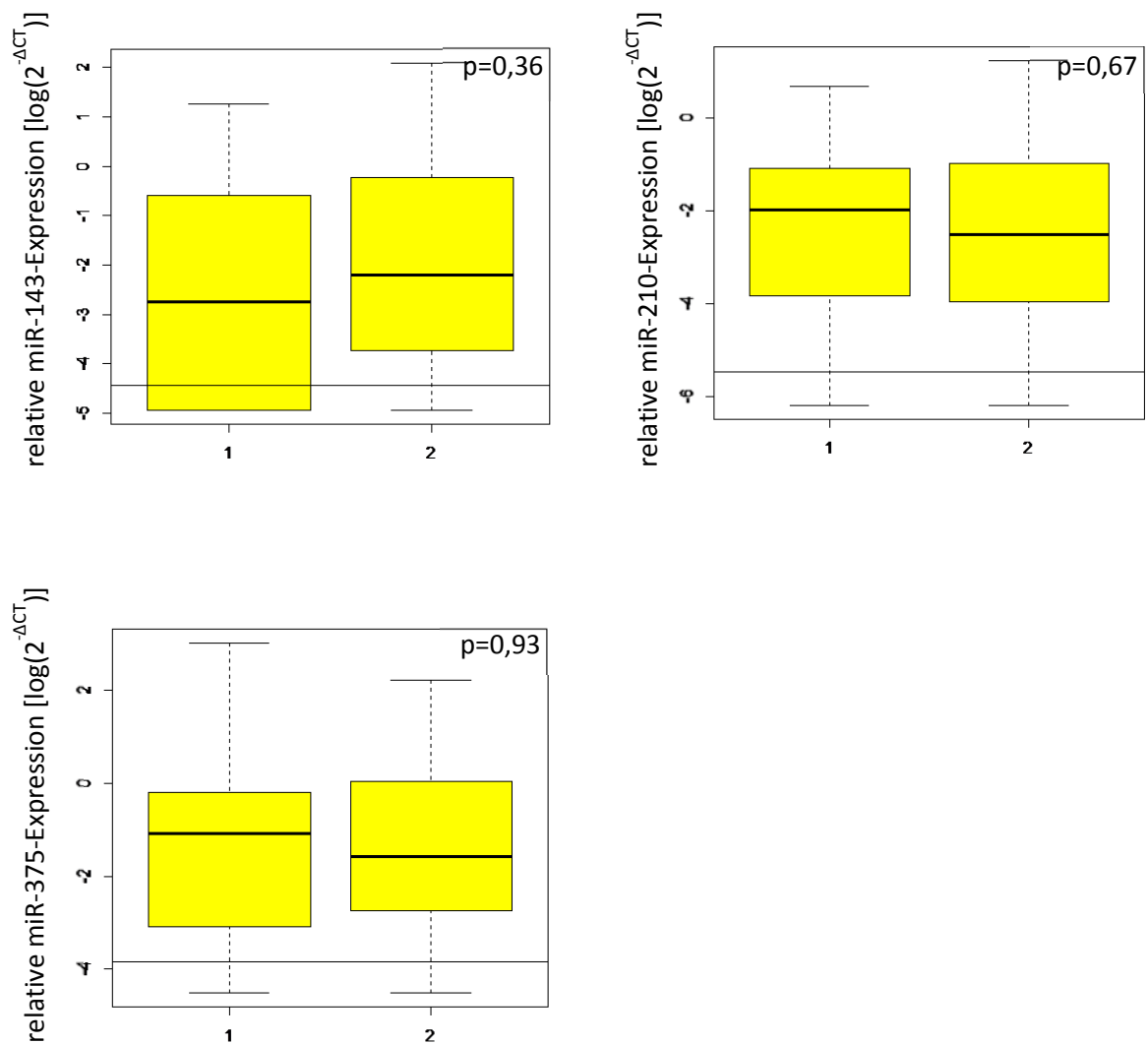


Abb. 6: Boxplot-Analyse der relativen microRNA-Expression beim normwertigen (1) und abnormalen (2) Spermogramm

Es werden die Verteilungen der Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 beim normwertigen (1) und abnormalen Spermogramm (2) unterschieden. In der Box sind 50% aller Daten enthalten und der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median der microRNA-Expression der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren das untere 2,5% - bzw. das obere 97,5% Quantil. Die schwarze, horizontale Linie markiert die Detektionsgrenze (kleinster gemessener Wert > 0). Der Abstand zwischen dieser Linie und dem unteren Whisker ist proportional zum geschätzten Mittel der Messungen unterhalb der Detektionsgrenze.

4.3.2 MicroRNA-Expression und Spermienkonzentration

Um eine Assoziation zwischen der microRNA-Expression und der Spermienkonzentration zu identifizieren, wurden die Daten mittels linearer Korrelationsanalyse nach Spearman-Rank ausgewertet. Die Ergebnisse für die miR-143, miR-210 und miR-375 wurden als Streudiagramm dargestellt. Es konnte keine Korrelation zwischen dem microRNA-Expressionslevel der miR-143 ($r=-0,04$; $p=0,66$), miR-210 ($r=-0,01$; $p=0,96$) bzw. miR-375 ($r=-0,04$; $p=0,74$) und der Spermienkonzentration gefunden werden.

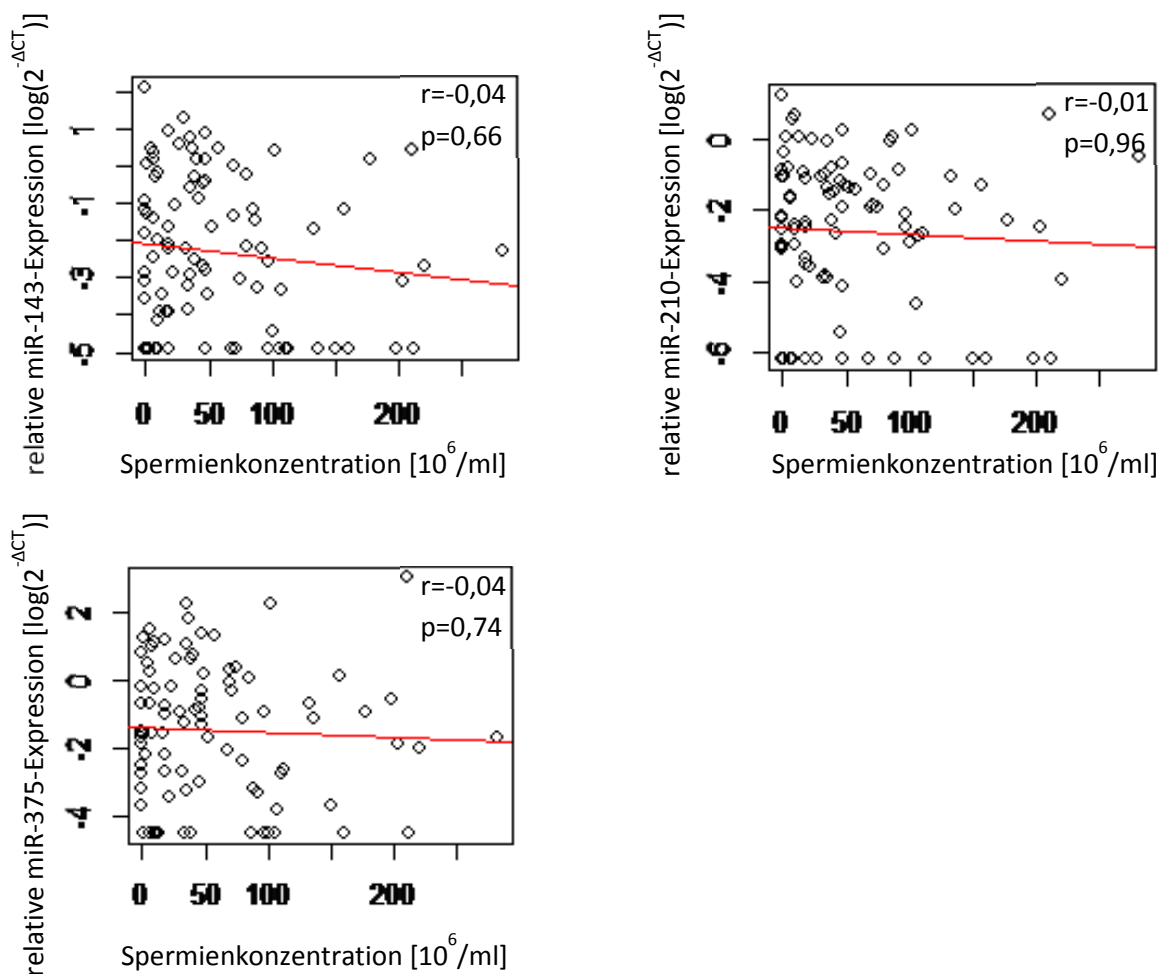


Abb. 7: Streudiagramme zur Veranschaulichung der Korrelation zwischen microRNA-Expressionslevel und Spermienkonzentration

Gezeigt ist die relative microRNA-Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 (y-Achse) gegen die Spermienkonzentration (x-Achse). Beim linearen Regressionskoeffizienten (r) ist mit $r = 0$ (r nach Spearman) keine Korrelation vorhanden, während bei $r = -1$ ein perfekt negativ korrelierter Zusammenhang vorliegt. Es zeigt sich eine negative Assoziation zwischen den beiden Parametern bei allen microRNAs, die jedoch statistisch nicht signifikant ausfällt.

4.3.3 MicroRNA-Expression bei Azoospermie, schwerer und leichter Oligozoospermie und Normozoospermie

Im nächsten Schritt wurde die microRNA-Expression zu verschiedenen Samenqualitäten mittels ANOVA untersucht. Es wurden Azoospermie, schwere und leichte Oligozoospermie sowie Normozoospermie miteinander verglichen. Bei schwerer Oligozoospermie liegt der Median für die Expression der miR-143 unterhalb der Nachweisgrenze. Die anderen Gruppen zeigten keine statistisch signifikante Expression der miR-143 ($p=0,47$). Die Expression von miR-375 und miR-210 in allen Gruppen annähernd homogen, sodass sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zeigt ($p=0,96$ und $p=0,61$).

