

Rolle der humanen *PIWIL*-Gene bei der Spermatogenese und der männlichen Infertilität

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg



vorgelegt

von Frau Dipl. Biochem. Maria Giebler

geboren am 20.10.1985 in Gardelegen

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre
2. PD Dr. rer. nat. habil. Stephan König
3. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

Tag der mündlichen Verteidigung: 26.04.2018

Für meine Eltern

Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.

(Enrico Fermi)

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	
1	Einleitung.....	1
1.1	Männliche Infertilität.....	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Diagnose.....	2
1.1.3	Therapie.....	3
1.2	Humane Spermatogenese.....	4
1.2.1	Männliche Keimzellentwicklung.....	4
1.2.2	Endokrine Regulation.....	6
1.2.3	<i>De novo</i> DNA-Methylierung.....	7
1.3	Die <i>PIWIL</i> -Genfamilie.....	9
1.3.1	Stammzellselbsterneuerung und Spermatogenese.....	12
1.3.2	piRNAs.....	13
1.3.3	Stilllegen von Retrotransposonen.....	15
1.3.4	Nicht-gonadale Funktion der <i>PIWIL</i> -Gene.....	17
1.4	Zielstellung.....	18
2	Material.....	20
2.1	Patientenproben.....	20
2.2	Prokaryoten.....	21
2.3	Eukaryoten.....	21
2.4	Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.5	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.6	Laborgeräte.....	24
2.7	Kits.....	25
2.8	Enzyme.....	26

2.9	Vektoren	27
2.10	Oligonukleotide	27
2.11	Antikörper.....	29
2.12	Puffer, Lösungen, Medien	29
2.12.1	Zellkultivierung.....	29
2.12.2	Bakterienkultivierung.....	30
2.12.3	DNA-Laufpuffer	31
2.12.4	Proteinisolation	31
2.12.5	Westernblot	31
2.13	verwendete Software	32
3	Methoden.....	34
3.1	Zellbiologische Methoden	34
3.1.1	Zellkultivierung und Kryokonservierung	34
3.1.2	Transfektion von Zellen.....	35
3.1.2.1	Transiente Transfektion von Vektoren	35
3.1.3	5'-Aza-2-Desoxycytidin-Behandlung	36
3.1.4	Zellvitalitätstest.....	37
3.1.5	MTT-Test	38
3.1.6	Proliferations- <i>assay</i> (Zellzählung).....	38
3.1.7	Caspase- <i>assay</i>	39
3.1.8	Durchflusszytometrische Sortierung von GFP-positiven Zellen.....	39
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	DNA Isolation.....	40
3.2.2	RNA Isolation.....	41
3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
3.2.4	Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA.....	41

3.2.5	DNA-Methylierung <i>in vitro</i>	43
3.2.6	<i>Genome editing</i> mit dem CRISPR/Cas9-System	43
3.2.7	Detektion von Mutationen in genomischer DNA.....	45
3.2.8	cDNA-Synthese	46
3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
3.2.10	<i>Quantitative Real-Time-PCR (Maxima SYBRGreen)</i>	48
3.2.11	<i>Quantitative Real-Time-PCR (TaqMan)</i>	49
3.2.12	Promotorstudien	50
3.2.13	Agarosegelelektrophorese	50
3.2.14	Restriktionsverdau	51
3.2.15	Isolation von DNA aus Agarosegelen	51
3.2.16	Ligation mittels Topoisomerase-Thymin-Adenin-Klonierung (<i>TOPO-TA Cloning Kit</i>)	51
3.2.17	Ligation mittels T4-DNA-Ligase	52
3.2.18	Transformation.....	52
3.2.19	Kontrolle der Klonierung durch Kolonie-PCR.....	52
3.2.20	Übernachtskultivierung von transformierten <i>E. coli</i> -Zellen	53
3.2.21	Isolation von Plasmid-DNA.....	53
3.2.22	Sequenzierung nach Sanger	53
3.2.23	Dualer Reporter-gen- <i>assay</i>	54
3.2.24	Mikroarray-Analysen.....	55
3.2.24.1	<i>Affymetrix Clariom™ S Assay</i>	56
3.2.24.2	Herstellung der ss-cDNA-Sonden.....	56
3.2.24.3	Hybridisierung.....	57
3.2.24.4	Auswertung der Daten und Transkriptomanalyse.....	58
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	59
3.3.1	Proteinisolation aus Zellkulturen mittels RIPA-Lysepuffer	59

3.3.2	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	59
3.3.3	Western Blot	59
3.3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	59
3.3.3.2	Transfer	60
3.3.3.3	Ponceau-S-Färbung.....	60
3.3.3.4	Immunodetektion	60
3.3.4	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	61
3.3.4.1	Herstellung von biotinylierten Oligonukleotidsonden	61
3.3.4.2	Gewinnung von Kern- und Cytoplasmaextrakten aus Zellkultur	62
3.3.4.3	Bindungsreaktion und Gelelektrophorese.....	62
3.3.4.4	Blotting und Detektion.....	62
3.3.5	Statistik.....	63
4	Ergebnisse	64
4.1	Analyse der mRNA-Expression der <i>PIWIL</i> -Gene innerhalb der Probandenkohorte .	64
4.1.1	Beschreibung der Studienkohorte	64
4.1.2	mRNA-Expression der <i>PIWIL</i> -Gene in ejakulierten Spermatozoen.....	65
4.1.3	mRNA-Expression der <i>PIWIL</i> -Gene und klinische Merkmale.....	66
4.1.4	mRNA-Expression der <i>PIWIL</i> -Gene und Spermiencharakteristika.....	66
4.2	Epigenetische Untersuchungen der <i>PIWIL</i> -Gene	68
4.2.1	Untersuchung der zelllinienspezifischen <i>PIWIL</i> -Gen-Expression.....	68
4.2.2	<i>In silico</i> Analyse der potentiellen Promotoren der Gene <i>PIWIL1-4</i>	69
4.2.3	Untersuchung der basalen Methylierungsmuster der Gene <i>PIWIL1-4</i>	71
4.2.4	Regulation der Expression der humanen <i>PIWIL</i> -Gene <i>1-4</i>	73
4.2.5	Einfluss von 5-Aza-2'-Desoxycytidin auf die <i>PIWIL</i> -Promotormethylierung.....	75
4.2.6	Funktionelle Analyse der Promotoren der humanen <i>PIWIL</i> -Gene	76
4.2.7	Analyse des <i>PIWIL2</i> -Promotorbereiches auf Transkriptionsfaktorbindestellen	78

4.2.8	DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des <i>PIWIL2</i> -Gens	79
4.3	Stabiler <i>knockdown</i> der Gene <i>PIWIL1</i> bzw. <i>PIWIL2</i> mittels CRISPR/Cas9-System	81
4.3.1	Nachweis des genomischen <i>knockdown</i> auf DNA-Ebene	81
4.3.2	Nachweis des stabilen <i>knockdown</i> der Gene <i>PIWIL1</i> bzw. <i>PIWIL2</i> auf mRNA- und Proteinebene.....	83
4.3.3	Mikroarray-Analysen in den Zelllinien NT2/D1 bzw. TCam-2 nach stabilem <i>knockdown</i> der Gene <i>PIWIL1</i> bzw. <i>PIWIL2</i>	86
4.3.4	Ontologische Zuordnung der differentiell exprimierten Gene	89
4.3.5	Validierung der in der Mikroarray-Analyse ermittelten Gene über qRT-PCR....	91
4.3.6	Zellfunktionelle Konsequenzen des <i>knockdown</i> der Gene <i>PIWIL1</i> bzw. <i>PIWIL2</i>	94
5	Diskussion.....	96
5.1	mRNA-Expression der <i>PIWIL</i> -Gene in ejakulierten Spermatozoen	96
5.2	Epigenetische Regulation der <i>PIWIL</i> -Genexpression	99
5.3	Stabiler <i>knockdown</i> der Gene <i>PIWIL1</i> bzw. <i>PIWIL2</i>	104
5.4	Modell zur Funktion der <i>PIWIL</i> -Gene in humanen Keimzellen	116
6	Zusammenfassung.....	118
7	Literaturverzeichnis.....	120
8	Anhang	132

Abkürzungen und Symbole

$2^{-\Delta\text{ct}}$	relative Expressionsrate
3'UTR	3' untranslatierte Region
5AzadC	5'-Aza-2-Desoxycytidin
5'UTR	5' untranslatierte Region
ad	addiere, auffüllen bis
AGO	<i>argonaute</i>
ART	assistierte Reproduktionstechnik
bidest.	zweifachdestilliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAS	CRISPR-assoziiert
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-KIT	<i>tyrosine protein kinase kit</i> (EC 2.7.10.1)
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
cT	<i>cycle threshold</i>
CT	<i>cancer/testis</i>
DAZL	<i>deleted in azoospermia-like</i>
ddNTP	Didesoxynukleotid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease (EC 3.1.21.1)
DND1	<i>dead end protein homolog 1</i>
DNMT	DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferase (EC 2.1.1.37)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPPA3	<i>developmental pluripotency-associated protein 3</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>

EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
<i>fw/rv</i>	<i>forward/reverse</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormone</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
HAND1	<i>heart and neural crest derivatives expressed protein 1</i>
HDR	<i>homology directed repair</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (EC 2.4.2.8)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (EC 1.11.1.7)
Hs	<i>Homo sapiens</i>
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
KD	<i>knockdown</i>
LB	<i>Luria Broth</i> mikrobielles Wachstumsmedium
LH	Luteinisierendes Hormon
LINE	<i>long interspersed nucleotide elements</i>
Me	methyliert
MeOH	Methanol
MES	2-(N -Morpholino)ethansulfonsäure
MID	<i>middle</i>
mio	Millionen
miRNA	<i>micro RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NANOS3	<i>nanos C2HC-type zinc finger protein 3</i>
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>
NHEJ	<i>nonhomologous endjoining</i>
nt	Nukleotid

ORF	<i>open reading frame</i>
PAM	<i>protospacer</i> -assoziiertes Motiv
PAX6	<i>paired box 6</i>
PAZ	PIWI, AGO und ZWILLE
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGC	<i>primordial germ cells</i> , primordiale Keimzellen
PGCLC	<i>primordial germ cells like cells</i> , primordialen Keimzellen ähnliche Zellen
piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-Element induced wimpy testis</i>
POU5F1	<i>POU class 5 homeobox 1</i>
PRDM	<i>PR domain-containing protein</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time-PCR</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLE	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease (EC 3.1.27.5)
RT	Raumtemperatur
SCO	<i>Sertoli cell only</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SOX	<i>sex determining region Y box (SRY)</i>
SP1	<i>specificity protein 1</i>
SPC	Spermatozyten
SPG	Spermatogonien
SPT	Spermatiden
SRB	Sulforhodamin B
SSC	<i>side scatter</i>
ss-cDNA	<i>single stranded cDNA</i> , einzelsträngige cDNA
T	<i>T brachyury transcription factor</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid, Trichloressigsäure</i>
TDRD	<i>tudor domain containing protein</i>
TFAP2a	<i>transcription activating enhancer binding protein 2 alpha</i>
TNAP	<i>tissue non-specific alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)</i>
TOPO-TA	Topoisomerase-Thymin-Adenin
tracrRNA	transaktivierende CRISPR-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstart
UnMe	unmethyliert
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>world health organization, Weltgesundheitsorganisation</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosidyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Männliche Infertilität

1.1.1 Definition

Laut Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bezeichnet Infertilität das Ausbleiben einer Schwangerschaft in einer Partnerschaft trotz regelmäßigen, ungeschützten Geschlechtsverkehrs über mindestens 12 Monate (Rowe 2003). Das betrifft in Deutschland etwa 15 % aller Paare (Jungwirth *et al.*, 2012). Dabei sind in 20 % der Fälle allein männliche Ursachen und in 39 % der Fälle allein weibliche Ursachen für die ungewollte Kinderlosigkeit kausal verantwortlich. In 26 % der Fälle liegen die Ursachen bei beiden Partnern. Bei 15 % der Paare liegt eine idiopathische Infertilität vor, was bedeutet, dass sich keine erkennbaren Ursachen feststellen lassen (Nieschlag *et al.*, 2009).

Männliche Infertilität ist vielseitig begründet. Zumeist liegen Störungen der Spermatogenese (etwa 40 % der Fälle) oder Störungen des Spermientransports (etwa 20 % der Fälle) vor (Jungwirth *et al.*, 2012). Ursachen für Störungen des Spermientransports stehen oft mit Fehlbildungen oder Entzündungen der Samenwege in Zusammenhang. Zu den Fehlbildungen zählen Kryptorchismus (Lageanomalie des Hodens), die kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (beidseitiges Fehlen der Samenleiter), Samenwegsobstruktionen (Verschlüsse), Hodendistorsionen (Verdrehungen) oder eine Varikozele (Krampfaderbildung am Hoden, oft mit erhöhter Skrotaltemperatur verknüpft). Entzündungen des Hodens ergeben sich aus Hodentumorerkrankungen oder Urogenitalinfektionen wie Prostatitis, Epididymitis oder Orchitis.

Störungen der Spermatogenese können sowohl endogene als auch exogene Ursachen haben. Exogene Faktoren sind beispielsweise Nikotinabusus, Medikamente oder Behandlungen im Rahmen von Tumorerkrankungen wie Chemotherapie oder Bestrahlung. Endokrine Störungen wie hypogonadotroper Hypergonadismus oder Hyperprolaktinämie führen zu Mangel an geschlechtsbildenden Hormonen und somit zu Störungen im Ablauf der Spermatogenese. Aber auch systemische Erkrankungen (Diabetes, Nieren- bzw., Leberinsuffizienz, Adipositas) können Auslöser sein. Weiterhin existieren genetische Ursachen wie das Klinefelter Syndrom oder Mikrodeletionen des Y-Chromosoms. Als immunologische Konsequenzen männlicher Infertilität gelten Spermienautoantikörper. Trotz

intensiver Diagnostik bleiben 30-50 % aller Fälle männlicher Infertilität idiopathisch. Die Aufklärung der Ursachen und deren Therapie ist eine wichtige Aufgabe für die zukünftige andrologische Forschung (Jungwirth *et al.*, 2015).

1.1.2 Diagnose

Neben der Erfassung der Anamnese und einer intensiven körperlichen Untersuchung des Mannes ist die Analyse des Ejakulates die wohl wichtigste Diagnostik im Rahmen der Untersuchungen männlicher Infertilität. Zur Standardisierung werden die so genannten Spermioogramme nach den Vorgaben des WHO-Laborhandbuchs zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates von 2010, 5. Auflage (WHO, 2010) interpretiert.

Das Ejakulat setzt sich aus verschiedenen Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zusammen. Diese Fraktionen werden in einem genauen zeitlichen Ablauf dem Ejakulat zugemischt. Anfangs sondert die Bulbourethraldrüse ein leicht alkalisches Sekret zur Neutralisation und Befeuchtung der Urethra (Harnröhre) ab (präejakulatorische Fraktion). Die Prostata sezerniert ein saures Sekret (pH 6,4), welches unter anderem Zink, saure Phosphatase, Zitronensäure sowie Prostata-spezifisches Antigen (PSA) enthält (Vorfraktion). Dieses Sekret ist für die Aktivierung und Mobilisierung der Spermien verantwortlich. Die gleichzeitige Kontraktion von spermienpeichernden Nebenhoden, Samenleiter und Prostata bewirkt eine Vermischung des Prostatasekretes mit der zellulären Fraktion des Ejakulats (Hauptfraktion). Die Abgabe eines fruktosehaltigen Sekrets aus den Bläschendrüsen führt letztendlich zur Ejakulation (Endfraktion). Erst nach Durchmischung der Fraktionen und damit einhergehender Verflüssigung des Ejakulats ist eine qualitative und quantitative Analyse möglich. Dabei wird zwischen dem zellulärem Anteil, der etwa 5 % ausmacht und dem Seminalplasma unterschieden (Nieschlag *et al.*, 2009).

Für die Anfertigung eines aussagekräftigen Spermioogramms ist bei der Probengewinnung eine Karenzzeit von zwei bis sieben Tagen notwendig. Zeigt sich im Spermioogramm ein auffälliger Befund, wird die Anfertigung eines Wiederholungsspermioogramms nach zwei bis drei Monaten empfohlen, da die Ejakulatparameter häufigen Schwankungen unterliegen. Bei der konventionellen Analyse erfolgen zunächst makroskopische Untersuchungen wie Konsistenz und Aussehen des Ejakulats, Volumen, pH-Wert und Liquifizierung (Verflüssigung). Dann folgen mikroskopische Untersuchungen zur Ermittlung der drei Standardparameter Spermienkonzentration, –morphologie und –motilität. Im Anschluss an

die Bestimmung dieser Parameter können bei entsprechender Indikation erweiterte Tests durchgeführt werden. Hierzu zählen biochemische Untersuchungen zur Bestimmung der Funktion der akzessorischen Drüsen, sowie Nachweise von Entzündungen durch Beurteilung der Leukozyten im Ejakulat und Nachweis von Spermienantikörpern.

Die Auswertung des Ejakulates erfolgte nach den standardisierten Kriterien der WHO (WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates, 5. Auflage, 2010) und Einteilung in Spermienparameter, sowie Diagnosen, welche in Kapitel 2.1 im Detail aufgeführt sind.

1.1.3 Therapie

Zur Behandlung von Paaren mit einer männlichen Subfertilität sollten außer dem Spermogramm, die Dauer des Kinderwunsches, das Alter des Paares und weibliche Fertilitätsfaktoren berücksichtigt werden. Zunächst wird regelmäßiger Geschlechtsverkehr empfohlen. Grundsätzlich sollten die Zufuhr exogener Noxen (Alkohol, Nikotin), aber auch Übergewicht vermieden werden. Sexuelle Funktionsstörungen wie vorzeitige oder retrograde Ejakulation sind medikamentös über unter anderem Lidocainsalben oder Sympathomimetika behandelbar. Im Falle von Entzündungen erfolgt die Gabe von Antibiotika. Bei endokriner Störung ist es möglich durch Gabe von Gonadotropinen oder FSH die fehlregulierte Spermatogenese wieder zu normalisieren. Eine chirurgische Therapie kann bei Verschlüssen oder Varikozelen zur Refertilisierung beitragen (Wang und Swerdloff 2014). Bei schweren Formen männlicher Fertilitätsstörungen werden assistierte Reproduktionstechniken (ART) empfohlen. Die Therapieformen der ART zielen auf die Vereinigung von Ei- und Samenzelle außerhalb des weiblichen Körpers ab. Am häufigsten zum Einsatz kommen hierbei die *in vitro* Fertilisation (IVF) und die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Unter IVF versteht man die spontane Vereinigung von männlichen und weiblichen Geschlechtszellen nach deren Entnahme im Reagenzglas. So erfolgt eine natürliche Selektion der mobilen und befruchtungskompetenten Spermien. Unter der ICSI versteht man die Injektion einer männlichen Samenzelle in eine weibliche Eizelle. Die ICSI wird unter anderem bei gestörter Beweglichkeit der Spermien, Spermienantikörpern oder sehr niedriger Spermienanzahl im Ejakulat verwendet (Berkovitz *et al.*, 2006). In der Regel wird im Zusammenhang mit der ART eine hormonelle Stimulation zur Unterstützung der weiblichen Follikelreifung durchgeführt. Im Jahr 2015 wurden in Deutschland knapp 100000 assistierte Reproduktionszyklen an etwa 55000 Frauen erfasst. Die Schwangerschaftsrate

betrug nach IVF oder ICSI pro Embryotransfer etwa 40 %, von denen etwa $\frac{3}{4}$ der Patientinnen das Baby austragen konnten (Blumenauer *et al.*, 2016).

1.2 Humane Spermatogenese

1.2.1 Männliche Keimzellentwicklung

Spermatogenese bezeichnet die Bildung haploider männlicher Keimzellen aus diploiden Stammzellen und ist für die geschlechtliche Fortpflanzung des Menschen unablässig. Männliche Keimzellen werden im Epithel der *Tubuli seminiferi* (Samenkanälchen) in den *Testis* (Hoden) produziert. Das Keimepithel setzt sich aus Keimzellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen sowie den als Stützzellen fungierenden Sertoli-Zellen zusammen. Das zwischen den Tubuli seminiferi gelegene Interstitium besteht aus Blut- und Lymphgefäßen, hormonbildenden Leydig-Zellen, Makrophagen, sowie Nerven und Fibroblasten (Lüllmann-Rauch 2012). Jeder Keimtubulus ist von einer *Lamina propria* umgeben, welche aus einer Basalmembran, Kollagenfaserschicht und den Myofibroblasten (Peritubulärzellen) besteht. Die Spermatogenese findet in einem mehrstufigen Prozess bestehend aus mitotischer Proliferation, Meiose und Differenzierung statt. Die mitotischen Teilungen spielen sich nahe der Basalmembran ab. Lumenwärts folgen die Spermatozyten erster und zweiter Ordnung und lumenah liegen die Spermatisden, welche nach ihrer Reifung ins selbige entlassen werden (Abb.1).

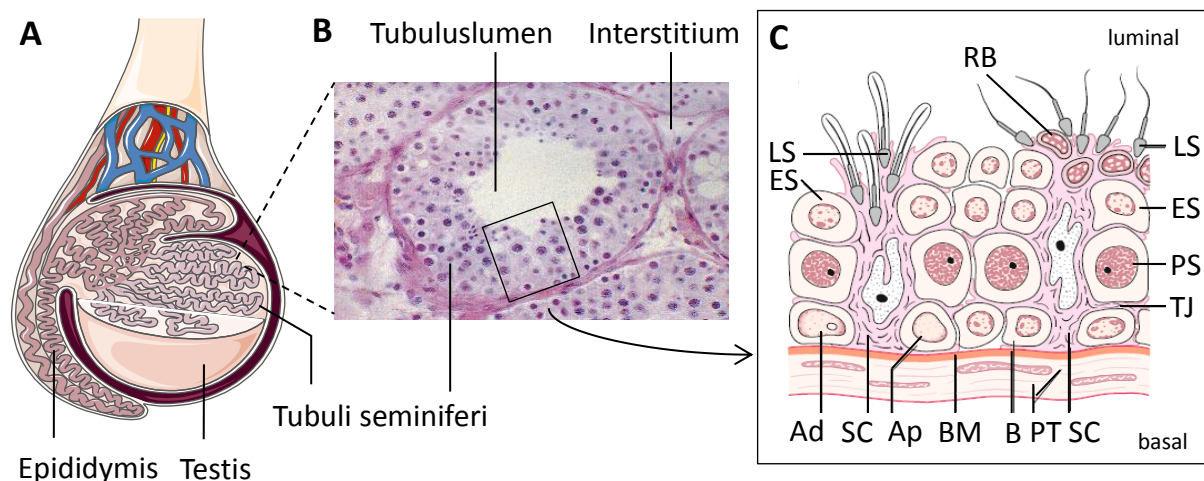


Abbildung 1: Übersicht über den Hoden (*Testis*) und die Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*)

A. Aufbau von Hoden und Nebenhoden (*Epididymis*). **B.** Querschnitt durch die Hodenkanälchen **C.** Überblick über die Zellen des Keimepithels. **Ad:** Typ $Ad_{(ark)}$ Spermatogonien, **Ap:** Typ $Ap_{(ale)}$ Spermatogonien, **B:** B-Spermatogonie, **PS:** pachytäne Spermatozyten, **ES:** frühe /runde Spermatisden, **LS:** späte, elongierende Spermatisden, **RB:** Residualkörperchen, **TJ:** *tight junctions*, Blut-Hoden-Schranke, **SC:** Sertoli-Zellen, **PT:** peritubuläre Myoidzellen. Abbildung modifiziert nach Weinbauer *et al.*, 2010.

Die Keimzellentwicklung beginnt bereits während der frühen Embryonalentwicklung. Die diploiden, als primordial bezeichneten, Urkeimzellen (*primordial germ cells*, PGC) leiten sich bereits in der zweiten Schwangerschaftswoche aus dem Epiblasten ab und wandern in der fünften Embryonalwoche in die Genitalleiste ein. Dort siedeln sie sich in den Keimsträngen an. Beim männlichen Embryo entwickeln sich diese Zellen zu fetalen Spermatogonien (Prospermatogonien) mit hohem Proliferationsgrad. Diese teilungsfähigen Zellen treten nach kurzer Zeit in einen mitotischen Arrest ein und werden erst bei Beginn der Pubertät wieder aktiv. Die postnatalen Spermatogonien lassen sich in Typ A- und Typ B-Spermatogonien einteilen. Typ A kann anhand seiner Kernmorphologie in einen Typ Ap_(ale) und Ad_(ark) unterteilt werden (Clermont 1963). Ad-Spermatogonien sind weitgehend teilungsinaktiv und bleiben als testikuläre Stammzellen erhalten. Aus Ap-Spermatogonien hingegen entwickeln sich durch asymmetrische mitotische Teilung die B-Spermatogonien, welche über Interzellularbrücken miteinander verbunden bleiben, wodurch eine synchrone Keimzellreifung ermöglicht wird (Weinbauer *et al.*, 2010). Die Typ-B-Spermatogonien lösen sich von der Basalmembran und treten in die Meiose ein. Mit Beginn der Meiose werden die Keimzellen als primäre Spermatozyten bezeichnet. Zunächst kommt es in der präleptotänen Phase zur Verdoppelung der DNA und es entstehen tetraploide Zellen (2n4C). Diese Zellen benötigen etwa drei Wochen um die Stadien der Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän) zu durchlaufen (Lüllmann-Rauch 2012). Allein die Phase als pachytäne Spermatozyte kann ein bis drei Wochen dauern. Diese Phase ist gekennzeichnet durch hohe transkriptionelle Aktivität, sowie homologe Rekombination (*crossing over*) (Russell *et al.*, 1993). Die diplotänen Spermatozyten unterliegen in einer ersten meiotischen Reifeteilung der Reduktion der Chromatiden, woraus kurzlebige sekundäre Spermatozyten (1n2C) resultieren. Diese durchlaufen innerhalb von ein bis zwei Tagen die zweite meiotische Reifeteilung und es entstehen haploide Spermatisden (1n1C). Für diese Zellen beginnt die Differenzierungsphase (Spermiogenese). Frühe Spermatisden weisen eine abgerundete Form und einen runden Zellkern auf weshalb sie auch als runde Spermatisden bezeichnet werden. Diese Zellen erfahren eine grundlegende Änderung ihrer Morphologie. Es erfolgt eine massive Umstrukturierung des Chromatins mit einhergehender Kompaktierung des Zellkerns. Das Zytoplasma nimmt eine längliche Form an (Elongation), so dass Kopf-, Mittel- und Schwanzteil entstehen. Überschüssiges Zytoplasma wird als Residualkörperchen abgeschnürt (Abb. 2). Die ausdifferenzierten Spermatisden werden in das

Lumen des Keimtubulus freigesetzt und nun als Spermien bezeichnet. Bis zu diesem Schritt vergehen etwa 74 Tage. Die morphologisch reifen Spermien gelangen in den Nebenhoden (*Epididymis*), wo schließlich die funktionelle Reifung stattfindet und sie unter anderem ihre Eigenbewegungsfähigkeit erhalten. So dauert es von der Bildung bis zur Ejakulation eines Spermiums etwa 86 Tage.

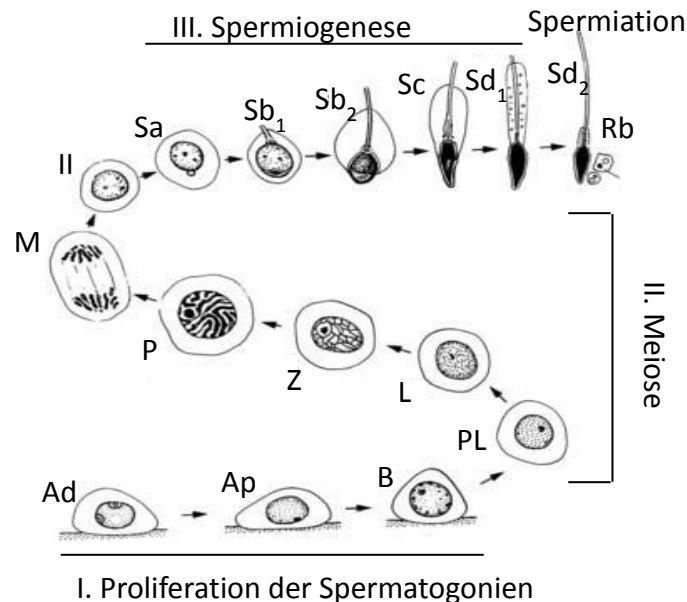


Abbildung 2: Schema der menschlichen Spermatogenese

Keimzellentwicklung des Mannes beginnend mit einem Spermatogonium, das eine geordnete Sequenz von Zellproliferation und Reifung durchläuft und in einem Spermatozoon endet. Spermatogonien: Typ Ad_(ark) (**Ad**), Typ Ap_(ale) (**Ap**) und Typ B (**B**); Primäre Spermatozyten: Präleptotän (**PL**), Leptotän (**L**), Zygotän (**Z**), Pachytän (**P**) und meiotische Teilung (**M**); Sekundärer Spermatozyten (**II**); Spermatisden (**Sa**, **Sb₁**, **Sb₂**, **Sc**, **Sd₁**, **Sd₂**); Residualkörperchen (**Rb**), Abbildung modifiziert nach Weinbauer *et al.*, 2010.

1.2.2 Endokrine Regulation

Zwei Zelltypen sind für die Entstehung befruchtungsfähiger Spermatozoen besonders wichtig: Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen. Die Sertoli-Zellen stellen die somatischen Zellen des Keimepithels dar. Sie haben Stützfunktionen für die Keimzellen und sind an der Abgabe der reifen Spermatisden aus dem Keimepithel (Spermiation) beteiligt. Sie sorgen für die Produktion der Tubulusflüssigkeit und sezernieren unter anderem Proteine und Wachstumsfaktoren. Das Zytoplasma der Sertoli-Zelle erstreckt sich mit lamellenartigen Zellfortsätzen durch das gesamte Keimepithel und bildet zahlreiche Zellkontakte sowohl untereinander als auch zu den Keimzellen. Die Zellverbindungen zwischen den Sertoli-Zellen (*tight junctions*) bilden die Blut-Hoden-Schranke aus. Dadurch entsteht das für die Spermatogenese wichtige Milieu und mutagene Substanzen werden aus dem Hoden

ferngehalten. Außerdem besitzen die Sertoli-Zellen resorptive Fähigkeiten, indem sie Residualkörperchen, sowie degenerierende Spermatozyten und Spermatisden phagozytieren (Krause *et al.*, 2011). Weiterhin übertragen sie, durch Bereitstellung von Rezeptoren, hormonelle Stimuli auf die Keimzellen. Dabei handelt es sich um die für die Initiierung und Aufrechterhaltung der normalen Spermatogenese wichtigsten Hormone Testosteron und Follikelstimulierendes Hormon (FSH). Das Steroidhormon Testosteron initiiert die Spermatogenese ab Beginn der Pubertät und wird von den interstitiellen Leydig-Zellen synthetisiert. Dieser Prozess wird durch das Luteinisierende Hormon (LH) aus der Hypophyse, indirekt durch das *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) aus dem Hypothalamus, sowie durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der Sertoli-Zellen gesteuert. Langfristig hat das LH trophische Wirkung auf die Leydig-Zellen. Ein hoher Testosterongehalt im Blut hemmt die Ausschüttung von LH und GnRH. Neben der Produktion männlicher Sexualhormone synthetisieren die Leydig-Zellen Katecholamine, Neuropeptide und verschiedene Zytokine (Krause *et al.*, 2011). Das FSH wird aus der Hypophyse sezerniert und wirkt direkt auf die Sertoli-Zellen, welche in der Lage sind durch Abgabe von Inhibin die Sezernierung von FSH zu hemmen. Das FSH stimuliert die Translation weiterer Proteine, welche die Spermatogenese vorantreiben (Lüllmann-Rauch 2012). Neben der hormonellen Regulation existieren Mechanismen auf genetischer und epigenetischer Ebene welche für die Keimzellentwicklung unablässig sind.

1.2.3 De novo DNA-Methylierung

In Säugetieren geht die Erzeugung von Keimzellen mit umfangreichen epigenetischen Veränderungen einher. Dadurch kann die Genexpression der Zelle beeinflusst werden, ohne die zugrundeliegende Nukleotidsequenz zu verändern. Diese epigenetischen Veränderungen umfassen hierbei Regulationen über *small* RNAs, Umstrukturierungen des Chromatins, Histon-Modifikationen und DNA-Methylierungen. Im Zuge von DNA-Methylierungen wird eine Methylgruppe kovalent am 5. Kohlenstoffatom des Pyrimidinringes eines in einer CpG-Insel befindlichen Cytosinnukleotids addiert (Talbert und Henikoff 2006). CpG-Inseln sind etwa 500 bp bis 2000 bp lange Genomregionen, die eine hohe Dichte an CG-Dinukleotiden (CG-Gehalt > 55 %) enthalten (Takai und Jones 2002). Diese Sequenzen befinden sich in den Promotorregionen von etwa 40 % aller Säugetiergene und sind mit prätranskriptioneller Genstilllegung assoziiert.

In der Entwicklung von Säugetieren gibt es zwei prominente Perioden der genomweiten epigenetischen Umprogrammierung. Diese Prozesse finden in der frühen Keimzelle und im Zweizellstadium der Zygote statt (Mayer *et al.*, 2000). Die zygotäre Neuprogrammierung dient der Auslöschung parentaler keimzellspezifischer Methylierungsmuster und der Etablierung von DNA-Methylierungen die zur Differenzierung des Embryos notwendig sind. PGC gehen aus dem frühen Embryo hervor und tragen somit diese somatischen Methylierungsmuster. Die Anforderungen an eine Keimzelle können nur erfüllt werden indem die somatischen Methylierungsmuster entfernt und keimzellspezifische Methylierungsmuster neu etabliert werden (Hajkova *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010). Vorhandene DNA-Methylierungsmuster werden während der PGC-Migration in die Genitalleiste umfassend gelöscht, so dass die Gesamtmethylierung von mehr als 75 % auf weniger als 10 % reduziert wird (Popp *et al.*, 2010; Saitou und Yamaji 2012). Dadurch wird ein naszierender Zustand hergestellt, der die Generierung von geschlechtsspezifischen Methylierungsmustern an ausgewählten Loci ermöglicht. Im männlichen Embryo wird die Remethylierung in den mitotisch arretierten Prospermatogonien initiiert und ist vor der Geburt abgeschlossen, so dass bereits pränatal die Spermatozoen-spezifischen Methylierungsmuster etabliert sind (Hajkova *et al.*, 2002; Jenkins und Carrell 2012). Studien zeigten, dass in Spermatischen die meisten Gene hypermethyliert vorliegen, wobei Transkription und Translation fast vollständig zum Erliegen kommen. Reife Spermatozoen zeigen eine globale Methylierung von etwa 80 % (Smallwood *et al.*, 2011). Weiterhin ergaben epigenetische Sequenzierungen, dass in ausgereiften Spermatozoen nur Promotorregionen von Genen hypomethyliert sind, die für die Induktion der Embryogenese verantwortlich sind (Hammoud *et al.*, 2009). Die DNA-Methylierung erfolgt durch das Enzym DNA-Methyltransferase (DNMT), welches den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das Cytosin katalysiert. Die *de novo* Methylierung während der Spermatogenese wird dabei von drei DNMT3-Methyltransferasen (DNMT3a /3b und DNMT3L) vermittelt (Okano *et al.*, 1999). Obwohl die epigenetische Neuprogrammierung für die Reproduktion von Säugetieren von wesentlicher Bedeutung ist, bietet sie die Möglichkeit zur Aktivierung endogener transponierbarer Elemente, welche autonom repliziert werden. Eine wichtige Funktion bei der Repression von endogenen mobilen DNA-Elementen besitzen die PIWIL-Proteine und ihre assoziierten *small* RNAs.