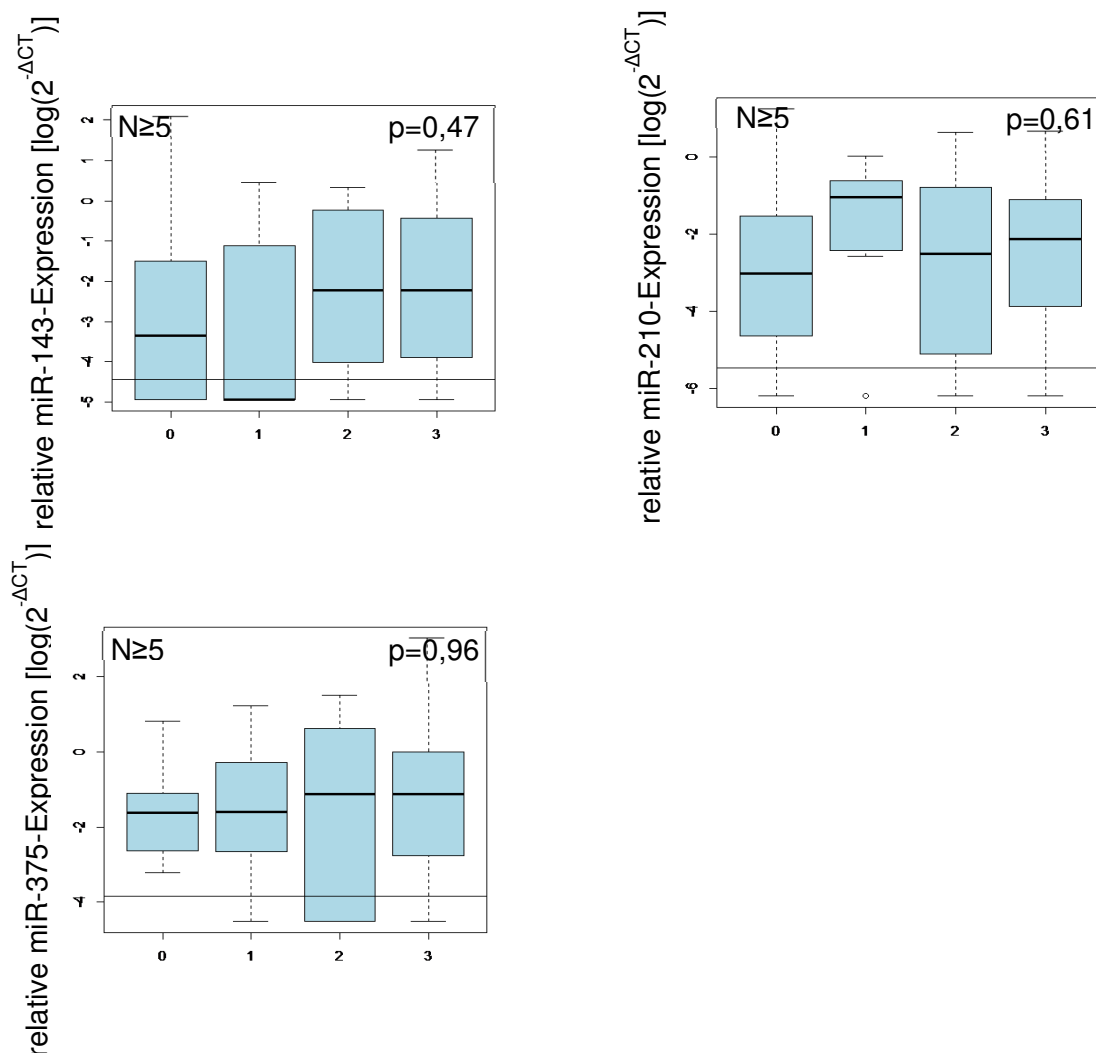


Abb. 8: Boxplot-Analyse der relative microRNA-Expression bei Azoospermie (0), schwerer (1) und leichter (2) Oligozoospermie und Normozoospermie (3)

Es werden die Verteilungen der microRNA-Expression miR-143, miR-210 bzw. miR-375 zwischen Azoospermie (0), schwerer Oligozoospermie (1), leichter Oligozoospermie (2), Normozoospermie (3) verdeutlicht (statistische Testung mittels einfaktorieller ANOVA). Der Cut-off für eine schwere

Oligozoospermie wurde für eine Spermienanzahl von unter $5 \times 10^6/\text{ml}$ festgelegt. In der Box sind 50% aller Daten enthalten und der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median der microRNA-Expression der jeweiligen Gruppe. 95% der Werte liegen innerhalb der Whisker. Die schwarze, horizontale Linie markiert die Detektionsgrenze (kleinster gemessener Wert > 0). Der Abstand zwischen dieser Linie und dem unteren Whisker ist proportional zum geschätzten Mittel der Messungen unterhalb der Detektionsgrenze.

4.3.4 MicroRNA-Expression und progressive Spermienmotilität

Anschließend wurde die microRNA-Expression zur abnormalen progressiven Spermienmotilität ($< 32\%$) korreliert. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der miR-143, miR-210 bzw. miR-375-Expression bei normwertiger und eingeschränkter progressiven Motilität gezeigt werden ($p=0,51$; $p= 0,39$; $p=0,65$).

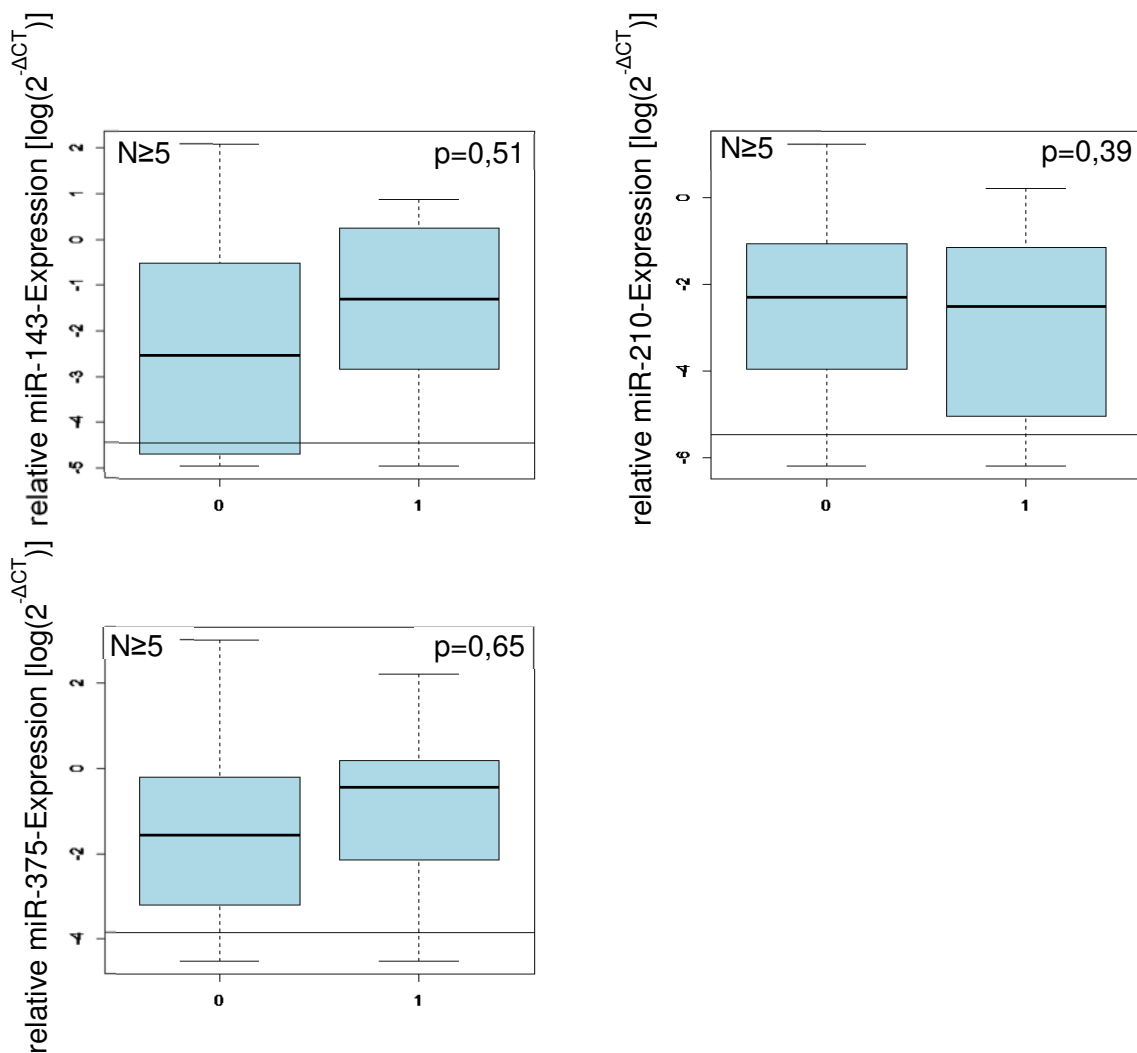


Abb. 9: Boxplot-Analyse der relativen microRNA-Expression bei reduzierter (0) und normwertiger (1) progressiven Spermienmotilität

Es werden die Verteilungen der microRNA-Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 bei reduzierter (0) und normwertiger (1) progressiven Spermienmotilität unterschieden. In der Box sind 50% aller Daten

enthalten und der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median der microRNA-Expression der jeweiligen Gruppe. Die Whisker markieren das untere 2,5% - bzw. das obere 97,5% Quantil. Die schwarze, horizontale Linie markiert die Detektionsgrenze (kleinster gemessener Wert > 0). Der Abstand zwischen dieser Linie und dem unteren Whisker ist proportional zum geschätzten Mittel der Messungen unterhalb der Detektionsgrenze.