1.3 Die PIWIL-Genfamilie

Entsprechend primärer Sequenzhomologien werden die eukaryotischen ARGONAUTE-Proteine in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe beschreibt die ubiquitär exprimierten AGO-Proteine, welche durch Assoziation an miRNAs oder siRNAs im Cytoplasma an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligt sind. Die zweite Klasse umfasst die *P-element-induced wimpy testis like* (PIWIL)-Proteine, welche hauptsächlich in Keimzellen über die Bindung an piRNAs die Genexpression beeinflussen (Siomi *et al.*, 2011; Meister 2013). Die ARGONAUTE-Proteine besitzen eine hochkonservierte, aus vier funktionellen Domänen bestehende Struktur: der N- (Aminoterminalen), PAZ- (PIWI-Argonaute-ZWILLE), MID- (*middle*) und PIWI-Domäne (Abb.3) (Cerutti *et al.*, 2000; Carmell *et al.*, 2002). Durch Kristallstrukturanalysen konnte ermittelt werden, dass die N-PAZ-, sowie die MID-PIWI-Domänen miteinander Wechselwirkungen eingehen. Zwei Linker-Strukturen (L1, L2) verbinden die Domänen und sorgen für eine Konformationsänderung während der Bindung der *small* RNA.

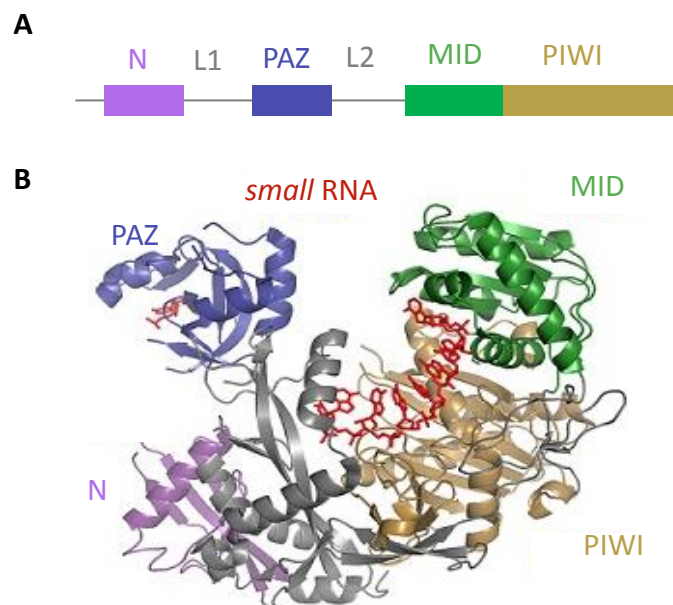


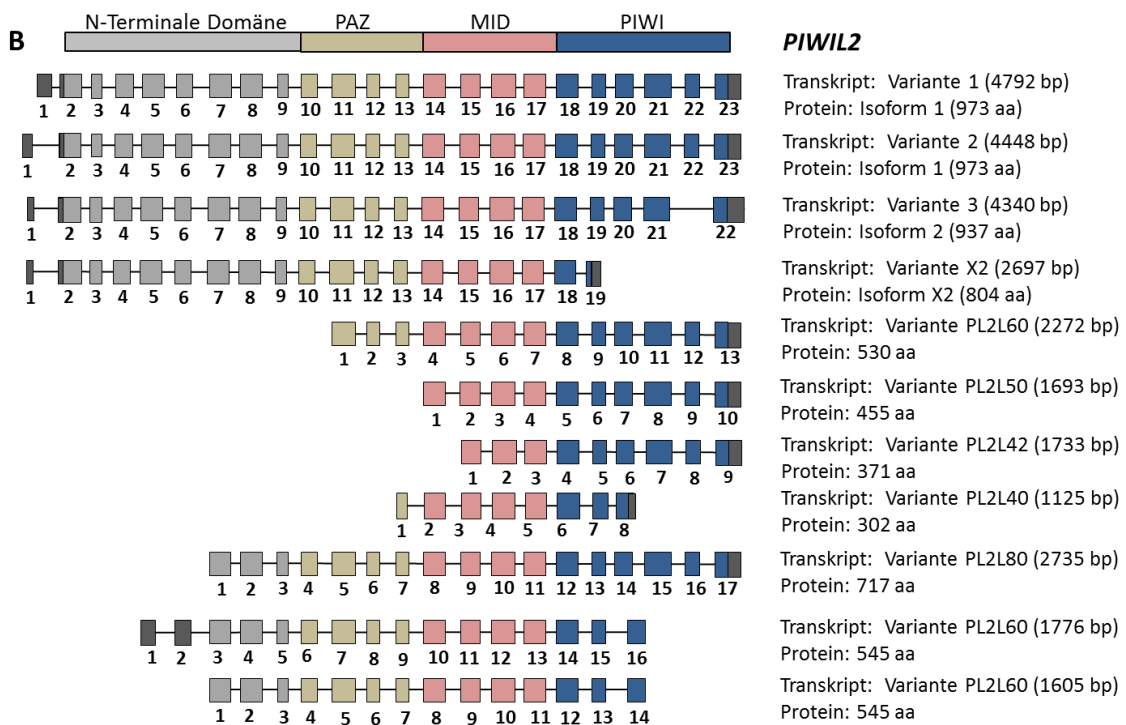
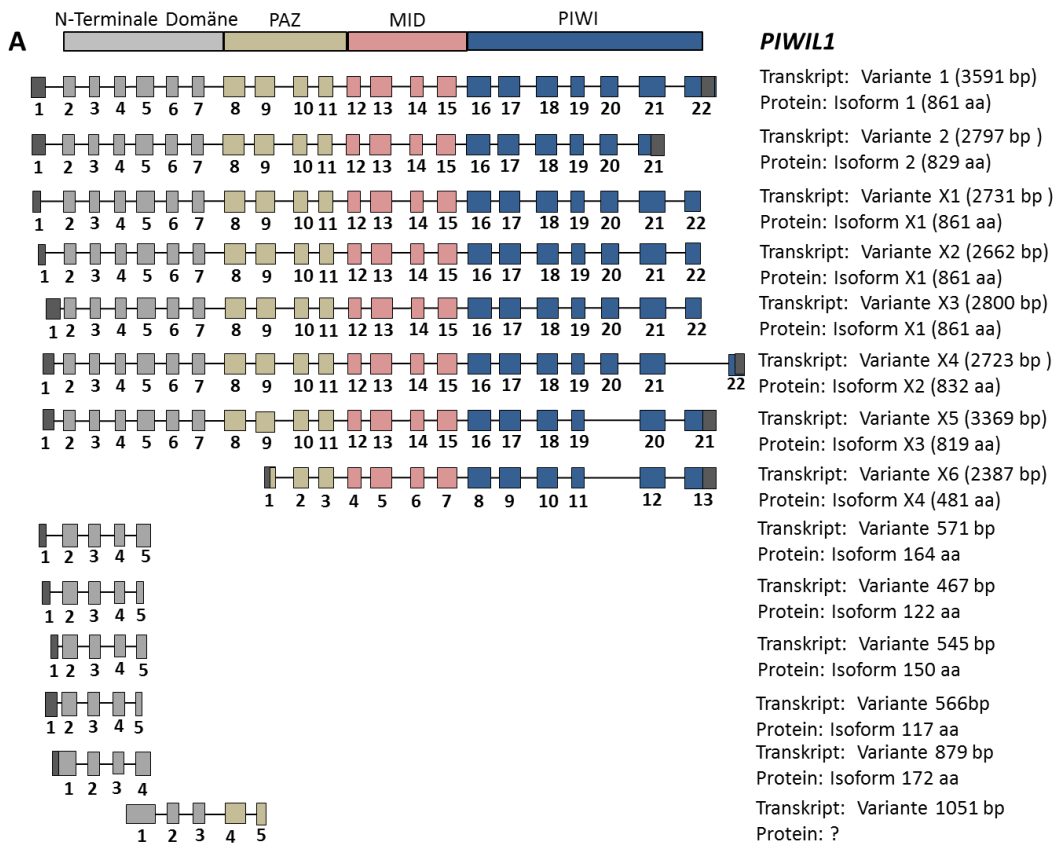
Abbildung 3: Die konservierte Struktur der AGO-Proteine

A. Schematischer Überblick über die Domänen des AGO2-Proteins aus *Homo sapiens* (Hs). **B.** Kristallstrukturmodell des HsAGO2-Proteins mit gebundener *small* RNA (rot). Die einzelnen Domänen sind in unterschiedlichen Farben gezeigt. Hauptsächlich wird die Bindung zwischen AGO2 und *small* RNA über nichtkovalente Wechselwirkung der Domänen MID-PIWI-L2-L1 mit den ersten acht Nukleotiden im 5'Bereich der *small* RNA vermittelt. Abbildung modifiziert nach Schirle und MacRae 2012.

Zwischen den Domänen entsteht eine hydrophile hochkonservierte Bindetasche in der die *small* RNAs am 3'OH-Überhang von der PAZ- und am 5'Phosphat-Ende von der MID-Domäne

in einer helikalen Position gehalten werden. (Jinek und Doudna 2009; Schirle und MacRae 2012). Die Ziel-mRNAs binden ebenfalls an der gleichen Position. Somit werden sie in räumliche Nähe zur PIWI-Domäne gebracht, welche einer RNase H strukturell sehr ähnlich und in einigen AGO-Proteinen befähigt ist, die gebundene mRNAs in Gegenwart eines Mg^{2+} -Ions zu hydrolysieren (Parker *et al.*, 2004). Die N-Domäne übt Helikasefunktion aus und hilft beim Entwinden des *small* RNA-Duplexes während der Assemblierung des *RNA-induced silencing complex* (RISC), dem Effektor-Komplex von *small* RNAs, bei dem die ARGONAUTE-Proteine die Hauptproteinkomponente bilden (Kwak und Tomari 2012).

Phylogenetische Analysen zeigen die Existenz der PIWIL-Proteine in diversen Eukaryoten von *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* über Maus bis zum Menschen (Sasaki *et al.*, 2003). Zudem wurden auch Homologe in Schwämmen oder Nematoden wie *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Yigit *et al.*, 2006; Funayama *et al.*, 2010). Die Anzahl der PIWIL-Proteine variiert dabei innerhalb verschiedener Spezies. So besitzt zum Beispiel *C. elegans* zwei (PRG-1 und PRG-2) und *Drosophila melanogaster* drei (PIWI, AUB und AGO3) PIWIL-Proteine. Die humanen Vertreter sind PIWIL1-4 und sind auf den Chromosomen 12, 11, 22 und 8 kodiert. Synonym sind die Genbezeichnungen *HIWI*, *HILI*, *HIWI3* und *HIWI2* (Aravin *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2003). Basierend auf *in silico* Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der PIWIL-Proteinfamilie eine große Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenz besitzen. Dabei besitzt PIWIL1 eine 34,3 %-ige Homologie zu PIWIL2, 50,2 % Sequenzidentität mit PIWIL3 und eine 48,7 %-ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit PIWIL4 (Sasaki *et al.*, 2003). Weiterhin wurden im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms diverse Spleißvarianten der *PIWIL*-Gene identifiziert. Die bisher bekannten Spleißvarianten von *PIWIL1* unterscheiden dabei sich hauptsächlich im 5'- und 3'-Bereich (Abb. 4A). Für das *PIWIL2*-Gen wurden über PCR-Analysen unterschiedlich lange Spleißvarianten charakterisiert, denen eine zelltypspezifische Expression und Funktionalität zugeordnet werden konnte (Ye *et al.*, 2010; Gainetdinov *et al.*, 2014). Die Expression der einzelnen Homologe der PIWIL-Proteine beschränkt sich hauptsächlich auf die männliche Keimbahn während der Spermatogenese (Qiao *et al.*, 2002)



Ye et al., 2010
Gainetdinov et al., 2014

Abbildung 4: Übersicht über die bekannten Spleißvarianten der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

Gezeigt sind die bisher beschriebenen Spleißvarianten von *PIWIL1* (A) sowie *PIWIL2* (B) mit den enthaltenen Exonen, mRNA-Längen und Anzahl der Aminosäuren des kodierenden Proteins. Die Zugehörigkeit der Exone zu den Proteindomänen ist farblich gekennzeichnet und im oberen Bildteil dargestellt. Dunkelgrau sind nichtkodierende Bereiche. Abbildung erstellt nach <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>; Ye et al., 2010; Gainetdinov et al., 2014.

1.3.1 Stammzellselbsterneuerung und Spermatogenese

Die PIWIL-Proteine wurden als erstes in Keimbahnstammzellen und angrenzenden Zellen der Ovarien von *Drosophila melanogaster* identifiziert, wobei ihnen eine essentielle Rolle bei der Teilung und Selbsterneuerung der Keimbahnstammzellen zugeschrieben werden konnten. Mutationsstudien zeigen, dass ein Funktionsverlust von *Drosophila* PIWI zu einem Defekt in der Keimbahnstammzellerhaltung und Proliferation in beiden Geschlechtern, und damit zur Sterilität, führt (Cox *et al.*, 1998; Lin und Spradling 1997). Auch in *Arabidopsis thaliana* hält das PIWIL-Protein ZWILLE die Meristemzellen während der Organogenese in einem undifferenzierten Zustand (Moussian *et al.*, 1998). Das murine Genom kodiert für die drei PIWIL-Homologe MIWI, MILI und MIWI2 (Peters und Meister 2007). Sie werden abundant in der männlichen Keimbahn exprimiert. (Aravin *et al.*, 2008; Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001; Unhavaithaya *et al.*, 2009). Diverse Studien zeigen ein zeitlich begrenztes Auftreten der PIWIL-Proteine während der murinen Keimzellentwicklung, wobei ein spermatogener Arrest mit dem spezifischen Expressionsmuster korreliert (Abb. 4). MILI (PIWIL2) wird zuerst in männlichen primordialen Keimzellen detektiert und wird während des Pachytän der Meiose stillgelegt, während MIWI (PIWIL1) nur von Midpachytän bis zur verlängerten Spermatidenstufe exprimiert wird (Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). Die Expression von MIWI2 (PIWIL4) beschränkt sich auf die primordialen Keimzellen (Carmell *et al.*, 2007). MIWI und MILI sind cytoplasmatisch lokalisiert. Ein Ausfall von MIWI führt zu einem Arrest der Spermatogenese in runden Spermatiden mit Defekten in der Stammzellerhaltung und Selbsterneuerung (Deng und Lin 2002). MILI-Mutanten zeigten einen vollständiger Verlust von meiotischen Zellen weil die Keimzellen als pachytäne Spermatozyten verharren (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). Obwohl MILI auch in weiblichen Keimzellen nachgewiesen wurde, verursacht der Verlust keine oogenen Defekte (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001). MIWI2 ist im Kern lokalisiert. Ein *knockout* von MIWI2 ist mit dem erhöhten Auftreten von DNA-Schäden verbunden (Carmell *et al.*, 2007). Weiterhin ist in MIWI2-Mutanten eine Reduktion der DNA-Methylierung transponibler Elemente zu verzeichnen, sodass angenommen wird MIWI2 katalysiert piRNA-abhängig die *de novo* Methylierung in den murinen Urkeimzellen (Brennecke *et al.*, 2007; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Ein damit assoziierter Arrest der Keimzellen in der Prophase der Meiose I zeigt, dass MIWI2 essentiell für die Spermatogenese ist (Abb. 5). Mutanten aller drei murinen Homologe zeigen zwar einen progressiven Verlust der

Keimzellen, jedoch keinen Einfluss auf Zellen somatischen Ursprungs (Carmell *et al.*, 2007; Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004).

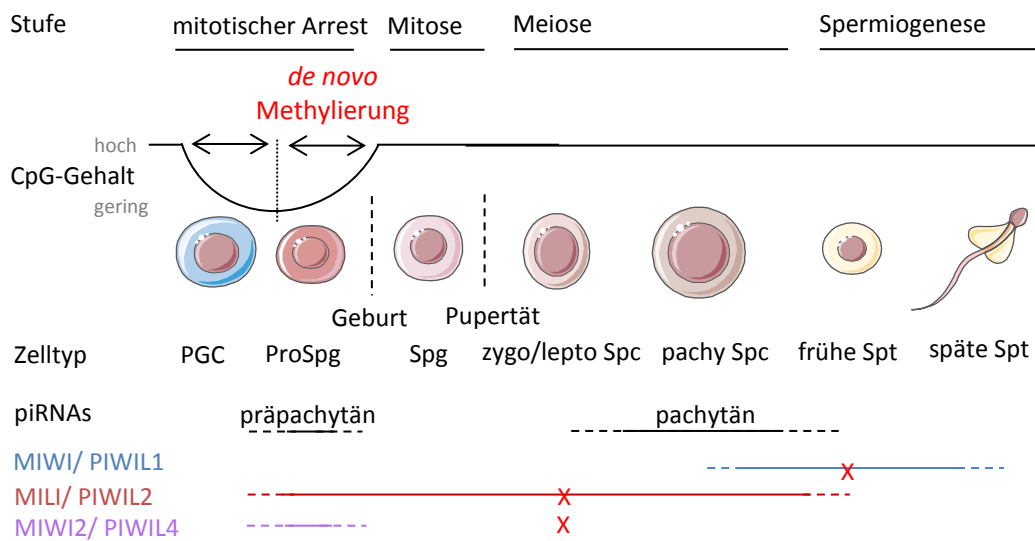


Abbildung 5: Expression der PIWI-Proteine und piRNAs während der verschiedenen Stufen der Säuigerspermatogenese

Die farbigen Linien repräsentieren das Expressionsschema der drei Maus-Homologe MIWI, MILI und MIWI2 in den Zelltypen der Spermatogenese. Die Kreuze markieren den spermatogenen Arrest bei Verlust des respektiven Proteins. Der CpG-Gehalt zeigt die Stufen der epigenetischen Neuprogrammierung in den PGC und Prospermatogonien, mit endgültigem CpG-Status in den Keimzellen ab der Geburt. *Primordial germ cells (PGC)*, Spermatogonien (**Spg**), Spermatozyten (**Spc**), Spermatisen (**Spt**). Abbildung modifiziert nach Zheng *et al.*, 2012.

Über die Funktion der *PIWIL*-Gene während der Spermatogenese des Menschen ist bisher wenig bekannt. Qiao und Kollegen gelang es bei Patienten mit Seminomen HIWI in Spermatozyten und runden Spermatisen zu detektieren (Qiao *et al.*, 2002). Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt ebenfalls die Expression von HIWI in pachytänen Spermatozyten und Spermatisen (Hempfling *et al.*, 2017). In einer Studie mit 500 chinesischen Patienten wurden mehrere Polymorphismen in den *PIWIL*-Genen identifiziert, die vermehrt bei infertilen Männern auftreten (Gu *et al.*, 2010). Einige dieser Polymorphismen konnten in einer Untersuchung mit iranischen Patienten verifiziert werden (Kamaliyan *et al.*, 2017).

1.3.2 piRNAs

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass die PIWIL-Proteine ausschließlich eine distinkte Klasse von *small RNAs*, die *PIWI-interacting RNAs* (piRNAs) binden (Aravin *et al.*, 2006; Grivna *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006) binden. Die Länge der piRNAs variiert entsprechend ihrer PIWIL-Interaktionspartner und liegt im Bereich zwischen 24 und 31 nt

(Vagin *et al.*, 2006). Während der Spermatogenese von Säugetieren existieren zwei Klassen von piRNAs, die molekulare Eigenschaften teilen, sich aber im genomischen Ursprung, der Biogenese, sowie den PIWIL-Bindungspartnern unterscheiden. Dabei handelt es sich um präpachytän und pachytän exprimierte piRNAs (Aravin *et al.*, 2008; Carmell *et al.*, 2007; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Präpachytäne piRNAs weisen in ihrer Sequenz eine starke Homologie zu transponiblen Sequenzen auf und stammen aus repetitiven Bereichen des Genoms. Es wurden zusätzlich auch präpachytäne piRNA-Sequenzen gefunden, die mit den 3'UTR proteincodierender DNA-Bereiche übereinstimmen (Aravin *et al.*, 2008). Der Ursprung der repetitiv-armen pachytänen piRNAs ist weitgehend ungeklärt. Sequenzanalysen zeigen, dass der Großteil aus nichtkodierenden DNA-Bereichen stammt, die in bidirektionalen Clustern angeordnet, über das Genom verteilt sind (Aravin *et al.*, 2007).

Es existieren zwei Mechanismen für die Biogenese der piRNAs aus denen primäre und sekundäre piRNAs hervorgehen. Bei der primären Biogenese wird die piRNA aus einem distinkten Locus transkribiert und das PIWIL-Protein, nach erfolgter Prozessierung und 2'O-Methylierung durch die HEN1-Methyltransferase, mit der reifen piRNA beladen. Primäre piRNAs entstehen durch die Endonukleaseaktivität der PIWIL-Proteine womit deren Bildung im Gegensatz zur Biogenese von miRNAs und siRNAs DICER-unabhängig verläuft (Vagin *et al.*, 2006). Die Reifung der sekundären piRNA wird durch den sogenannten Ping-Pong-Mechanismus vorangetrieben. In dessen Verlauf werden die in der Zelle vorhandenen Transposon-mRNAs durch einen mit einer piRNA beladenen PIWIL-Proteinkomplex abgebaut und dienen als Vorlage für die Genese weiterer piRNAs (Aravin *et al.*, 2008; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008).

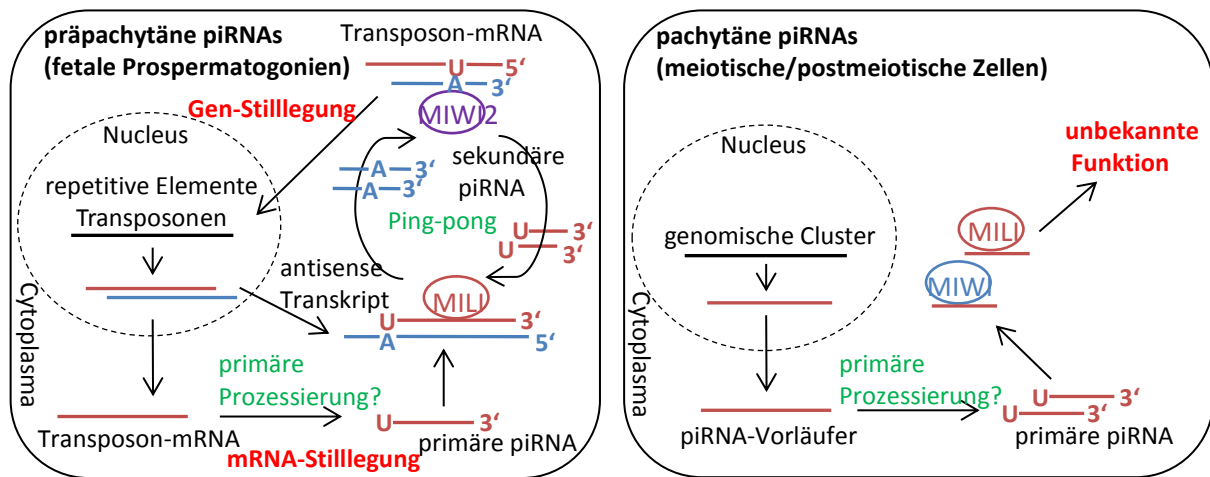


Abbildung 6: Biosynthese und Funktion von piRNAs

Sequenzanalysen MILI- und MIWI2-gebundener präpachytärer piRNAs in fetalen Prospermatogonien zeigen, dass ihre Produktion durch einen Ping-Pong-Mechanismus gesteuert wird, bei dem piRNAs aus den entgegengesetzten Strängen die Synthese des anderen in einer Vorwärtsbewegung fördern. Der Start des Ping-Pong-Zyklus erfordert zu Beginn einen Satz aus primären piRNAs, die über einen unbekannten Mechanismus generiert werden. Durch die Bindung an MIWI2 lokalisiert die *antisense* piRNA an die komplementäre Transposon-mRNA, die durch die SLICER-Aktivität der PIWI-Proteine geschnitten wird. Die daraus resultierenden Spaltprodukte dienen als *sense* piRNAs, die von MILI gebunden werden. Dieser Komplex kann weitere *antisense* Transposon-mRNAs spalten, wodurch ein *auto feedback loop* etabliert wird. Präpachytäre piRNAs legen Retrotransposonen auf posttranskriptioneller mRNA-Ebene und über methylierungsabhängige Mechanismen auf DNA-Ebene still. MIWI- und MILI-gebundene pachytäre piRNAs werden über einen unbekannten Mechanismus aus definierten genomischen Loci transkribiert. Ihre Funktionsweise ist bisher nicht charakterisiert. Abbildung modifiziert nach Meikar *et al.*, 2011.

Für die Bindung primärer piRNAs an die PAZ- und MID-Domäne der PIWI-Subfamilie-Mitglieder ist dabei ein 5'-Uracil (1U), sowie eine 2'-O-Ribosyl-Methylierung am 3'-Ende Voraussetzung, so dass die jeweiligen sekundären piRNAs an ihrer zehnten Position bevorzugt ein Adenin (10A) haben (Aravin *et al.*, 2008). MILI und MIWI binden an piRNAs, die überwiegend ein 1U haben und genomischen Clustern entstammen, während piRNAs, die an MIWI2 gebunden sind, ein 10A haben und hauptsächlich aus *sense* Transkripten von Retrotransposonen stammen (Frank *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2011; Aravin *et al.*, 2007). Über diesen Mechanismus reprimieren die PIWI-Proteine durch Demethylierungsprozesse auftretende transponible Elemente im Cytoplasma und erlangen funktionelle Bedeutung bei der Kontrolle der Keimzeldifferenzierung und der reproduktiven Gesundheit des Organismus (Aravin *et al.*, 2007).

1.3.3 Stilllegen von Retrotransposonen

Die genomische Stabilität der Keimbahn ist für die Aufrechterhaltung einer Spezies essentiell. Diese Integrität kann durch transponierbare Elemente maßgeblich beeinflusst werden. Unter Transposition versteht man die Verschiebung eines im Genom vorhandenen

DNA-Elements an eine andere Stelle des Genoms (Craig, 2002). Das humane Genom besteht zu 44 % aus transponierbaren Elementen, von denen etwa 0,05 % aktiv sind. Je nachdem ob die mobile Zwischenstufe DNA oder RNA ist, unterscheidet man zwischen DNA-Transposonen oder Retrotransposonen. Allerdings sind bei weitem nicht alle Retroelemente in der Lage selbstständig ihre Position im Genom zu verändern, weshalb man in nicht-autonome und autonome Retrotransposonen unterscheidet. Zur Gruppe der autonomen Retrotransposonen zählen die *long interspersed nucleotide elements* (LINE). Die LINE-1-Retrotransposonen, besitzen zwei offene Leseraster (ORF1 und ORF2), die für die Proteine kodieren, welche für reverse Transkription und die Integration an neue Stellen im Genom erforderlich sind. Dadurch können Mutationen durch DNA-Doppelstrangbrüche und Verschiebungen in Gen-kodierenden Bereichen entstehen (Castañeda *et al.*, 2011). Eine Möglichkeit der Zelle die Aktivität zu regulieren, ist die Verpackung von transposonreichen Regionen in Heterochromatin. Diese Regionen zeichnen sich durch spezifische Modifikationen an Histonen, wie die Methylierung von Lysylrest 9 in Histon H3 (H3K9) oder DNA-Methylierungen aus. Eine weitere Möglichkeit bietet die RNA-basierte Abwehr. Bereits die Genese der piRNAs sorgt für einen posttranskriptionellen Abbau von Retrotransposon-mRNA. Weiterhin gibt es Daten, die zeigen dass die piRNAs in Assoziation mit den PIWIL-Proteinen hauptsächlich Chromatinmodifikationen bewirken, die zur Stilllegung transponierbarer Elemente führen. Ein *knockout* von MILI oder MIWI2 zeigt sich in einem Verlust von piRNAs, welcher zu signifikant niedrigerer *de novo* DNA-Methylierung und erhöhten LINE-1-mRNA- und Proteingehalten in der Meiose führt. (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008; Aravin *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2009). Weiterhin sind Mutationen in MIWI2 mit der Akkumulation von DNA-Schäden assoziiert (Carmell *et al.*, 2007). Die Mobilisierung von Transposon-Transkripten in den *knockout*-Organismen weist auf eine übergeordnete Rolle der PIWIL-Proteine bei der Repression transponibler Elemente in den Gonaden hin (Vagin *et al.*, 2004; Kalmykova *et al.*, 2005). Ein Verlust von MIWI, bei dem die Keimzellen als runde Spermatiden verharren, führt zwar nicht zu einer Aktivierung von Retrotransposonen aber zu einer abnormalen Regulation des post-meiotischen Genexpressionsprogramms (Deng und Lin 2002). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass MIWI spermiogene mRNAs direkt bindet, um sie vor vorzeitigem Abbau oder Translation zu schützen, bis sie später in der Spermiogenese notwendig sind (Vourekas *et al.*, 2012).

1.3.4 Nicht-gonadale Funktion der *PIWIL*-Gene

Neben der keimzellspezifischen Expression der *PIWIL*-Proteine wird auch deren Auftreten in somatischen Geweben diskutiert. *PIWIL*-Proteine wurden in Neoblasten von Strudelwürmern nachgewiesen. Bei Neoblasten handelt es sich um totipotente Stammzellen, die verantwortlich für die Regeneration aller Gewebe sind. In *knockdown*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der *PIWIL*-Homologe *SMEDWI-2* und *SMEDWI-3* zu einem Ausfall der Gewebehomöostase und damit zum Tod des Organismus führt (Reddien *et al.*, 2005; Palakodeti *et al.*, 2008). Bereits Cox und Kollegen (1998) stellten fest, dass die Keimbahnfunktion von *PIWI* in *Drosophila melanogaster* von den somatischen Zellen des Ovars abhängt. Zusätzlich wurde eine Expression in frühen somatischen Zellen der *Testis* beschrieben, welche essentiell für die Anzahl sowie Teilungsraten der Keimbahnstammzellen ist (Cox *et al.*, 2000). Außerhalb der Gonade führen Mutationen in *PIWI* zu epigenetischen Veränderungen des Augenfarbens, welche zur Ausprägung eines weißen Phänotyps führen (Brower-Toland *et al.*, 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass *PIWI*, *AUB* und *AGO3* während der frühen Embryogenese exprimiert werden und ein Verlust des maternalen *PIWI* in chromosomalen und mitotischen Defekten resultiert (Mani und Juliano 2013).

Außerhalb der Keimbahn konnte die humane *PIWIL*-Genexpression in *CD34+* hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen, jedoch nicht in höher differenzierten Zellpopulationen oder Geweben nachgewiesen werden (Sharma *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2003). Eine große Anzahl von Studien dokumentiert jedoch die ektopische Expression der *PIWIL*-Gene in diversen Tumorentitäten. Eine Überexpression von *HIWI* wurde erstmals in Seminomen (testikuläre Keimzelltumoren) beschrieben (Qiao *et al.*, 2002). Weiterhin konnte eine klinische Signifikanz für *HIWI* in Ösophagus-Tumoren und Gliomen beobachtet werden (He *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011). In Magentumoren steht eine erhöhte Expression von *HIWI*, in Zusammenhang mit der Proliferation dieser Tumorzellen (Liu *et al.*, 2006). *HILI* wurde in Brustkrebszellen, Tumoren des Gastrointestinaltraktes, Nierenzellkarzinom und Endometriumkarzinomen detektiert (Lee *et al.*, 2006). In weiteren Studien konnten DNA-modifizierende Eigenschaften der *PIWIL*-Gene beschrieben werden. In Sarkomen wurde eine Korrelation zwischen *HIWI*-Expression und DNA-Hypermethylierung, sowie damit assoziierter erhöhter Tumorgenese beschrieben (Siddiqi *et al.*, 2012). Für *HILI* und *HIWI2* konnte gezeigt werden, dass sie an der Chromatin-Modifikation durch Beteiligung an der Histon-H3-Acetylierung mitwirken (Yin *et al.*, 2011; Sugimoto *et al.*, 2007). Einige Studien erwägen die

PIWIL-Expression als prognostischen Marker. In Leberzellkarzinomen ist eine erhöhte HIWI-Expression mit Tumorgröße und Metastasierung assoziiert (Zhao *et al.*, 2012). In Weichteilsarkomen wurden erhöhte mRNA-Expressionen von *PIWIL1*, 2, und 4 detektiert, die mit einem verschlechterten Überleben korrelieren (Taubert *et al.*, 2007; Greither *et al.*, 2012). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem *PIWIL1*-mRNA-Gehalt und schlechter Prognose in Pankreaskarzinomen gezeigt werden (Grochola *et al.*, 2008).

1.4 Zielstellung

Eine intakte Spermatogenese ist eine Grundvoraussetzung für die reproduktive Gesundheit des Individuums. Noch immer sind über 30-50 % der Ursachen für männliche Infertilität ungeklärt (Nieschlag *et al.*, 2010). Moderne Andrologie kann helfen, idiopathische Fertilitätsprobleme auf der Basis zellulärer Mechanismen zu analysieren und Behandlungsmöglichkeiten zu optimieren, die den Bedürfnissen der Patienten entsprechen. Ein wichtiger molekularer Faktor für die erfolgreiche Spermatogenese ist dabei die *PIWIL*-Genfamilie. Die *P-element induced wimpy testis like* (*PIWIL*)-Proteine gehören zu Familie der evolutionär hochkonservierten ARGONAUTE-Proteine, die eine essentielle Rolle bei RNA-Interferenz und der posttranskriptionellen mRNA-Kontrolle spielen. In Tiermodellen konnte den *PIWIL*-Proteinen bereits eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und Reifung der männlichen Keimzellen, sowie dem Erhalt der Keimbahnstammzellfunktion zugeschrieben werden. Bisher ungeklärt ist die Relevanz der *PIWIL*-Gene für die Spermatogenese des Menschen. Weiterhin fehlen tiefgehende klinische Untersuchungen, die den prädiktorischen Wert und eine potentielle klinische Nutzung einer *PIWIL*-Genexpression bei Männern mit eingeschränkten Ejakulatparametern eruieren.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Expression der humanen *PIWIL*-Gene (*PIWIL1-4*) in ejakulierten Spermatozoen zu bestimmen und darüber eventuelle klinische Zusammenhänge zu verminderten Ejakulatparametern zu untersuchen.

Die *PIWIL*-Proteine weisen in murinen Testis ein definiertes Expressionsschema auf. Wie diese periodische Expression reguliert wird ist bisher unklar. Die *PIWIL*-Gene sollen auf epigenetische Regulationsmechanismen in humanen Keimzellmodellen untersucht werden. Des Weiteren sollen putative Promotorabschnitte identifiziert werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Expression der *PIWIL*-Gene zu haben scheinen. Diese Bereiche sollen auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht werden. Zum Nachweis

der physikalischen Bindung sollen *electrophoretic mobility shift*- und *supershift*-Analysen durchgeführt werden.

Abschließend sollen die Konsequenzen eines Verlustes der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf die Expression Spermatogenese-relevanter Gene, sowie auf zellfunktionelle Auswirkungen in humanen Keimzellmodellen untersucht werden.

2 Material

2.1 Patientenproben

Das Forschungsvorhaben „Rolle der humanen *PIWIL*-Gene bei Spermatogenese und männlicher Infertilität“ wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befürwortet. Zur Untersuchung wurden 83 Ejakulatproben von Patienten des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie sowie von freiwilligen Spendern aus dem Zeitraum von September 2010 bis November 2011 verwendet. Alle Probanden wurden ärztlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Nutzung ihrer Ejakulatprobe für wissenschaftliche Untersuchungen.