4.3.5 MicroRNA-Expression und Morphologie

Anschließend wurde die microRNA-Expression zur Morphologie (= Prozentanteil der Normalform) mittels Spearman-Rank korreliert. Die Korrelationsanalyse konnte zeigen, dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der miR-143 ($r=0,07$; $p=0,54$), miR-210 ($r=-0,03$; $p=0,76$) miR-375 ($r=-0,01$; $p=0,93$) und der Morphologie besteht.

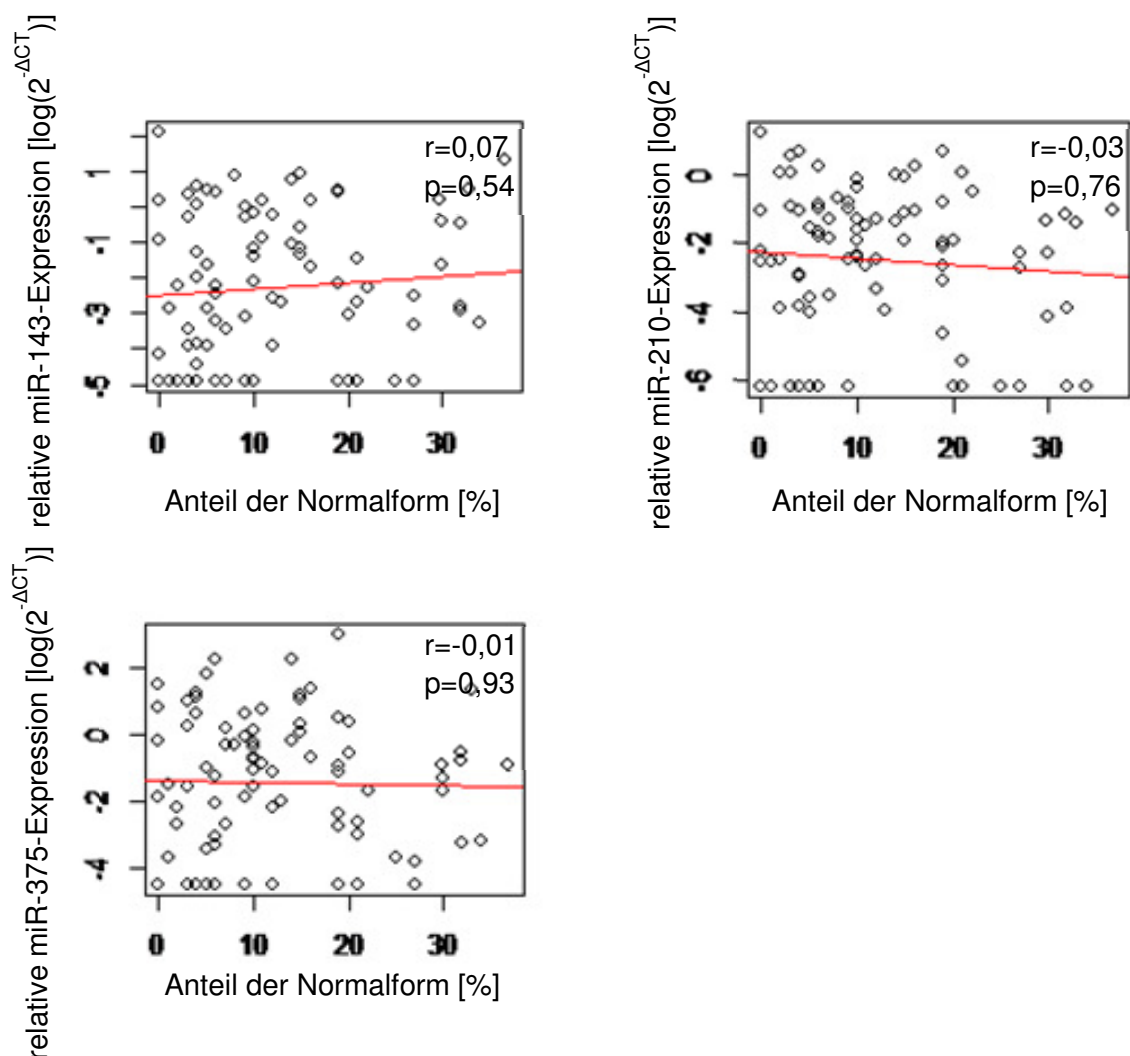


Abb. 10: Streudiagramme zwischen microRNA-Expressionslevel und Spermienmorphologie

Gezeigt ist die relative microRNA-Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 (y-Achse) gegen die Morphologie (x-Achse). Beim linearen Regressionskoeffizienten (r) ist mit $r = 0$ keine Korrelation vorhanden,

während bei $r = -1$ ein perfekt negativ korrelierter Zusammenhang vorliegt (r nach Spearman). Man erkennt eine positive Assoziation der miR-143 und eine negative Assoziation der miR-210 bzw. miR-375 mit der Spermienmorphologie, die jedoch statistisch nicht signifikant ausfällt.

Im nächsten Schritt wurde überprüft ob ein Zusammenhang zwischen der microRNA-Expression bei eingeschränkter (< 4% der Normalform) im Vergleich zur normwertigen Morphologie besteht. Zwischen der Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 bei abnormaler versus normwertiger Morphologie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden ($p=0,63$; $p=0,98$; $p=0,77$).

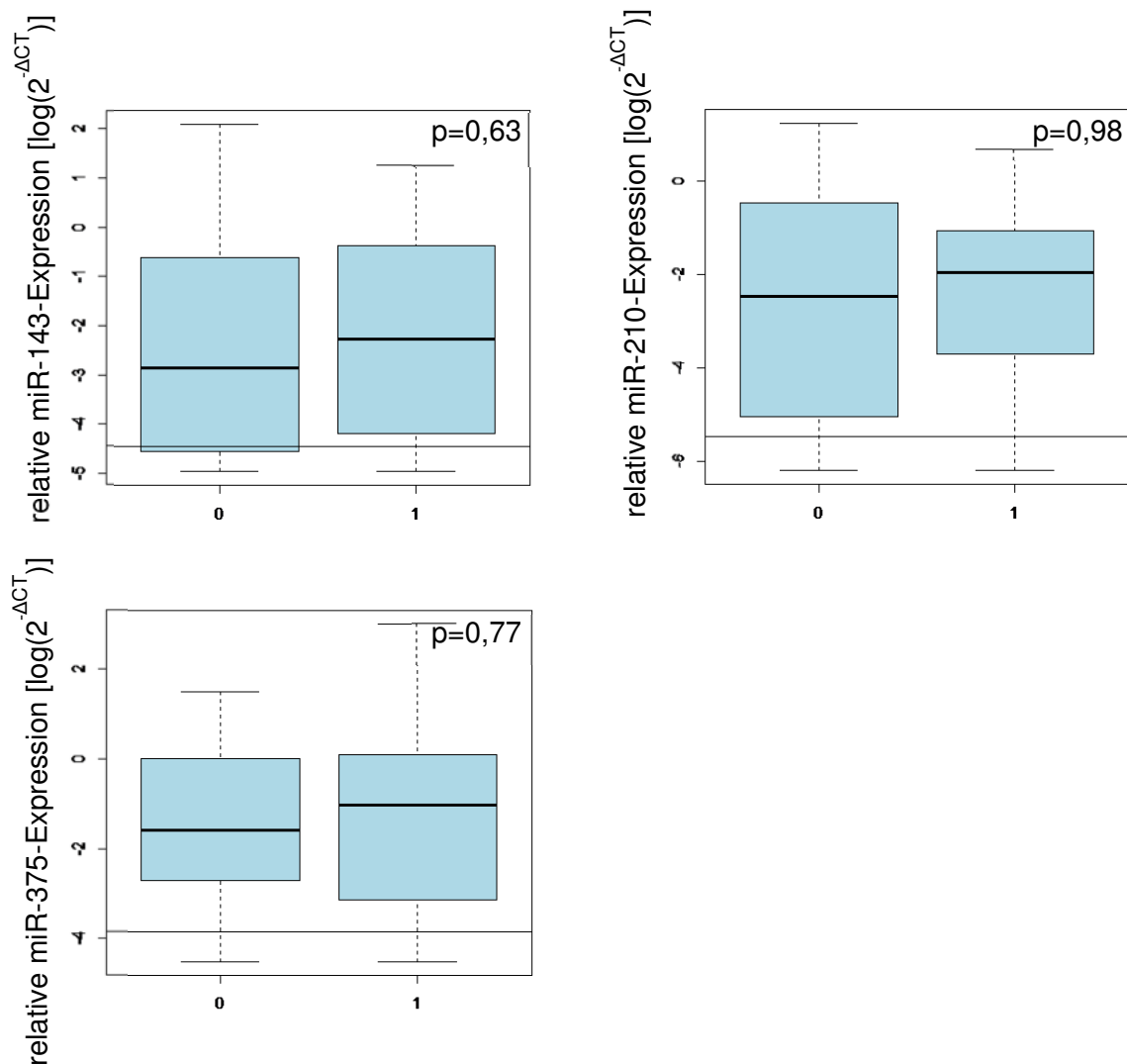


Abb. 11: Boxplot-Analyse der relativen microRNA-Expression bei eingeschränkter (0) und normwertiger (1) Spermienmorphologie

Es werden die Verteilungen der microRNA-Expression der miR-143, miR-210 bzw. miR-375 bei eingeschränkter (0) und normwertiger (1) Morphologie unterschieden. In der Box sind 50% aller Daten enthalten und der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median der microRNA-Expression der jeweiligen

Gruppe. Die Whisker markieren das untere 2,5% - bzw. das obere 97,5% Quantil. Die schwarze, horizontale Linie markiert die Detektionsgrenze (kleinster gemessener Wert > 0). Der Abstand zwischen dieser Linie und dem unteren Whisker ist proportional zum geschätzten Mittel der Messungen unterhalb der Detektionsgrenze.

4.3.6 MicroRNA-Expression bei unterschiedlicher Samenqualität

Im letzten Schritt wurden die microRNA-Expressionen bei Normozoospermie, Azoospermie, Oligozoospermie, Asthenozoospermie, OAT und Oligoasthenozoospermie mittels ANOVA auf mögliche Unterschiede untersucht. Zwischen der microRNA-Expression der miR-143 ($p=0,64$) und miR-210 ($p=0,73$) und der Samenqualität konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Expression der miR-375 ist ein Trend zur Signifikanz bei Korrelation zur Samenqualität zu erkennen ($p=0,06$).

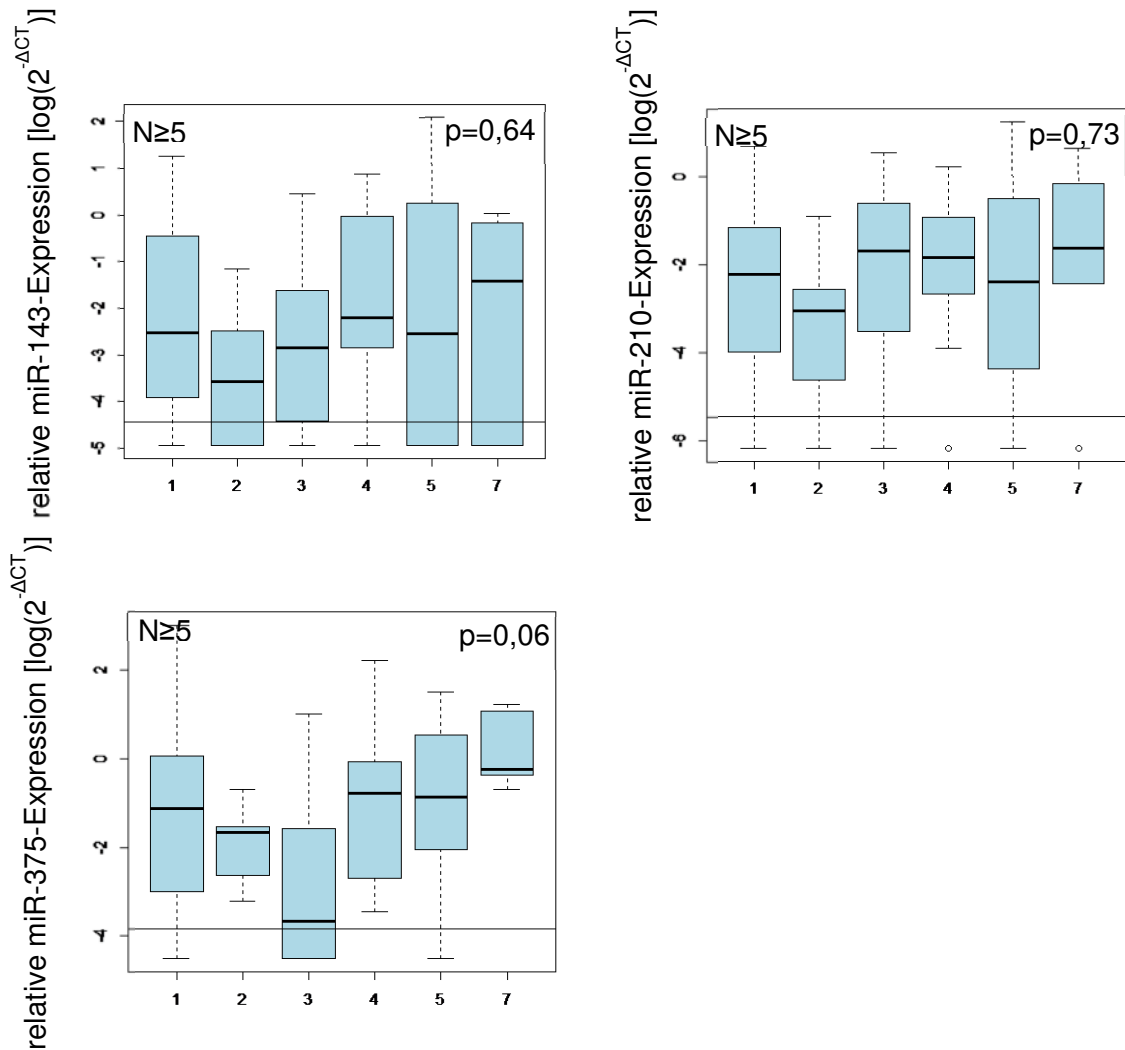


Abb. 12: Boxplot-Analyse der microRNA-Regulation bei unterschiedlicher Samenqualität u.a. bei Normozoospermie (1), Azoospermie (2), Oligozoospermie (3), Asthenozoospermie (4), OAT (5), Oligoasthenozoospermie (7)

Es werden die Verteilungen der microRNA-Expression der miR-143, miR-210 und miR-375 bei Normozoospermie (1), Azoospermie (2), Oligozoospermie (3), Asthenozoospermie (4), OAT (5), Oligoasthenozoospermie (7) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA. In der Box sind 50% aller Daten enthalten und der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median der microRNA-Expression der jeweiligen Gruppe. 95% der Werte liegen innerhalb der Whisker. Die schwarze, horizontale Linie markiert die Detektionsgrenze (kleinster gemessener Wert > 0). Der Abstand zwischen dieser Linie und dem unteren Whisker ist proportional zum geschätzten Mittel der Messungen unterhalb der Detektionsgrenze.

5. DISKUSSION

5.1 Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs

Das Kollektiv umfasste 94 Probanden und Patienten, die zu Beginn in eine Kontrollgruppe mit normwertigen Spermogramm und eine Gruppe mit abnormalem Spermogramm unterteilt wurden. Das mittlere Alter der Probanden und Patienten in den beiden Gruppen unterschied sich signifikant ($p=0,01$). Da das Alter die Ergebnisse als Confounder verzerren könnte, wurden die Analysen in Form einer Sensitivitätsanalyse für das Alter adjustiert. Hierbei zeigten sich keine relevanten Abweichungen der geschätzten Effekte von den unadjustierten Analysen; insbesondere zeigten sich keine signifikanten Beziehungen nach Adjustierung zum Alter.

Die WHO empfiehlt, dass Ejakulatproben nach mindestens zwei Tagen bis maximal sieben Tagen sexueller Karez gewonnen werden (WHO, 2012). Die zeitlichen Abstände zwischen den Ejakulationen können die Menge an microRNAs im Seminalplasma verändern (Huang et al., 2009). Bei mehreren Probanden und Patienten war die Karezzeit nicht hinterlegt oder nicht erinnerlich, sodass es dadurch möglicherweise zu Schwankungen gekommen ist. Zusätzlich sei darauf hingewiesen, dass die Ejakulatqualität eines Individuums Schwankungen unterliegt. Für unsere Untersuchungen lag pro Mann genau eine Probe vor und es erfolgten keine weiteren Nachuntersuchungen.

Ebenfalls befinden sich in der gesunden Kontrollgruppe Probanden, die keine Kinder gezeugt haben und bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Kinderwunsch bestand, sodass in dieser Arbeit keine Aussage über die Fertilität und ihre potentielle Assoziation zur microRNA-Expression getroffen werden kann. Die ideale Kontrollgruppe würde sich aus Männern mit gesicherter Fertilität zusammensetzen, d.h. am besten aus Individuen, die in den letzten zwei Jahren mit ihrer Partnerin ein Kind bekommen haben bzw. aus Männern mit gesicherter Infertilität, die sich bereits mit ihrer Partnerin in Kinderwunschbehandlung befinden.

5.2 Analyse der microRNA-Array-Untersuchung

Im ersten Schritt erfolgte die makroskopische microRNA-Array-Untersuchung des Seminalplasmas von drei verschiedenen Männern mit je einmal Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie, um eine qualitative Aussage bezüglich des microRNA-Expressionsprofils zu erhalten. Bei Normozoospermie und Oligozoospermie

fanden sich 139 gemeinsam exprimierte microRNAs. Zwischen Normozoospermie und Azoospermie hingegen 147. Zwischen Oligozoospermie und Azoospermie fanden sich 136 gemeinsame microRNAs. Zwischen allen drei Gruppen fanden sich 127 gemeinsam exprimierte microRNAs von den insgesamt 244 getesteten microRNAs.

Makroskopisch konnte eine deutliche Expression der miR-375 in allen drei Seminalplasma-Proben detektiert werden. Die miR-143 wurde unterschiedlich stark exprimiert: Bei Normozoospermie und Azoospermie war die Expression optisch stärker als bei Oligozoospermie. Die miR-210 ließ sich bei Normozoospermie und Oligozoospermie nur schwach detektieren, wohingegen keine Expression bei Azoospermie sichtbar war.

Die Arbeitsgruppe um Liu konnte zeigen, dass quantitative Unterschiede in der microRNA-Expression in Spermien zwischen fertilen und infertilen Patienten bestehen. Sie stellten fest, dass insgesamt 52 microRNAs unterschiedlich exprimiert wurden; davon zeigte sich eine Überexpression von 31 microRNAs und eine verringerte Expression von 21 microRNAs bei Infertilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das infertile Kollektiv wurde dabei allerdings nicht näher charakterisiert, mit Ausnahme der Aussage, dass überwiegend eine Asthenozoospermie bei den 86 Probanden vorlag (Liu et al., 2012).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Abu-Halima und Kollegen, die in Array-Untersuchungen einen quantitativen microRNA-Expressionsunterschied in den Spermien zwischen Asthenozoospermie, Oligoasthenozoospermie und Normozoospermie feststellten. Zwischen Asthenozoospermie und Oligoasthenozoospermie zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied (Abu-Halima et al., 2013).

In einem Tierexperiment haben Yan et al. das microRNA-Expressionsmuster im Hodengewebe zwischen jungen und sexuell adulten Tieren verglichen. Sie konnten zeigen, dass eine Reihe von microRNAs in Jungtieren höher exprimiert waren als in den sexuell adulten Tieren und folgerten, dass spezifische microRNAs eine wichtige Rolle bei der sexuellen Reifung und der Spermatogenese spielen (Yan et al., 2007).