Die Einteilung des Ejakulates erfolgte nach den standardisierten Kriterien der WHO (WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates, 5. Edition, 2010) in folgende Parameter:

Parameter (Einheit)	Referenz (95 % Konfidenzintervalle)
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 (progressiv und nichtprogressiv, %)	40 (38-42)
Progressive Motilität (%)	32 (31-34)
Vitalität (%)	58 (55-63)
Morphologie (normale Form, %)	4 (3,0-4,0)
pH-Wert	$\geq 7,2$

Aufgrund dieser Kriterien wurden die Spermiogramme nach folgender Nomenklatur beurteilt:

Aspermie	kein Ejakulat
Asthenozoospermie	reduzierte Motilität (<32 % motile Spermatozoen)
Azoospermie	keine Spermatozoen im Ejakulat

Kryptozoospermie	reduzierte Spermienkonzentration (<1 Mio Spermien/mL)
Nekrozoospermie	geringer Prozentsatz von lebenden Spermien und keine Beweglichkeit
Normozoospermie	den Referenzwerten entsprechende Ejakulatparameter
Oligoasthenozoospermie	eingeschränkte Konzentration und Motilität
Oligoasthenoteratozoospermie	eingeschränkte Konzentration, Motilität und Morphologie
Oligozoospermie	reduzierte Spermienkonzentration (<15 Mio. Spermatozoen/mL)
Teratozoospermie	verminderter Anteil morphologisch normaler Spermatozoen (<4 % normale Formen)

Es wurden 47 Probanden in die Gruppe „normales Spermogramm“ und 36 Probanden in die Gruppe „pathologisches Spermogramm“ eingeteilt. Die zugehörigen Patientendaten wurden anonymisiert und in einer Datenbank erfasst. Dann wurden die Ejakulatproben durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000 U/min in einen Plasma- und einen Zellenanteil separiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2 Prokaryoten

One Shot TOP10 E. coli

Invitrogen (Karlsruhe)

2.3 Eukaryoten

NT2/D1 humane embryonale Karzinomzelllinie; zur Verfügung gestellt vom Labor für Zell-und Tumorbologie des DKFZ in Heidelberg von Dr. rer. nat. Achim Breiling

TCam-2 Humane Seminomzelllinie; zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Bonn von Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

2.4 Chemikalien und Reagenzien

0,05% Trypsin-EDTA mit Phenolrot

Invitrogen (Karlsruhe)

2-Propanol (95%)

Roth (Karlsruhe)

5-Aza-2'-Desoxycytidin (5AzadC)	Sigma-Aldrich (München)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich (München)
<i>100 bp DNA Ladder</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Aceton	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem (Darmstadt)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
<i>CutSmart-Puffer</i>	Fermentas (St Leon Rot)
DNA <i>Retardation</i> Gel (6%)	Thermo Scientific (Bonn)
DEPC-H ₂ O	Roth (Karlsruhe)
Desoxycholat	Sigma-Aldrich (München)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
dNTP Mix 10 mM total	Bioline (Luckenwalde)
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)</i>	Gibco (Karlsruhe)
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare (München)
Essigsäure (100%)	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol (96%)	Sigma-Aldrich (München)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum	Gibco (Karlsruhe)
<i>FuGene HD Transfection Reagent</i>	Promega (Mannheim)
<i>GelPilot DNA Loading Dye</i>	Qiagen (Hilden)
Glycin	Appllichem (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Gibco (Karlsruhe)

Kodak D-19 <i>Developer</i>	Sigma-Aldrich (München)
LB Agar, <i>powder</i> (Lennox L Agar)	Invitrogen (Karlsruhe)
LB Broth Base, <i>powder</i> (Lennox L Broth Base)	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
<i>Maxima SYBR Green qPCR Mastermix</i>	Fermentas (St Leon Rot)
Methanol (100%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumacetat für Molekularbiologie	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
<i>NEBuffer 2</i> (für M.SssI)	Fermentas (St Leon Rot)
<i>Nu Page LDS Sample Buffer (4x)</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Nu Page MES SDS Running Buffer</i> für Bis-Tris Gele (20x)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Nu Page Sample Reducing Agent</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Nu Page Transfer Buffer (20x)</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>NuPage 4-12 % Bis-Tris-Gele</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Opti-MEM I reduced serum medium</i>	Gibco (Karlsruhe)
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific (Bonn)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	Biochrom (Berlin)
Ponceau-S	Sigma Aldrich (München)
Proteaseinhibitor	Invitrogen (Karlsruhe)
Puffer R (für XhoI, HindIII und KpnI)	Fermentas (St Leon Rot)
RPMI 1640 + GlutaMAX	Gibco (Karlsruhe)
S-Adenosylmethionin (SAM)	New England Biolabs (Schwalbach)
SOC-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sulforhodamin B	Sigma Aldrich (München)
Trichloressigsäure (10 %)	AppliChem (Darmstadt)

Tris	AppliChem (Darmstadt)
Tris-HCl	AppliChem (Darmstadt)
Triton-X 100	AppliChem (Darmstadt)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween-20	AppliChem (Darmstadt)

2.5 Verbrauchsmaterialien

<i>Countess Cell Counting Chamber Slides</i>	Thermo Scientific (Bonn)
Gewebekulturflaschen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Einmalhandschuh	Semperit (Wien)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Scientific (Bonn)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikrotiterplatten, 96-Loch	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Nylon-Membran	Thermo Scientific (Bonn)
<i>Partec CellTrics 20µm Filter</i>	Systemex (Görlitz)
Pasteurpipetten	Hirschmann Labor (Eberstadt)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
PVDF-Membran	Biorad (München)
Reaktionsgefäße (0,2-2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Wachstube <i>Phasetrap</i>	peqLab (Erlangen)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

2.6 Laborgeräte

<i>Affymetrix Scanner „Model 3000 G7“</i>	Thermo Scientific (Bonn)
---	--------------------------

Analysewaage „ABJ“	Kern&Sohn (Balingen)
Brutschrank „Hera Cell 240i“	Thermo Scientific (Bonn)
<i>Cell Sorter</i> „BD FACS Aria II“	BD Bioscience (Heidelberg)
<i>DNA-Sequencer</i> „ABI Prism“	Applied Biosystems (Darmstadt)
Elektrophorese-Kammer „40-0911“	PeqLab (Erlangen)
<i>GeneChip Fluidics Station</i> „450“	Thermo Scientific (Bonn)
<i>GeneChip Hybridization Oven</i> „640 “	Thermo Scientific (Bonn)
Inkubator „Unimax1011“	Heidolph (Schwalbach)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
PCR Thermo-Cycler „T3000“	Biometra (Göttingen)
Photometer „BioPhotometer“	Eppendorf (Hamburg)
Plattenreader „Tecan“	Tecan (Grödig)
<i>Power Supply</i> „EPS 301“	GE Healthcare (München)
Sterilbank „Herasafe“	Heraeus (Hanau)
<i>Realtime-Cycler</i> „iCycler“	Bio-Rad (München)
Thermoblock „Thermomixer Comfort“	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer „Vortex IR“	Starlab (Hamburg)
<i>Western Blot Electrophoresis Cell</i> „XCell SureLock™“	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Western Blot Transfer-Kammer</i> „Mini Trans-Blot Cell“	Bio-Rad (München)
Zellzählgerät „Countess“	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifuge „Centrifuge 5415D“	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge „Sprout“	Kisker (Steinfurt)
Zentrifuge „4-5L“	Sigma (Osterode am Harz)

2.7 Kits

<i>Affymetrix Clariom™ S Assay</i>	Thermo Scientific (Bonn)
------------------------------------	--------------------------

<i>Biotin 3' End DNA Labeling Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
<i>Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems (Darmstadt)
<i>Caspase-Glo 3/7 Assay</i>	Promega (Mannheim)
<i>CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i>	Promega (Mannheim)
<i>Dual Glo Luciferase Assay System</i>	Promega (Mannheim)
<i>GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit</i>	Thermo Scientific (Bonn)
<i>GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit</i>	Thermo Scientific (Bonn)
<i>HotStarTaq DNA Polymerase</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Lightshift EMSA Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
<i>MasterPure DNA Purification Kit</i>	Biozym (Hessisch Oldendorf)
<i>Mycoplasma PCR Test Kit</i>	AppliChem (Darmstadt)
<i>NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Kit</i>	Pierce (Rockford, USA)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Fermentas (St- Leon-Rot)
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>ZR Plasmid Miniprep Kit</i>	Zymo Research (Freiburg)

2.8 Enzyme

BstUI (EC 3.1.21.4)	New England Biolabs (Schwalbach)
CpG Methyltransferase (M.SssI) (EC 2.1.1.37)	New England Biolabs (Schwalbach)
DNase, RNase-frei (EC 3.1.21.1)	Qiagen (Hilden)
HindIII (EC 3.1.21.4)	Fermentas (St Leon Rot)
KpnI (EC 3.1.21.4)	Fermentas (St Leon Rot)
Proteinase K (EC 3.4.21.64)	Serva (Heidelberg)
RNase A (EC 3.1.27.5)	Serva (Heidelberg)
T4 DNA Ligase (EC 6.5.1.1)	Fermentas (St Leon Rot)

XhoI (EC 3.1.21.4)

Fermentas (St Leon Rot)

2.9 Vektoren

pCR 2.1-TOPO

Invitrogen (Karlsruhe)

pGL4.10[luc2]

Promega (Mannheim)

pGL4.74[hRluc/TK]

Promega (Mannheim)

U6gRNA-Cas9-2A-GFP

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Gen	Sequenz 5'-3' <i>fw</i>	Sequenz 5'-3' <i>rv</i>
Methylierungsanalysen		
PIWIL1 Me_Ins1	TGTTGATTTTGTTCATGAGG	TTAAACTTTAACCCCAAAAAA
PIWIL1 Me_Ins2	TGGGGTTAAAGTTAAATTTTGTG	TAATCCTACAATCCCCAATAC
PIWIL2 Me_Ins1	GGTAGGAATGGGGTAAGTTAATT	CACATACTCCAAAACCAATTC
PIWIL2 Me_Ins2	GATGGGTAAATTAGATAGTTTGT	CTAAACACCTTCTTAAAACC
PIWIL3 Me	TTGTTTGTAGAAAGAAGTTAAAATG	TCAAAAAATAAAAACCATCCTA
PIWIL4 Me	ATGAAAAAGTTGGATAATGTAAATT	CCACAAAACTACAAAATCTCA
Promotorstudien		
PL2 Prom_ A	AAACTCGAGTGGTGCCAGGGTATTTGGAGTC	TTTAAGCTTTGGCATGCTCCAGGGCCAATTC
PL2 Prom_ B	AAACTCGAGTGGTGCCAGGGTATTTGGAGTC	TTTAAGCTTTGGTAGCGATACAGGTGGTGAAA
PL2 Prom_ C	AAAGGTACCTGGTGTGGGAGAGGGATGCAGTTA	TTTAAGCTTTGGTAGCGATACAGGTGGTGAAA
PL2 Prom_ D	AAACTCGAGTGGTGTGGGAGAGGGATGCAGTTA	TTTAAGCTTTGGAACCGGGCCAGTACTCA
PL2 Prom_ E	AAACTCGAGTGGTGTATCGCAATCCTCTTAA	TTTAAGCTTTGGGCCAGGGTTCTATCTCCTC
PL2 Prom_ F	AAAGGTACCTGGACAGGTCTTGTGGCCAATGG	TTTAAGCTTTGGGTAGCAGATACTTGGCTGTC
Sequenzierung		
pCR2.1-TOPO	CAGGAAACAGCTATGAC	GTAAAACGACGGCCAG

pGL4.10[luc2]	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	GCCCTTCTTAATGTTTTTG
qRT-PCR		
c-KIT	TGCATTCAAGCACAAATGGCACGG	GTGTGGGGATGGATTTGCTCTTTG
DAZL	GGAGCTATGTTGTACCTCC	CCATGTAAGTAGATAAGCCAG
DND1	TGCTGGGACAGGGACCTATG	ACGGCCATGGAAGATCACTG
DNMT1	CGCTGTATCTAGCAAGGGTCA	TCGAATCTCGCGTAGTCTTG
DPPA3	ACGCCGATGGACCCATCACAGTTT	TCTCGGAGGAGATTTGAGAGGCC
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
HAND1	AAGGCTCAGGACCCAGAAG	CGGTGCGTCCTTTAATCCTC
LINE1	TAACCAATACAGAGAAGTGC	GATAATATCCTGCAGAGTGT
NANOG	TGCTGAGATGCCTCACACGGA	TGACCGGGACCTTGCTTCCTT
NANOS3	CCCGAAACTCGGCAGGCAAGA	AAGGCTCAGACTTCCCGGCAC
PAX6	GGAATCAGAGAAGACAGGCCAG	GGGTGTAGGTATCATAACTCCG
POU5F1	GCTGGAGCAAAACCCGGAGG	TCGGCCTGTGTATATCCCAGGGTG
PRDM1	CGGGGAGAATGTGGACTGGGTAGA	CTGGAGTTACTTGGGGGCAGC
PRDM14	CTACCGAGCCCGAGTGGCCTAC	TAGAGCCATCCCGGGACCGCA
SOX2	ACACCAA TCCCA TCCACACT	CCTCCCCAGGTTTTCTCTGT
SOX17	GAGCCAAGGGCGAGTCCCGTA	CCTCCACGACTTGCCCAGCAT
T	ACCCAGTTCATAGCGGTGAC	CCATTGGGAGTACCCAGGTT
TDRD1	ACCACCCTATAGACCAAGAAT	TTTCAATGTTTCCATAGTCTGCA
TDRD5	CCAGCCGGACTGAAGAATTG	GCTTCAATACCGCTGATCAG
TFAP2C	CGCTCATGTGACTCTCCTGACATCC	TGGGCCGCAATAGCATGTTCT
TNAP	AAGCAGGTCTTGGGGTGCACCA	TTGGTCTCGCCAGTACTTGGGGT
VASA	AGAAAGTAGTGATACTCAAGGACC	TGACAGAGATTAGCTTCTTCAAAA

genome editing

PL1_DNA E3	CTTTATTTGGTGACTCTTCT	TGCAATCCTGAGTAACCATT
------------	----------------------	----------------------

PL1_DNA E15	CTACTGATTAGCTGTGTGGC	CGATCATCACGAGCTTCAGC
PL2_DNA E6	GAGCAGGTCTTCTTGAGTCA	GCACAACCTCGAACATACAGG
PL2_DNA E12	ACTCCTTAGTGCGCAAGGTA	TGAGGATGAAGACAGAGTTG

TaqMan Sonden

Der Hersteller der unten genannten *TaqMan* Sonden ist Thermo Scientific (Bonn).

Gen	Ziel-Exons
PIWIL1 Hs00380290_m1	3-4
PIWIL2 Hs01032719_m1	4-5
PIWIL3 Hs00908837_m1	13-14
PIWIL4 Hs00895218_m1	1-2

2.11 Antikörper

primäre Antikörper

<i>Anti-PIWIL2 rabbit antibody</i> (ab181340)	1:5000	Abcam (Cambridge, UK)
<i>β-AKTIN AC-15 mouse antibody</i>	1:10.000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>MIWI rabbit antibody</i> (D478)	1:1000	Cell Signaling (Cambridge, UK)
<i>PAX5 antibody</i>	1µg/µL	Cell Signaling (Cambridge, UK)
<i>PIWIL1 Polyclonal rabbit antibody</i> (PA521051)	1:5000	Thermo Scientific (Dreieich)

sekundäre Antikörper

<i>Goat anti-rabbit IgG</i>	1:30.000	Cell Signaling (Cambridge, UK)
<i>Rabbit anti-mouse IgG</i>	1:50.000	Dako (Glostrup, Dänemark)

2.12 Puffer, Lösungen, Medien

2.12.1 Zellkultivierung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium RPMI komplett (TCam-2)	500 mL RPMI 1640 + GlutaMAX 50 mL FKS

Kulturmedium DMEM komplett (NT2/D1)	5 mL Antibiotika (Pen/Strep) 500 mL DMEM + GlutaMAX 50 mL FKS 5 mL Antibiotika (Pen/Strep)
Einfriermedium	1 mL Kulturmedium komplett 10 % DMSO (frisch hinzugeben)
SRB-Lösung	0,46 g Sulforhodamin B ad 100 mL 1 %-ige Essigsäure
20 mM Tris-HCL-Puffer (pH 8)	2,24 g Tris ad 1 L <i>Aqua bidest.</i> (pH 8 mit HCl einstellen)
20 mM Tris-NaOH-Puffer (pH 10)	2,24 g Tris ad 1 L <i>Aqua bidest.</i> (pH 10 mit NaOH einstellen)

2.12.2 Bakterienkultivierung

Bezeichnung

LB-Medium

Zusammensetzung

20 g LB Broth Base

ad. 1 L *Aqua bidest.*

→ autoklavieren

Zugabe von Ampicillin (100 mg/L)

oder Kanamycin (100 mg/L)

Nähragar für Bakterienkulturen

32g LB Agar

ad. 1 L *Aqua bidest.*

→ autoklavieren

Zugabe von Ampicillin (100 mg/L)

oder Kanamycin (100mg/L)

2.12.3 DNA-Laufpuffer

Bezeichnung

10xTBE-Puffer (pH 8)

Zusammensetzung

54,0 g Tris

27,5 g Borsäure

20 mL 0,5 M EDTA (pH 8)

ad. 1 L Aqua bidest.

1xTBE-Laufpuffer (pH 8)

100 mL 10x TBE-Puffer

900 mL *Aqua bidest.*

10xTris-Glycin-Puffer (pH 8,3)

30 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

ad 1 L *Aqua bidest.*

0,5xTris-Glycin-Puffer (pH 8,3)

50 mL 10x Tris-Glycin-Puffer

ad 1 L *Aqua bidest.*

2.12.4 Proteinisolation

Bezeichnung

RIPA-Lysepuffer (pH 7,4)

Zusammensetzung

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

200 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 % Triton X-100

0,25 % Desoxycholat

1:100 Proteaseinhibitor

(frisch hinzugeben)

2.12.5 Westernblot

Bezeichnung

Zusammensetzung

1xMES-Laufpuffer (pH 7,3)	50 mL MES-Puffer (20x) 950 mL <i>Aqua bidest.</i>
1xTransferpuffer (pH 7,2)	50 mL Transferpuffer (20x) 100 mL Methanol 850 mL <i>Aqua bidest.</i>
10xTBS (pH 8)	100 mL 5M NaCl 300 mL 1M Tris (pH 8,0 mit HCl einstellen) 600 mL <i>Aqua bidest.</i>
1xTBS-T (pH 8)	100 mL 10x TBS 900 mL <i>Aqua bidest.</i> 500 µL Tween-20 (0,2 %)
Ponceau-S	1 mg Ponceau-S 5 mL 100 % Essigsäure ad 100 mL <i>Aqua bidest.</i>

2.13 verwendete Software

ALGGEN PROMO	http://alggen.lsi.upc.es
BIQ-ANALYZER V2.0	Max-Planck-Institut (München)
CPG-ISLAND SEARCHER	http://cpgislands.usc.edu
EXPRESSION CONSOLE SOFTWARE (v.1.4.1)	Thermo Scientific (Bonn)
GENESIS	Technische Universität Graz
METHYL PRIMER EXPRESS V1.0	Thermo Scientific (Bonn)
PANTHER	http://pantherdb.org/
PROMOTORSCAN1.7	http://www-bimas.cit.nih.gov
QUANTITATIVE REALTIME-PCR	Bio-Rad iQ5 2.1 (Bio-Rad, München)

SEQUENCE SCANNER SOFTWARE V1.0

Applied Biosystems (Darmstadt)

Statistische Auswertung

EXCEL 2010 (Microsoft, USA)

SPSS STATISTICS 20.0 (IBM, Ehningen)

TF-SEARCH

<http://www.cbrc.jp>

TIDE (*Tracking of Indels by DEcomposition*)

<https://tide-calculator.nki.nl>

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultivierung und Kryokonservierung

Die Zelllinie NT2/D1 wurde in DMEM-Medium kultiviert, das mit 10 % FKS, 2 mM GlutaMAX und 1 % Pen/Strep versetzt war. Die Kultivierung der Zelllinie TCam-2 erfolgte in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 2 mM GlutaMAX und 1 % Pen/Strep. Bei 37 °C, 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchte wurden die Zellen als adhärenente *monolayer* in sterilen Kulturflaschen inkubiert. Ein Mediumswechsel erfolgte alle ein bis drei Tage. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Das Ablösen der TCam-2-Zellen erfolgte durch Inkubation mit 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min. Das erhaltene Zellpellet wurde in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:6 in neue Kulturgefäße übertragen. Die NT2/D1-Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst, um unerwünschte Differenzierungsprozesse durch die Trypsin/EDTA-Lösung zu vermeiden. Die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in 1,8 mL Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei -80 °C für 24 h, die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen wieder in Kultur aufzunehmen, wurden die Gefrieröhrchen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und der Inhalt zügig in 5 mL Medium überführt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit Kompletmedium gewaschen und erneut zentrifugiert, um toxische DMSO-Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in sterile Kulturflaschen überführt. In regelmäßigen Abständen wurden alle Zelllinien unter Verwendung des *Mycoplasma PCR Test Kits* auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Es wurde zu keinem Zeitpunkt eine Kontamination festgestellt.

3.1.2 Transfektion von Zellen

Die Transfektion stellt eine Möglichkeit dar, genetisches Material in humane Zellen einzubringen. Die gewählte liposomale Transfektion basiert auf der Komplexierung von DNA oder RNA mit kationische Liposomen. Die entstandenen Lipoplexe werden endozytotisch aufgenommen und die Nukleinsäuren ins Cytoplasma entlassen.

3.1.2.1 Transiente Transfektion von Vektoren

Zur Transfektion der Vektoren wurde *FuGeneHD Transfection Reagent* in einem Verhältnis von 3:1 (μL *FuGeneHD*: μg Plasmid) verwendet.

Für die Promotorstudien wurden die Plasmide in 96-Loch-Platten transfiziert. Dazu wurden die Zellen 24 h zuvor eingestreut und vor der Transfektion mit 95 μL frischem Komplettmedium versetzt. Der Ansatz pro Loch setzt sich wie folgt zusammen:

0,11 μg Plasmid-DNA (pGL4.10[luc2]:pGL4.74[hRluc/TK] = 50:1)

ad 5,20 μL *Opti-MEM I reduced serum medium*

0,30 μL *FuGeneHD*

Die Komplexbildung wurde unter Ausschluss von FKS für 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden 5 μL des *FuGeneHD*-DNA-Gemisches zu den Zellen pipettiert und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Für das *genome editing* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* mittels CRISPR/Cas-Plasmiden wurden 1×10^6 Zellen in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm^2 in 5 mL Komplettmedium eingestreut und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach folgendem Ansatz:

8,8 μg U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Plasmid

ad 414 μL *Opti-MEM I reduced serum medium*

26 μL *FuGeneHD*

Die Komplexierung erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen mit 400 μL Transfektionsansatz für 24 h im Brutschrank inkubiert bevor die Sortierung mittels Durchflusszytometer erfolgte.

3.1.3 5'-Aza-2-Desoxycytidin-Behandlung

Eine Möglichkeit zur Reexpression inaktivierter Gene bietet das Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5AzadC). Hierbei handelt es sich um ein Cytosinanalogon, welches als Desoxyribonukleosid in neu synthetisierte DNA-Stränge inkorporiert wird und die DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferase 1 (DNMT1), verantwortlich für *de novo* Methylierung, irreversibel inhibiert. Durch die Inhibierung der DNMT1 kommt es zu einem passiven Methylierungsverlust in den nachfolgenden Zellteilungen mit Reaktivierung der betroffenen Gene (Christman 2002).

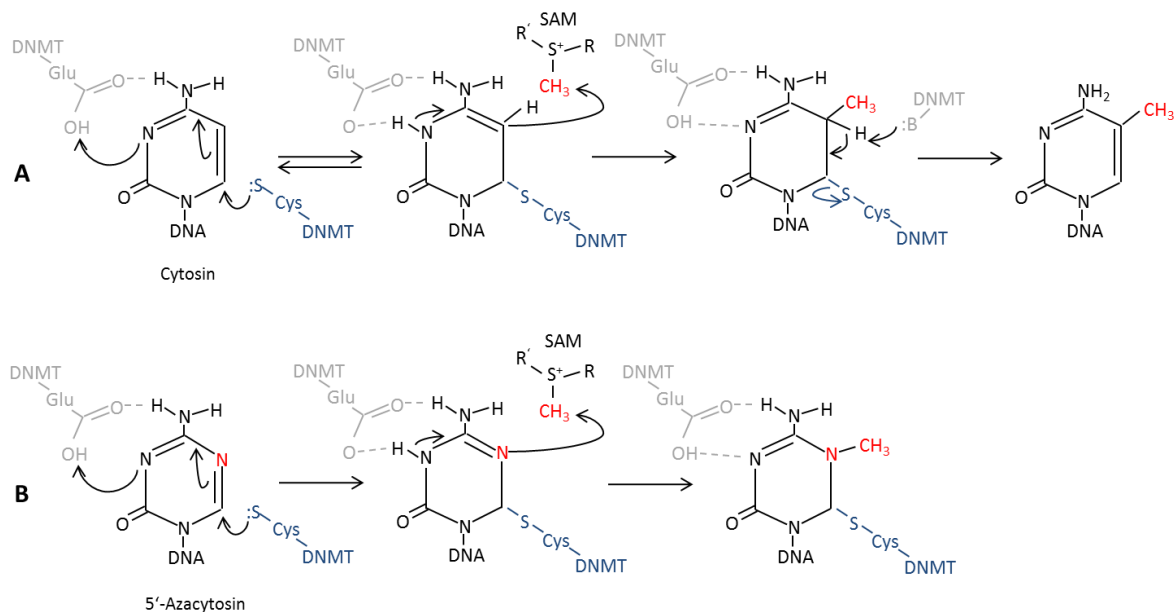


Abb.7: Mechanismus der *de novo* DNA-Methylierung

A. die DNMT bindet kovalent an das C6-Atom des Cytosin und wird nach dem Transfer der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin durch „β-Eliminierung“ von der DNA abgespalten. **B.** Im Falle eines Azanukleosides kann die „β-Eliminierung“ nicht stattfinden, die DNMT bleibt kovalent an die DNA gebunden und der Komplex wird proteasomal degradiert. SAM=S-Adenosylmethionin Abbildung modifiziert nach Wongtrakoongate 2015.

Für die 5AzadC-Behandlung wurden die 4×10^5 Zellen nach dem Einstreuen mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M 5AzadC) über 72 h kultiviert. Aufgrund der hohen Instabilität des Reagenz, bei dem die Halbwertszeit 3,5-21 h in Abhängigkeit von pH-wert und Temperatur beträgt, wurde das Kulturmedium alle 24 h mit frisch in DMSO gelösten 5AzadC erneuert (Rogstad *et al.*, 2009). Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, wurde zusätzliche eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Im Anschluss erfolgten die Ernte der Zellen und die Extraktion von DNA, RNA und Protein.

3.1.4 Zellvitalitätstest

Der Sulforhodamin B-*assay* (SRB) wird benutzt, um den zytotoxischen Effekt auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Hierzu wird der Proteingehalt der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle photometrisch bestimmt. Sulforhodamin B bindet unter mild sauren Bedingungen aufgrund der anionischen Sulfonsäuregruppe an basische Aminosäuren der Zellproteine. Der gebundene Farbstoff kann unter schwach alkalischen Bedingungen wieder aus den Zellen extrahiert und bei einer Wellenlänge von 564 nm vermessen werden. Zugrunde liegt, dass die Menge an aufgenommenem Farbstoff proportional zur Zahl der lebenden Zellen ist (Skehan *et al.*, 1990).

Für den Zellvitalitätstest wurden 5000 bis 10000 Zellen pro Loch in einem Volumen von 100 µL in eine 96-Loch-Platte eingestreut und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurde die Peripherie der Platte nicht verwendet, da die Zellen dort ein reduziertes Wachstumshalten zeigen. Sie stellte den mit Medium befüllten Verdunstungsring dar. Nach 48 h wurde das Medium inklusive der toten Zellen abgenommen und die lebenden Zellen durch Zugabe von 100 µL 10 %-iger Trichloressigsäure-Lösung pro Loch bei 4 °C fixiert. Nach einer Stunde wurden die Platten in Eiswasser gewaschen und für 30 min bei 37 °C getrocknet. Die fixierten Zellen wurden mit 100 µL einer 4,4 %-igen SRB-Lösung für 10 min bei RT angefärbt, bevor der nicht gebundene Farbstoff durch Waschen mit 1 %-iger Essigsäurelösung entfernt wurde. Die Platten wurden anschließend für 30 min bei 37 °C getrocknet bevor der Farbstoff mit 300 µL Tris-NaOH-Puffer (20 mM, pH 10), bei 150 rpm schüttelnd, eluiert wurde. Zur Analyse wurde die Extinktion am Plattenreader photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Zur Auswertung wurden die Werte der Testproben auf die Werte der Kontrolle bezogen.

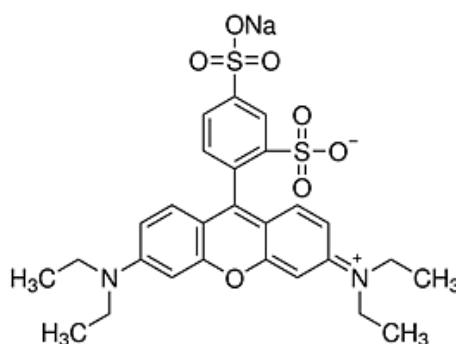


Abbildung 8: Sulforhodamin B

3.1.5 MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um ein weiteres Testverfahren zur Bestimmung von Zellproliferation und Zytotoxizität. Dabei wird das Maß lebender Zellen indirekt über deren metabolische Aktivität ermittelt. Das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird in den Mitochondrien durch spezielle Dehydrogenasen zum wasserunlöslichen lilafarbenen Formazan reduziert, wobei es zum Farbumschlag des Mediums kommt. Misst man die Absorption am Spektrophotometer bei 570 nm erhält man eine Aussage über die enzymatische Aktivität und somit Vitalität der Zellen.

Die Aussaat der Zellen erfolgte analog zum SRB-assay. Zum Messen der proliferativen Zellen wurde der *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* verwendet. Nach 48 h wurden in jedes Loch 15 µL *MTT-Dye-Solution* pipettiert und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden 100 µL *Solubilization/Stop-Lösung* dazu pipettiert und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Bildung des Formazan-Produkts wurde bei 570 nm photometrisch am Plattenreader „Tecan“ quantifiziert. Um eine Interferenz des Signals mit dem Medium oder Zelltrümmern auszuschließen wurde zusätzlich eine Referenzmessung bei 650 nm durchgeführt und vom Messwert subtrahiert. Alle Messungen erfolgten als Triplets. Zur Ermittlung der proliferativen Unterschiede wurden die Werte der behandelten Zellen auf die Kontrollen bezogen.

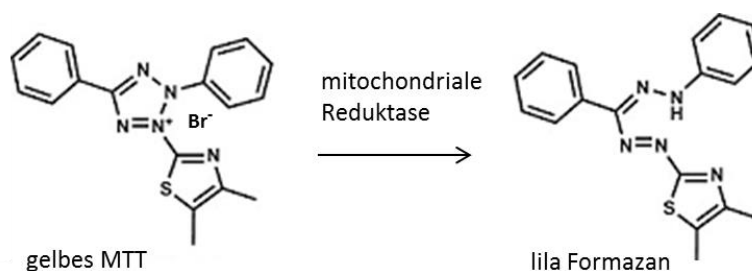


Abbildung 9: Reduktion von MTT zu Formazan

3.1.6 Proliferations-assay (Zellzählung)

Für diesen Versuch wurden 2×10^5 Zellen in Kulturflaschen mit 25 cm²-Wachstumsfläche eingestreut und für 48 h Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Dann wurden die Zellen je nach Zelllinie durch Trypsinisieren oder Abkratzen vom Flaschenboden gelöst und in 1 mL Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte aus einem 10 µL Aliquot,

welches mit 10 µL Trypanblau gemischt wurde, in einer Zählkammer im Zellzählgerät „Countess“. Der Azofarbstoff Trypanblau kann tote Zellen passieren, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos, tote Zellen erscheinen blau. Es wurden somit die Gesamt-, die Lebend- und die Totzellzahl bestimmt. Der Anteil der proliferierten Zellen wurde aus der Lebendzellzahl nach einer Behandlung relativ zur unbehandelten Kontrolle ermittelt.

3.1.7 Caspase-assay

Mit Hilfe des *Caspase-Glo 3/7 Assays* kann ermittelt werden, ob eine durchgeführte Behandlung, einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Zellen hat. Dabei wird die Aktivität der intrazellulären Caspasen 3 und 7 (EC 3.4.22.56; EC 3.4.22.60) bestimmt, indem man die Lumineszenzzunahme misst, die nach Gabe eines, durch Aminoluciferin modifizierten, Tetrapeptidsubstrates zustande kommt. Die Caspasen hydrolysieren das Aminoluciferin vom Aspartyl-Glutamyl-Valyl-Aspartat (Z-DEVD), welches wiederum das Substrat für eine im Test enthaltene Luziferase ist.

Die Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte analog zum SRB- und MTT-*assay* in einer 96-Loch-Platte für 48 h. Zum Messen der Aktivität von Caspase 3 und 7 wurde das Substrat nach Herstellerangaben frisch aufgelöst, davon 50 µL pro Loch pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Lumineszenzsignal am Plattenreader „Tecan“ quantifiziert. Die Analyse erfolgte jeweils als Triplikat. Zur Auswertung wurden die behandelten Proben auf die unbehandelten bezogen.

3.1.8 Durchflusszytometrische Sortierung von GFP-positiven Zellen

Bei der Durchflusszytometrie mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) können Zellen anhand unterschiedlicher physikalischer und molekularer Eigenschaften analysiert und sortiert werden. Die Detektion erfolgt mittels dreier verschiedener Parameter. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) beschreibt die Beugung des Lichts im flachen Winkel und gilt als Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und hängt von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und den intrazellulären Bestandteilen ab. Die Fluoreszenzintensität der Zellen nach Laseranregung bei 488 nm gibt Auskunft über zelluläre Strukturen und Funktionen sowie das Vorhandensein von zellulären Subpopulationen. Zur

Verstärkung der Signale können die Zellen zusätzlich an Antikörper oder Fluorophore als Oberflächen- oder intrazelluläre Moleküle gekoppelt sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sortierung nach Fluoreszenzintensität verwendet wobei die Emission über einen 530/540 nm Bandpassfilter mittels *Cell Sorter* „BD FACSAria II“ detektiert wurde. Dabei wurden ausschließlich GFP-exprimierende Zellen aus inhomogenen Zellpopulationen isoliert. Für die Sortierung wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben mit den U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Plasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Zellen geerntet und in 500 µL Kulturmedium resuspendiert. Um eine gute Vereinzelnung zu erreichen wurden die Zellen unmittelbar vor der Sortierung durch einen Filter mit einer Porengröße von 20 µm gegeben und in einem leeren FACS-Röhrchen gesammelt. Die Sortierung erfolgte bei einer Flussrate von 1.500 Ereignissen/s. Es wurden diejenigen Zellen, deren Fluoreszenzintensität aufgrund der GFP-Expression in dem zuvor festgelegten Bereich ab 10^3 Fluoreszenzeinheiten lag, in einem neuen FACS-Röhrchen in 500 µL Komplettmedium gesammelt. Zum Abgleich der Eigenfluoreszenz wurde stets eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die GFP-positiven Zellen wurden in neue Kulturflaschen eingestreut und als Zellpopulation bis zur zellfunktionellen Untersuchung, sowie DNA-, RNA und Proteinisolation angereichert.

Die präparative FACS-Analyse erfolgte in der *Core Facility* der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung zusammen mit Dr. rer. nat. Alexander Navarette-Santos.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA Isolation

Die Isolation genomischer DNA aus Zellkultur erfolgte unter Verwendung des *MasterPure DNA Purification Kit*. Die Zellpellets wurden in 299 µL *Tissue and Cell Lysis Solution* und 1 µL Proteinase K (50 µg/ µL) resuspendiert und für 15 min bei 65 °C im Thermocycler unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 37 °C wurde die Probe für 30 min mit 1 µL RNase A (5 µg/ µL) versetzt. Um die Reaktion abzustoppen erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Durch Zugabe von 175 µL *MPC Protein Precipitation Agent* wurden nach gründlichem Vortexen und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µL Isopropanol für 20 min bei RT präzipitiert. Die DNA wurde durch

Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm pelletiert und nach zweimaligem Waschen mit 70 %-igem EtOH luftgetrocknet. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung in 15 µL RNase-freiem Wasser bei -20 °C.

3.2.2 RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mittels TRIzol nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific). Dazu wurde das Zellpellet in 500 µL TRIzol lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit 200 µL Chloroform versetzt und für 15 s kräftig geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation zur Phasentrennung erfolgte für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C. Die RNA-haltige Oberphase wurde für 15 min mit 35 µL RDD-Puffer und 5 µL DNase inkubiert und anschließend die RNA mittels 500 µL Isopropanol für 20 min bei RT präzipitiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit jeweils 96 %-igem und 70 %-igem eiskalten Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 15 µL RNase-freiem H₂O aufgelöst. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mittels Photometer. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm wurde die Absorption einer 1:100-Verdünnung gemessen. Hierbei entspricht OD_{260nm} von 1,0 ca. 50 µg/mL doppelsträngiger DNA oder 40 µg/mL RNA. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260/280nm gab Auskunft über die Reinheit der gemessenen Lösung. Bei geringen Verunreinigungen mit Proteinen liegt der Wert bei 1,7-1,9 für DNA und 1,9-2,1 für RNA.

3.2.4 Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA

Die Bisulfittechnik bietet die Möglichkeit der Analyse von DNA-Methylierungsmustern durch DNA-Modifikation von einzelsträngiger DNA. Das C5-Atom des Cytosin bindet in einem pH-abhängigen Schritt (pH 5,0) ein Bisulfition und es entsteht ein Cytosinsulfonat. In wässriger Lösung kommt es zur Desaminierung und es entsteht ein Uracilsulfonat welches in einer anschließenden Alkalibehandlung (pH 12) zu Uracil desulfoniert wird (Abb. 10). Am C5-Atom methylierte Cytosine werden hingegen nicht konvertiert und bleiben als Cytosine erhalten. In einer anschließenden PCR werden die Uracile durch Thymin ersetzt und man kann unmethylierten Cytosinen von 5-Methylcytosinen in der Sequenzabfolge unterscheiden

(Darst *et al.*, 2010). Zur Analyse der Sequenzunterschiede wurden die PCR-Produkte kloniert und sequenziert.

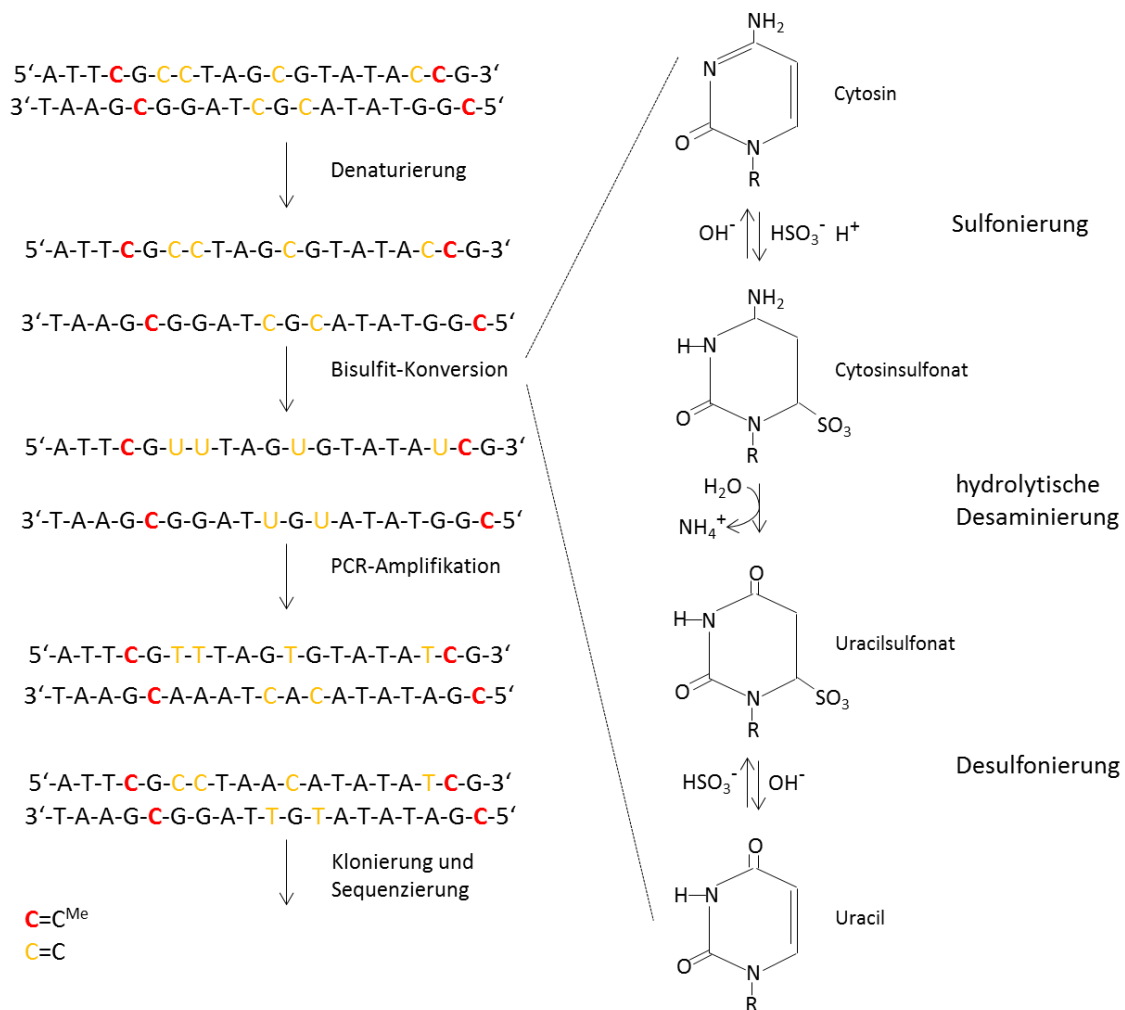


Abbildung 10: Übersicht über die Natriumbisulfitbehandlung der genomischen DNA

Der Mechanismus der Desaminierung von Cytosin nach Uracil ist rechts dargestellt. Gelbe Cytosine sind unmethyliert, rote Cytosine liegen methyliert vor. Abbildung modifiziert nach Kristensen *et al.*, 2009.

Es wurde 1 µg DNA nach Anleitung des *EpiJET Bisulfite Conversion Kit* konvertiert. Für die Sulfonierung wurde die DNA in einem Volumen von 20 µL mit 120 µL Modifizierungsreagenz versetzt und für 10 min bei 98 °C und 150 min bei 60°C inkubiert. Für die Aufreinigung der DNA wurde der Ansatz mit 400 µL Bindepuffer versetzt, auf eine Silicasäule gegeben und für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit 200 µL Waschpuffer für 30 s bei 12.000 rpm gewaschen. Nun folgte die alkalische Desulfonierung mit 200 µL Puffer für 20 min bei RT. Die Säule wurde noch zweimal mit je 200 µL Waschpuffer versetzt, bevor die DNA in 10 µL nukleasefreiem Wasser für 1 min bei 12.000 rpm eluiert wurde. Nach der Konvertierung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

3.2.5 DNA-Methylierung *in vitro*

Die im Luziferase-*assay* verwendeten *PIWIL2*-Promotorkonstrukte wurden im Rahmen der Analyse *in vitro* methyliert. Für die DNA-Methylierung *in vitro* wurde die CpG-Methyltransferase M.SssI verwendet. Das Enzym katalysiert die Methylierung von Cytosin-Basen an der C5-Position, innerhalb der doppelsträngigen Dinukleotidkennungssequenz 5'-CpG-3'. Die DNA-Methylierung *in vitro* geschah nach folgendem Protokoll:

5 µg DNA

2 µL *NEBuffer 2*

2 µL M.SssI (4 U/µL)

320 µM SAM

ad 20 µL nukleasefreies H₂O

Der Ansatz wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und die DNA über eine Natriumacetat-Ethanol-fällung präzipitiert. Dazu wurde die Reaktion mit 2 µL 3 M Natriumacetat und 50 µL eiskaltem 100 %-igen Ethanol versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Zu Fällung der DNA wurde für 10 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurde die DNA in 15 µL nukleasefreiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Effizienz der DNA-Methylierung *in vitro* wurde über Restriktion mit BstUI überprüft. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass BstUI nicht in der Lage ist, methylierte DNA zu schneiden. Der Verdau von 1 µg Plasmid mit 1 µL BstUI (1U/µL) in 1x *CutSmart*-Puffer erfolgte für 1 h bei 60 °C und wurde über eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.2.6 Genome editing mit dem CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System bietet die Möglichkeit der gezielten genomischen Sequenzveränderung des Erbgutes lebender Zellen und Organismen, um damit die Funktion und Organisation von Genen in ihrem physiologischen Kontext zu analysieren. Die Methode basiert auf einem adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien, dem CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), mit dessen Hilfe die Organismen auf das Eindringen von genetischem Material reagieren und dieses eliminieren können. Dem liegen im Bakteriengenom befindliche repetitive Sequenzen (*repeats*, 23-44 bp) zugrunde,

die sich mit nichtrepetitiven Sequenzen (*spacer*) abwechseln (Ishino *et al.*, 1987). Neben diesen Sequenzen kodieren die CRISPR-Loci zusätzlich für verschiedene Cas-Gene (CRISPR-assoziierte Gene), welche als Endonukleasen für die CRISPR-Aktivität essentiell sind. Auf der molekularen Ebene kann die Wirkung des CRISPR/Cas-System in drei Phasen unterteilt werden. Im ersten Schritt wird die Fremd-DNA erkannt, durch die Cas-Endonukleasen gespalten und als *spacer* in das Bakteriengenom in den CRISPR-Loci integriert. Im zweiten Schritt wird der CRISPR-Lokus transkribiert und durch die Cas-Proteine zu einer reifen crRNA (CRISPR-RNA) prozessiert. Im letzten Schritt wird die crRNA zusammen mit den Cas-Endonukleasen in einen Effektor-Komplex eingebaut, der zur Spaltung der fremden Ziel-DNA dient. Es existieren drei Haupttypen von CRISPR/Cas-Systemen (Typ I, Typ II und Typ III). Die Typen unterscheiden sich dabei in den Cas-Genen und repetitiven Sequenzen. In der Molekularbiologie werden für das *genome editing* vorrangig Typ II-CRISPR/Cas-Systeme verwendet. Der Vorteil des Systems besteht darin, dass für die Genstilllegung nur ein Cas-Protein (Cas9) erforderlich ist (Deltcheva *et al.*, 2011). Um die Ziel-DNA sequenzspezifisch erkennen und spalten zu können, muss die Endonuklease Cas9 sowohl mit einer crRNA als auch mit einer separaten transaktivierenden crRNA (tracrRNA) assoziieren. Die tracrRNA ist teilweise komplementär zur crRNA und bildet mit ihr einen RNA-Duplex, der als *guide* RNA (gRNA) bezeichnet wird und den Effektor-Komplex zur Ziel-DNA leitet. Die gRNA bestimmt die Präferenz für die Ziel-DNA zusammen mit dem *protospacer*-assoziierten Motiv (PAM), einer 2-5 nt langen konservierten Sequenz die in der Ziel-DNA 3' auf die crRNA-komplementäre Sequenz folgt. (Jinek *et al.*, 2012). Die Cas9 induziert Doppelstrangbrüche in der Zelle. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann auf zellulärer Ebene auf zwei Wegen erfolgen: Homologie-gerichtete Reparatur (HDR) und nicht-homologischer Endverbund (NHEJ). Die HDR erfordert das Vorhandensein einer Matrize, was es ermöglicht präzise Mutationen in das Genom einzufügen. Der in unserem Fall genutzte NHEJ-Weg benötigt keine Reparaturvorlage und führt zu unspezifischen Insertionen und Deletion (Indels), die zu einer Leserasterverschiebung führen können, wodurch die Funktionalität des gebildeten Proteinproduktes verloren gehen kann (Hanlon *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, welche sowohl für die Cas9-Endonuklease als auch für die gewünschte gRNA codieren. Weiterhin ermöglichte das Plasmid die FACS-Separation (Kapitel 3.1.8) positiv transfizierter Zellen über die Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP). Die Transfektion der CRISPR/Cas9-Plasmide zum *genome editing* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

erfolgte wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben. Die Lage der Ziel-Exone für das *genome editing* wurde so gewählt, dass möglichst viele Spleißvarianten der *PIWIL*-Gene 1 bzw. 2 von der genomischen Veränderung betroffen waren. Weiterhin wurde darauf geachtet die PIWI-Domäne beim Einbringen der Mutationen außen vor zu lassen, da *PIWIL1* und *PIWIL2* eine Sequenzhomologie im 3'-Bereich der RNA aufweisen und in Folge dessen, beide Homologe zu gleichen Zeit vom *knockdown* betroffen sein könnten.

3.2.7 Detektion von Mutationen in genomischer DNA

Zur Ermittlung der durch die Transfektion der CRISPR/Cas-Plasmiden hervorgerufenen Mutationen in den genomischen DNA-Abschnitten von *PIWIL1* und *PIWIL2* wurde das *GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit* verwendet. Es bietet eine zuverlässige Methode zur Detektion sequenzspezifischer Doppelstrangbrüche. Dazu wird die DNA aus den Zellen isoliert, amplifiziert und in einem finalen Schritt denaturiert. Durch das Vorhandensein von Wildtyp-DNA ohne Mutationen und mutierter DNA entstehen nach Renaturierung Heteroduplexe mit Basenfehlpaarung, welche durch eine Nuklease gespalten und die Spaltprodukte im Agarosegel visualisiert werden können. Ein Teil der DNA wurde nach der Amplifikation direkt sequenziert und die Chromatogramme mit Hilfe des Programmes *TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition)* auf die vorherrschenden Arten von Insertionen und Deletionen (Indels) in der DNA des untersuchten Zellpools analysiert.

Zur Extraktion der DNA wurde das Zellpellet mit 50 µL Lysepuffer und 2 µL Proteindegradierer resuspendiert und im Thermocycler für 15 min bei 68 °C, sowie 10 min bei 95 °C aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde schnell auf Eis gekühlt und die lokusspezifische PCR nach Standardprogramm (Kapitel 3.2.8) mit folgenden Komponenten durchgeführt:

22 µL nukleasefreies Wasser

25 µL *Amplitaq 360 Mastermix*

0,5 µL Primer *fw* (10µM)

0,5 µL Primer *rv* (10µM)

2 µL Zelllysate

Für die Erzeugung der Heteroduplexe wurden 3 µL PCR-Produkt mit 1 µL 10x Detektionspuffer und 9 µL nukleasefreiem Wasser versetzt, thermisch denaturiert und langsam wieder renaturiert:

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	5 min
Renaturierung I	95 °C - 85 °C	-2 °C/ s
Renaturierung II	85 °C - 25°C	-0,1 °C/ s

Der enzymatische Verdau erfolgte nach Zugabe von 1 µL Detektionsenzym für 1 h bei 37 °C und wurde im Agarosegel analysiert.

3.2.8 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der isolierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Als Startermolekül dienen hierbei Hexamerprimer, die unspezifisch entlang der mRNA binden. Die reverse Transkriptase generiert mit Hilfe der Primer und dNTPs ein RNA-DNA-Hybrid, welches nach Denaturierung durch Erhitzen in einen Doppelstrang überführt wird.

Zur cDNA-Synthese wurde das *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet. Der Hybridisierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

1 µg RNA

1 µL *random* Primer (0,2 µg/µL)

ad 11 µL nukleasefreies H₂O

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und dann zügig auf 4 °C gekühlt, um eine effektive Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Anschließend wurde der Mastermix hinzugegeben:

4 µL 5x Reaktionspuffer

1,5 µL nukleasefreies Wasser

2 µL dNTP Mix (10mM)

1 µL *RiboLock* RNase-Inhibitor (20 U/µL)

0,5 µL Reverse Transkriptase (200 U/µL)

Für die cDNA-Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Primer- <i>annealing</i>	25°C	5 min
cDNA-Synthese	42°C	60 min
Denaturierung	70°C	5 min

Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik ist eine enzymatische Methode, welche die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente ermöglicht (Saiki *et al.*, 1988). Die Spezifität dieser Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren und nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen hybridisieren. Eine hitzestabile *Taq*Polymerase (EC 2.7.7.7) synthetisiert bei einer Temperatur von 72 °C die DNA entlang der Region zwischen den Primern in 5'-3'-Richtung. Durch Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (*annealing*) und DNA-Synthese (Elongation) kann eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragmentes erreicht werden. Die PCR-Technik wurde im Rahmen von Klonierungen, DNA-Methylierungsanalysen und RNA-Expressionsanalysen verwendet.

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten des *Kit* der *HotStarTaq DNA Polymerase* durchgeführt. Der Ansatz für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

- 9,1 µL nukleasefreies Wasser
- 1,5 µL 10x Puffer
- 1,2 µL MgCl₂ (25 mM)
- 1,0 µL dNTPs (10 mM)
- 0,5 µL Primer *fw* (20 µM)
- 0,5 µL Primer *rv* (20 µM)
- 0,2 µL *HotStarTaq*Polymerase (5 U/µL)

Dem Reaktionsansatz wurde je 1 µL cDNA hinzugefügt. Die Amplifikation der verschiedenen Bereiche erfolgte im PCR Thermocycler nach folgenden Programmen:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Polymeraseaktivierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 25x - 45x
Primer- <i>annealing</i>	58 °C - 62 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s - 120 s	

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese identifiziert.

3.2.10 Quantitative Real-Time-PCR (*Maxima SYBRGreen*)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit der quantitativen Expressionsanalyse. Hierbei interkaliert der hochsensitive Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen in die sich bildende dsDNA. Am Ende eines jeden Elongationsschrittes wird das nach Anregung entstehende Fluoreszenzsignal erfasst, wobei die Intensität der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase des PCR-Zyklus proportional zu der gebildeten Produktmenge ist. Zur Auswertung der qRT-PCR dient der *cT*-Wert (*cycle threshold*), ein definierter Schwellenwert bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig höher liegt als die Fluoreszenz der Hintergrundaktivität. Dieser Schwellenwert wird umso eher erreicht je mehr template-DNA sich im Ansatz befindet. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der $2^{-\Delta cT}$ -Methode relativ zum Referenzgen *GAPDH* oder *HPRT* (Livak und Schmittgen 2001). Zusätzlich wird am Reaktionsende eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei einer für das Amplifikat charakteristischen Temperatur wird der Doppelstrang wieder in zwei Einzelstränge aufgetrennt, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und die Fluoreszenz abnimmt. Reines Produkt kann als einheitlicher thermischer Übergang identifiziert werden. Der Ansatz für eine Reaktion des *Maxima SYBR Green qPCR Kit* ist im Folgenden dargestellt:

5,5 µL nukleasefreies Wasser

7,5 µL *Maxima SYBRGreen*

0,5 µL Primer *fw* (20µM)

0,5 µL Primer *rv* (20µM)

1 µL cDNA

Für die Reaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Polymeraseaktivierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 45x
Primer- <i>annealing</i>	58°C - 62 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Schmelzkurve	55 °C - 90 °C		1

3.2.11 Quantitative Real-Time-PCR (*TaqMan*)

Eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Analyse des Expressionsverhaltens von Genen bietet die qRT-PCR mittels *TaqMan*-Primern. Dabei erhält der Reaktionsansatz eine genspezifische Oligonukleotid-Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem *quencher*-Farbstoff am 3'-Ende ausgestattet ist. Bei der intakten Sonde wird durch das FRET-Prinzip (*fluorescence resonance energy transfer*) die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den *quencher* übertragen und dadurch eine Fluoreszenzemission verhindert wird. Die Hybridisierung der Sonde an die cDNA indiziert durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*Polymerase eine räumlichen Trennung von *quencher* und Reporter und hat einen Anstieg des Fluoreszenzsignals zur Folge. Während der exponentiellen Phase der PCR ist die gemessene Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zum entstandenen Amplifikat. Dieses ist wiederum proportional zur eingesetzten *template*-Menge. Zur Auswertung setzte man zuerst einen Schwellenwert (cT-Wert) fest, bei dem sich alle PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase befinden. Die Quantifizierung der einzelnen Proben erfolgte relativ zum Referenzgen *GAPDH* nach der $2^{-\Delta cT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001).

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der *HotStarTaq DNA Polymerase* durchgeführt. Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 9,4 µL nukleasefreies Wasser
- 1,5 µL 10x Puffer
- 1,2 µL MgCl₂ (25 mM)
- 1,0 µL dNTPs (10 mM)
- 0,7 µL Primer (20x)
- 0,2 µL *HotStarTaq*Polymerase (5 U/µL)

Dem Reaktionsansatz wurde je 1 μL cDNA hinzugefügt. Die Amplifikation der verschiedenen Bereiche erfolgte im Thermocycler „iCycler“ nach folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Polymeraseaktivierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	} 45x
Elongation	60 °C	1 min	

3.2.12 Promotorstudien

Für die Promotorstudien von *PIWIL2* wurden die verwendeten Vektoren selbst generiert. Über spezifische Primerpaare wurden aus isolierter DNA verschiedene Promotorfragmente bis 2000 bp vor dem Transkriptionsstart generiert. Dabei enthielten der *fw*-Primer zusätzlich an seinem 5'-Ende einen XhoI spezifischen Nukleotid-Überhang, während der *rv*-Primer einen HindIII- bzw. KpnI-Überhang besaß. Die Restriktionsschnittstellen waren nach der Amplifikation im PCR-Produkt enthalten. Die Fragmente wurden im Agarosegel (Kapitel 3.2.15) aufgereinigt und in den pCR2.1-TOPO-TA-Vektor ligiert (Kapitel 3.2.16). Dann erfolgte der Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und HindIII oder KpnI (Kapitel 3.2.14), wobei der Reportergenvektor pGL4.10[luc2] ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut wurde. Die Fragmente wurden in den pGL4.10[luc2]-Zielvektor ligiert und mittels Sequenzierung das Vorhandensein des gewünschten Inserts überprüft (Kapitel 3.2.22). Die erzeugten Plasmide wurden in *E. coli*-Zellen vervielfältigt und anschließend für die Reportergenstudien eingesetzt (Kapitel 3.2.23). Ein Teil der Promotorkonstrukte wurde vor der Aktivitätsmessung *in vitro* methyliert (Kapitel 3.2.5).

3.2.13 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine effektive Methode dar, um DNA-Fragmente mit Hilfe einer Gelmatrix der Größe nach aufzutrennen. Die Nukleinsäuren wandern aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückrates zur Anode und werden je nach Größe und Konformation unterschiedlich stark im Gel zurückgehalten. Dabei wurden für DNA-Fragmente bis 500 bp 1 %-ige und ab 500 bp 2 %-ige Gele verwendet. Zur Vorbereitung des Agarosegels wurden in Abhängigkeit von der DNA-Größe 1-2 g Agarose in 100 mL 0,5xTBE-Puffer aufgekocht und mit 2 μL des DNA-bindenden Farbstoffes Ethidiumbromid (10 mg/mL) versetzt. Nach Erstarren des Gels erfolgte die Elektrophorese in 0,5xTBE-Puffer bei 120 V.

Zur Größenbestimmung wurde der DNA-Größenmarker *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* mitgeführt. Die Dokumentation der Banden erfolgte mittels UV-Licht bei 254-300 nm.

3.2.14 Restriktionsverdau

Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte für 2 h bei 37 °C unter folgenden Bedingungen:

1 µg DNA

1 µL Puffer R

2 µL Restriktionsenzym (10 U/µL)

ad 10 µL nukleasefreies Wasser

Eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65 °C über 20 min. Die Auswertung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

3.2.15 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung der Amplifikate aus dem Agarosegel wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht lokalisiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Hierbei wurde auf eine möglichst kurzzeitige Exposition mit UV-Licht geachtet um keine DNA-Veränderungen zu induzieren. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mittels *QiaQuick Gelextraktions Kits*. Dazu wurde das Gelstück in 400 µL QG-Puffer für 10 min bei 50 °C verflüssigt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 150 µL Isopropanol und anschließende Bindung an eine Silicagel-Säule durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen der Säule mit PE-Puffer für 1 min bei 12.000 rpm bevor die DNA in 15 µL RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.16 Ligation mittels Topoisomerase-Thymin-Adenin-Klonierung (TOPO-TA

Cloning Kit

Die Ligation der Amplifikate erfolgte in das lacZ-Gen des pCR2.1-TOPO-TA-Vektors. Der Vektor besitzt Desoxythymidin-Überhänge, die eine direkte Ligation mit dem PCR-Produkt erlauben, welches durch die *HotStartTaq* Polymerase während der PCR Desoxyadenosin-Überhänge erhielt. Eine an den Vektor gebundene DNA Topoisomerase I (EC 5.99.1.2) hält diesen offen und induziert nach Zugabe einer Salzlösung die Ligation von Amplifikat und Vektor. Für jeden Klonierungsansatz wurden 4 µL gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µL

Salzlösung und 1 µL pCR2.1-TOPO-TA-Vektor vorsichtig vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.17 Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Vor der Ligation wurden Vektor und Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und aufgereinigt. Die Ligation erfolgte für 30 min bei 22 °C in dem angegebenen Reaktionsansatz. Das Insert lag dabei in einem mehrfach molaren Überschuss über dem Vektor vor.

1,0 µL nukleasefreies Wasser

1,0 µL 10x Puffer

1,0 µL Vektor

5,0 µL DNA-Fragment

2,0 µL T4-DNA-Ligase (5 U/µL)

3.2.18 Transformation

Die als Transformation bezeichnete Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen stellt eine einfache Methode dar, um rekombinante DNA in Bakterien zu vervielfältigen. Auf Eis wurden 100 µL chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10) aufgetaut und mit 2-5 µL Ligationsansatz für 10 min inkubiert. Ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C führte zur kurzzeitigen Ausdehnung der Zellwände und somit zur Einschleusung der DNA in die Bakterien. Die Zellen wurden anschließend für 10 min auf Eis gekühlt, dann mit 250 µL warmem SOC-Medium versetzt und 1 h bei 200 rpm und 37 °C horizontal im Thermoschüttler inkubiert. Ein Aliquot von 50 µL wurde auf entsprechende selektive Medien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion positiver Transformanden erfolgte durch Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin oder 100 µg/mL Kanamycin in den Selektionsagar und bei Verwendung des pCR2.1-TOPO-TA-Vektors wurde zusätzlich eine Blau/Weiß-Selektion unter Verwendung von X-Gal (40 µg/mL) durchgeführt.

3.2.19 Kontrolle der Klonierung durch Kolonie-PCR

Zur Kontrolle einer Klonierung des gewünschten Inserts wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden vom Selektionsagar mit einem sterilen Zahnstocher weiße

Einzelkolonien gepickt und in einen zuvor vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz überführt. Die amplifizierte DNA wurde über eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.2.20 Übernachtkultivierung von transformierten *E. coli*-Zellen

Die durch die Kolonie-PCR oder die Blau/Weiß-Selektion positiv markierten Klone wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 5 mL LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Thermoschüttler kultiviert.

3.2.21 Isolation von Plasmid-DNA

Die Übernachtkultur wurde 10 min bei 4000 rpm pelletiert und anschließend die Plasmid-DNA unter Verwendung des *ZR Plasmid Miniprep Kit* isoliert. Dazu wurden die Zellen in 200 µL Puffer P1 resuspendiert und zum Aufschließen der Zellwände mit einem Aliquot Puffer P2 versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren und 1 min Inkubation bei RT wurde mit 400 µL gekühltem Puffer P3 neutralisiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm an die Säule gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µL Waschpuffer wurde die Plasmid-DNA mit 25 µL nukleasefreiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.22 Sequenzierung nach Sanger

PCR-Produkte oder Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Kettenabbruch-Synthese sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). In einer PCR-Reaktion mit nur einem eingesetzten Primer amplifiziert man die DNA unter Verwendung eines Gemisches an Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs), welche statt einer OH-Gruppe in Position 3 des Kohlenstoffrings nur ein Wasserstoffatom besitzen, so dass sich dort kein weiteres Nukleotid anlagern kann. Die Synthese der DNA-Kette wird durch den Einbau eines ddNTPs an zufälliger Stelle abgebrochen. Dadurch entsteht eine heterogene Population an DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen, welche ihrer Größe nach aufgetrennt und durch die ddNTP-Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende mittels Laser detektiert werden können. Da die vier verwendeten ddNTPs mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind, lässt sich die Basensequenz des DNA-Fragments ableiten.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* nach Angaben des Herstellers. Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5,5 µL nukleasefreies Wasser
- 1,5 µL 5x Sequenzierpuffer
- 1,0 µL *BigDye Sequencing Mix*
- 1,0 µL spezifischer Primer (10 µM)
- 1,0 µL DNA (20-500 ng)

Die Sequenzierreaktion wurde in 0,5 mL Reaktionsgefäßen nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
<i>hold</i>	96 °C	1 min	1
Denaturierung	96 °C	10 s	} 45 x
Primer- <i>annealing</i>	50°C	5 s	
Elongation	60 °C	4 min	

Anschließend erfolgte die Fällung des Sequenzierproduktes unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung. Der Ansatz wurde mit 2 µL 125 mM EDTA, 2 µL 3 M Natriumacetat und 50 µL 96%-igem Ethanol für 15 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde anschließend für 20 min 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 µL 70 %-igem Ethanol gewaschen und 10 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet 2 min bei 70 °C im Thermocycler getrocknet. Die Analyse der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. rer. nat. Darmer und Herrn Dr. rer. nat. Christov unter Nutzung des DNA-Sequenziergerätes „ABI Prism“.

3.2.23 Dualer Reporter-gen-*assay*

Der duale Reporter-gen-*assay* erlaubt es die Aktivität von Promotoren unter variablen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurde das Plasmid pGL4.10[luc2] als Ausgangsvektor für die Untersuchungen verwendet und der zu untersuchende Promotorabschnitt stromaufwärts vom *firefly*-Luziferase-Gen kloniert. Die Messung der Luziferase-Expression über die Umsetzung des Substrates Luciferin gibt Auskunft über die Aktivierbarkeit der einzelnen Promotorfragmente *in vitro*. Es wurden 15000 Zellen TCam-2 und 20000 Zellen NT2D1 pro Loch in eine weiße 96-Loch-Platte eingestreut. Nach 24 h wurden die

Reportergenkonstrukte wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben transfiziert. Es wurde ein pGL4.74[hRluc/TK]-Vektor in einem Verhältnis von 1:50 zum pGL4.10[luc2] cotransfiziert. Dieser Vektor enthält eine konstitutiv exprimierte *renilla*-Luziferase (EC 1.13.12.5), die zur Normalisierung verwendet werden kann. 48 h nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität unter Verwendung des *Dual Glo Luciferase Assay Systems Kit* am Luminometer vermessen. Der Vektor pGL4.10[luc2], in den der *PIWIL2*-Promotor kloniert wurde, beinhaltet das Gen für die *firefly*-Luziferase (EC 1.13.12.7). Das Enzym katalysiert die ATP-abhängige Monooxygenierung von Luciferin. Die dabei entstehende Chemilumineszenz ist nachweisbar. Der zur Normalisierung verwendete Vektor pGL4.74[hRluc/TK] enthält das Gen für die *renilla*-Luziferase, welche die Monooxygenierung von Coelenterazin, ebenfalls unter Emission von Chemolumineszenz, katalysiert. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus dem Werten der *firefly*- und der *renilla*-Luziferase gebildet. Die Messung der relativen Luziferase-Aktivität erfolgte luminometrisch in Triplikaten. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 50 µL serumfreies Medium ersetzt. Dann wurden die Zellen pro Loch mit 50 µL Substratlösung für die *firefly*-Luziferase für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Messung der Lumineszenz erfolgte die Zugabe von 50 µL *Stop&Glo Reagent* pro Loch, welches die *firefly*-Luziferase Reaktion inhibiert und gleichzeitig ein Substrat für die *renilla*-Luziferase enthält. Nach 20-minütiger Inkubation wurde ebenfalls die Lumineszenz vermessen.

3.2.24 Mikroarray-Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Mikroarray-Technologie basiert auf der Hybridisierung zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide auf der Oberfläche eines Trägermaterials (*array*). Dabei bilden auf dem *array* immobilisierte Oligonukleotide (*probes*) bekannter Sequenz spezifische Doppelstränge mit DNA- oder RNA-Molekülen aus, die einer zu untersuchenden Probe entstammen (*target*). Die zu untersuchende RNA wird nach der Isolation zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend mit biotinylierten Nukleotiden markiert, um nach der Hybridisierung auf dem *GeneChip (array)* lokalisiert und über fluoreszierende Antikörper anhand der Fluoreszenzstärke quantifiziert werden zu können. Die hohe Anzahl an Gensequenzen auf einem *array* ermöglicht die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils (Transkriptom) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

3.2.24.1 Affymetrix Clariom™ S Assay

Für die Erstellung des Transkriptionsprofils der NT2/D1- und TCam-2-Zellen mit und ohne *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* wurde der *Clariom™ S Assay* von *Affymetrix* verwendet. Hierbei handelt es sich um einen 25-mer-Oligonukleotid-Mikroarray, der über 211300 präzise lokalisierter Oligo-Probensets enthält, mit dem mehr als 337100 Transkriptvarianten von über 20800 Genen vermessen werden können. Um eine hohe Abdeckung aller relevanten Transkripte zu erzeugen existieren für jedes Gen 16 verschiedene, jeweils 25 nt lange Oligo-Paare als Probenset. Dabei gibt es für jedes Set 16 genspezifische *perfect match*-Sonden und 16 *mismatch*-Sequenzen, die eine Punktmutation an Stelle 13 des Oligonukleotides enthalten. Die große Anzahl an Sonden eignet sich zum Abgleich ineffektiv oder falsch hybridisierter cDNA. Die dazugehörigen *mismatch*-Sonden ermöglichen die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz und werden zur Berechnung der Gesamtfluoreszenzintensität von den *perfect match*-Werten abgezogen. Bei der Auswahl der Oligonukleotid-Sonden wird darauf geachtet, dass diese am 3'-Ende der cDNA-Moleküle liegen, damit der Einfluss von partiell degradierter RNA eingeschränkt wird. Es sind außerdem Kontrollgene auf dem *GeneChip* enthalten, deren Sequenzen am 5'-Ende liegen, um die Qualität der synthetisierten cDNA und die Effizienz der reversen Transkription zu überprüfen.

3.2.24.2 Herstellung der ss-cDNA-Sonden

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den NT2/D1- und TCam-2-Zellen erfolgte nach der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen TRIzol-Methode. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Herstellung der cDNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des *GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit*. Zunächst wurden 100 ng RNA unter Verwendung von T7-Oligo(dT)-Promotor-Primern und reverser Transkriptase (EC 2.7.7.49) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, die nun einen zusätzlichen T7-Promotor enthielt. Als Amplifikationskontrolle enthielt jeder Ansatz zusätzlich synthetische RNA-Polymere (Poly-A-Kontrollen) einer bestimmten Verdünnung. Anschließend wurde die einzelsträngige cDNA in doppelsträngige cDNA umgewandelt, welche als Vorlage der nachfolgenden *in vitro* Transkription (IVT) zugeführt wurde. Bei der IVT-Reaktion wird unter Anwesenheit einer T7-RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6) die doppelsträngige cDNA in wieder in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben. Im nächsten Schritt wurde unter Verwendung von dUTP's in einem stöchiometrischen Verhältnis zu dTTP's aus der cRNA einzelsträngige

cDNA (ss-cDNA) synthetisiert. Der Einsatz von dUTP's diente zur späteren Fragmentierung der ss-cDNA. Dann folgte der Verdau der einzelsträngigen RNA-Vorlage über die Zugabe von RNase H (EC 3.1.26.4). In einem finalen Schritt wurde die cDNA über den Einsatz der Restriktionsendonuklasen Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) (EC 3.2.2.27) und Apurinische/apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) (EC 4.2.99.18) in etwa 20-200 bp lange Fragmente gespalten. Diese Fragmente wurden unter Verwendung von terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) (EC 2.7.7.31) und biotinmarkierter Didesoxynukleotide markiert (Abb. 11).