Lian et al. verglichen die microRNA-Expression im Hodengewebe bei nicht-obstruktiver Azoospermie und einer fertilen Kontrollgruppe und konnten eine Dysregulation von insgesamt 173 microRNAs feststellen. Sie fanden 19 verstärkt exprimierte und 154 verringert exprimierte microRNAs bei Azoospermie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs von insgesamt nur fünf Patienten ist eine generalisierte Aussage allerdings nur eingeschränkt möglich (Lian et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die microRNA-Array-Analyse eine effiziente Möglichkeit darstellt, einen Überblick über die microRNA-Expression von Individuen und damit mögliche einhergehende Veränderungen bei eingeschränkter Fertilität zu erhalten (Garrido et al., 2013). Ein direkter Vergleich der oben erwähnten Studien mit dieser Arbeit ist aufgrund der Verwendung von unterschiedlichem Probenmaterial (hier: Seminalplasma) nur eingeschränkt möglich. Auch ein Vergleich zwischen den Studien ist aufgrund der stark variierenden microRNA-Expressionsmuster nur bedingt gegeben.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir zeigen, dass ein makroskopisch sichtbarer Unterschied in der microRNA-Expression im Seminalplasma zwischen Normozoospermie, Azoospermie und Oligozoospermie besteht. Es liegt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der microRNA-Expression im Seminalplasma und dem Vorliegen eines abnormalen Spermioграмms besteht. Um eine genauere Aussage diesbezüglich zu treffen, wurde die Expression der miR-143, miR-210 und miR-375 im Seminalplasma von 94 Männern untersucht und zu verschiedenen Spermienvariablen korreliert.

5.3 Analyse der Expression der miR-143, miR-210, miR-375 im Seminalplasma

Im folgenden Abschnitt sollen die drei ausgewählten microRNAs, d.h. die miR-143 (Prostata-spezifisch), miR-210 (Hypoxie-assoziiert) und miR-375 (Androgen-reguliert) und ihre mögliche Assoziation zu abnormalen Ejakulatparametern ausführlich besprochen werden.

5.3.1 MiR-143

Es konnte gezeigt werden, dass die Prostata-spezifische miR-143 eine Rolle in der Entstehung des Prostatakarzinoms spielt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass die Expression der miR-143 in einem Prostatakarzinom stark abfällt (Clapé et al., 2009; Szczyrba et al., 2010; Hart et al., 2014). Clapé et al. konnten zeigen, dass die miR-143-Expression invers mit dem Tumorstadium korreliert und als Tumorsuppressor in Prostatakarzinomzellen fungiert (Clapé et al., 2009). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Szczyrba et al. und

Hart et al. keine Korrelation zwischen der miR-143-Expression zum Tumorstadium und der Prognose herstellen (Szczyrba et al., 2010; Hart et al., 2014).

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die miR-143 bei Männern mit gesunder Prostata regelrecht exprimiert sein sollte. Das steht im Einklang mit unseren Ergebnissen: In unserer Arbeit konnten wir eine gut detektierbare miR-143-Expression in einem Großteil des Kollektivs mittels qRT-PCR nachweisen. Bei der Korrelation der miR-143-Expression mit verschiedenen Parametern wie Konzentration, Motilität, Morphologie und Samenqualität fanden wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, was unseren Erwartungen entsprach.

Die makroskopische Analyse der microRNA-Arrays zeigte eine ungewöhnlich starke Expression der miR-143, die möglicherweise auf eine verringerte Spezifität der Arrays im Vergleich zur qRT-PCR oder auf die Tatsache, dass nur wenige Männer (n=3) untersucht worden sind, zurückzuführen ist.

5.3.2 MiR-210

Die miR-210 ist eine Hypoxie-assoziierte microRNA, die in den meisten Tumoren überexprimiert wird (Kulshreshtha et al., 2007; Ivan et al., 2008). Greither et al. konnten zeigen, dass die miR-210-Expression in Pankreastumoren und Weichteilsarkomen erhöht ist und mit einem schlechteren Überleben korreliert (Greither et al., 2010, 2012).

Hypoxie kennzeichnet eine Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und führt u.a. zu einer Hemmung verschiedener physiologischer Prozesse (Giaccia et al., 2004). Die Aktivierung der miR-210-Expression erfolgt durch den sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Kulshreshtha et al., 2007). HIF-1 α ist ein Heterodimer, welches aus einer sauerstoffsensiblen α -Einheit und einer konstitutiv exprimierten β -Einheit besteht (Wang und Semenza, 1995; Semenza, 2003). Unter Normoxie wird HIF-1 α von dem Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) für den proteosomalen Abbau ubiquitinyliert, anschließend abgebaut und ist im Zytoplasma nicht nachweisbar (Semenza, 2003; Giaccia et al., 2004). Unter Hypoxie kommt es zu einer Hemmung des Abbaus und HIF-1 α akkumuliert im Zytoplasma und wird in den Zellkern transloziert, um dort an assoziierte Zielgene zu binden, u.a. auch an den Promotor der miR-210 (Giaccia et al., 2004; Kulshreshtha et al., 2007). HIF-1 α reguliert viele Gene, die in Prozessen wie Glukoseaufnahme, Glukosemetabolisierung, Zellproliferation, Angiogenese, Erythropoese und Apoptose involviert sind (Wang und Semenza, 1995; Semenza,

2003). Im Spermium befindet sich HIF-1 α hauptsächlich im Akrosom und im Mittelstück (Depping et al., 2004).

Depping und Kollegen konnten zeigen, dass eine HIF-1 α Isoform, die hHIF-1 α TE ausschließlich im humanen Hoden exprimiert wird (Depping et al., 2004). Jedoch sind weder HIF-1 α noch hHIF-1 α TE mit den Mitochondrien assoziiert, sodass der genaue molekulare Mechanismus unklar ist (Depping et al., 2004). Interessanterweise führt eine Überexpression von hHIF-1 α TE zu einer Inhibierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Depping et al., 2004). Bei Mäusen mit ausgeschaltetem Von-Hippel-Lindau Protein (pVHL) konnte eine Oligozoospermie, ein verringertes Hodenvolumen und Infertilität festgestellt werden, sodass die Vermutung naheliegt, dass eine Beeinträchtigung der HIF-1 α -Regulation eine Störung der Spermatogenese nach sich zieht (Ma et al., 2003).

Durch die hohe Proliferationsrate unterliegt die Spermatogenese in den Samenkanälchen des Hodens einem erheblichen Sauerstoffverbrauch (Depping et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind die Samenkanälchen nur schwach vaskularisiert und da die Spermatogenese durch Diffusion aufrecht erhalten wird, herrscht intraluminal ein niedriger Sauerstoffpartialdruck (Depping et al., 2004; Giaccia et al., 2004). Der intraluminale Sauerstoffpartialdruck beträgt 2 mmHg; ein Druck, der ansonsten im Körper nur in den Mitochondrien existiert (Max, 1992). Wenn dieser Sauerstoffpartialdruck für eine längere Zeit unterschritten wird und anhält, ist anzunehmen, dass eine Stresssituation der Zellen hervorgerufen wird (Aitken und De Iulius, 2010). Zum Beispiel kommt es beim Krankheitsbild der Varikozele durch die venöse Blutstase im Hoden zur Hypoxie und Mikrozirkulationsstörungen, die eine gestörte Spermatogenese zur Folge haben (Chakraborty et al., 1985).

Oxidativer Stress entsteht, wenn ROS (reaktive Sauerstoffspezies) in zu hohen Konzentrationen vorliegen bzw. überschießend gebildet werden. Wichtige Vertreter von ROS sind z.B. Superoxid- und Hydroxylradikale. Bei gesunden Männern werden ROS von den Spermien in geringen Mengen gebildet und wirken als physiologische Transmitter (Sharma und Agarwal, 1996). Wenn die ROS-Bildung unkontrolliert abläuft, kommt es zu zellschädigenden Effekten, wie z.B. der Oxidierung von Lipiden, Proteinen und DNA mit Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Kasturi et al., 2008). Es kommt ebenfalls zu einer Schädigung der Mitochondrien, die wiederum reaktiv vermehrt ROS bilden und somit entsteht ein Circulus vitiosus (Aitken und De Iulius, 2010). Eine überschießende ROS-Bildung im männlichen Geschlechtstrakt wird mit Infertilität assoziiert (Sharma und Agarwal, 1996).

In den Spermien läuft die ROS-Bildung in den Mitochondrien und im Zytosol ab (Max 1992; Aitken und De Iuliis, 2010). Es wird vermutet, dass die im Mittelstück des Spermiums entstandenen ROS in den Nukleolus diffundieren und dort zur DNA-Schädigung führen (Aitken und De Iuliis, 2010). Zusätzlich enthalten Spermien eine große Menge an hochungesättigten Fettsäuren, die durch ROS oxidiert werden (Max, 1992). Die Lipidoxidation bei Spermien stört die zelluläre Membranintegrität und verringert somit ihre Motilität und Befruchtungsfähigkeit (Max, 1992; Agarwal et al., 2003; Kasturi et al., 2008). Andere Studien konnten zeigen, dass bei Oligozoospermie und Asthenozoospermie die ROS-Bildung im Vergleich zur Normozoospermie stark erhöht ist (Zalata et al., 1995; Sharma und Agarwal, 1996). Die Arbeitsgruppen um Ollero et al. und Gil-Guzman et al. konnten zeigen, dass die Höhe der ROS-Produktion negativ mit dem Anteil der Normalform im Ejakulat korreliert (Gil-Guzman, 2001; Ollero, 2001). Daraus ergibt sich, dass die Höhe der ROS-Bildung einen Einfluss auf die Motilität, die Morphologie und die Konzentration der Spermien besitzt. Ebenfalls werden Spermien ROS im Nebenhoden ausgesetzt, die von Leukozyten und unreifen Spermien gebildet werden oder aufgrund einer fehlerhaften Mitochondrienfunktion entstehen (Shamsi et al., 2011).