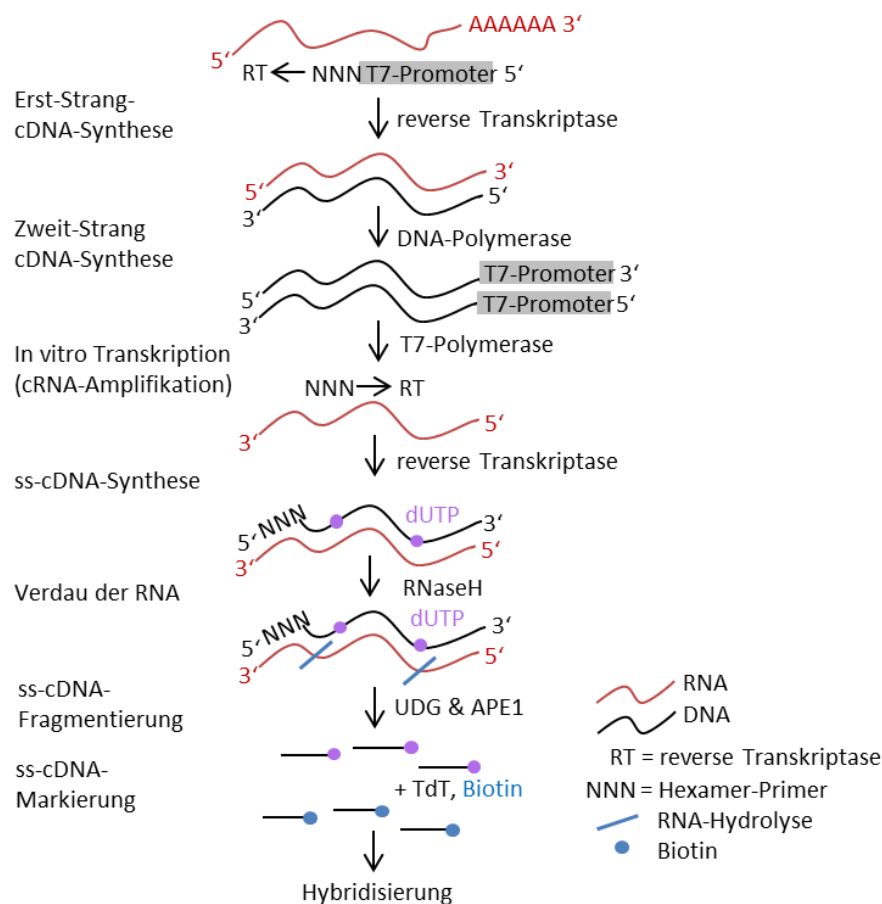


Abbildung 11: Amplifikation und Biotinmarkierung der ss-cDNA-Sonden zur Verwendung für den Affymetrix Clariom™ S Assay.

Zunächst wurde die mRNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben, um daraufhin wieder in cRNA transkribiert zu werden. Dabei kommt es neben einer bis zu 100-fachen Amplifikation auch zu einem Einbau von biotinmarkierten Nucleotiden. Es erfolgt eine Fragmentierung und die Hybridisierung der ss-cDNA-Sonden auf die *GeneChips* hybridisiert. Nach anschließenden Färbe- und Waschschrritten können die *GeneChips* eingescannt und analysiert werden (nicht gezeigt). Abbildung modifiziert nach www.Affymetrix.com.

3.2.24.3 Hybridisierung

Die fragmentierte und biotinmarkierte cDNAs wurden unter Verwendung des *Affymetrix Clariom™ S-Oligonukleotid-Assays* für 16 h bei 45 °C und 60 rpm im *GeneChip Hybridization*

Oven „640“ hybridisiert. Der Hybridisierungscocktail enthielt Kontroll-Oligonukleotide, welche ebenfalls als Sonden auf dem *array* vorliegen und zur Qualitätsbeurteilung der Hybridisierung sowie Orientierung bei der späteren Auswertung der GeneChips dienen. Nach Abschluss der Hybridisierung wurden die GeneChips in einer Waschstation (*GeneChip Fluidics Station* „450“) nach einem vorgegebenen Programm gewaschen und zur Detektion und Verstärkung des Fluoreszenzsignals mit Färbe- und Antikörperlösungen inkubiert.

3.2.24.4 Auswertung der Daten und Transkriptomanalyse

Zum Scannen der *GeneChips* wurde der *Affymetrix Scanner* „Model 3000 G7“ verwendet. Der *GeneChip-Scanner* erzeugt mit Hilfe eines Lasers und eines Detektors eine Datei mit den Bilddaten (DAT-Datei). Nachfolgend wurde für jede Probenzelle eine Durchschnittsintensität der Bildpixel auf Basis der DAT-Datei berechnet und in einer Datei mit den Intensitätsdaten gespeichert (CEL-Datei). Dies umfasst einen Intensitätswert, eine Standardabweichung der Intensität, sowie die Anzahl von Pixeln, die verwendet wurden, um den Intensitätswert zu berechnen. Die Datenextraktion aus der CEL-Datei erfolgte über die *EXPRESSION CONSOLE SOFTWARE* (v.1.4.1) mit Hilfe des *Robust Multi-array Average (RMA)*-Algorithmus. Dazu wurde zunächst die unspezifische Hintergrundfluoreszenz von den Rohintensitätswerten abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden logarithmisch zur Basis 2 transformiert und über die Quantilnormalisierung angepasst. Die Informationen wurden in einer CHP-Datei gespeichert. Als nächstes wurden die Daten wieder entlogarithmiert und die Genbezeichnungen hinzugefügt.

Die Auswahl differentiell exprimierter Gene erfolgte über die Schwellenwertmethode. Zugrunde liegt hierbei die Berechnung des Verhältnisses zwischen Expressionsniveau der Gene unter Kontroll- und Experiment-Bedingungen. Dann erfolgt die Wahl eines festen Schwellenwertes zur Festlegung einer differentiellen Expression beider Gruppen. In den hier durchgeführten Experimenten musste für eine Veränderung der Genexpression eine mindestens dreifache Differenz vorliegen. Anschließend wurden die selektierten Gene in einem sogenannten Cluster angeordnet. Hierunter versteht man die Gruppierung von Genen mit gleichem Expressionsverhalten. Dabei werden die Elemente so in Gruppen angeordnet, dass die Elemente eines Clusters einander ähnlich und Elemente aus verschiedenen Clustern unähnlich werden. Damit können unter Umständen Rückschlüsse auf übereinstimmende Regulationsmechanismen oder biologische Funktionen gezogen werden. Zur Berechnung der Ähnlichkeit von Genen wurden die Daten mit Hilfe der Software

GENESIS (TU Graz) wieder logarithmiert, medianzentriert und das „Manhattan-Abstandsmaß“ ermittelt. Auf diese Weise werden die Gene schrittweise gruppiert und im weiteren Verlauf durch Fusion von Gruppen zu größeren Gruppen ein hierarchisches System erzeugt, welches in einem Dendrogramm visualisiert werden kann.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinisolation aus Zellkulturen mittels RIPA-Lysepuffer

Für die Proteinisolation wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und zusammen mit dem Zellüberstand für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Aufarbeitung erfolgte je nach Größe des Zellpellets in 20 -50 µL RIPA-Lysepuffer. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abgetrennt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Quantifizierung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode nach Bradford mittels *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bradford 1976). Hierbei resultiert die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 an basische und aromatische Seitenketten von Proteinen in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Das Bradfordreagenz wurde 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µL des Proteinlysats mit 998 µL Färbelösung für 5 min inkubiert und die Extinktion photometrisch bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand einer Eichkurve aus den gemessenen Absorbationswerten errechnet. Zur Erstellung der Eichkurve wurden bekannte Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

3.3.3 Western Blot

3.3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse geschieht durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteine werden zunächst durch das Detergenz SDS denaturiert und negativ geladen. Danach erfolgt die Auftrennung im Polymergel durch elektrischen Strom. Kleine Proteine zeigen hierbei eine hohe Laufgeschwindigkeit, wohingegen große Proteine stärker im Gel zurückgehalten werden.

Die elektrophoretische Auftrennung von 20 µg Protein erfolgte in 4-12 %-igen *Bis-Tris*-Gradientengelen. Die Proben wurden zunächst in einem Volumen von 20 µL mit 2 µL Denaturierungspuffer und 6 µL Laufpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gelkammer („XCell Sure lock™“) in 1xMES-Laufpuffer bei 120 V und 4 °C. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt (*PageRuler Prestained Protein Ladder*).

3.3.3.2 Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden via „Tank-Blot-Verfahren“ mittels einer *Mini Trans-Blot Cell-Apperatur* auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Die Membran wurde zuvor zur Aktivierung eine Minute in MeOH geschwenkt und dann in 1xTransferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in 1xTransferpuffer für 2 h bei 150 V und 4 °C.

3.3.3.3 Ponceau-S-Färbung

Nach dem Western-Transfer wurden die Proteine durch Färbung mit Ponceau-S visualisiert. Hierzu wurde die PVDF-Membran für 5 min in 1 %-ige Ponceau-S Lösung inkubiert und der überschüssige Farbstoff mit *Aqua bidest.* abgewaschen. Mithilfe der rot angefärbten Proteine konnten die aufgetragene Proteinmenge der Proben und die Qualität des Blots überprüft werden. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit 1xTBS-T.

3.3.3.4 Immunodetektion

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran auszuschließen, wurde diese zunächst für 15 min in 2 % Magermilchpulver/TBS-T-Puffer (w/v) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in geeigneter Verdünnung zum 2 % Magermilch/TBS-T-Puffer (w/v) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C mit der PVDF-Membran unter Schütteln inkubiert. Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran drei Mal für 15 min mit 1xTBS-T gewaschen. Zum indirekten Nachweis der immobilisierten Proteine wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Dieser wurde in 2 % Magermilch/TBS-T (w/v) verdünnt und die Membran für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundene sekundäre Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1xTBS-T entfernt. Die Detektion erfolgte unter Anwendung des „ECL-Plus-Verfahrens“. Die Lösungen enthalten ein Substrat der Meerrettichperoxidase, welches unter Bildung von Sauerstoffradikalen die Oxidation von Luminol bewirkt. Die Reaktion wurde mittels *Kodak Biomax MR*-Röntgenfilms

detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Röntgenfilmfixierer (Kodak) abgestoppt, die Entwicklung erfolgte mittels Röntgenfilmentwickler (Kodak).

3.3.4 Electrophoretic mobility shift assay

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Detektion der Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren *in vitro*. Hierzu wird ein biotinmarkiertes Oligonukleotid mit Proteinlysat inkubiert. Diese Komplexe wandern langsamer im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel als freie DNA (*shift*). Zur Überprüfung der Identität des an die DNA gebunden Proteins, kann die Analyse in Gegenwart eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers durchgeführt werden. Tritt hierbei eine Bande mit zusätzlich verzögertem Laufverhalten auf (*supershift*), lässt sich das Protein spezifisch nachweisen. Die Durchführung erfolgte mit dem *Lightshift EMSA Kit*.

3.3.4.1 Herstellung von biotinylierten Oligonukleotidsonden

Die Biotinmarkierung der Oligonukleotide am 3'OH-Ende zum späteren Nachweis der DNA-Protein-Interaktion mittels Chemolumineszenz wurde mittels *Biotin 3' End DNA Labeling Kit* durchgeführt. Um eine optimale Biotinylierung zu erreichen, wurden die Sonden zunächst einzelsträngig behandelt. Der Einfachansatz setzt sich wie folgt zusammen:

25 µL nukleasefreies Wasser

10 µL TdT Reaktionspuffer

5 µL Biotin-11-UTP (5µM)

5 µL terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) (1,5 U/µL)

5 µL Oligonukleotid (1 µM)

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von 2,5 µL 200 mM EDTA abgestoppt. Die Extraktion der TdT erfolgte durch Zugabe von 50 µL Isopropanol/Chloroform (1:25). Der Ansatz wurde gut gemischt, für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und die DNA-haltige Oberphase abgenommen. Zur Generierung von dsDNA-Sonden wurden gleiche Anteile an markierten komplementären Oligonukleotiden für 1 min bei 90 °C denaturiert und langsam mit -0,1 °C/s zu Doppelstrangoligonukleotiden verbunden.

3.3.4.2 Gewinnung von Kern- und Cytoplasmaextrakten aus Zellkultur

Die zellulären Extrakte wurden mit dem *NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Kit* gewonnen. Für eine Anreicherung hochkonzentrierter Proteinlysate wurden 2×10^6 Zellen mit 200 μL hypotonischem Puffer CER I versetzt, gründlich gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 11 μL detergenzhaltigem Puffer CER II wurde die Zellmembran lysiert. Der Ansatz wurde für 1 min auf Eis inkubiert und dann für 1 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der im Überstand enthaltene Cytoplasmaextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die kernhaltige Fraktion wurde in 100 μL Puffer NER resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde der Ansatz alle 10 min gut gemischt. Zur Trennung der Kernproteine von den übrigen Zelltrümmern wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die zellulären Kernextrakte bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.4.3 Bindungsreaktion und Gelelektrophorese

In einem 18 μL Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt und für 5 min bei RT äquilibriert:

2 μL 10xBindepuffer

2 μL Poly (dI/dC) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

1 μL 50 % Glycerol

5 μg Proteinextrakt

Dann wurden 2 μL einer 1:20-Verdünnung der markierten Oligonukleotidsonde (entspricht 20 fmol Biotinmarkierung) hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Für *supershift*-Analysen wird dem Reaktionsansatz der entsprechende Antikörper vor Zugabe des markierten Oligonukleotids zugesetzt und mit diesem für 60 min bei 4 °C präinkubiert. Nach einem Gelvorlauf von 20 min bei 100 V wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und auf ein 6 %-iges DNA *Retardation* Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 2 h bei 120 V und 380 mA in 0,5xTris-Glycin-Puffer bei 4 °C.

3.3.4.4 Blotting und Detektion

Die elektrophoretisch aufgetrennten Protein-DNA-Komplexe wurden via „Tank-Blot-Verfahren“ auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor für 10 min 1xTBE-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in 1xTBE-Puffer für 30 min bei 380 mA und

4 °C. Die Fixierung der DNA auf der Nylon-Membran erfolgte mittels UV-Transilluminator bei 254 nm für 2 min. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen wurde diese mit 20 mL Blockierungspuffer für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde in einer 1:300-Verdünnung das biotinbindende Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat hinzugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran vier Mal für je 10 min in 1xWaschpuffer gewaschen um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Durch eine Chemilumineszenzreaktion wurden die DNA-Protein-Komplexe auf einem geeigneten Röntgenfilm nachgewiesen.

3.3.5 Statistik

Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) mittels EXCEL 2010 (Microsoft) dargestellt. Die jeweilige Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student's t-Test, der unter Annahme unterschiedlicher Varianzen der Stichproben durchgeführt wurde. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) gilt hierbei als signifikant.

Die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte mit der Software SPSS STATISTICS 20.0 (IBM). Für die Bewertung der Assoziation zwischen der mRNA-Expression der humanen Gene *PIWIL1-4* und klinischem Ejakulatparametern wurden Bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho und nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der *PIWIL*-Gene für die menschliche Spermatogenese darzustellen. Im folgenden Teilprojekt sollte untersucht werden, ob Patienten mit eingeschränkten Ejakulatparametern eine dysregulierte mRNA-Expression der *PIWIL*-Homologe 1-4 aufweisen und welche Auswirkungen eine mögliche Veränderung auf die Bildung reifer Spermatozoen hinsichtlich normozoospermer Ejakulatparameter haben könnten.

4.1 Analyse der mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene innerhalb der Probandenkohorte

Es wurden 90 Studienteilnehmer am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie rekrutiert. Das Forschungsvorhaben „Rolle der humanen *PIWIL*-Gene bei der Spermatogenese und männlicher Infertilität“ wurde zuvor von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg positiv begutachtet. Alle Probanden gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie. Von den Teilnehmern wurden eine Blut-, sowie eine Ejakulatprobe gewonnen. Die Qualität der Ejakulatprobe wurde nach Kriterien des WHO Laborhandbuches zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates von 2010 (5. Auflage) beurteilt und die klinischen Parameter im Rahmen der ärztlichen Behandlung ermittelt.

4.1.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die untersuchte Kohorte setzte sich aus 47 Probanden mit Normozoospermie und 36 Probanden mit eingeschränkten Ejakulatparametern zusammen. Bei sieben Probanden wurde im Vorfeld eine Diagnose Azoospermie diagnostiziert. Diese dienten als Negativkontrolle für die mRNA-Expression der Gene *PIWIL1-4* in den somatischen Zellen des Ejakulats. Die relevanten klinischen Parameter der Studienteilnehmer sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

	normozoosperme Teilnehmer		nicht-normozoosperme Teilnehmer		Alle Teilnehmer	
	Mittelwert	n	Mittelwert	n	Mittelwert	n
Alter (Jahre)	29 (22-40)	47	33 (22-48)	36	31 (22-48)	83
Karenzzeit (Tage)	4 (2-7)	47	4 (2-6)	36	4 (2-7)	83
Konzentration (mio/ mL)	82 (17-283)	47	22 (>0-158)	36	56 (>0-283)	83
Gesamtzahl (mio/ Ejakulat)	330 (66-878)	47	70 (>0-494)	36	217 (>0-878)	83
progressive Motilität (%)	53 (33-90)	47	30 (0-60)	36	43 (0-90)	83
normale Morphologie (%)	18 (4-37)	47	7 (0-29)	36	13 (0-37)	83
Vitalität (%)	83 (67-93)	25	60 (0-98)	24	71 (0-98)	49
Volumen (mL)	4,1 (1,8-8,0)	47	3,1 (0,5-8,5)	36	3,7 (0,5-8,5)	83
pH	8,2 (7,9-8,7)	47	8,3 (7,9-8,7)	36	8,2 (7,9-8,7)	83

Tabelle 1: Klinische Merkmale der Studienteilnehmer.

Die Statistik wird als Mittelwert mit Minimum und Maximum in Klammern angegeben. Die Daten der sieben azoospermen Patienten wurden aus der Statistik ausgeschlossen. Die Zuordnung eines Studienteilnehmers zur Gruppe „nicht-normozoosperme Teilnehmer“ erfolgte, wenn bereits ein Ejakulatparameter nicht den Referenzwerten entsprach. Daraus resultiert die Überschneidung der in den Klammern angegebenen Werte einzelner Kategorien bei „normozoospermen“ und „nicht-normozoospermen“ Teilnehmern.

4.1.2 mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene in ejakulierten Spermatozoen

Nach Separation der Ejakulatprobe in Zell- und Plasmateil erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA aus der zellulären Fraktion mit Hilfe der beschriebenen TRIzol-Methode. Mittels qRT-PCR wurde der mRNA-Gehalt der Gene *PIWIL1-4* in den ejakulierten Spermatozoen aller 83 Teilnehmer quantifiziert. Dabei waren *PIWIL1* (100 % der Fälle) und *PIWIL2* (49 %) häufiger nachweisbar als *PIWIL3* (9,6 %) und *PIWIL4* (15,7 %). *HPRT* wurde stabil in jeder Probe exprimiert und diente als interne Referenz zur Normierung der mRNA-Expression der Gene *PIWIL1-4*. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Methode. In den zellulären Ejakulatfraktionen der sieben azoospermen Patienten war die mRNA der Gene *PIWIL1-4* in keiner Probe nachweisbar. Neben Spermatozoen können im Ejakulat auch andere Zellarten wie Epithelzellen, Makrophagen oder auch Leukozyten enthalten sein. Diese Zelltypen werden kollektiv als Rundzellen bezeichnet. Rundzellen ($\geq 0,1$ mio/mL)

wurden in 13 Ejakulatproben nachgewiesen, während die übrigen 70 Proben keine detektierbaren Kontaminationen mit Rundzellen zeigten ($<0,1$ mio/mL). Die mittlere Konzentration an Rundzellen betrug $0,3$ mio/mL (Bereich $0-3,8$ mio/mL), während der Median 0 mio/mL betrug. In nichtparametrischen Tests konnte keine Korrelation zwischen dem Auftreten von nachweisbaren Konzentrationen an Rundzellen im Ejakulat und der Expression von *PIWIL1-4*-mRNA beobachtet werden (p von $0,37$ bis $0,6$; Mann-Whitney U-Test). Weiterhin wurde eine nichtparametrische bivariate lineare Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho durchgeführt, um zu untersuchen, ob die mRNA-Expressionen der einzelnen *PIWIL*-Gene in ejakulierten Spermatozoen untereinander korrelieren. In den analysierten Ejakulatproben war die mRNA-Expression von *PIWIL1* positiv mit der von *PIWIL2* korreliert ($r_s=0,543$; $p=2,1 \times 10^{-9}$; $n=83$).

4.1.3 mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene und klinische Merkmale

Die in Tabelle 1 aufgeführten klinischen und biografischen Merkmale wurden über die nichtparametrische bivariate lineare Regressionsanalyse nach Spearman-Rho in Korrelation mit der individuellen *PIWIL*-Genexpression untersucht. Der Prozentsatz der Spermatozoen mit reduzierter Vitalität war signifikant invers korreliert mit der mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens ($r_s=-0,34$; $p=0,018$; $n=49$).

Darüber hinaus gab es eine signifikante positive Korrelation zwischen einem erhöhten Alter der Teilnehmer und einer erhöhten mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens ($r=0,29$; $p=0,008$; $n=83$) sowie des *PIWIL2*-Gens ($r_s=0,26$; $p=0,016$; $n=83$).

4.1.4 mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene und Spermiencharakteristika

Die mRNA-Expression der verschiedenen humanen *PIWIL*-Gene in Korrelation mit den klinischen Diagnosen wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney U-Tests analysiert. Die mRNA-Expression des *PIWIL2*-Gens war in den Ejakulatproben mit einer Oligozoospermie (<15 mio Spermatozoen/mL) im Vergleich zu Proben mit Normozoospermie ($p=0,022$) signifikant verringert. Weiterhin war eine verminderte mRNA-Expression des *PIWIL2*-Gens signifikant mit einer geringeren Gesamtspermienzahl (<39 mio/Probe) korreliert ($p=0,022$) (Abb. 12B).

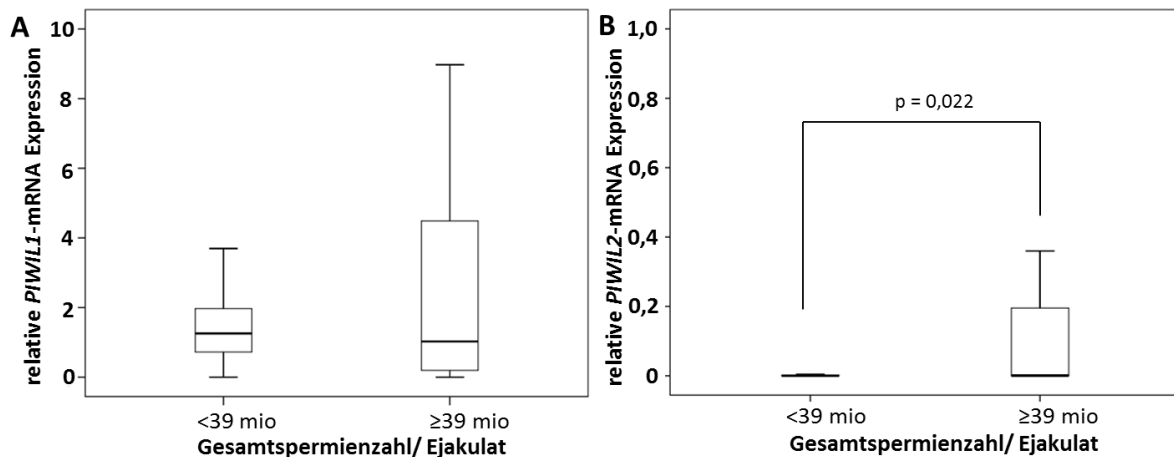


Abbildung 12: Vergleich der relativen mRNA-Expression von *PIWIL1* (A) und *PIWIL2* (B) in ejakulierten Spermatozoen in Korrelation mit der Gesamtspermienzahl.

Proben von Patienten mit Oligozoospermie (<39 Mio Spermatozoen/Ejakulat; n=26) zeigten eine signifikant verminderte *PIWIL2*-mRNA-Expression im Vergleich mit Normozoospermie (≥39 mio Spermatozoen/Ejakulat; n=57; p=0,022, Mann-Whitney U-Test).

Weil in der Hälfte der Proben keine mRNA-Expression von *PIWIL2* nachweisbar war wurden statistische Analysen mit den Kategorien "nachweisbare *PIWIL2*-mRNA-Expression" und "nicht-nachweisbare *PIWIL2*-mRNA-Expression" durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht-nachweisbare mRNA-Expression des *PIWIL2*-Gens mit einer verringerten Spermienkonzentration (p=0,017, Mann-Whitney U-Test) und einer geringeren Gesamtspermienzahl (p=0,004, Mann-Whitney U-Test) assoziiert ist.

Die Untersuchung von progressiver Motilität und *PIWIL*-Gen-mRNA-Expression zeigten eine Assoziation zwischen erhöhter *PIWIL1*-mRNA-Expression und dem Auftreten einer Asthenozoospermie (<32 % progressive motile Spermatozoen, p=0,048, Mann-Whitney U-Test, Abb. 13A). Weder waren die mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens noch die *PIWIL2*-Gens signifikant mit dem Anteil morphologisch abnormaler Spermien assoziiert (≤4 %; p=0,24 und p=0,19, Mann-Whitney U-Test).

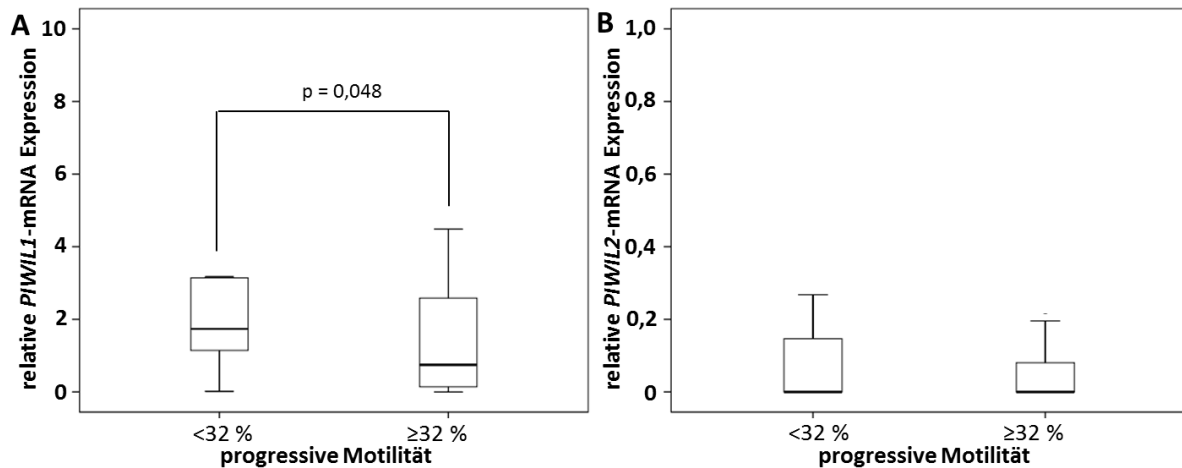


Abbildung 13: Vergleich der relativen mRNA-Expression der Gene *PIWIL1* (A) und *PIWIL2* (B) in ejakulierten Spermatozoen in Korrelation mit der progressiven Motilität.

Proben von Patienten mit Asthenozoospermie (<32 %; n=23) zeigten eine erhöhte *PIWIL1*-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten mit Normozoospermie (≥32 %; n=60; p=0,048, Mann-Whitney U-Test).

4.2 Epigenetische Untersuchungen der *PIWIL*-Gene

Die Expression der *PIWIL*-Gene ist auf die Keimbahn beschränkt und normalerweise in somatischen Zellen reprimiert. Auch während der Spermatogenese folgt die *PIWIL*-Expression einem streng regulierten chronologischen Muster. Bisher existieren wenige Studien, die die Regulationsmechanismen der *PIWIL*-Gene untersuchen. Im Mittelpunkt der hier beschriebenen Versuche steht die Fragestellung, ob die Expression der humanen *PIWIL*-Gene über epigenetische Mechanismen in Form von DNA-Methylierung reguliert wird. Die ausgewählten Kandidatengene *PIWIL1-4* wurden zunächst in Bezug auf die mRNA-Expression, den DNA-Methylierungsstatus und einen möglichen Zusammenhang dieser zwei Faktoren in den verwendeten humanen testikulären Zelllinien NT2/D1 und TCam-2 untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss des demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5AzadC) auf die Expression der *PIWIL*-Gene untersucht, sowie funktionelle Promotoranalysen in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus durchgeführt.

4.2.1 Untersuchung der zelllinienspezifischen *PIWIL*-Gen-Expression

Zunächst sollte eine Expression der einzelnen *PIWIL*-Homologe in den verwendeten Zellkulturmodellen bestimmt werden. Dazu wurde die basale mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 in der humanen Seminomzelllinie TCam-2 und der humanen embryonalen Karzinomzelllinie NT2/D1 in der qRT-PCR vermessen und nach der $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Methode quantifiziert (Abb. 14). Die Expression der Gene wurde auf das Referenz-Gen *GAPDH* bezogen. Es zeigte sich, dass die Gene *PIWIL1* und *PIWIL3* auf mRNA-Ebene in beiden

Zelllinien gleich stark exprimiert wurden, wobei *PIWIL3* das geringere Expressionsniveau zeigte. Die mRNA-Expression des *PIWIL4*-Gens ist in der TCam-2-Zelllinie etwa 4fach so hoch wie in der NT2/D1-Zelllinie ($p=0,003$). Ein noch deutlicherer Unterschied besteht in der Expression des *PIWIL2*-Gens. Der mRNA-Gehalt dieses Homologs beträgt in der NT2/D1-Zelllinie das 1300fache der TCam-2-Zelllinie ($p=0,01$).

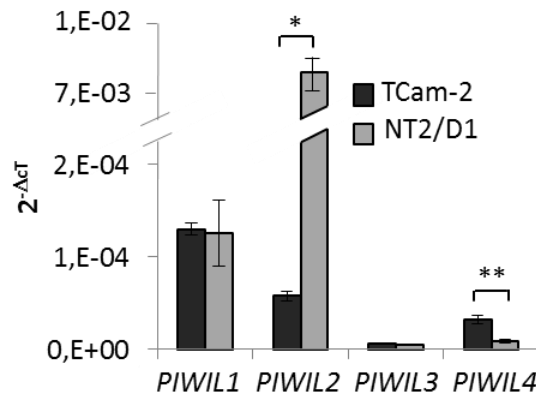


Abbildung 14: Basale Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 in TCam-2- und NT2/D1-Zellen

Dargestellt sind qRT-PCR-Ergebnisse der mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 in den verwendeten Zellkultursystemen als Mittelwerte \pm SD relativ zu *GAPDH*. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

4.2.2 *In silico* Analyse der potentiellen Promotoren der Gene *PIWIL1-4*

Ausgehend von den gemessenen Unterschieden in der basalen *PIWIL*-Expression sollte untersucht werden ob die Stärke der *PIWIL*-Expression vom Status der genomischen DNA-Methylierung in den Zelllinien NT2/D1 und TCam-2 abhängt. Deshalb wurden *in silico* Analysen des Bereiches 5' vom Transkriptionsstart (TSS) der *PIWIL*-Gene 1-4 durchgeführt, um eventuelle Promotoren und Bereiche mit erhöhter CpG-Dinukleotiddichte zu identifizieren. Diese sogenannten CpG-Inseln in Promotorbereichen sind Ziel von DNA-Methylierungsprozessen, die zu einer epigenetischen Inaktivierung von Genen führen können. Die identifizierten Regionen sollten Gegenstand von DNA-Methylierungsuntersuchungen werden, sowie im Rahmen von Luziferase-Experimenten auf die *in vitro* Aktivierbarkeit getestet werden. In die Untersuchung eingeschlossen wurden die Region 2000 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart, sowie ein Teil der 5'UTR, welche oftmals Bindestellen von Proteinen, die die Translation unterstützen, besitzt. Zur Untersuchung wurde das Computerprogramm PROMOTORSCAN1.7 (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) verwendet, welches putative Promotorregionen identifiziert. Dabei werden die untersuchten DNA-Bereiche auf Homologien mit

mutmaßlichen eukaryotischen Pol-II-Promotorsequenzen abgeglichen und entsprechend klassifiziert. Weiterhin wurden die Sequenzbereiche mit dem Programm METHPRIMER (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer>) auf potentielle CpG-Inseln untersucht. Das Programm definiert eine CpG-Insel als einen Bereich mit >50 % CpG-Anteil und einem Quotienten von 0,6 von beobachtetem/erwartetem CpG-Verhältnis in einem DNA-Abschnitt definierter Länge. Zusätzlich erfolgte die Ausgabe von Oligonukleotid-Primern für entsprechende Bereiche, die für nachfolgende DNA-Methylierungsanalysen verwendet werden konnten.

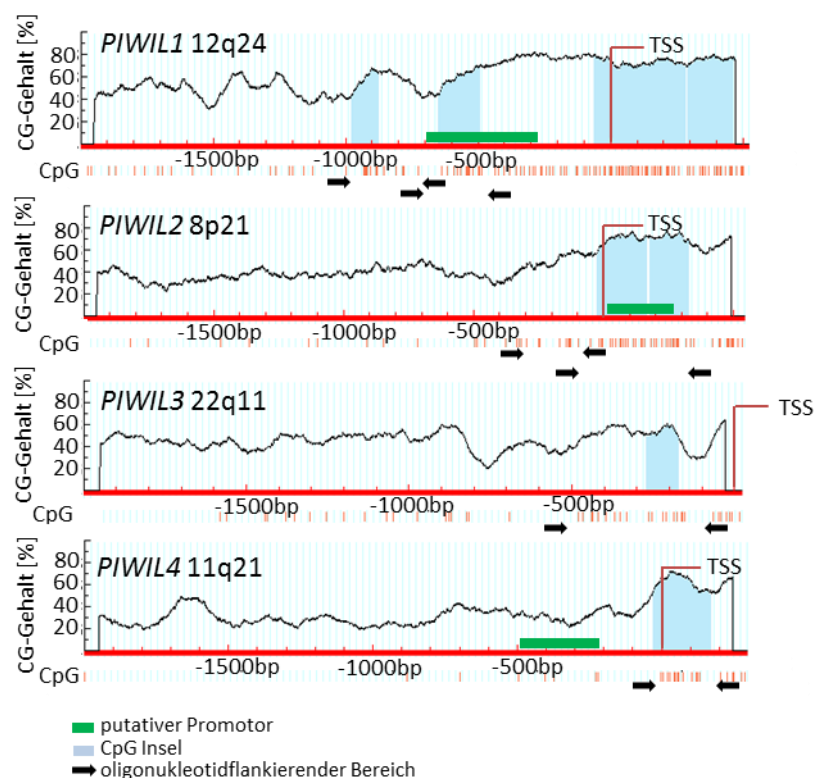


Abbildung 15: Lokalisation von putativen Promotoren und CpG-Inseln der humanen *PIWIL*-Gene 1-4.

Dargestellt ist der CG-Gehalt [%] in Abhängigkeit von der Lage relativ zum Transkriptionsstart am entsprechenden *PIWIL*-Genort. Ein CG-Dinukleotid wird durch einen orangen Strich repräsentiert. Die putativen Promotorregionen von *PIWIL1-4* sind schematisch als grüne Balken und die CpG-Inseln als blaue Bereiche dargestellt. Zusätzlich sind die für die DNA-Methylierungsanalysen verwendeten Oligonukleotide als Pfeile gezeigt. TSS=Transkriptionsstart (rot markiert).

Die Sequenzanalysen des *PIWIL1*-Lokus zeigen eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden über einen etwa 1500 bp langen Bereich ab 1000 bp stromaufwärts vom TSS bis 500 bp in die 5'UTR hinein. Ein Promotor wurde im Bereich von 700 bp bis 300 bp vor dem TSS identifiziert. Dieser Bereich sollte in der nachfolgenden Bisulfitsequenzierung auf die Intensität der

Methylierung untersucht werden. Die Bisulfittechnik bietet die Möglichkeit der Analyse von DNA-Methylierungsmustern durch DNA-Modifikation. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass Natriumbisulfit bei einzelsträngiger DNA zu einer hydrolytischen Desaminierung von unmethylierten Cytosinen zu Uracil führt. Methylierte Cytosine werden hingegen nicht konvertiert und bleiben als Cytosine erhalten. In einer anschließenden PCR werden die Uracile durch Thymin ersetzt und es kann eine Unterscheidung von unmethylierten Cytosinen und 5-Methylcytosinen in der Sequenzabfolge stattfinden. Da die DNA durch die Natriumbisulfitbehandlung stark fragmentiert wird, ist eine Amplifikatlänge von 200 bp bis maximal 400 bp empfehlenswert. Aufgrund der hohen CpG-Dichte im *PIWIL1*-Lokus war eine Generierung von Sequenzierprimern, welche die Eigenschaften der konvertierten Sequenz tragen müssen, nicht möglich. Die verwendete Methode machte deshalb nur eine Analyse des Bereichs von 1000 bp bis 500 bp stromaufwärts vom *PIWIL1*-TSS möglich (Abb. 15).

Der *PIWIL2*-Promotor befindet sich ebenfalls innerhalb einer CpG-Insel (Abb. 15). Sie erstreckt sich über den Bereich vom TSS bis 300 bp stromabwärts. Die in Bezug auf den Methylierungsgrad analysierte Region erstreckt sich von etwa 300 bp vor dem Transkriptionsstart bis etwa 300 bp über diesen hinaus.

Die Untersuchung des *PIWIL3*-Lokus zeigt kein Vorhandensein Promotorspezifischer DNA-Sequenzen und ein schwach ausgeprägtes CpG-Profil im Bereich um 300 bp vor dem TSS. Der Bereich von 500 bp bis 100 bp vor dem TSS wurde für die Bisulfitsequenzierung amplifiziert.

Ebenfalls nur eine geringe CpG-Dinukleotiddichte war im *PIWIL4*-Gen nachzuweisen. Ein Promotor wurde im Bereich von 500 bp bis 200 bp vor dem TSS identifiziert. Da sich in diesem Bereich kaum CpG-Methylierungsstellen befinden wurde für die Bisulfitsequenzierung der Bereich vom TSS bis 200 bp stromabwärts ausgewählt (Abb. 15).

4.2.3 Untersuchung der basalen Methylierungsmuster der Gene *PIWIL1-4*

Zur Analyse der basalen CpG-Profile der humanen *PIWIL*-Gene 1-4 wurde die genomische DNA aus den NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen isoliert und mit Natriumbisulfit behandelt. Anschließend erfolgte die Amplifikation und Klonierung der *in silico* ermittelten Promotorfragmente. Eine abschließende Sequenzierung gab Aufschluss über den Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide innerhalb der untersuchten Sequenz. Der Methylierungsstatus wurde mit Hilfe der Software BIQ-ANALYZER (Max-Planck-Institut, München) untersucht. Dabei wurden für die Analyse nur solche Fragmente verwendet, die

Der TSS des *PIWIL2*-Gens welcher einen putativen Promotor enthält, sowie die flankierenden Bereiche von -300 bp bis +300 bp besitzen 41 CpG-Dinukleotide. Die untersuchte Region unterscheidet sich hinsichtlich ihres Methylierungsstatus in beiden Zelllinien deutlich voneinander. Der Bereich lag in der NT2D1-Zelllinie hypomethyliert (20%), in der TCam-2-Zelllinie dagegen hypermethyliert (85%) vor. Diese Beobachtungen könnten die Unterschiede der basalen *PIWIL2*-mRNA-Expression in den verwendeten Zelllinien erklären, sowie einen Zusammenhang zwischen hoher Promotormethylierung und verringerter mRNA-Expression herstellen.

Das *PIWIL3*-Gen zeigte in den verwendeten Zellkulturmodellen das geringste mRNA-Expressionsniveau der vier *PIWIL*-Homologe. Der Bereich 600 bp bis 200 bp vor dem TSS enthielt 12 CpG-Dinukleotide und lag sowohl in der NT2/D1- (95 %) als auch in der TCam-2-Zelllinie (85 %) hypermethyliert vor (Abb. 16).

Die Analyse der in der 5'UTR des *PIWIL4*-Gens befindlichen CpG-Insel mit ihren 17 CpG-Dinukleotiden ergab eine 100 %ige Methylierung in der NT2/D1-Zelllinie. Die TCam-2-Zelllinie zeigte eine zu 80 % methylierte CpG-Insel. Diese Beobachtung korrespondiert mit einer etwa vierfach höheren mRNA-Expression in dieser Zelllinie im Vergleich zur NT2/D1-Zelllinie (Abb. 14).

4.2.4 Regulation der Expression der humanen *PIWIL*-Gene 1-4

Die vorhergehenden Experimente gaben Hinweise darauf, dass die Promotorhypermethylierung von *PIWIL1-4* in den humanen Zelllinien mit einer verringerten mRNA-Expression der jeweiligen Gene korrelieren. Führt die Promotormethylierung zu einer verringerten mRNA-Expression, sollte die Inhibierung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5Aza-dC) die Reaktivierung des Gens und folglich die mRNA-Reexpression induzieren. Um dies zu analysieren, wurden die NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen über 72 h mit 1, 5 und 10 μ M 5Aza-dC in DMSO gelöst inkubiert und dann für RNA- und Proteinisolation verwendet. Es erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene *PIWIL1-4* in der qRT-PCR über die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Methode bezogen auf das Referenzgen *GAPDH*, welches von 5Aza-dC nicht in seiner Expression beeinflusst wurde. Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte Zellen und mit DMSO versetzte Zellen, zur Abschätzung des Lösungsmiteleinflusses auf die *PIWIL*-Genexpression.

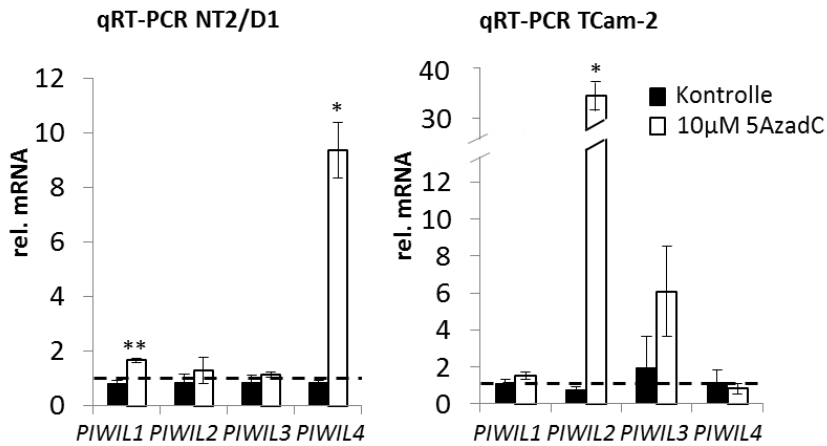


Abbildung 17: Relative mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 in NT2/D1- bzw. TCam-2-Zelllinie 72 h nach Stimulation mit 10 µM 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Die gestrichelte Linie zeigt das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle ($\cong 1$). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression von *GAPDH*. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$, Kontrolle=unbehandelte Zellen.

In der Zelllinie NT2/D1 führte die Inkubation mit 10 µM 5AzadC für 72 h zu einer neunfachen Expressionerhöhung der *PIWIL4*-mRNA ($p=0,044$). Das *PIWIL1*-Gen zeigte eine Verdopplung des mRNA-Gehaltes relativ zur DMSO-Kontrolle ($p=0,00031$). Die mRNA-Expression der Gene *PIWIL2* bzw. *PIWIL3* hingegen waren nicht durch 5AzadC beeinflusst. In der Zelllinie TCam-2 konnte eine Expressionssteigerung der *PIWIL2*-mRNA um das 35fache ($p=0,027$) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden. Es kam außerdem zu einem Anstieg der mRNA-Expression des *PIWIL3*-Gens, der nicht signifikant war (Abb. 17).

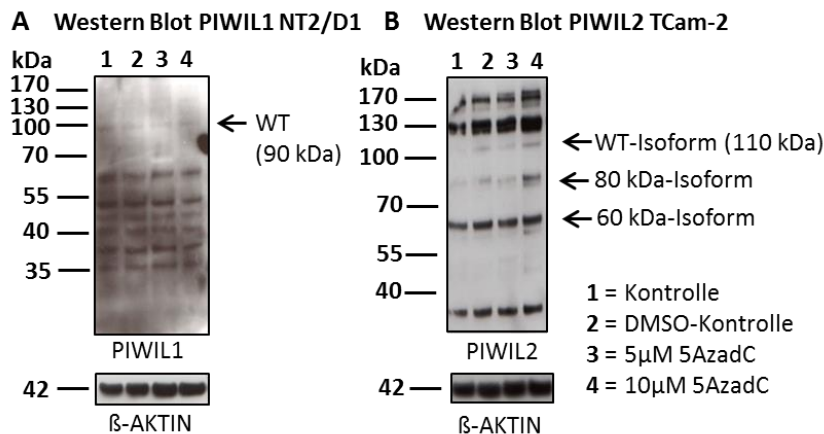


Abbildung 18: Protein-Expression von *PIWIL1* in der NT2/D1-Zelllinie und *PIWIL2* in der TCam-2-Zelllinie 72 h nach Stimulation mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Gezeigt ist die *PIWIL*-Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit 5µM und 10µM 5AzadC. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit DMSO-behandelte Zellen. Endogenes β -AKTIN diene als Ladekontrolle. Die Pfeile markieren die Höhe der *PIWIL1*- und *PIWIL2*-Wildtyp-Isoformen (WT), 80 kDa-Isoform und 60 kDa-Isoform. Die Auswertung erfolgte nach optischer Beurteilung der Bandenstärken.

Um zu untersuchen, ob sich der Anstieg an *PIWIL*-mRNA auf den *PIWIL*-Proteingehalt in den verwendeten Zelllinien auswirkt, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Es zeigt sich, dass eine Verdopplung der mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens in der NT2/D1-Zelllinie in keiner Zunahme der Proteinexpression resultierte. In der TCam-2-Zelllinie bewirkte die Behandlung der Zellen mit 10 μ M 5AzadC eine starke Zunahme der *PIWIL2*-Proteinexpression, insbesondere der Spleißvarianten mit einer molekularen Masse von 60 kDa bzw. 80 kDa (Abb. 18).

4.2.5 Einfluss von 5-Aza-2'-Desoxycytidin auf die *PIWIL*-Promotormethylierung

Um eine direkte Korrelation der *PIWIL*-Genexpressionsänderung und DNA-Methylierung zu bestätigen wurde der CpG-Status der *PIWIL*-Gene 1-4 nach Stimulation mit 10 μ M 5AzadC bestimmt.

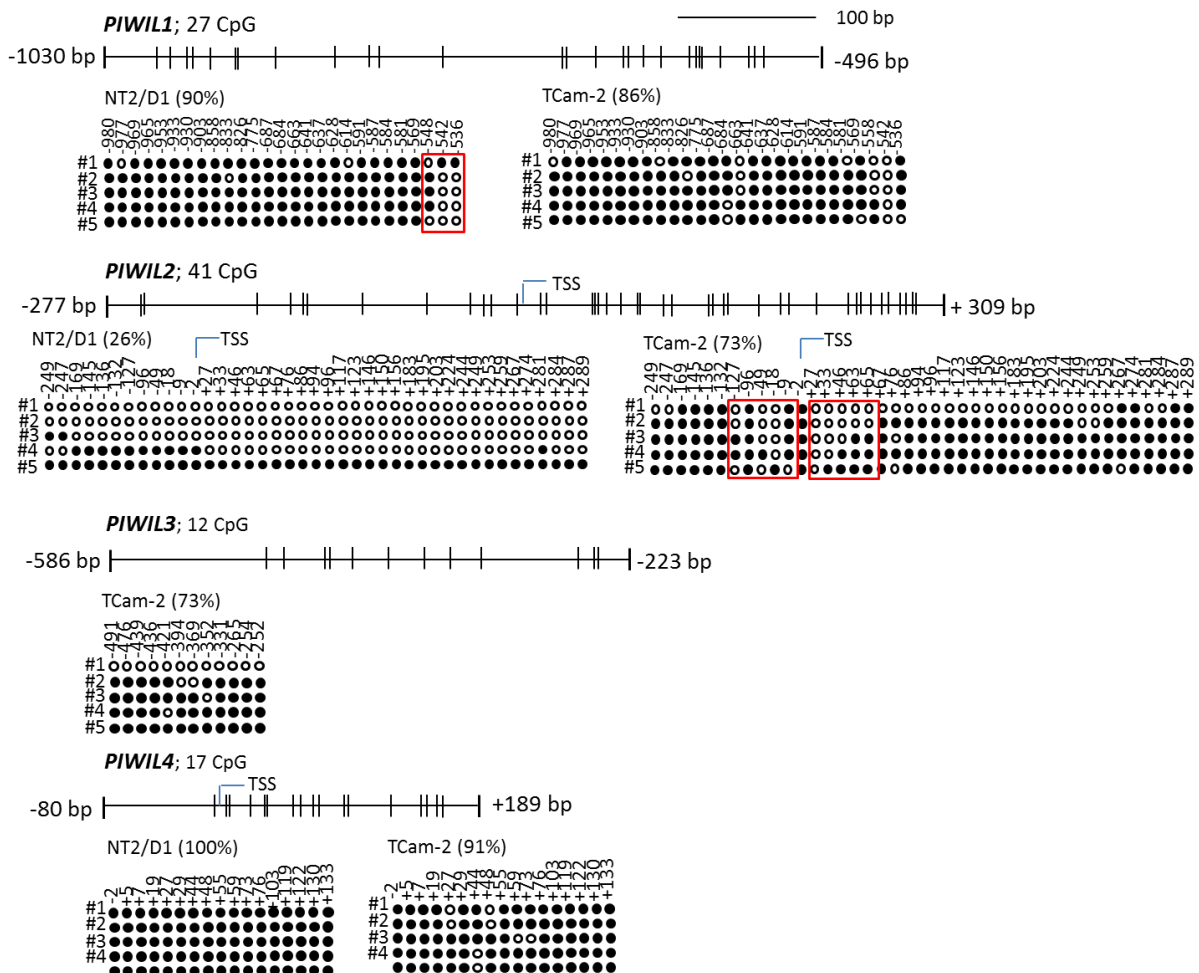


Abbildung 19: Graphische Darstellung der DNA-Methylierungsmuster der *PIWIL*-Gene 1-4 in den NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen nach Stimulation mit 10 μ M 5AzadC

Schematische Übersicht über die Lage der untersuchten CpG-Dinukleotide in der *PIWIL*-Sequenz. Darunter jeweils der Methylierungsstatus der CpG's mit Angabe der Lokalisation in Bezug auf den TSS. Dabei entspricht jede Zeile in der Darstellung einem sequenzierten Klon und jeder Kreis einem CpG-Dinukleotid. Die

Prozentzahlen in Klammern geben den Methylierungsgehalt der untersuchten Sequenz an. Die roten Kästen markieren Bereiche mit reduzierter Methylierung nach Behandlung mit 10 μ M 5AzadC. • methyliertes CpG-Dinukleotid, o unmethyliertes CpG-Dinukleotid, n= 1.

Trotz einer Behandlung der Zellen mit 10 μ M des demethylierenden Agens AzadC lag der untersuchte genomische Abschnitt von *PIWIL1* weiterhin hypermethyliert vor. Die Gesamt-Methylierung war in der Zelllinie NT2/D1 im Gegensatz zur basalen Methylierung (96 %) leicht reduziert (90 %). In der Zelllinie TCam-2 kam es zu einem leichten Anstieg der Gesamt-methylierung (78 % zu 86 %) (Abb. 19). In beiden Zelllinien lagen die CpG-Dinukleotide in der Region um 550 bp vor dem TSS, in der sich auch der putative Promotor befindet, in beiden Zelllinien partiell demethyliert vor, was auf einen *PIWIL1*-regulierenden Genabschnitt hinweisen kann (Abb. 19). Die partielle Demethylierung dieses Bereiches durch die Exposition gegenüber 10 μ M 5AzadC könnte die Verdopplung der mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens in der NT2/D1-Zelllinie erklären.

Das CpG-Profil des *PIWIL2*-Gens lag in der NT2/D1-Zelllinie nach Behandlung mit 10 μ M 5AzadC hypomethyliert (26 %) vor. In der TCam-2-Zelllinie kam es zu einer leichten Reduktion der Gesamt-methylierung von 85 % auf 73 %. Insbesondere der Genabschnitt von -50 bp bis etwa +60 bp relativ zum TSS, welcher auch in den unbehandelten Zellen unmethylierte CpG-Dinukleotide enthält, zeigte eine Zunahme der Demethylierung und könnte für die Regulation der *PIWIL2*-Genexpression entscheidend sein.

Der CpG-Methylierungsstatus des *PIWIL3*-Gens wurde nur in der Zelllinie TCam-2 untersucht, da in der Zelllinie ein Anstieg der mRNA-Expression detektierbar war. Die Gesamt-methylierungsrate war nach der Behandlung mit 10 μ M 5AzadC von 85 % auf 73 % reduziert (Abb. 19).

Die Bisulfitequenzierung der 5'UTR des Gens *PIWIL4* ergab für die NT2/D1-Zellen trotz einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression ein zu 100 % methyliertes CpG-Profil. In den TCam-2-Zellen lag der untersuchte *PIWIL4*-Genabschnitt ebenfalls hypermethyliert vor (91 %).

4.2.6 Funktionelle Analyse der Promotoren der humanen *PIWIL*-Gene

Um die Funktionsfähigkeit der potentiellen Promotorbereiche von *PIWIL1-4* zu testen, wurden Reporter-genektoren mit verschieden langen Fragmenten der Promotoren für den Einsatz im Luziferase-*assay* konstruiert. Dazu wurden die, in Abschnitt 4.2.2 ermittelten, Promotorbereiche über eine PCR amplifiziert und in den pGL4.10[luc2]-Vektor vor ein *firefly*-

Luziferase-Gen kloniert. Dann erfolgte die Transfektion der Konstrukte in die NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen für 48 h, bevor die Aktivierung der *firefly*-Luziferase durch zelluläre Transkriptionsfaktoren nach Zugabe eines Substrates vermessen wurde. Zur Normierung der gemessenen Lumineszenz wurde ein pGL4.74[hRluc/TK]-Vektor im Verhältnis von 1:50 cotransfiziert. Dieser kodiert für eine *renilla*-Luziferase, welche konstitutiv exprimiert wird. Nach der Klonierung wurde ein Teil der die Promotor enthaltenden Vektoren *in vitro* methyliert und diese *in vitro* Methylierung über Restriktion mit BstUI überprüft. Das Enzym ist methylierungssensitiv und spaltet keine methylierte DNA.

Die für die Gene *PIWIL1*, *PIWIL3* und *PIWIL4* generierten Reporterkonstrukte induzierten keine Luziferase-Expression in den verwendeten Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

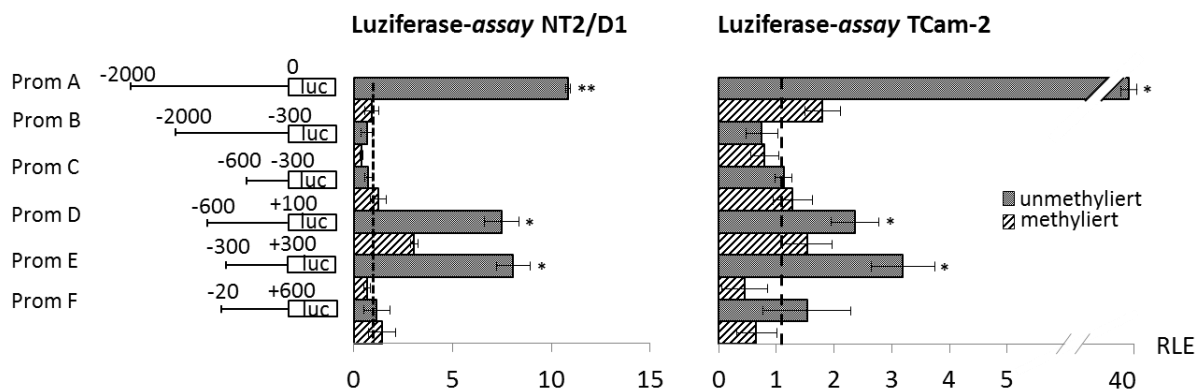


Abbildung 20: Luziferase-assay mit den Promotorkonstrukten für *PIWIL2* in den NT2/D1 bzw. TCam-2-Zellen

Transfiziert wurden pGL4.10-Reporterkonstrukte die *PIWIL2*-Promotorabschnitte (Prom A-F) in verschiedener Lage zum TSS enthalten. Lage und Länge der Fragmente ist links dargestellt. Die Fragmente wurde unmethyliert und nach Methylierung *in vitro* durch die CpG-Methyltransferase M.SssI transfiziert. Untransfizierte Zellen sowie der unmethylierte und methylierte pGL4.10-Expressionsvektor dienten als Kontrollen (nicht dargestellt). Die gestrichelte Linie zeigt die relative Aktivität des unmethylierten pGL4.10-Leervektors ($\cong 1$). Die Normierung der *firefly*-pGL4.10-Aktivitätsmessung erfolgte auf einen im Verhältnis 1:50 cotransfizierten *renilla*-pGL4.74-Vektor. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD. n=3; Student's t-Test *p<0,05, **p<0,01. RLE=relative Lichteinheiten.

Verglichen mit dem Leervektor pGL4.10[luc2] führte die Transfektion mit dem 2000 bp langen *PIWIL2*-Promotorkonstrukt Prom A in der NT2/D1-Zelllinie zu einer 12fachen Steigerung der Luziferase-Expression (p=0,0044), während die Methylierung *in vitro* die Promotoraktivität wieder auf Niveau des Leervektors senkte. In der Zelllinie TCam-2 nahm die Luziferase-Aktivität nach Transfektion mit *PIWIL2*-Prom A um das 35fache zu (p=0,020). Auch in der TCam-2-Zelllinie führte die Methylierung *in vitro* des Konstruktes zu einer Aufhebung der Luziferase-Aktivität. Die *PIWIL2*-Promotorfragmente D und E führten in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme der Luziferase-Aktivität (NT2/D1-Zellen:

p=0,0428, p=0,0002; TCam-2-Zellen: p=0,042, p=0,011). Die Methylierung *in vitro* der Fragmente reduzierte die Luziferase-Aktivität auf Basalexpression. Die Transfektion mit den *PIWIL2*-Promotorfragmenten B, C und F hatten in beiden Zelllinien keine Auswirkungen auf die Promotoraktivität (Abb. 20).

Insgesamt betrachtet konnten verschiedene Abschnitte des *PIWIL2*-Promotors erfolgreich in einen Luziferasevektor kloniert und im Luziferase-*assay* verwendet werden. Die Daten zeigen, dass der Promotorabschnitt 300 bp vor dem TSS notwendig für die Induktion der *PIWIL2*-Expression ist und dass eine Methylierung der CpG-Dinukleotide dieses Bereiches die Promotoraktivität unterbinden kann.

4.2.7 Analyse des *PIWIL2*-Promotorbereiches auf Transkriptionsfaktorbindestellen

In den Luziferase-*assays* wiesen die Fragmente, welche die 5'-flankierende Region bis 300 bp vor dem TSS des *PIWIL2*-Gens enthielten, die höchste Promotoraktivität auf. Diese Tatsache läßt vermuten, dass in dem untersuchten Abschnitt regulatorische Sequenzelemente existieren, die durch die Interaktionen mit entsprechenden Transkriptionsfaktoren für die Aktivität des *PIWIL2*-Promotors verantwortlich sind. Daher wurde der Bereich mit Hilfe des Programms ALGGEN PROMO (<http://alggen.lsi.upc.es>) auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei wird die eingegebene Promotorsequenz mit Hilfe faktorspezifischer Gewichtsmatrizen auf Übereinstimmung mit bereits experimentell bestätigten Bindemotiven untersucht. Als Grenzwert diente hierbei ein Ungleichheitsparameter von 15 %. Im untersuchten Abschnitt von 300 bp stromabwärts vom TSS wurden 49 verschiedene Transkriptionsfaktoren mit 407 potentiellen Bindestellen detektiert. Dabei konnten sechs *B-cell specific activator protein*-Erkennungsmotive (PAX5) innerhalb der 5'-UTR gezeigt werden (Abb. 21). Der Name des Transkriptionsfaktors resultiert aus einer hochkonservierten DNA-Domäne, bekannt als *paired box*. Das Protein wird vorrangig in frühen Stadien der B-Zell-Differenzierung, aber auch während der neuronalen Entwicklung und in adulten *Testis* exprimiert (Adams *et al.*, 1992). Obwohl bisher kein Zusammenhang zur *PIWIL*-Genexpression hergestellt werden konnte, ist PAX5 als Transkriptionsfaktor, der bei der Zellentwicklung und-differenzierung eine entscheidende Rolle spielt ein interessanter Kandidat.

A Genomische Sequenz *PIWIL2*

5' "TGTATCGCTAATCCTCTTAACTGGCAGGAATGGGGCAAGTCAATTTCAAC
ACGCGAGTCTTAGGCTAAATCTGTTTATAGGAGTTGCCCCAGAAAGGGAG
TCAGGATCTCCAAACCCTAACACATTTTAACGCTGAGGTTACATAACTCCCA
GCGCTCCTTCGCACGAACCGCCCCTGCACAGGGAACCTGCTGGAAAGGA
CGAGCCTCTTGCAGATGGGCCAATTAGATAGCTTGCTCTTGTGAACGACA
GGTCTTGTGGCCAATGGGCTCATCCCGGAGGCCTCGAAGAGCGGAAATT
GGCCC"3

- CpG-Dinukleotid -TSS -PAX5-Bindestelle

B Western Blot

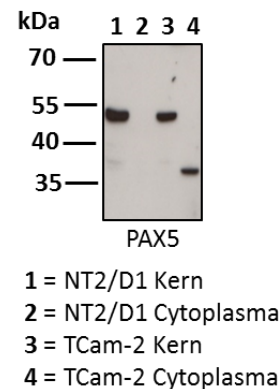


Abbildung 21: Genomische Sequenz von *PIWIL2* und Expression von PAX5 in NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen

A. Dargestellt ist die genomische Sequenz 300 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart (orange) mit den enthaltenen CpG-Dinukleotiden (rot) und den *in silico* ermittelten Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PAX5 (schwarz unterstrichen) B. Expression des Transkriptionsfaktors PAX5 in den verwendeten Zelllinien nach fraktionierter Proteinisolation.

Der Nachweis der nuklären PAX5-Expression in der NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen erfolgte nach fraktionierter Proteinisolation mittels Western Blot. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 50 kDa und liegt als Kernprotein vor. In der Zelllinie TCam-2 war zusätzlich eine etwa 38 kDa große cytoplasmatisch exprimierte Isoform zu detektieren.

4.2.8 DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des *PIWIL2*-Gens

Eine Methode zur Analyse der Bindung regulatorischer Proteine an DNA-Sequenzen stellt der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) dar. Hierfür wurden verschiedene *PIWIL2*-Promotorbereiche, welche eine Biotin-Markierung trugen, mit nuklären Proteinlysaten aus den NT2/D1-Zellen inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden danach auf ein TBE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Komplexe wurden im Gel stärker retardiert als ungebundene DNA, woraus ein Gel-*shift* resultierte. Es sollte somit untersucht werden, ob Transkriptionsfaktoren in dieser Region mit der DNA interagieren. Die Spezifität des entstandenen Banden-*shifts* wurde durch Auslöschung des Bandensignals mit unmarkierter DNA verifiziert. Die Competitor-DNA war homolog zur Sonden-DNA und wurde in 100–1000fachem Überschuss der Reaktion hinzugesetzt. Die Inkubation der DNA-Protein-Komplexe mit einem Antikörper zur Erzeugung eines *supershifts* sollte PAX5 als spezifischen Transkriptionsfaktor identifizieren.

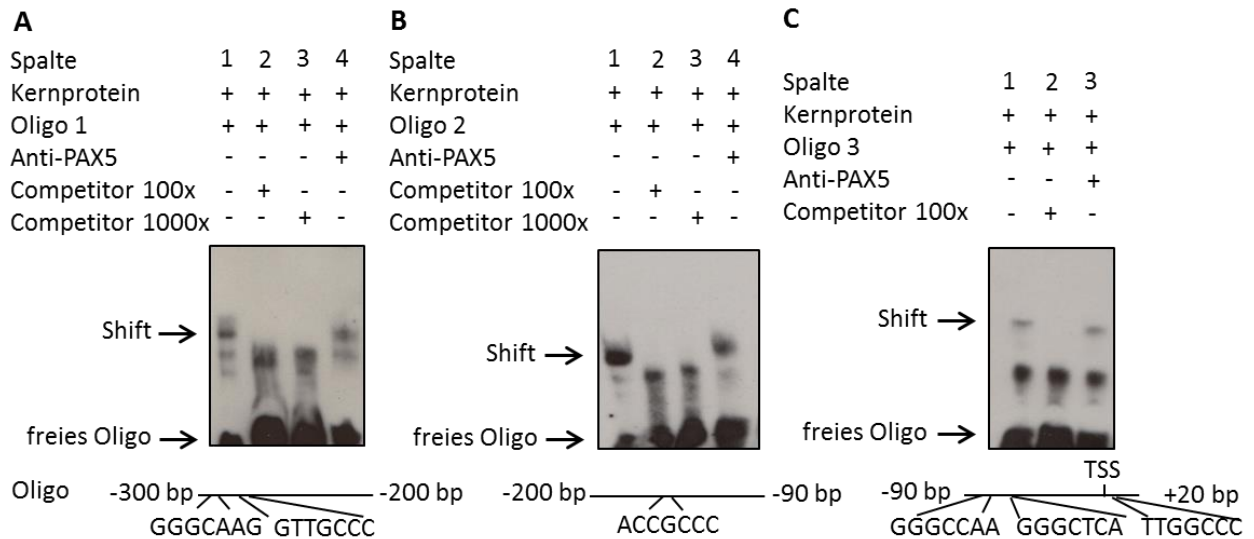


Abbildung 22: Elektromobilitätsshiftassay von PAX5 am *PIWIL2*-Promotor in der Zelllinie NT2/D1

Die Biotin-markierten Oligos wurden mit 5 µg Kernprotein in Anwesenheit oder Abwesenheit von 100-1000fachem Überschuss von unmarkiertem Oligo (Competitor), sowie 1 µg PAX5-Antikörper inkubiert. Freie Oligos und DNA/Protein-Komplexe (*shift*) sind mit Pfeilen markiert. Die Lage der Oligos relativ zum Transkriptionsstart (TSS) und die vorausgesagten Bindestellen von PAX5 sind unter dem Elektromobilitätsshiftassay dargestellt. **A.** Oligo 1 (-300 bp bis -200 bp). **B.** Oligo 2 (-200 bp bis -90 bp). **C.** Oligo 3 (-90 bp bis +20 bp). Die Auswertung erfolgte über optische Beurteilung der Bandenstärken.

Es wurden drei Oligonukleotidsonden verwendet, die jeweils eine Länge von etwa 100 bp hatten und in fortlaufender Weise die 300 bp-Sequenz stromabwärts vom TSS beinhalteten (Abb 22). Die Auswertung der Gelbanden von Oligo 1 zeigte drei Banden, von denen die oberste nach Konkurrenz verschwand. Übrig blieben unspezifische Protein-DNA-Interaktionen, die auch durch 1000fachen Überschuss an Competitor im Gel detektierbar waren. Somit lässt sich vermuten, dass es sich bei der obersten Bande um eine spezifische DNA-Protein-Interaktion handelt. Sonde 2 zeigte im Gel nach Extrakt-Inkubation ebenfalls eine spezifische Bande. Experimente mit Competitor-DNA und Oligonukleotid 3 konnten eine spezifische Bande in der mittleren Gelbahn bestätigen (Abb. 22C). Eine Inkubation der DNA-Protein-Komplexe mit einem PAX5-Antikörper sollte im Falle einer spezifischen Interaktion durch Vergrößerung der molekularen Masse zu einem weiteren *shift* führen. Keine der drei verwendeten Sonden konnte PAX5 als Transkriptionsfaktor nachweisen.

Die Versuche hierzu konnten eindeutig belegen, dass die Inkubation der drei verwendeten Oligonukleotide mit nukleären Extrakten aus der NT2/D1-Zelllinie zu einer DNA-Protein-Interaktion mit unbekanntem Transkriptionsfaktoren führt.

4.3 Stabiler *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* mittels CRISPR/Cas9-System

Um die Defizienz der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in der Stammzelle und die Auswirkungen auf die Expression Spermatogenese-relevanter Gene zu simulieren wurden in einem weiteren Versuchsabschnitt Zelllinien generiert, welche einen stabilen *knockdown* der beiden Homologe aufweisen sollten. Für diese Experimente wurde die CRISPR/Cas9-Technik verwendet. Das CRISPR/Cas9-System ist ein Instrument zum *genome editing*, das punktuelle Veränderungen der DNA ermöglicht und aus zwei Komponenten besteht. Zum einen gibt es den CRISPR-Abschnitt, der eine integrierte gRNA (*guide RNA*) enthält, die sequenzgleich mit dem zu verändernden DNA-Bereich ist. Die an den CRISPR-Abschnitt gekoppelte Cas9-Endonuklease schneidet den DNA-Doppelstrang genau an der gewünschten Zielsequenz. Die Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt nun durch zelluläre Mechanismen. Je nachdem welcher Mechanismus greift, ist es möglich einzelne Nukleotide zu entfernen, hinzuzufügen oder auszutauschen. Betrifft die genomische Mutation Exonbereiche von Genen, kann es zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zu falsch gefalteten Proteinen unzureichender Funktionalität führen, die von der Zelle abgebaut werden.

4.3.1 Nachweis des genomischen *knockdown* auf DNA-Ebene

Beide Elemente – CRISPR mit gRNA und Cas9 – lagen auf einem U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektor kodiert vor. Die Vektoren enthielten verschiedene gRNAs, die komplementär zu unterschiedlichen Exonbereichen in den *PIWIL1*- bzw. *PIWIL2*-Genen waren (Abb. 22/23). Die NT2/D1- und TCam-2-Zellen wurden jeweils mit Vektoren für *PIWIL1* oder *PIWIL2* für 24 h transfiziert. Dann erfolgte die Separierung der positiv transfizierten Zellen mit Hilfe des im Vektor integrierten GFP-Gens über FACS-Sortierung. Die positiven Zellen wurden kultiviert und dann für DNA-, RNA-, Proteinanalysen und zellfunktionelle *assays* benutzt.

Das *genome editing* von *PIWIL1* sollte wie in Abbildung 23 gezeigt in den Exons 3 und 15 erfolgen.

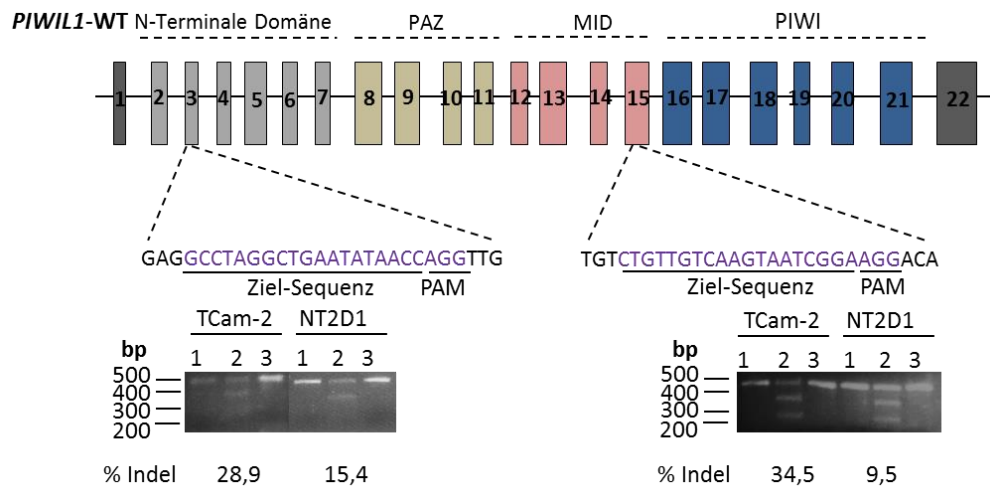


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Exons des *PIWIL1*-Gens mit den gRNA-Sequenzen für das genome editing und dem Nachweis der genomischen Mutation in den NT2/D1- und TCam-2-Zellen

Die Sequenz der gRNA (komplementär zur genomischen Zielsequenz) ist mit ihrer zugehörigen Exonlage in lila dargestellt. Die PAM-Sequenz, als Erkennungssequenz für Cas9 (NGG), ist unterstrichen. Das genome editing von *PIWIL1* erfolgte in den Exonen 3 und 15. Der untere Bildabschnitt zeigt den Nachweis des genome editing durch das CRISPR/Cas9-System. Die Doppelstrangbrüche wurden mit Hilfe des GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit analysiert und mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert. Nach einer finalen Sequenzierung wurde die DNA mit Hilfe des Internetprogrammes TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition) auf die vorherrschenden Arten von Insertionen und Deletionen (Indels) in der DNA des untersuchten Zellpools analysiert. Angegeben ist Gesamtheit der genomischen Veränderungen in % wobei $p < 0,001$. 1=unbehandelte Kontrolle, 2=knockdown *PIWIL1*, 3=knockdown *PIWIL2*, WT=Wildtyp.