Interessanterweise enthält Seminalplasma verschiedene Antioxidantien, wie z.B. die Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und nicht-enzymatische Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Coenzym Q10, Glutathion und Urat, die zu einer Verminderung von ROS beitragen können (Aitken und De Iuliis, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der antioxidativen Kapazität eine Rolle bei Infertilität spielt (Smith et al., 1996).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hypoxie zu einer überschießenden ROS-Produktion führt, was wiederum oxidativen Stress in den Spermien und ihren Vorläuferzellen auslöst und diese schädigt (Kulshreshtha et al., 2007; Aitken und De Iuliis, 2010). Bei Hypoxie wird die Expression von HIF-1 α stabilisiert, was eine verstärkte Transkription der miR-210 induziert (Kulshreshtha et al., 2007). Somit könnte es möglich sein, dass die miR-210-Expression im Seminalplasma ein Spiegelbild für Fertilitätsstörungen und damit möglichen abnormalen Ejakulatparametern aufgrund von oxidativem Stress unklarer Genese darstellt.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass nichtsignifikante Unterschiede in der miR-210-Expression zwischen den verschiedenen Gruppen bestehen. Auch die Höhe der miR-210-Expression verhält sich teilweise entgegengesetzt von den in der Literatur beschriebenen Effekten der Hypoxie auf die Fertilität. U. a. konnten wir eine niedrigere

Expression der miR-210 bei Azoospermie im Vergleich zur Normozoospermie nachweisen. Bei Oligozoospermie lag die Expression im Vergleich zur Normozoospermie wieder höher, was in Einklang mit der oben erwähnten Literatur steht. Auch bei der progressiven Motilität und Morphologie zeigte sich kein Zusammenhang zur microRNA-Expression.

In der microRNA-Array-Analyse zeigte sich eine zum größten Teil schwache Expression bei Normozoospermie und Oligozoospermie der miR-210, was mit unseren qRT-PCR-Ergebnissen übereinstimmt. Bei Azoospermie zeigte sich keine Expression der miR-210 was im Gegensatz zu den Ergebnissen mittels qRT-PCR steht. Die Diskrepanz ist wie auch bei der miR-143 möglicherweise mit der geringen Spezifität der Arrays und der kleinen Gruppe vermessener Seminalplasma-Proben (n=3) zu erklären.

5.3.3 MiR-375

In eigenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass die miR-375 in vivo Androgen-abhängig reguliert wird. Genauer konnte gezeigt werden, dass die miR-375-Expression in den Fettzellen bei Adipogenese hochreguliert wird und sich unter Androgenbehandlung signifikant verringert (Kraus et al., 2015).

Interessanterweise konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die miR-375-Transkriptionsaktivität in Prostatakarzinom-Zelllinien vom Androgenrezeptor abhängig ist, jedoch ist der genaue Mechanismus unbekannt (Tiryakioglu et al., 2013; Chu et al., 2014; Costa-Pinheiro et al., 2015). Chu et al. konnten nachweisen, dass in Androgen-positiven Prostata-Karzinomzellen die miR-375-Expression erhöht ist und negativ mit dem Methylierungsstatus des miR-375-Promotors assoziiert ist. In Androgen-negativen Karzinomzellen ergibt sich ein gegenteiliges Bild: Die miR-375-Expression ist erniedrigt und der Promotor hypermethyliert (Chu et al., 2014).

Eine Assoziation der Expression dieser microRNA zur Androgen-abhängigen Spermatogenese liegt somit nahe, es könnten sich Unterschiede bei einem abnormalen Spermogramm bzw. einzelnen Spermienvariablen in der miR-375-Expression ergeben.

In unserer Arbeit konnten wir eine gut detektierbare Expression der miR-375 in einem Großteil des Kollektivs nachweisen. Bei der quantitativen miR-375-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR konnte keine Korrelation mit der Motilität, Morphologie und Konzentration der Spermien gezeigt werden. Beim Vergleich der Samenqualitäten war ein Trend zu erkennen, der jedoch statistisch nicht signifikant ausfällt (p=0,06). Dieses Ergebnis kommt durch die starke Expressionsdifferenz zwischen Oligozoospermie und

Oligoasthenozoospermie zustande und ist wenig aussagekräftig, zumal eine weitergehende Post-Hoc-Analyse zwischen diesen beiden Gruppen negativ ausfällt.

In der microRNA-Array-Analyse zeigte sich makroskopisch eine homogene Expression der miR-375 in allen drei untersuchten Seminalplasma-Proben. Das steht im Einklang zu den in der qRT-PCR gemessenen Ergebnissen.

5.4 Ergebnisse der microRNA-Expression mittels qRT-PCR in Bezug auf andere Studien

In den letzten Jahren wurde die Rolle von microRNAs im Kontext der männlichen Infertilität im Hodengewebe, in Spermien und im Seminalplasma genauer untersucht. In diesem Abschnitt werden die Studien systematisch dargestellt und mit den hier vorliegenden Ergebnissen verglichen.

Lian et al. untersuchten menschliches Hodengewebe und stellten fest, dass die miR-302a und miR-491-3p hoch- und die miR-520d-3p und miR-383 bei Azoospermie im Vergleich zur Normozoospermie herunterreguliert waren (Lian et al., 2009). Abu-Halima et al. konnten eine microRNA-Dysregulation (u.a. miR-34b und miR-429) in Hodenbiopsaten feststellen, als sie Probanden mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Azoospermie miteinander verglichen (Abu-Halima et al., 2014).

Ebenfalls führten Abu-Halima et al. Versuche mit Spermien durch. Sie stellten fest, dass verschiedene microRNAs (u.a. miR-122, miR-34b, miR-16, miR-200a, miR-141) bei Normozoospermie, Asthenozoospermie und Oligoasthenozoospermie dysreguliert waren (Abu-Halima et al., 2013). Hierbei sei auf die kleine Patientenzahl mit je 9 Patienten pro Subgruppe hingewiesen. In einer weiteren Untersuchung aus dem Jahre 2014 beim Vergleich der microRNA-Expression zwischen normwertigen und abnormalen Spermioogrammen war es ihnen möglich eine Vorhersage zum Fertilitätsstatus aus der Kombination fünf verschiedener microRNAs (miR-34b*, miR-34b, miR-34c-5p, miR-122 und miR-429) zu berechnen, die mit einer Genauigkeit von 98,65 % beziffert wird (Abu-Halima et al., 2014).

Liu et al. fand mittels microRNA-Arrays 11 signifikant überexprimierte microRNAs in Spermien bei infertilen Männern; bei der qRT-PCR-Analyse zeigten sich davon nur noch 7 überexprimiert und 6 unterexprimiert im Vergleich zur Normozoospermie (Liu et al., 2012). Wie auch in unserer Arbeit zeigten sich Diskrepanzen zwischen der microRNA-Array-Analyse und der Untersuchung mittels qRT-PCR. Eine mögliche Erklärung könnte

die geringere Spezifität der microRNA-Arrays im Vergleich zu qRT-PCR, die den Goldstandard darstellt, sein.

Die aufgeführten Studien sind durch die Verwendung unterschiedlicher biologischer Ausgangsmaterialien mit unserer Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar. Der Vorteil bei der Untersuchung von microRNAs im Seminalplasma statt in Spermien ist, dass auch eine Aussage bei Azoospermie (keine Spermien im Ejakulat) möglich wird. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur eine Handvoll Studien, die sich mit der microRNA-Expression im Seminalplasma bei männlicher Infertilität beschäftigen:

Wang et al. untersuchte das Seminalplasma bei nicht-obstruktiver Azoospermie und Asthenozoospermie auf die Expression der microRNAs miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p und miR-513-1-5p und stellte fest, dass diese bei Azoospermie alle signifikant erniedrigt und bei Asthenozoospermie alle erhöht waren (Wang et al., 2011). Interessanterweise ergibt sich bei unserer Auswertung nach Samenqualität ein identisches Verhalten der Expression bei der miR-143, miR-210, miR-375, wenn man nur die Gruppen Normozoospermie, Asthenozoospermie und Azoospermie betrachtet. Die Differenzen in der Expression erreichen jedoch im Gegensatz zu Wang et al. kein Signifikanzniveau.

Die Arbeitsgruppe um Wu et al. führte zwei Studien mit Seminalplasma durch. 2012 untersuchten sie die Expression der miR-19b-3p und let-7a-5p bei Normozoospermie, Oligozoospermie und nicht-obstruktiver Azoospermie. Die miR-let-7a-5p zeigte sich signifikant erhöht bei Infertilität; die miR-19b-3p nur bei nicht-obstruktiver Azoospermie (Wu et al., 2012). 2013 fand die Arbeitsgruppe heraus, dass Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie tendenziell eine höhere microRNA-Expression (miR-141, miR-141-3p, miR-193a-5p, miR-20a, miR-429, miR-572, miR-590-5p und miR-7-1-3p) zeigen, jedoch erreichten nur einige statistische Signifikanz (Wu et al., 2013).

An diesen Beispielen zeigt sich die Heterogenität der microRNA-Expression in Bezug auf männliche Infertilität. In unserer Arbeit konnten wir in Übereinstimmung mit der Literatur unterschiedliche Expressionen der microRNA zwischen normwertigen und abnormalen Ejakulatparametern ausmachen, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Auch die Diskrepanzen zwischen der microRNA-Array-Analyse in Vergleich zu den Ergebnissen der qRT-PCR traten in unserer Arbeit auf.

5.5 Abschließende Betrachtungen

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass das spezifische microRNA-Expressionsprofil im Seminalplasma eines Individuums in Assoziation mit abnormalen Ejakulatparametern steht.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Datenlage zur microRNA-Expression im Seminalplasma gering, sodass diese Arbeit eine Analyse der Anwendbarkeit für spätere Untersuchungen darstellen soll. Ebenfalls wurden die microRNAs miR-143, miR-210 und miR-375 in diesem Kontext vorher noch nie untersucht, was zwar eine direkte Vergleichbarkeit schwierig macht, aber bis dato einzigartig ist.