Zunächst wurde der Status des genome editing von *PIWIL1* in den mit dem Exon3-U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektor bzw. Exon15-U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektor transfizierten Zellen detektiert. Für die Ermittlung von Mutationen in genomischer DNA wurde das Genomic Cleavage Detection Kit verwendet (Abschnitt 3.2.7). Dazu wurde die DNA aus den modifizierten Zellen isoliert und nach Amplifikation mit Zielregion-spezifischen Primern denaturiert und erneut hydrolysiert um Heteroduplex-Inkongruenzen dort zu erzeugen, wo Doppelstrangbrüche aufgetreten sind. Diese Inkongruenzen werden durch das Detektionsenzym aufgespalten und ergeben Produkte unterschiedlicher Größe. Eine Sequenzierung des DNA-Abschnittes und Auswertung der erhaltenen Chromatogramme über das Programm TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition) kann über Auswertung der Signalstärken Art und Häufigkeit der eingefügten Mutation im Vergleich zu unmodifizierten Kontrollzellen identifizieren.

Die Auswertung des genomischen Lokus von *PIWIL1* zeigte in beiden Zelllinien eine unterschiedlich ausgeprägte Veränderung im *PIWIL1*-Gen. Die Transfektion der NT2/D1-Zellen mit den CRISPR/Cas9-Plasmiden gegen Exon3 und Exon15 führte zu einer 10-15%igen Veränderung des DNA-Status am entsprechenden Genort. In der TCam-2-Zelllinie

konnte eine etwa zu 29-35 % mutierte DNA in den Exon3- und Exon15-Loci detektiert werden.

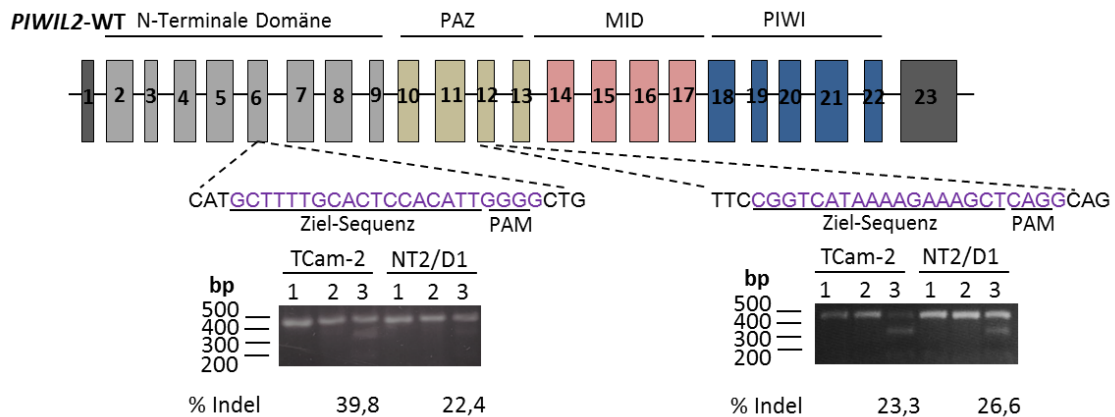


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Exons des *PIWIL2*-Gens mit den gRNA-Sequenzen für das genome editing und dem Nachweis der genomischen Mutation in den NT2/D1- und TCam-2-Zellen

Die Sequenz der gRNA (komplementär zur genomischen Zielsequenz) ist mit ihrer zugehörigen Exonlage in lila dargestellt. Die PAM-Sequenz ist unterstrichen. Das genome editing von *PIWIL2* erfolgte in den Exonen 6 und 12. Der untere Bildabschnitt zeigt den Nachweis der genome editing durch das CRISPR/Cas9-System. Die Doppelstrangbrüche wurden mit Hilfe des GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit analysiert und mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert. Nach einer finalen Sequenzierung wurde die DNA mit Hilfe des Internetprogrammes TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition) auf die vorherrschenden Arten von Insertionen und Deletionen (Indels) in der DNA des untersuchten Zellpools analysiert. Angegeben sind die genomischen Veränderungen in % wobei $p < 0,001$. 1=unbehandelte Kontrolle, 2=knockdown *PIWIL1*, 3=knockdown *PIWIL2*, WT=Wildtyp.

Die Transfektion der Zelllinien NT2/D1 und TCam-2 mit den Exon6-U6gRNA-Cas9-2A-GFP- und Exon12-U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektoren gegen *PIWIL2* führte in der Zelllinie NT2/D1 zu einer Veränderung der genomischen DNA am respektiven Locus von 22-27 %. In der Zelllinie TCam-2 wurden nahezu 40 % Indels am *PIWIL2*-Exon6-Genort und 23 % Indels am *PIWIL2*-Exon12-Genort eingeführt (Abb. 24).

4.3.2 Nachweis des stabilen knockdown der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf mRNA- und Proteinebene

Der Einfluss des genome editing des *PIWIL1*- bzw. *PIWIL2*-Locus auf die Genexpression wurde auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde diese aus den Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die mRNA-Expression der Gene *PIWIL1-4* mit Hilfe der qRT-PCR über die $2^{-\Delta CT}$ -Methode ermittelt. Die Expression der Gene wurde auf das Referenzgen *GAPDH* bezogen. Der Nachweis von *PIWIL1*- sowie *PIWIL2*-Protein erfolgte im Western Blot mit Hilfe des Referenzproteins β -AKTIN.

Die Transfektion der NT2/D1-Zellen mit den U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektoren für die Erzeugung genomischer Mutationen in Exon3 und Exon15 von *PIWIL1* führte zu einer 50fachen Steigerung der mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,028$) (Abb. 25). Die mRNA-Expression der Gene *PIWIL2* und *PIWIL3* waren nach *PIWIL1*-*knockdown* unverändert. Die mRNA-Expression des *PIWIL4*-Gens zeigte eine 1,5fache Zunahme ($p=0,021$). Die Analyse der Proteinexpression zeigt zunächst mehrere prominente Banden im Western Blot. Die Wildtyp-Isoform (WT) von *PIWIL1* besitzt eine molekulare Masse von etwa 90 kDa. Weiterhin traten im Western Blot Isoformen mit einer molekularen Masse von 60 kDa, 50 kDa, 37 kDa und 30 kDa in der Zelllinie NT2/D1 auf. Es sind bisher mehrere *PIWIL1*-Isoformen mit unterschiedlichen molekularen Massen beschrieben worden. Im Western Blot traten jedoch Banden mit unbekanntem molekularen Massen auf, bei denen es sich um unspezifische Antikörperbindungen handeln könnte. Es zeigte sich, dass eine Mutation in den Exonen 3 und 15 von *PIWIL1* zu einem *knockout* der Spleißvarianten 60 kDa und 50 kDa führte, die WT-Variante jedoch verstärkt exprimiert wurde (Abb. 25B). Betrachtet man die Proteinexpression des *PIWIL2*-Gens nach *knockdown* von *PIWIL1* war keine Auswirkung auf die Expression der einzelnen *PIWIL2*-Isoformen zu detektieren (Abb. 25C).

Die Mutation der Exone 6 und 12 im *PIWIL2*-Gen durch den Einsatz des U6gRNA-Cas9-2A-GFP-Vektors führte zu einem 3,5fachen Anstieg der *PIWIL1*-mRNA-Expression ($p=0,003$). Die Expression von *PIWIL2*- und *PIWIL3*-mRNA wurde im Vergleich zur Kontrolle um fast 100 % reduziert ($p=0,006$; $p=0,005$). Die mRNA-Expression von *PIWIL4* war nicht signifikant verändert (Abb. 25A). Die Analyse der Proteinexpression nach *PIWIL2*-*knockdown* zeigte eine Zunahme der *PIWIL1*-Speißvariante mit einer molekularen Masse von 50 kDa, sowie das Auftreten von Proteinbanden mit einer Größe von über 170 kDa. Der Western Blot nach Verwendung des *PIWIL2*-Antikörpers zeigte ebenfalls das Auftreten mehrerer dominanter Isoformen in der NT2/D1-Zelllinie (Abb. 25C). Die WT-Variante wird mit 110 kDa angegeben und ist mit einem Pfeil markiert. Es existieren weitere Isoformen bei 80 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 40 kDa und 20 kDa. Eine Mutation in den Exonen 6 und 12 von *PIWIL2* führte zu einer Reduktion der WT-Proteinisoform, sowie der Isoform bei 60 kDa. Da nicht alle detektierten Banden anhand ihrer molekularen Massen eindeutig *PIWIL2*-Isoformen zugeordnet werden können, kann es sich mitunter um unspezifische Bindungen des Antikörpers handeln.

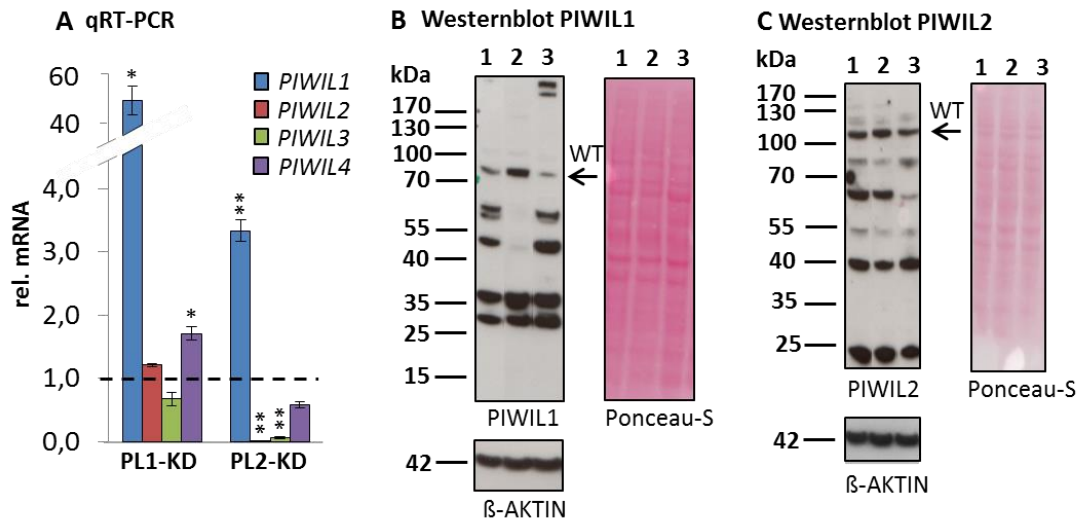


Abbildung 25: Auswirkungen des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* mittels CRISPR/Cas9-System auf die *PIWIL*-mRNA- und Proteinexpression in der NT2/D1-Zelllinie

A. Die qRT-PCR wurde verwendet, um die mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zu untersuchen. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der unbehandelten Kontrolle ($\cong 1$). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD relativ zu *GAPDH*. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$ **B+C.** Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression von *PIWIL1* (**B**) und *PIWIL2* (**C**) Aufgetragen wurden 20 μ g Gesamtprotein. Färbung der Membran mit Ponceau-S und endogenes β -AKTIN diene als Ladekontrolle. 1=unbehandelte Zellen, 2=*knockdown PIWIL1*, 3=*knockdown PIWIL2*, WT=Wildtyp-Isoform. Die Auswertung erfolgte über optische Beurteilung der Bandenstärken.

Um den CRISPR/Cas9-induzierten *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in den TCam-2-Zellen zu untersuchen wurden qRT-PCR und Western Blot verwendet. Die qRT-PCR zeigte, dass das Einbringen einer Mutation in Exon 3 und Exon 15 von *PIWIL1* zu einer 50 %igen Reduktion der mRNA-Expression von *PIWIL1* in der TCam-2-Zelllinie führte ($p=0,025$). Die mRNA-Expression der Gene *PIWIL2* bzw. *PIWIL3* war nicht signifikant vom *knockdown* betroffen. Die mRNA-Expression von *PIWIL4* nahm um das 2,5fache zu ($p=0,002$) (Abb. 26A). Darüber hinaus bestätigte der Western Blot die Reduktion der *PIWIL1*-Proteinexpression. Es zeigte sich eine sehr starke Reduktion der in der TCam-2-Zelllinie vorhandenen *PIWIL1*-Isoformen 90 kDa (WT), 60 kDa und 55 kDa (Abb. 26B). Die Proteinexpression von *PIWIL2* nach *PIWIL1*-*knockdown* war ebenfalls beeinflusst. Es zeigte sich eine Abnahme der Isoformen mit einer molekularen Masse von 110 kDa (WT), 80 kDa, 60 kDa und 50 kDa (Abb. 26C).

Der genomische *knockdown* von *PIWIL2* über das Einbringen von Mutationen in die Exone 6 und 12 dieses Gens zeigte in der qRT-PCR eine Reduktion der mRNA-Expression des *PIWIL1*-Gens um die Hälfte ($p=0,034$). Die mRNA-Expression von *PIWIL2* sowie *PIWIL4* war nicht vom *knockdown* betroffen. Das *PIWIL3*-Gen zeigte eine Verdopplung der mRNA-Menge nach

knockdown von *PIWIL2* (Abb. 26B). Der Western Blot von *PIWIL1* nach *knockdown* des *PIWIL2*-Gens zeigte das Auftreten zweier Isoformen bei 80 kDa und 120 kDa (Abb. 26B). Die Proteinexpression der 110 kDa- (WT), 80 kDa-, 60 kDa-, und 50 kDa-Isoformen von *PIWIL2* wurde nach dem *knockdown* durch über das CRISPR/Cas9-System reduziert (Abb. 26C).

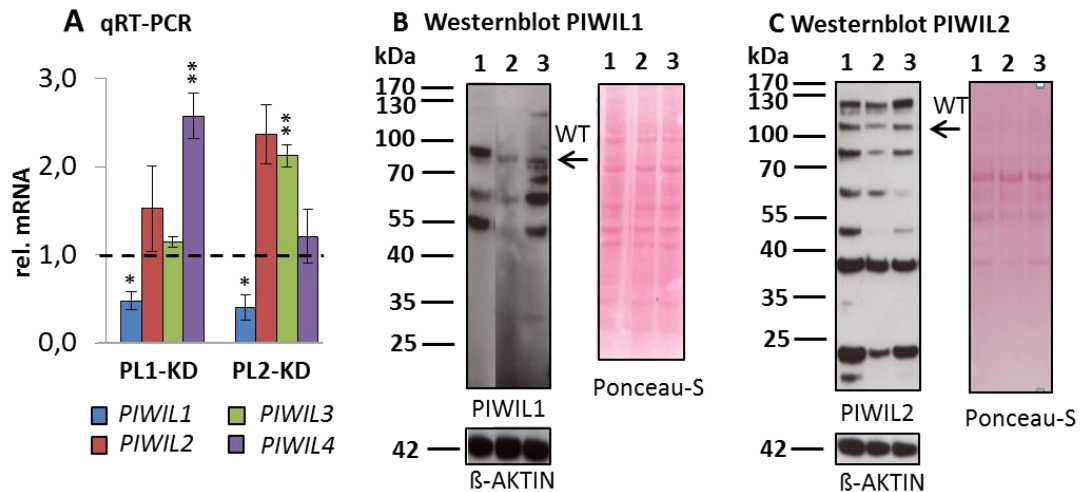


Abbildung 26: Auswirkungen des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* mittels CRISPR/Cas9-System auf die *PIWIL*-mRNA- und Proteinexpression in der TCam-2-Zelllinie

A. Die qRT-PCR wurde verwendet um die mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene 1-4 nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zu untersuchen. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der unbehandelten Kontrolle ($\cong 1$). Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD relativ zu *GAPDH*. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$ **B+C.** Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression von *PIWIL1* (B) und *PIWIL2* (C) Aufgetragen wurden 20 μ g Gesamtprotein. Färbung der Membran mit Ponceau-S und endogenes β -AKTIN diente als Ladekontrolle. 1=unbehandelte Zellen, 2=*knockdown PIWIL1*, 3=*knockdown PIWIL2*, WT=Wildtyp-Isoform. Die Auswertung erfolgte über optische Beurteilung der Bandenstärken.

4.3.3 Mikroarray-Analysen in den Zelllinien NT2/D1 bzw. TCam-2 nach stabilem *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

Nach dem stabilen *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* wurde die genomweite Genexpressionsänderung in den NT2/D1- und TCam-2-Zellen mittels *Affymetrix Clariom™ S* Assay untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA über die TRizol-Methode aus den Zellen isoliert und die Mikroarray-Analyse nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der bioinformatischen Auswertung wurde als Grenzwert für die Detektion eine Signalstärke von mindestens 100 gewählt. Die ermittelten Expressionsdaten der CRISPR/Cas9-behandelten Zellen wurden auf die unbehandelten Zellen relativiert. Die Kriterien für eine Regulation waren erfüllt wenn der Quotient aus *knockdown* und Kontrolle außerhalb von $>0,3$ und <3 (dreifache Veränderung) lag, bevor die Clusteranalyse erfolgte. Zur Visualisierung der Daten wurde eine *heatmap* mittels GENESIS-Software (TU Graz) erstellt.

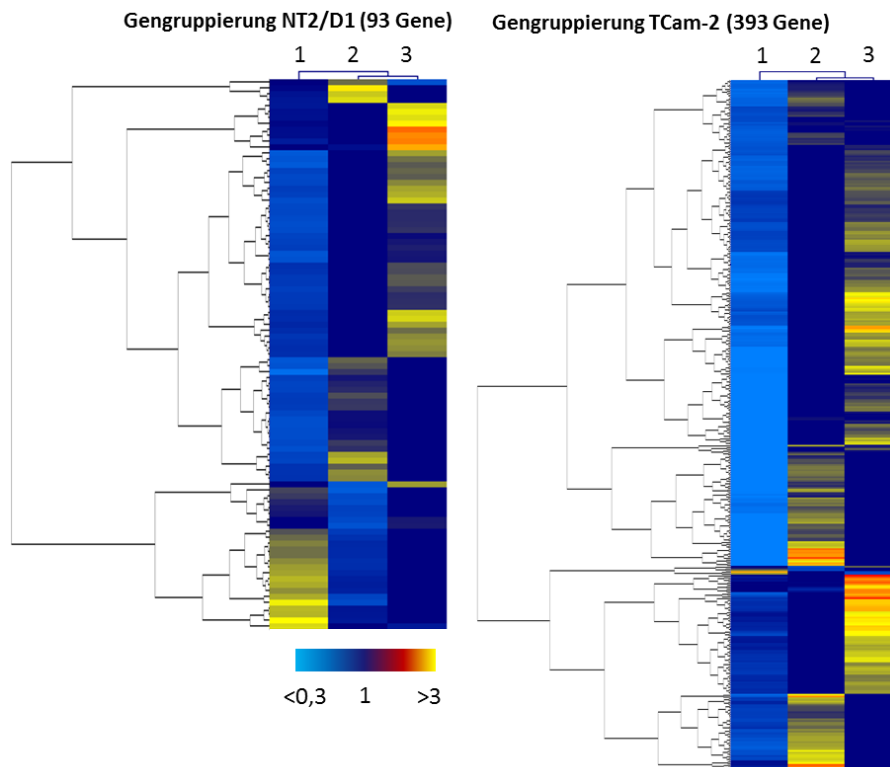


Abbildung 27: Gruppierung der differentiell exprimierten Gene nach ihrem Expressionsverhalten nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in den NT2/D1- und TCam-2-Zellen

Die Gruppierung der Gene ist links als Dendrogramm dargestellt. Rechts ist die Expression als *heatmap* dargestellt. Expressionswerte, die keine Veränderung der Genexpression in Bezug auf das Kontrollexperiment repräsentieren, werden durch eine Dunkelblaufärbung der entsprechenden Zelle gekennzeichnet. Bei einer Erhöhung des Expressionswertes in Bezug auf das Kontrollexperiment, ist die Zelle mit einer Farbe aus dem Gradienten von Rot nach Gelb eingefärbt, dabei steht reines Gelb für die größte beobachtete Erhöhung. Bei einer Verringerung der Expression, werden Farben aus dem Gradienten von Dunkelblau nach Hellblau verwendet. Hellblau stellt die maximale beobachtete Verringerung der Genexpression dar. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene ist in Klammern hinter der Zelllinienbezeichnung dargestellt. 1=unbehandelte Zellen, 2=*knockdown PIWIL1*, 3=*knockdown PIWIL2*, n=1.

Die *heatmap* stellt eine Matrix dar, in der die Zeilen die Gene und die Spalten die verschiedenen Bedingungen darstellen. Die Farbcodierung spiegelt hierbei die Stärke der Genexpression wider. So werden die untersuchten Proben auf der Basis der Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsprofile in ein Verhältnis gestellt und ihr Zusammenhang in einem Dendrogramm visualisiert. In der Zelllinie NT2/D1 lagen nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* insgesamt 93 Gene differentiell reguliert vor (Abb. 27). Die *heatmap* zeigt, dass sich die Expressionswerte des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* insgesamt ähnlicher sind als die zur Kontrolle. Weiterhin lag in der Kontrolle die Mehrheit der Gene verringert exprimiert vor (Hellblau) im Vergleich zu den Zellen mit dem *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*. Insgesamt führte *knockdown* von *PIWIL2* in der NT2/D1-Zelllinie zu einer verstärkten Expression von Genen (Gelbfärbung). Der *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

fürte zu einer veränderten Expression von 393 Genen in den TCam-2-Zellen. Auch in dieser Zelllinie waren sich beide *knockdown*-Strategien vom Expressionsverhalten ähnlicher als zur Kontrolle. In den Kontrollzellen waren fast ausschließlich alle Gene herunterreguliert im Vergleich zu den Zellen mit *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*. Eine Liste mit der chronologischen Übersicht über die differentiell exprimierten Gene befindet sich im Anhang.

Im Weiteren wurde ermittelt, welche Gene im Einzelnen nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in ihrer Expression beeinflusst wurden und welchen Einfluss der *knockdown* auf die Expression der *PIWIL*-Homologe hatte. Die Transkriptomanalysen ergaben dass in der NT2/D1-Zelllinie nach *PIWIL1-knockdown* 53 Gene und nach *knockdown* von *PIWIL2* 58 Gene in der Zelle in ihrer Expression beeinflusst waren. Dabei waren nach *knockdown* von *PIWIL1* 15 Gene in ihrer Expression verringert und 38 Gene in ihrer Expression erhöht. Ein *knockdown* von *PIWIL2* zeigte in der NT2/D1-Zelllinie zwei Gene mit erniedrigter Expression und 56 Gene mit erhöhter Expression (Abb. 28A). Die Anzahl der beeinflussten Gene, sowie das Ausmaß der Regulation waren nach *knockdown* von *PIWIL1* (n=305) bzw. *PIWIL2* (n=365) in der TCam-2-Zelllinie größer. In beiden Fällen wurde eine Zunahme an Genen mit erhöhter Expression detektiert ($n_{\text{PL1-KD}} = 301$; $n_{\text{PL2-KD}} = 363$).

Weiterhin wurden die Genexpressionsprofile der *PIWIL*-Homologe 1-4 nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* betrachtet (Abb. 28B). In der Zelllinie NT2/D1 führte ein *knockdown* von *PIWIL1* zu einer 50 %-igen Zunahme der *PIWIL1*-Expression und zu einer Abnahme der *PIWIL4*-Expression um die Hälfte. Die Gene *PIWIL2* und *PIWIL3* waren in ihrer Expression nicht beeinflusst. Der *knockdown* des Gens *PIWIL2* resultierte in einer Reduktion der *PIWIL2*-Transkriptmenge auf 25 % und einer Reduktion der *PIWIL4*-mRNA um die Hälfte. Die Gene *PIWIL1* und *PIWIL3* hingegen waren nicht in ihrer Expression beeinflusst. In der Zelllinie TCam-2 führte der *knockdown* von *PIWIL1* zu einer starken Reduktion der Expression der Gene *PIWIL*, 2 und 4 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Das Gen *PIWIL3* zeigte eine 3fache Zunahme der Expression. Der *knockdown* von *PIWIL2* zeigte in der Zelllinie TCam-2 ähnliche Ergebnisse wie in der Zelllinie NT2/D1. Auch hier führte er zu einer starken Abnahme der Expression der Gene *PIWIL1*, 2, und 4. Das Gen *PIWIL3* war in seiner Expression nicht beeinflusst (Abb. 28B).

A Anzahl der regulierten Gene

rel. Expressionsniveau		$\leq 0,1$	$\leq 0,3$	≥ 3	≥ 30	≥ 100
NT2/D1	PIWIL1-KD n=53	0	15	38	0	0
	PIWIL2-KD n=58	0	2	56	0	0
TCam-2	PIWIL1-KD n=305	0	4	283	16	2
	PIWIL2-KD n=365	1	1	352	11	0

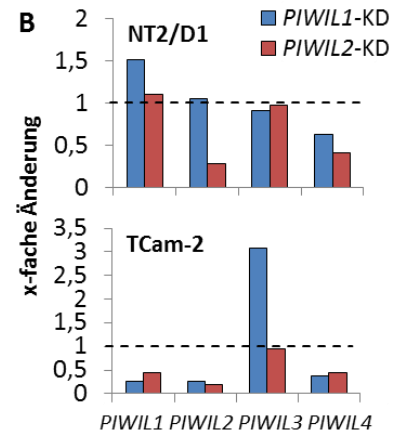


Abbildung 28: Überprüfung differentiell exprimierter Gene der NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen nach knockdown der Gene PIWIL1 bzw. PIWIL2 in der Mikroarray-Analyse

A. Gezeigt ist die Anzahl der Gene, welche in der Mikroarray-Analyse nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* oder *PIWIL2* in ihrer Expression erhöht oder erniedrigt waren. Die Stärke der Regulation ist als Quotient aus *knockdown* (KD) und unbehandelten Zellen (Kontrolle) dargestellt. n gibt die Gesamtheit der regulierten Gene an. **B.** Einfluss des *knockdowns* der Gene *PIWIL1* (blaue Balken) bzw. *PIWIL2* (rote Balken) auf die Expression der *PIWIL*-Homologe 1-4 in der Mikroarray-Analyse. Angegeben ist die Änderung der Genexpression als Quotient aus *knockdown* und Kontrolle. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der unbehandelten Kontrolle ($\hat{=}$ 1), n=1.

4.3.4 Ontologische Zuordnung der differentiell exprimierten Gene

Die in der Mikroarray-Analyse als differentiell exprimiert ermittelten Gene wurden Gen-Ontologie-Analysen (GO-Analysen) mithilfe des Online-Programms PANTHER (*protein annotation through evolutionary relationship*, <http://pantherdb.org/>) unterzogen. PANTHER ist eine biologische Datenbank für Proteinfamilien und deren funktionell verwandten Unterfamilien, die zur Klassifizierung und Identifizierung der Funktion von Genprodukten im Rahmen einer Hochdurchsatzanalyse verwendet werden kann (Thomas *et al.*, 2003). Zur Zuordnung des Proteins in PANTHER verwendet man die vom Mikroarray-Hersteller angegebenen Gensymbole basierend auf den Angaben der Referenzsequenz-Datenbank (*RefSeq*). Diese Datenbank ist eine Sammlung von Nukleotidsequenzen (DNA, RNA) und deren Proteinprodukten. Die *RefSeq*-Datenbank wurde vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) erstellt und ordnet einen Datensatz an Biomolekülen jeweils nur einem Gen pro Organismus zu (Pruitt *et al.*, 2005). Die GO-Analyse kann dazu genutzt werden, Gene nach ihrem Vorkommen in der Zelle, ihrer molekularen Funktion oder Vorkommen in biologischen Prozessen einzuteilen. Um den Einfluss des *knockdowns* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf zelluläre Abläufe zu ermitteln wurde die Einteilung nach biologischem Prozess gewählt. Da PANTHER nicht alle in der Mikroarray-Analyse angegebenen

Gensymbole zuordnen konnte, kommt es zu Abweichungen in der Anzahl der regulierten Gene laut Mikroarray-Analyse und PANTHER-Datenbank (Vgl. Abb. 28 und Abb. 29).

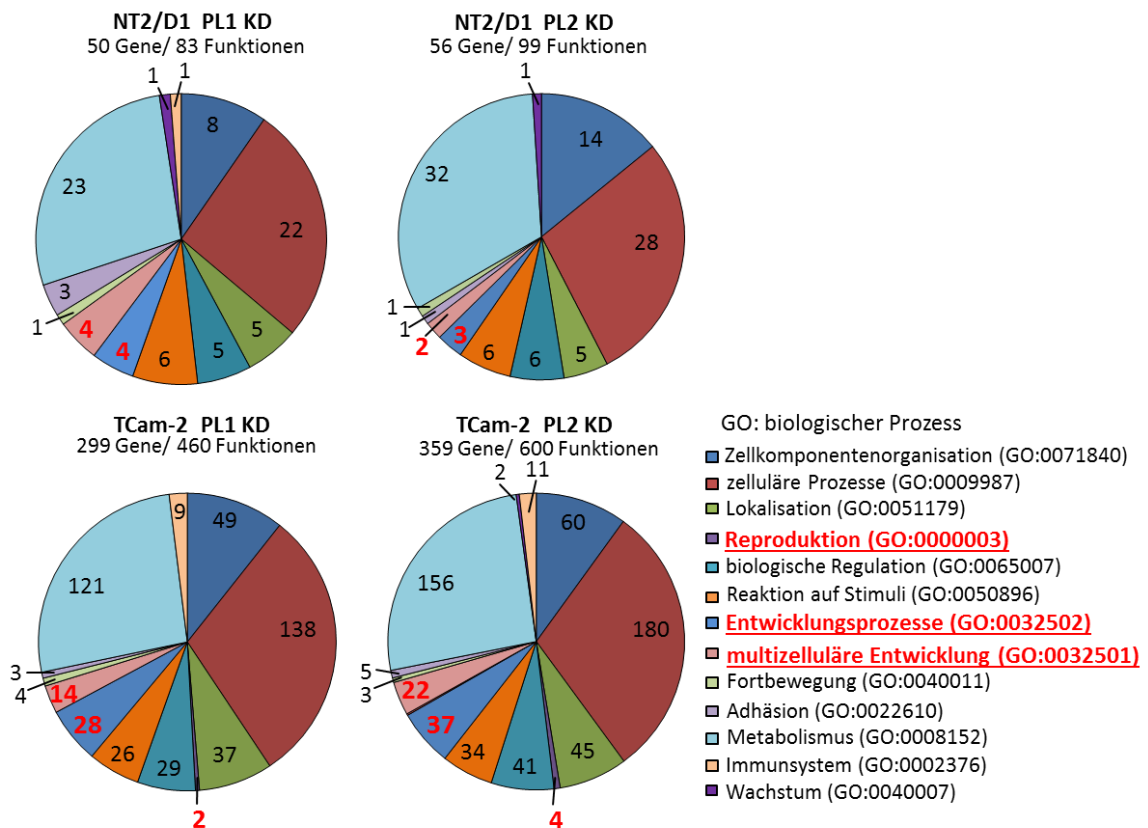


Abbildung 29: Überprüfung von differentiell exprimierten Genen nach *PIWIL1*- bzw. *PIWIL2*-knockdown in der Zelllinie NT2/D1 bzw. TCam-2.

Gezeigt ist die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene in der Mikroarray-Analyse nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* oder *PIWIL2* mit ihren, laut PANTHER-Datenbank ermittelten, biologischen Funktionen. Rot gedruckt ist die Anzahl der Gene aus reproduktionsbiologischen, sowie entwicklungsbiologischen Prozessen. Diese Gene sollten über qRT-PCR validiert werden. Die angegebenen Nummern der biologischen Prozesse beziehen sich auf die Nomenklatur der PANTHER-Datenbank bezüglich dieser.

Die GO-Analyse zeigte, dass ein *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in der NT2/D1- bzw. TCam-2-Zelllinie insbesondere die Expression von Genen betrifft, die zelluläre (Rot) sowie metabolische (Hellblau) Prozesse regulieren (Abb. 29). Dabei meint der Begriff „zelluläre Prozesse“, Abläufe auf zellulärer Ebene, die nicht unbedingt auf Einzelzellen beschränkt sein müssen wie Zell-Zell-Kommunikation, Zellzyklus, Zellwachstum oder Proliferation. „Metabolische Prozesse“ umfassen Abläufe welche die Biosynthese, Verstoffwechslung und Abbau von Biomolekülen betreffen, aber auch DNA-Reparatur- und Replikation. Ein *knockdown* von *PIWIL2* führt ebenfalls zu einer Regulation von Genen, die an zellulären und metabolischen Prozessen beteiligt sind. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der *PIWIL*-Defizienz auf die Expression von Stammzell-, sowie spermatogenese-relevanter Gene

untersucht werden sollte, wurden insgesamt die Gene gesondert betrachtet, welche den biologischen Prozessen „Reproduktion“, „Entwicklung“ und „multizelluläre Entwicklung“ zugeordnet sind.

Es zeigt sich, dass nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in der NT2/D1-Zelllinie keine und in der TCam-2-Zelllinie 2-4 Gene in ihrer Expression beeinflusst waren, die in reproduktionsbiologische Prozesse (Lila) involviert sind. Der Anzahl regulierter Gene, die Entwicklungs- und Differenzierungsabläufe koordinieren liegt in der Zelllinie NT2/D1 bei 2-4 und in der Zelllinie TCam-2 bei 14-37 (Mittelblau und Altrosa).

4.3.5 Validierung der in der Mikroarray-Analyse ermittelten Gene über qRT-PCR

Die Auswahl der Gene für die Analyse in der qRT-PCR erfolgte basierend auf der Transkriptom-Analyse nach *PIWIL1*- bzw. *PIWIL2*-*knockdown* in den NT2/D1- bzw. TCam-2-Zellen. Kriterien, die der Auswahl der Kandidaten zugrunde lagen, waren eine mindestens dreifach abweichende Regulation der Gene im Vergleich zur Kontrolle und die Zugehörigkeit zu den GO-Gruppierungen „Reproduktion“ und „Entwicklungsprozessen“. Weiterhin wurden Gene ausgewählt, die zwar in der Mikroarray-Analyse keinen Effekt zeigten, jedoch kanonische Marker für Stammzellentwicklung und –erhaltung, aber auch Differenzierung somatischer Linien, sowie Marker unterschiedlicher Keimzellstadien darstellen.