Zum Vorliegen von zirkulierenden microRNAs im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten existiert die Theorie, dass microRNAs mittels Exozytose von verschiedenen Zellen (einschließlich Spermien) ins Serum gelangen. Die exosomal gebundenen microRNAs könnten dann von den anderen Zellen aufgenommen werden und deren zellulären Phänotyp unterschiedlich stark beeinflussen. Damit könnten microRNAs theoretisch eine hormon-ähnliche Funktion erfüllen (Cortez et al., 2011).

Ebenfalls ist unklar, welcher Teil des männlichen Geschlechtstraktes welche microRNAs sezerniert und wie hoch diese Sekretion ist (Hu et al., 2014). Ejakulat entsteht erst zum Zeitpunkt der Ejakulation und ist eine Mischung aus Sekreten verschiedener Organe (Hu et al., 2014). Bei der Prostata-spezifischen miR-143 und der Androgen-regulierten miR-375 wird die Prostata wahrscheinlich die größte Menge an microRNAs sezernieren, da sie zusammen mit den akzessorischen Drüsen ca. 90% des Ejakulatvolumens produziert. Wo und wie viel der Hypoxie-assoziierten miR-210 im männlichen Geschlechtstrakt sezerniert wird, lässt sich nur mit weiteren Untersuchungen klären. Hu et al. gehen davon aus, dass speziell microRNAs, die spezifisch im Hoden oder Nebenhoden exprimiert werden, am besten geeignet sind um Fertilitätsstörungen aufzudecken, auch wenn diese Organe nur 10% des Ejakulatvolumens beisteuern. Da die in unserer Arbeit untersuchten microRNAs Prostata-spezifisch, Hypoxie-assoziiert bzw. Androgen-reguliert sind, könnte das eine mögliche Erklärung für die wenig aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich des Vorhandenseins eines abnormalen Ejakulates darstellen (Hu et al., 2014).

Eine Stärke unserer Arbeit ist, dass wir insgesamt sechs Subgruppen untersucht haben, was bis dato einzigartig ist. Andererseits hätte eine größere Anzahl an Männern in den einzelnen Subgruppen eine bessere Aussagekraft ermöglicht und möglicherweise hätten statistische Effekte besser nachgewiesen werden können. Im Vergleich ist unsere Arbeit

mit 94 analysierten Fällen im zu anderen Studien (z.B. Wang, 2004; Yan, 2007; Lian, 2009), in denen teilweise sehr kleine Kollektive (z.B. n=5) untersucht wurden, als überdurchschnittlich anzusehen.

Ein weiterer Punkt ist, dass trotz mehrmaliger Versuche in mehreren Proben kein Nachweis über eine microRNA-Expression erbracht werden konnte, sodass hier möglicherweise in der Auswertung Unterschiede in der microRNA-Expression nicht genügend zur Geltung kommen.

Am Rande sei darauf hingewiesen, dass das Spermogramm immer nur eine Momentaufnahme zeigt und eine eingeschränkte Fertilität des Mannes durch eine gesunde Partnerin kompensiert werden kann (Garrido et al., 2008). In unserem Kollektiv befinden sich Probanden, die keine Kinder gezeugt bzw. keinen Kinderwunsch haben, sodass eine Aussage über die microRNA-Expression in Bezug zur Fertilität nicht getroffen werden kann. Auch wenn wir keine Assoziation zwischen der microRNA-Expression und abnormalen Ejakulatparametern gefunden haben, ist es denkbar, dass die microRNA-Expression einen übergeordneten Faktor darstellt, der indirekt mit der Fertilität eines Mannes in Verbindung steht. Hinzu kommt, dass wir nur eine eingeschränkte Auswahl von microRNAs untersucht haben, sodass die Aussage dieser Arbeit sich lediglich auf die miR-143, miR-210 und miR-375 beschränkt.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Arbeit Unterschiede in der microRNA-Expression bei eingeschränkten Ejakulatparametern im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, jedoch befanden sich die Unterschiede im nichtsignifikanten Bereich. Die Diskrepanz der Expression der miR-143 und miR-210 in den microRNA-Arrays zur qRT-PCR ist sehr wahrscheinlich auf die geringere Spezifität der Arrays im Vergleich zur qRT-PCR und die geringe Probenanzahl (n=3) zurückzuführen. Auch in anderen Arbeiten (Liu et al, 2012) trat dieses Phänomen auf. Auch wenn die Array-Analyse einen schnellen Überblick über die globale microRNA-Expression im Seminalplasma bieten kann, so bleibt der Goldstandard für die Analyse eines validen microRNA-Markerpanels in einem größeren Kollektiv die qRT-PCR.

5.6 Ausblick

In der Literatur wurden verschiedenen microRNAs beschrieben, die eine Zuordnung zum Fertilitätsstatus erlauben und auch die Berechnung aus einer Kombination verschiedener microRNAs soll die Fertilität mit hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen können (Abu-Halima et al., 2014). Verschiedene Arbeiten konnten auch zeigen, dass

microRNAs für längere Zeit stabil bleiben und konstant im Seminalplasma exprimiert werden, was sie zu einem idealen Biomarker macht (Huang et al., 2009; Wu et al., 2013). Ebenfalls ist der einfache, nichtinvasive Zugang zu Seminalplasma günstig.

Trotz der wenig überzeugenden Ergebnisse bezüglich einer Assoziation der microRNA-Expression und abnormalen Ejakulatparametern, kann diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für die zukünftige Forschung leisten. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir zeigen, dass Unterschiede im microRNA-Expressionsprofil bei abnormalen Spermienvariablen bestehen, jedoch bleiben die zu Grunde liegenden Mechanismen unklar. Es sind weitere Studien notwendig, um die Rolle der microRNA-Expression im Seminalplasma zu ergründen und den Zusammenhang zu abnormalen Spermienvariablen und männlicher Infertilität zu identifizieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

10-15% aller Paare weltweit sind ungewollt kinderlos. In ca. der Hälfte der Fälle liegt die Ursache beim Mann. Die Ursache männlicher Infertilität bleibt bei ca. 10% Männern ungeklärt, sodass man von einer idiopathischen Infertilität spricht.

MicroRNAs sind kleine, nichtkodierende RNAs endogenen Ursprungs, die in der Lage sind, die intrazelluläre Transkription verschiedener Gene zu regulieren. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Datenlage bezüglich der microRNA-Expression im Ejakulat und ihrer Assoziation zu einem abnormalen Spermogramm schwach. Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation von bestimmten microRNAs im Seminalplasma in Zusammenhang mit abnormalen Ejakulatparametern zu untersuchen.

Das Kollektiv (n=94) setzte sich aus sechs verschiedenen Gruppen zusammen, die nach den Kriterien der WHO von 2012 klassifiziert wurden: Normozoospermie (n=50), Azoospermie (n=7), Oligozoospermie (n=11), Asthenozoospermie (n=13), OAT (n=8) und Oligoasthenozoospermie (n=5).

Im ersten Schritt erfolgte eine microRNA-Array-Untersuchung von drei Männern, diagnostiziert mit je Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie. Dabei zeigten sich makroskopische Expressionsunterschiede.

Im zweiten Schritt wurden drei interessante Kandidaten-microRNAs, u.a. miR-143 (Prostata-spezifisch), miR-210 (Hypoxie-assoziiert) und miR-375 (Androgen-reguliert) mittels qRT-PCR am gesamten Kollektiv vermessen und zu klinischen Spermienvariablen korreliert. Für die microRNA-Expression mittels qRT-PCR konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu klinischen Parametern wie Spermienkonzentration, Samenqualität, progressiver Spermienmotilität und Morphologie gefunden werden.

Trotz der wenig überzeugenden Ergebnisse bezüglich des Zusammenhanges der microRNA-Expression und idiopathischer männlicher Infertilität, kann diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für die zukünftige Forschung leisten. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir zeigen, dass Unterschiede im microRNA-Expressionsprofil bei abnormalen Spermienvariablen bestehen, jedoch bleiben die zu Grunde liegenden Mechanismen unklar. Es sind weitere Studien notwendig, um die Rolle der microRNA-Expression im Seminalplasma zu ergründen und den Zusammenhang zu abnormalen Spermienvariablen und männlicher Infertilität zu identifizieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C (2013) Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertility and sterility* 99: 1249-1255.e16.

Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, Keller A, Meese E (2014) Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertility and sterility* 102: 989-997.e1.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 79: 829–843.

Aitken RJ, De Iuliis, G N (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction* 16: 3–13.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 5003–5008.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.

Bergmann M (2005) Spermatogenese. *Physiologie und Pathophysiologie. Der Urologe. Ausg. A* 44: 1131-2, 1134-8.

Blumenauer V, Czeromin U, Fiedler K, Gnoth C, Happel L, Krüssel JS, Kupka MS, Tandler-Schneider A (2014) *DIR Annual 2013 - German IVF-Registry. J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 11: 236–273.

Braun RE (1998) Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 9: 483–489.

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J (2008) hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 1340–1348.

Chakraborty J, Hikim AP, Jhunjhunwala JS (1985) Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. *Journal of andrology* 6: 117–126.

Chu M, Chang Y, Li P, Guo Y, Zhang K, Gao W (2014) Androgen receptor is negatively correlated with the methylation-mediated transcriptional repression of miR-375 in human prostate cancer cells. *Oncology reports* 31: 34–40.

Clapé C, Fritz V, Henriquet C, Apparailly F, Fernandez PL, Iborra F, Avancès C, Villalba M, Culine S, Fajas L (2009) miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PloS one* 4: e7542.

Cooke HJ, Saunders, Philippa T K (2002) Mouse models of male infertility. *Nature reviews. Genetics* 3: 790–801.

Cooper, TG, Yeung, CH (2009) 3. Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hgg.) *Andrologie; Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Medizin, Heidelberg, S. 64-82.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA (2011) MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews. Clinical oncology* 8: 467–477.

Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Vieira FQ, Torres-Ferreira J, Oliveira J, Gonçalves CS, Costa BM, Henrique R, Jerónimo C (2015) MicroRNA-375 plays a dual role in prostate carcinogenesis. *Clinical epigenetics* 7: 42.

Depping R, Hägele S, Wagner KF, Wiesner RJ, Camenisch G, Wenger RH, Katschinski DM (2004) A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 alpha specifically expressed in human testis. *Biology of Reproduction* 71: 331–339.

Fabian MR, Sonenberg N (2012) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* 19: 586–593.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics* 9: 102–114.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current opinion in structural biology* 15: 331–341.

Garrido N, García-Herrero S, Meseguer M (2013) Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertility and sterility* 99: 1008–1022.

Garrido N, Remohí J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M (2008) Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reproductive biomedicine online* 17: 855–865.

Gelmann EP (2002) Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology* 20: 3001–3015.

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R (2004) The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development* 18: 2183–2194.

- Gil-Guzman E (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* 16: 1922–1930.
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würll P, Taubert H (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int. J. Cancer* 126: 73–80.
- Greither T, Würll P, Grochola L, Bond G, Bache M, Kappler M, Lautenschläger C, Holzhausen H, Wach S, Eckert AW, Taubert H (2012) Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 130: 1230–1235.
- Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic acids research* 32: D109-11. Online verfügbar unter www.mirBase.org, letzter Zugriff am 27.07.2015.
- Gupta A, Mahdi AA, Ahmad MK, Shukla KK, Jaiswer SP, Shankhwar SN (2011) ¹H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54: 106–113.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL (2001) Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England journal of medicine* 345: 1388–1393.
- Hart M, Nolte E, Wach S, Szczyrba J, Taubert H, Rau TT, Hartmann A, Grässer FA, Wullich B (2014) Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR* 12: 250–263.
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522–531.
- Hu L, Wu C, Guo C, Li H, Xiong C (2014) Identification of microRNAs predominately derived from testis and epididymis in human seminal plasma. *Clinical biochemistry* 47: 967–972.
- Huang S, Li H, Ding X, Xiong C (2009) Presence and characterization of cell-free seminal RNA in healthy individuals: implications for noninvasive disease diagnosis and gene expression studies of the male reproductive system. *Clinical chemistry* 55: 1967–1976.
- Ivan M, Harris AL, Martelli F, Kulshreshtha R (2008) Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. *Journal of cellular and molecular medicine* 12: 1426–1431.
- Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE (2008) The metabolic syndrome and male infertility. *Journal of andrology* 29: 251–259.

- Kraus M, Greither T, Wenzel C, Braeuer-Hartmann D, Wabitsch M, Behre HM (2015) Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375. *Molecular and cellular endocrinology*.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* 37: 495–500.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu C, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology* 27: 1859–1867.
- Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115: 787–798.
- Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun F (2009) Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 7: 13.
- Liu T, Cheng W, Gao Y, Wang H, Liu Z (2012) Microarray analysis of microRNA expression patterns in the semen of infertile men with semen abnormalities. *Molecular medicine reports* 6: 535–542.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25: 402–408.
- Ma W, Tessarollo L, Hong S, Baba M, Southon E, Back TC, Spence S, Lobe CG, Sharma N, Maher GW, Pack S, Vortmeyer AO, Guo C, Zbar B, Schmidt LS (2003) Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer research* 63: 5320–5328.
- Max B (1992) This and That: hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. *Trends in Pharmacological Sciences* 13: 272–276.
- Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I (2010) Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases* 16: 34–38.
- Natali A, Turek PJ (2011) An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology* 77: 1027–1034.
- Nieschlag, E (2009) 1. Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hgg.) *Andrologie; Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Medizin, Heidelberg, S. 4-12.
- Okada H, Tajima A, Shichiri K, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I (2008) Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates ART3 in genetic susceptibility. *PLoS genetics* 4: e26.

- Ollero M (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction* 16: 1912–1921.
- Pacey AA (2012) Male fertility and infertility in 2011 and beyond. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 22: 16–20.
- Schill T, Strik D, Germer U (2000) In: 5. Sterilität und Infertilität. In: Diedrich, K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KT, Weiss, JM (Hgg.) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer, Berlin, S.103-104.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 3: 721–732.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada R (2011) Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics* 28: 1073–1085.
- Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835–850.
- Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson A, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J (2006) Is human fecundity declining? *International journal of andrology* 29: 2–11.
- Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E (1996) Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human reproduction (Oxford, England)* 11: 1655–1660.
- Szczyrba J, Löprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, Grobholz R, Wieland W, Stöhr R, Hartmann A, Wullich B, Grässer F (2010) The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research: MCR* 8: 529–538.
- Tiryakioglu D, Bilgin E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U (2013) miR-141 and miR-375 induction and release are different from PSA mRNA and PCA3 upon androgen stimulation of LNCaP cells. *Biomedical reports* 1: 802–806.
- Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 270: 1230–1237.
- Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, Li L, Wang J, Li X, Shao Y, Liu Y, Ji J, Zhang J, Zen K, Zhang C, Zhang C (2011) Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical chemistry* 57: 1722–1731.

Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni E, Nieschlag E (2009) 2. Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hgg.) *Andrologie; Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Medizin, Heidelberg, S. 16-56.

World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* - 5th ed. Geneva, CH: World Health Organization, 2012.

Wu W, Hu Z, Qin Y, Dong J, Dai J, Lu C, Zhang W, Shen H, Xia Y, Wang X (2012) Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Molecular human reproduction* 18: 489–497.

Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, Guo X, Zhao Y, Zhu Y, Zhang W, Hang B, Sha J, Shen H, Xia Y, Hu Z, Wang X (2013) Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Human reproduction (Oxford, England)* 28: 1827–1836.

Yadav RP, Kotaja N (2014) Small RNAs in spermatogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 382: 498–508.

Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, Ma Y (2007) A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction (Cambridge, England)* 134: 73–79.

Zalata A, Hafez T, Comhaire F (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction* 10: 1444–1451.

THESEN

- 1) Ziel dieser Arbeit war es, das Vorliegen einer Assoziation zwischen der microRNA-Expression im Seminalplasma und abnormalen Ejakulatparametern zu untersuchen.
- 2) Bei der qualitativen microRNA-Array-Untersuchung des Seminalplasmas von drei Männern mit je einmal Normozoospermie, Oligozoospermie und Azoospermie ließen sich makroskopische Unterschiede im Expressionsprofil detektieren.
- 3) Für die qRT-PCR wurde die miR-143 als Prostata-spezifische microRNA, die miR-210 als Hypoxie-assoziierte microRNA in Zusammenhang mit oxidativen Stress und die miR-375 als Androgen-regulierte microRNA als wahrscheinliche Kandidaten ausgewählt.
- 4) Für die quantitative microRNA-Expression mittels qRT-PCR konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu klinischen Ejakulatparametern wie Spermienkonzentration, Samenqualität, progressiver Spermienmotilität und Morphologie gefunden werden.
- 5) Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der microRNA-Expression im Seminalplasma zu analysieren und das Potential als Marker in Ergänzung zum Spermogramm in der Diagnostik der männlichen Infertilität zu eruieren.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicoletta Nalazek
Familienstand	ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdaten	12. Februar 1989 in Berlin

Ausbildung

Studium

05/2015	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: „sehr gut“)
09/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: „gut“)
10/2010 - 05/2015	Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg Studium der Humanmedizin
09/2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: „gut“)
10/2008 - 09/2010	Heinrich–Heine-Universität Düsseldorf Studium der Humanmedizin

Praktisches Jahr

1. Tertial:	Innere Medizin im Kantonsspital Winterthur, Schweiz
2. Tertial:	Strahlentherapie im Universitätsklinikum Halle
3. Tertial:	Chirurgie im Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau

Schulausbildung

2001 – 2008	Gabriele-von-Bülow-Gymnasium, Abitur
2005 – 2006	Cicero North Syracuse High School, NY, USA
1997 – 2001	Grundschule am Tegelschen Ort
1995 – 1997	Paul-Klee-Grundschule

Promotion

seit 2011 – 2016	Promotion im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universitätsklinik Halle zum Thema: "Nachweis und Rolle von microRNAs im Seminalplasma als Faktoren des unerfüllten Kinderwunsches"
------------------	---

Nicoletta Nalazek, Halle/Saale, den 01.12.2015

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials und Erstellung des Manuskripts haben mich folgende Personen unterstützt: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre und Dr. Thomas Greither. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Nicoletta Nalazek, Halle/Saale, den 01.12.2015

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass bei mir keine früheren Promotionsversuche vorliegen.

Nicoletta Nalazek, Halle/Saale, den 01.12.2015

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen meinen Dank aussprechen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erste Stelle möchte ich **Herrn Professor Behre** für die Überlassung des Themas und die konstruktive Begleitung bis zur Fertigstellung der Arbeit danken. Im Besonderen danke ich Ihm für die Ermöglichung zur Teilnahme an zahlreichen Kongressen.

Mein besonderer Dank geht auch an **Herrn Dr. Thomas Greither** für die engagierte Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit, seine Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei **Frau Constanze Kloß** möchte ich mich für die Aufbereitung und Analyse der Ejakulatproben bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei **Maria Giebler, Sindy Pelka und Matthias Kraus** aus unserer **Arbeitsgruppe** bedanken; eine bessere Atmosphäre hätte man sich kaum wünschen können!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei der **Familie Medenwald** bedanken. **Herrn Dr. Daniel Medenwald** aus dem Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik danke ich für die kompetente statistische Beratung. Ebenso bedanke ich mich bei **Frau Dr. Katharina Medenwald**, die mich in meiner nicht immer leichten Zeit des Schreibens der Arbeit begleitet hat, für ihre Geduld und ihre Aufmunterungen.

Bei **Sebastian Gottschling** möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die Hilfe bei der Erstellung des Layouts bedanken.

Meinen guten Freundinnen **Ines Hirschbil** und **Magdalena Thomas** danke ich für ihre Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte.

Sehr dankbar bin ich auch meiner **Mutter Mariola**, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit sehr unterstützt hat.