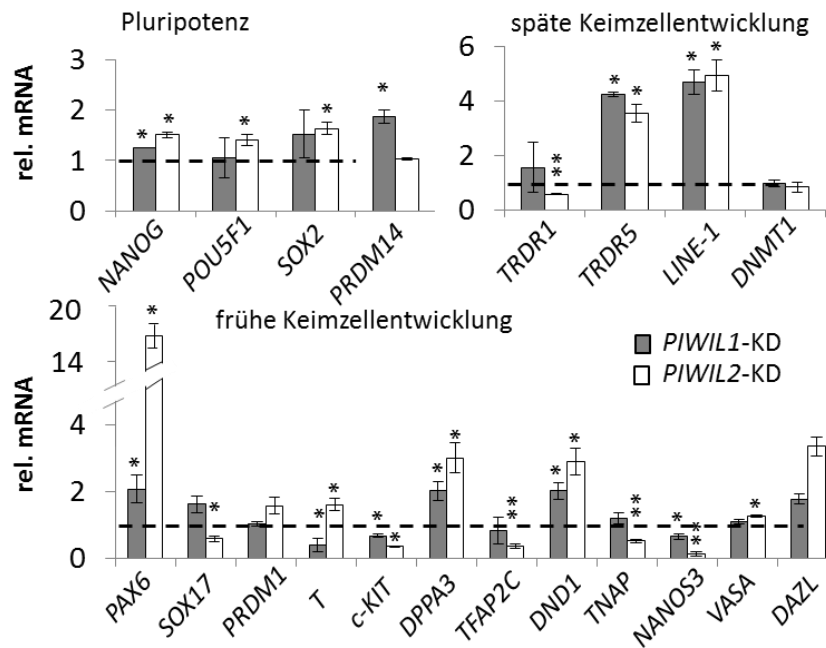


Abbildung 30: Validierung der in der Mikroarray-Analyse ermittelten Gene, sowie Stamm- und Keimzellmarker in der Zelllinie NT2/D1

Die qRT-PCR wurde verwendet um die mRNA-Expression von verschiedenen Genen nach *knockdown* des Gens *PIWIL1* (PL1-KD) bzw. *PIWIL2* (PL2-KD) zu untersuchen. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der unbehandelten Kontrolle ($\cong 1$). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression von GAPDH. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Die genaue Bezeichnung der Gene ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Es wurden vier Gene ausgewählt, die als klassische Pluripotenzmarker gelten (*POU5F1*, *NANOG*, *PRDM14*, *SOX2*) und zehn Gene, die verantwortlich sind für PGC-Spezifikation (*PRDM1*, *DPPA3*, *SOX17*, *TNAP*, *NANOS3*, *TFAP2C*, *c-KIT*, *DND1*, *VASA*, *DAZL*). Weiterhin wurden zwei Gene untersucht, die als Interaktionspartner der PIWIL-Proteine während der RNA-Interferenz gelten (*TRDR1*, *TRDR5*), sowie ein bekanntes Ziel der RNA-Interferenz (*LINE-1*-Retrotransposon). Zusätzlich wurde der Einfluss des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf die mRNA-Expression der DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferase 1 (*DNMT1*) untersucht. Weiterhin wurden Gene analysiert, die frühe Differenzierungsmarker für die mesoderme (*T* (*BRACHYURY*), *HAND1*, *PAX6*) Linie darstellen, aus welcher im weiteren Verlauf der Entwicklung die Geschlechtszellen hervorgehen.

Der *knockdown* des Gens *PIWIL1* führte in der Zelllinie NT2/D1 zu einer leichten Erhöhung der mRNA-Expression der Pluripotenzmarker *NANOG* ($p=0,017$) und *PRDM14* ($p=0,032$). Betrachtet man die Expression von Genen, welche Keimbahnstammzellen spezifizieren, zeigte sich eine Verdopplung der *DPPA3*-mRNA- ($p=0,046$) und der *DND1*-mRNA-Expression ($p=0,046$). Die Gene *NANOS3* ($p=0,032$) und *c-KIT* ($p=0,036$) hingegen wurden in Ihrer mRNA-

Expression erniedrigt. *TRDR5* ($p=0,025$) als Interaktionspartner der PIWIL-Proteine nahm in seiner mRNA-Expression um das 4fache zu, ebenso wie die Expression des *LINE-1*-Retrotransposons ($p=0,027$). Der *knockdown* von *PIWIL2* resultierte in der NT2/D1-Zelllinie in einer leichten mRNA-Erhöhung der Pluripotenzgene *POU5F1* ($p=0,040$), *NANOG* ($p=0,021$) und *SOX2* ($p=0,041$). Die PGC-Gene *DPPA3* ($p=0,029$) und *DND1* ($p=0,037$) wurden um das 3fache in ihrer mRNA-Expression erhöht. Weiterhin war eine Reduktion von *TFAP2C* ($p=0,0016$), *c-KIT* ($p=0,016$) und *NANOS3* ($p=0,00015$) zu detektieren. Die mRNA-Expression von *TRDR5* ($p=0,044$) und *LINE-1* ($p=0,026$) wurde etwa um das 4fache erhöht, wiederum die von *TRDR1* ($p=0,001$) auf die Hälfte erniedrigt. Der Marker für frühes Mesoderm *PAX6* ($p=0,031$) erfuhr eine 16fache Steigerung der mRNA-Expression nach *knockdown* des *PIWIL2*-Gens (Abb. 30).

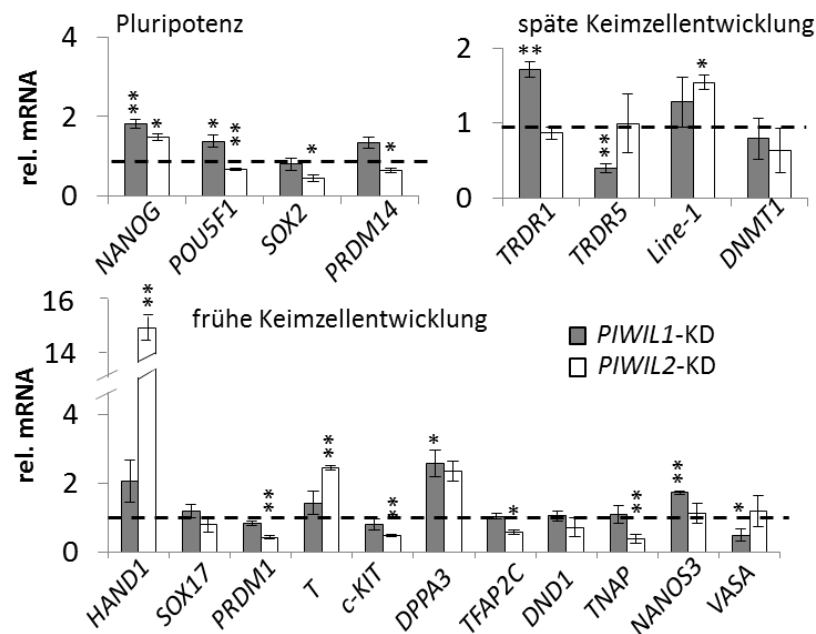


Abbildung 31: Validierung der in der Mikroarray-Analyse ermittelten Gene, sowie Stamm- und Keimzellmarker in der TCam-2-Zelllinie

Die qRT-PCR wurde verwendet um die mRNA-Expression von verschiedenen Genen nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* (PL1-KD) bzw. *PIWIL2* (PL2-KD) zu untersuchen. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression der unbehandelten Kontrolle (± 1). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression von GAPDH. $n=3$; Student's t-Test * $p<0,05$, ** $p<0,01$ Die genaue Bezeichnung der Gene ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Ein *knockdown* von *PIWIL1* führte in der Zelllinie TCam-2 zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von *NANOG* ($p=0,003$) und *POU5F1* ($p=0,041$) um die Hälfte. Die Keimbahnstammzellgene *NANOS3* ($p=0,0008$) und *DPPA3* ($p=0,046$) wurden ebenfalls in ihrer mRNA-Expression verstärkt. Die PIWIL-Interaktionspartner *TRDR1* ($p=0,0033$) und

TRDR5 (p=0,0054) erfuhren je eine 50 %-ige Zu- und Abnahme des mRNA-Gehaltes. Das meiotisch exprimierte Gen *VASA* (p=0,046) wurden ebenfalls um die Hälfte herunterreguliert. Ein *knockdown* von *PIWIL2* induzierte in der TCam-2-Zelllinie eine Reduktion der Stammzellmarker *POU5F1* (p=0,0011) und *PRDM14* (p=0,024), sowie *SOX2* (p=0,033). Ebenfalls um das 0,5fache erniedrigt wurde die Expression der frühen Keimzellgene *PRDM1* (p=0,0006), *TFAP2C* (p=0,043) und *c-KIT* (p=0,0002). Die Expression von *T (BRACHYURY)* (p=0,0029) und *HAND1* (p=0,0044) als Marker für frühes Mesoderm nahm nach *PIWIL2-knockdown* um das bis zu 15fache zu (Abb. 31).

4.3.6 Zellfunktionelle Konsequenzen des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

In diesem Teilversuch sollten die Auswirkungen des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf das Zellwachstums- und –proliferationsverhalten, sowie die Zellvitalität und Apoptose bestimmt werden. Zur Analyse der Wachstumsrate wurden 2×10^5 Zellen in Kulturgefäße eingestreut und nach 48 h die Zellzahl bestimmt. Die Zellvitalität wurde mittels Sulforhodamin B-*assay* (SRB) bestimmt, welcher auf der Anfärbung lebender Zellen beruht. Ausgehend von identischen Zellzahlen gibt eine Änderung der Farbintensität Aufschluss über die Änderung der Zahl vitaler Zellen. Die Ermittlung der Proliferationsrate erfolgte über die Gabe eines Substrates und eines damit verbundenen Farbumschlages des Mediums hervorgerufen durch Substratspaltung in metabolisch aktiven Zellen. Die Apoptoserate der Zellen wurde über die Aktivität der Caspasen 3 und 7 untersucht.

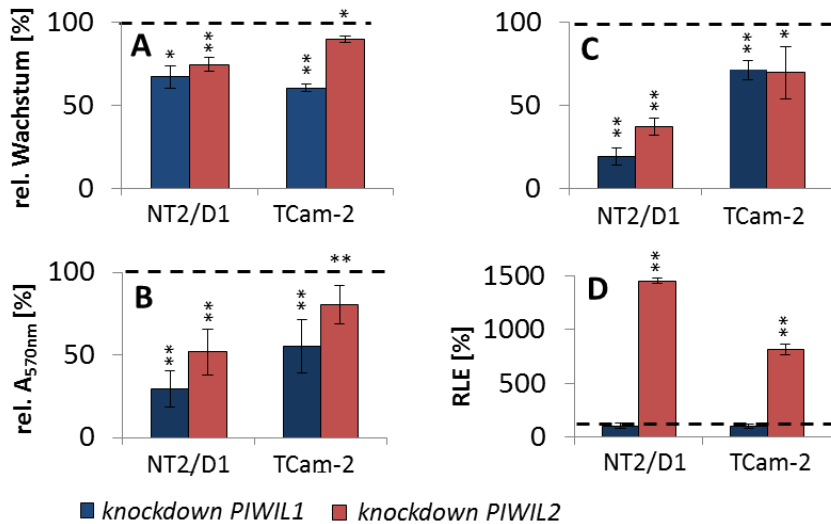


Abbildung 32: Effekte des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf das Zellwachstum (A), die Zellproliferation (B), die Zellvitalität (C) und das Apoptoseverhalten (D) von NT2/D1- und TCam-2-Zellen

Die Darstellung erfolgte bezüglich der unbehandelten Kontrolle (gestrichelte Linie, 100 %); RLE=relative Lichteinheiten, n=3; Student's t-Test, *p<0,05, **p<0,01.

Der *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* führte in beiden Zelllinien zu einer Abnahme des Wachstums von 10-40 %. Eine Reduktion der Proliferationsrate war ebenfalls in beiden Zelllinien zu beobachten, wobei die Zelllinie NT2/D1 mit bis zu 80 % Rückgang stärker betroffen war als die Zelllinie TCam-2, die eine bis zu 50 % reduzierte Proliferation zeigte. Ein ähnlicher Effekt war bei der Messung der Zellvitalität zu beobachten. Dort zeigte sich, in Abhängigkeit des durchgeführten *knockdown*, eine 60-75 %-ige Verminderung der Zellvitalität in der NT2/D1-Zelllinie, ebenso wurde die Vitalität der Zelllinie TCam-2 um bis zu 40 % reduziert. Weiterhin sollte getestet werden, ob die Wachstums- und Vitalitätsminderung in den Zelllinien mit erhöhter Apoptose assoziiert ist. In den verwendeten Zelllinien konnte keine Änderung der Apoptoserate nach *PIWIL1-knockdown* detektiert werden. Ein *knockdown* des Gens *PIWIL2* induzierte jedoch eine starke Erhöhung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 von 800-1000 % je nach verwendeter Zelllinie (Abb. 33).

5 Diskussion

5.1 mRNA-Expression der *PIWIL*-Gene in ejakulierten Spermatozoen

Männliche Infertilität stellt ein gesundheitliches Problem dar, welches etwa 7 % der Männer weltweit betrifft (Lotti und Maggi 2015). Eine Diagnostik erfolgt routinemäßig über deskriptive Samenanalysen. Die derzeitigen genetischen Untersuchungen infertiler Männer beinhalten Karyotypisierung und Y-Chromosom-Mikrodeletionstests. Obwohl Spermienanomalien bei vielen infertilen Männern üblich sind, wird in etwa 50 % der Fälle eine idiopathische Infertilität diagnostiziert, bei der genetische Faktoren wahrscheinlich mitwirken (Lipshultz und Lamb 2007). Aufgrund der genetischen und klinischen Heterogenität ist das Verständnis der männlichen Infertilität begrenzt. Die Samenanalyse bietet keine individuelle Möglichkeit zwischen fertilen und Männern mit eingeschränkter Fertilität zu unterscheiden. Da es bei den Samenparametern beider Gruppen in vielen Bereichen zu Überlappungen kommt, sind Kliniker veranlasst auf die Suche nach geeigneten Biomarkern zur Aufklärung idiopathischer Infertilität zu gehen (Murray *et al.*, 2012).

Trotz mehr als 3000 im männlichen Fortpflanzungssystem exprimierter Gene, galten ausgereifte Spermatozoen lange Zeit als transkriptionell inaktiv (Schultz *et al.*, 2003). Während der Spermatogenese werden die an der DNA befindlichen Histone durch Testis-spezifische Protamine ersetzt. Dieser Vorgang gewährleistet die Integrität der DNA, eine erfolgreiche Spermienreifung, sowie die spätere Fertilisation. Dabei kommt es zu einer Verdichtung des Chromatins und die *de novo* Transkription in postmeiotischen Spermien kommt fast vollständig zum Erliegen. Daher wurde ursprünglich angenommen, dass Spermien-RNAs einfach Relikte der Spermatogenese sind (Miller *et al.*, 2005). Allerdings zeigen Untersuchungen Transkriptionsaktivität in den Spermien sowie eine wesentliche Rolle von Spermien-RNAs bei der Fertilisation und Embryonalentwicklung (Fischer *et al.*, 2012; Bourc'his und Voinnet 2010). Mittels Mikroarray-Analysen konnten in ejakulierten Spermatozoen über 3000 RNAs unterschiedlicher Klassen nachgewiesen werden (Krawetz 2005). Obwohl die Struktur von Spermien-RNA gut beschrieben ist, bleibt ihre Funktion bei männlicher Infertilität weiterhin ungeklärt.

Ein Ziel unserer Studie war die Messung der mRNA-Expression der Spermatogenese-relevanten Gene *PIWIL1-4* in ejakulierten Spermatozoen in Assoziation zu männlicher Infertilität. Die Expression der *PIWIL1*-mRNA war in 100 % der Fälle nachweisbar. Analog

zum Mausmodell konnte HIWI (PIWIL1) nur in midpachytänen Spermatozyten, sowie frühen Spermatiden detektiert werden, aber nicht in Spermatogonien und Sertoli-Zellen (Deng und Lin 2002; Hempfling *et al.*, 2017). Die Expression von *PIWIL1* in ausschließlich postpubertären Stadien der murinen und humanen Spermatogenese könnte den Nachweis von *PIWIL1*-mRNA in 100 % der Ejakulatproben erklären.

In unserer Studie war die mRNA-Expression des Gens *PIWIL2* in 49 % der Ejakulatproben detektierbar. Das murine Homolog MILI (*PIWIL2*) wird in Prospermatogonien bis zum Stadium der runden Spermatiden exprimiert (Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). HILI (*PIWIL2*) konnte neben Testisproben von normozoospermen und hypoospermen Probanden in geringen Mengen auch in *Sertoli cell only*-Biopsieproben detektiert werden (Hempfling *et al.*, 2017, Lim *et al.*, 2013).

Die mRNA-Expression des *PIWIL3*-Gens konnte nur in 10 % der ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen werden. Bisher wurde die Expression von *PIWIL3* noch nicht in humanen Testis beschrieben. Studien zeigen ein Vorhandensein dieses Homologs im menschlichen Ovar und einigen Tumorentitäten, wo es in Zusammenhang mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und Tumorprogression steht. (Lim *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Gambichler *et al.*, 2017). Gu *et al.*, (2010) zeigten, dass ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im *PIWIL3*-Gen mit Oligozoospermie in chinesischen Patienten korreliert.

Die mRNA-Expression von *PIWIL4* wurde in 15 % der Fälle detektiert. Im Mausmodell wurde die Expression von MIWI2 (*PIWIL4*) ausschließlich für Prospermatogonien beschrieben (Bao *et al.*, 2014). Hempfling *et al.*, (2017) dokumentierten eine hohe mRNA-Expression von *PIWIL4* in Testisproben mit spermatogenem Arrest. In Übereinstimmung damit zeigte eine Untersuchung an spanischen Männern mit eingeschränkter Fertilität, dass im *PIWIL4*-Gen Einzelnukleotid-Polymorphismen existieren, die mit Keimzellarrest assoziiert sind (Muñoz *et al.*, 2014). Einer der untersuchten Einzelnukleotid-Polymorphismen konnte in einer Studie mit iranischen Männern in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Azoospermie verifiziert werden (Kamaliyan *et al.*, 2017). Gu *et al.*, 2010 identifizierten im humanen *PIWIL4*-Gen einen Einzelnukleotid-Polymorphismus, der mit einem erhöhten Risiko eine Oligozoospermie zu entwickeln verknüpft ist. Aufgrund seiner Lage in der 3'UTR der transkribierten mRNA kann dieser allerdings nicht mit der Funktionalität des Proteins in Zusammenhang stehen.

Weiterhin wurde in unserer Studie eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *PIWIL1*- und *PIWIL2*-mRNA gezeigt, was auf eine überlappende Expression dieser Gene während der Spermatogenese hindeuten könnte, wie es bereits für die Maus-Homologe MIWI (*PIWIL1*) und MILI (*PIWIL2*) beschrieben wurde (Bak *et al.*, 2011). Die Expression der beiden Homologe konnte insbesondere in späten Stadien der Spermatogenese detektiert werden (Vourekas *et al.*, 2012). Zusätzlich war eine erhöhte mRNA-Expression der Gene *PIWIL1* sowie *PIWIL2* mit erhöhtem Alter der Studienteilnehmer assoziiert (siehe Tabelle 1). Bisher wurde noch kein Zusammenhang zwischen erhöhtem Alter und *PIWIL*-Genexpression beschrieben. Die erhöhte Expression von *PIWIL1* und *PIWIL2* könnte ein Hinweis darauf sein, wie alternde Männer ihr genetisches Material gegen Transposonaktivierung, Umwelteinflüsse oder oxidativen Stress schützen. Insbesondere die mRNA-Expression von *PIWIL2* scheint dabei eine Rolle zu spielen. In Weichteilsarkomen ist eine erniedrigte Expression von *PIWIL2*- oder *PIWIL4*-mRNA mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Greither *et al.*, 2012). Da in unserer Studie die Altersverteilung im Bereich von 22-48 Jahren lag, sind grundlegende Schlussfolgerungen bezüglich der Altersabhängigkeit der *PIWIL1-4*-mRNA-Expression noch spekulativ. Ähnlich wie in Weichteilsarkomen, wo sich eine verminderte *PIWIL2*-mRNA-Expression nachteilig auf das Überleben auswirkt, ist in unserer Kohorte eine verminderte mRNA-Expression von *PIWIL2* mit verschlechterten Samencharakteristiken wie verminderte Gesamtspermatozoenzahl sowie verringerte Spermienkonzentration assoziiert. Einen Zusammenhang zwischen *PIWIL2* und Spermienzahl konnten auch Schütte *et al.*, (2013) zeigen. In ihrer Studie war die erhöhte DNA-Methylierung von *PIWIL2* in ejakulierten Spermatozoen mit verminderter Spermienzahl assoziiert. Heyn und Kollegen (2012) analysierten die Expression von *PIWIL2*-mRNA in Spermatozoen von normozoospermen Probanden im Vergleich zu Hodenproben von Patienten mit Spermatogenese-arrest. Es gab eine signifikante Erhöhung der Promotor-Methylierung von *PIWIL2* bei Patienten mit spermatogenem Arrest, begleitet von reduzierter mRNA-Expression von *PIWIL2*, fehlerhafter Produktion von piRNA und Verlust der DNA-Methylierung in repetitiven Elementen. Weiterhin existiert in unserer Studienkohorte eine signifikante Assoziation zwischen einer erhöhten *PIWIL1*-mRNA-Expression und einem verminderten Prozentsatz an progressiv beweglichen Spermien sowie verringerter Spermienvitalität. Die reduzierten Motilitäts- und Vitalitätsparameter könnten auf die Notwendigkeit einer zeitlich geregelten Expression der *PIWIL*-Gene für eine gelungene

Spermienentwicklung hinweisen. Einen Hinweis darauf liefern Gou und Kollegen (2017). Sie konnten zeigen, dass Mutationen im *PIWIL1*-Gen existieren, welche die Ubiquitinierung und somit den proteasomalen Abbau verhindern. Das Vorhandensein von *PIWIL1* blockiert den Histon-Protamin-Austausch in postmeiotischen Stadien der Spermatogenese. Diese Mutationen induzieren im Mausmodell einen spermatogenen Arrest in späten Stadien der Spermatogenese und wurden bei Patienten mit Azoospermie detektiert. Zusammenfassend zeigt unsere Studie die mRNA-Expression der vier humanen *PIWIL*-Gene in ejakulierten Spermatozoen von 83 Männern mit unterschiedlichem Samenstatus. Laut unserer Hypothese weisen die *PIWIL1*- und *PIWIL2*-mRNA-Expressionsniveaus auf das Vorhandensein unreifer beziehungsweise nicht intakter Spermien im Ejakulat hin, die eine Subfertilität der untersuchten Männer begründen könnten. Die *PIWIL*-Genexpression könnte somit einen interessanten Biomarker zur Messung der Stadien der menschlichen Spermatogenese und der Assoziation zu eingeschränkten Fertilitätsparametern darstellen.

5.2 Epigenetische Regulation der *PIWIL*-Genexpression

Die murinen Homologe *MIWI*, *MILI* und *MIWI2* zeigen ein zeitlich geregeltes Expressionsmuster während der Spermatogenese (Zheng und Wang 2012). Während *MILI* und *MIWI2* in frühen Spermien nachgewiesen wurden, wird *MIWI* in postmeiotischen Stadien der Spermatogenese exprimiert. Wie die Expression reguliert wird, ist bisher noch ungeklärt. Es ist hinreichend bekannt, dass Spermien umfangreichen epigenetischen Modifikationen während der Differenzierung zu reifen Spermatozoen unterzogen werden. Dabei sind DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und Chromatin-remodelling wesentliche Regulatoren der Spermatogenese (Güneş und Kulaç 2013). In den primordialen Keimzellen der fetalen Keimbahn werden alle Methylierungsmuster im Wesentlichen gelöscht, wodurch Totipotenz beziehungsweise ein äquivalenter epigenetischer Zustand wiederhergestellt werden. Die keimzellspezifischen Methylierungsmuster werden dann während der Spermatogenese etabliert (Hajkova *et al.*, 2008). Die Remethylierung wird nach dem pränatalen mitotischen Arrest in der Prospermatogonie initiiert und erfolgt bis zum Ende des Stadiums der pachytänen Spermatozyten (Oakes *et al.*, 2007). Hierbei zeigten Methylierungsanalysen des Spermien-genoms eine Promotorhypomethylierung insbesondere von Genen, die eine schnelle Aktivierung im Embryo für Entwicklung und Differenzierung erfordern (Hammoud *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine epigenetische Modifikation der DNA in Form von Cytosin-Methylierung als potentieller Regulationsmechanismus der humanen *PIWIL*-Gene untersucht werden. Epigenetisch regulierbare Cytosine liegen als sogenannte CpG-Inseln vor. Diese Regionen verfügen über einen erhöhten CG-Gehalt und sind meist mit Promotorregionen assoziiert. Die Methylierung eines CpG-Dinukleotids innerhalb eines regulatorischen Elements einer Promotorregion kann die Zugänglichkeit von DNA für spezifische Transkriptionsfaktoren verändern und somit eine verminderte Genexpression verursachen. Im Gegensatz dazu ist die Hypomethylierung von CpG-Dinukleotiden in den Promotorregionen generell mit einer erhöhten Genexpression verbunden.

Als Modelle für die epigenetischen Analysen dienten zwei Zelllinien testikulären Ursprungs. Die Zelllinie NT2/D1 entstammt einem pluripotenten ektodermalen Karzinom und weist dadurch eine hohe Ähnlichkeit zu embryonalen Stammzellen auf (Schwartz *et al.*, 2005). Die aus einem Keimzelltumor gewonnene Seminomzelllinie TCam-2 zeigt hingegen Eigenschaften von Keimbahnstammzellen, sowie frühen Keimzellen (Jong *et al.*, 2008). Zunächst wurde mittels Bisulfitsequenzierung die basale Promotormethylierung der *PIWIL*-Homologe 1-4 in den Zellmodellen untersucht. Die Analyse des auf Chromosom 12q24 befindlichen *PIWIL1*-Lokus ergab einen hohen Gehalt an CpG-Dinukleotiden ab -1000 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart bis in das Exon 1 hinein, welches nicht proteinkodierend ist und somit die 5'UTR darstellt. Beide Zelllinien zeigten im untersuchten Bereich von -1000 bp bis -400 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart eine starke Promotormethylierung, wobei die Zelllinie NT2/D1 die höhere Methylierungsrate aufwies als die Zelllinie TCam-2 (96 % und 78 %). Beide Zelllinien zeigten eine ähnlich starke basale mRNA-Expression von *PIWIL1* in der qRT-PCR. Die hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden in der 5'Region stromaufwärts vom Transkriptionsstart bzw. Exon 1, die mit der verwendeten Methode nicht analysiert werden konnten, lassen auf alternative Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *PIWIL1*-Sequenz schließen, die das Auftreten mehrerer prominenter Banden im Western Blot erklären könnten (Abb. 17). Obwohl dies bisher für das *PIWIL1*-Gen noch nicht beschrieben worden ist, existieren Studien für das *PIWIL2*-Gen, welche alternative Promotoren in den Exonen 1, 5, 7 sowie Intron 10 identifizieren und somit auf das Vorhandensein mehrerer *PIWIL2*-Isoformen schließen lassen (Gainetdinov *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Die hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden am *PIWIL1*-Lokus könnte die moderate Expression von *PIWIL1* beider Zelllinien erklären. Eine Behandlung der Zellen mit dem

demethylierenden Agens 5AzadC führte in der NT2/D1-Zelllinie zu einer leichten Demethylierung der CpG-Dinukleotide im Bereich um -550 bp vor dem Transkriptionsstart. In diesem Bereich befindet sich ebenfalls ein putativer Promotor. Weiterhin durch die Exposition gegenüber 5AzadC konnte die Gesamtmethylierung des untersuchten Abschnitts auf 90 % reduziert werden. Trotz einer nachweisbaren Demethylierung nach Behandlung mit 5AzadC in der genannten Region konnte keine Steigerung der mRNA- und Proteinexpression in der Zelllinie NT2/D1 detektiert werden. Aufgrund des hohen Gehaltes an CpG-Dinukleotiden am *PIWIL1*-Genlokus ist eine epigenetische Regulation dennoch denkbar. Qiu und Kollegen (2016) untersuchten den Methylierungsstatus des *PIWIL1*-Promotors in verschiedenen Zelltypen der Hühnerspermatogenese. In Übereinstimmung mit unseren Modellsystemen, die Zellen der frühen Spermatogenese entsprechen, fanden sie eine hohe Methylierung in Keimbahnstammzellen und detektierten eine abnehmende Methylierung des *PIWIL1*-Promotors mit zunehmendem Grad der Spermatogenese. Weitere Analysen in primordialen Keimzellen von Hühnern zeigten, dass ein 252 bp langer Abschnitt im *CIWI*-Promotor, welcher ein CCAAT-Element sowie Transkriptionsfaktorbindestellen für *specificity protein 1* (SP1), *nuclear factor Y* (NF-Y), und *activating enhancer binding protein 2 alpha* (TFAP2A) enthält, wichtig für die Expression von *PIWIL1* ist. Dieser Abschnitt ist hoch konserviert und liegt beim Menschen, im von uns nicht analysierten Bereich, von -132 bp bis +65 bp relativ zum TSS (Sohn *et al.*, 2014). Untersuchungen an Yak-Kuh-Hybriden zeigten, dass der *PIWIL1*-Promotor in der Tochtergeneration höher methyliert ist, als in der Elterngeneration. Diese Methylierung geht mit verminderter *PIWIL1*-Expression einher und wird als Auslöser für die Sterilität der Hybriden vermutet (Gu *et al.*, 2013). Eine Studie in Mäusen zeigte ebenfalls eine hohe Promotormethylierung von *MIWI* (*PIWIL1*) in Keimbahnstammzellen und eine Hypomethylierung in pachytänen Spermatozyten, runden Spermatischen und sogar Spermatozoen. Weiterhin sind die Transkriptionsfaktoren NF-Y und *upstream stimulatory factor* (USF) für die Aktivierung des *MIWI*-Promotors verantwortlich und binden methylierungsabhängig im Bereich des Transkriptionsstarts (Hou *et al.*, 2012). Eine Aktivierung des untersuchten Promotorbereiches von *PIWIL1* konnte *in vitro* im Luziferase-assay nicht detektiert werden. Eine Studie von Navarro *et al.*, (2015) zeigte in zwei Lungenkarzinomzelllinien die Aktivierbarkeit der mRNA-Expression der vier humanen *PIWIL*-Homologe über 5AzadC. Darüber hinaus zeigte die Bisulfidsequenzierung für im Exon1 des *PIWIL1*-Gens befindliche CpG-Dinukleotide, eine Korrelation zwischen dem

Methylierungsstatus und *PIWIL1*-positiven, sowie *PIWIL1*-negativen Lungentumorproben. In Übereinstimmung damit deuten die hohe Methylierungsraten des von uns untersuchten *PIWIL1*-Genabschnittes und die Daten aus anderen Organismen darauf hin, dass die Region um den Transkriptionsstart wichtig für die Expression von *PIWIL1* ist und über DNA-Methylierung reguliert wird.

Die Promotoranalyse des auf Chromosom 8p21 befindlichen Gens *PIWIL2* ergab einen hohen Gehalt an CpG-Dinukleotiden im Bereich von -300 bp bis +300 bp ausgehend vom TSS, einschließlich eines 250 bp langen putativen Promotors in Exon 1, das nicht proteinkodierend ist und die 5'UTR darstellt. Bezogen auf die basale Methylierung zeigte die Zelllinie TCam-2 einen hypermethylierten Promotorbereich, wohingegen die Zelllinie NT2/D1 eine stark hypomethylierte Promotorregion aufwies. Entsprechende Beobachtungen könnten eine 1300fach höhere mRNA-Expression von *PIWIL2* in der NT2/D1-Zelllinie im Vergleich zur TCam-2-Zelllinie erklären. Die Bisulfitsequenzierung des 5'UTR des *PIWIL2*-Gens in Aalbutten ergab ein geringes Methylierungslevel in den Gonaden von Männchen einhergehend mit erhöhter *PIWIL2*-Expression im Vergleich zu weiblichen Individuen (Zhang *et al.*, 2014). Eine Behandlung der TCam-2-Zellen mit dem demethylierenden Agens 5AzadC führte zu einer Zunahme der mRNA- und Proteinexpression und deutet auf eine potentielle epigenetische Regulation hin. Die Untersuchung der Methylierungsmuster zeigte nur eine leichte Abnahme der Gesamtmethylierungsrate des Bereiches von -300 bp bis +300 bp des *PIWIL2*-Promotors, jedoch eine verminderte Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide um den TSS. Übereinstimmend damit, zeigt der Luziferase-*assay*, dass für die Aktivierung des *PIWIL2*-Promotors, der Bereich von -300 bp bis zum TSS entscheidend sein könnte. Die Promotoraktivierung kann durch Methylierung *in vitro* in beiden Zelllinien komplett aufgehoben werden. Im Gegensatz zur NT2/D1, die eine hohe *PIWIL2*-mRNA-Expression aufweist, konnte nach Behandlung der TCam-2 mit 5AzadC keine Hypomethylierung des *PIWIL2*-Promotors trotz gesteigerter mRNA- und Proteinexpression nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnte die Behandlungsdauer mit 5AzadC über 72 h sein. Das Cytosinanalogon 5AzadC wird als Desoxyribonukleosid nach jeder Zellteilung in neu synthetisierte DNA-Stränge inkorporiert und inhibiert dort die *de novo* Methylierung. Unter Berücksichtigung der Proliferation erhält man nach 72 h eine Mischkultur aus Zellen mit zellspezifischen Methylierungsmustern, sowie Zellen mit globaler Demethylierung, sodass nach dieser Zeitdauer lediglich ein Verdünnungseffekt an demethylierten CpG-

Dinukleotiden gemessen werden kann. Weiterhin könnte die Steigerung der *PIWIL2*-Expression in der TCam-2 ein sekundärer Effekt sein, der aus der Demethylierung von Transkriptionsfaktoren resultiert und nicht direkt mit der Demethylierung des *PIWIL2*-Promotors zusammenhängt. Der Elektromobilitätsshift-*assay* zeigt die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren an den untersuchten Abschnitt, konnte jedoch PAX5 nicht als Regulator der *PIWIL2*-Expression identifizieren. Der von uns, in der NT2/D1- bzw. TCam-2-Zelllinie detektierte, differentiell methylierte *PIWIL2*-Promotorstatus wurde auch in Patienten gezeigt. Eine Hypermethylierung des *PIWIL2*-Promotors in Spermatozoen ging mit verminderter *PIWIL2*-Expression, piRNA-Biogenese und spermatogenem Arrest einher (Heyn *et al.*, 2012). Schütte *et al.*, (2013) detektierten eine erhöhte Promotormethylierung von *PIWIL2* in Patienten mit reduzierter Spermienzahl. Friemel *et al.*, (2014) zeigten eine allelspezifische Methylierung der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* in infertilen Patienten in Assoziation zu methylierungssensitiven Einzelnukleotid-Polymorphismen.

Das Gen *PIWIL3* befindet sich auf Chromosom 22q11 und enthält nur 12 CpG-Dinukleotide in dem untersuchten Bereich von etwa -600 bp bis -200 bp. Die CpG-Dinukleotide liegen in den verwendeten Zelllinien hypermethyliert vor (NT2/D1: 95 %, TCam-2: 85 %). Die basale Expression ist die geringste aller *PIWIL*-Homologe in den verwendeten Zelllinien und kann auch durch die Behandlung mit 5AzadC nicht induziert werden. Eine CpG-Insel ist definiert als eine Region mit einem CpG-Gehalt von mindestens 50 % und einem beobachteten CpG-zu erwarteten CpG-Verhältnis von mehr als 0,6 über einen Abschnitt von mindestens 200 bp, wobei diese Grenze arbiträr ist (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Die 5'UTR des *PIWIL3*-Gens enthält keine CpG-Insel und ist vermutlich nicht epigenetisch reguliert. McCallie *et al.*, (2016) beschrieben die genomische Lage von *PIWIL3* als hypomethylierte zytogene Region des Chromosoms 22 und detektierten eine verminderte Expression des Homologs in Monosomie-22-Blastozysten. Generell ist über *PIWIL3* und seine Expression wenig bekannt. Sasaki *et al.*, (2003) identifizierten es als Mitglied der AGO-Proteinfamilie und konnte die mRNA-Expression ausschließlich in Testis nachweisen. In der chinesischen Bevölkerung ist ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im *PIWIL3*-Gen mit einem erhöhten Risiko für Oligozoospermie verknüpft (Gu *et al.*, 2010). Eine Reexpression von *PIWIL3* konnte in einigen Tumorentitäten, sowie dem Ovar detektiert werden (Lim *et al.*, 2014; Gambichler *et al.*, 2017).

Die Bisulfidsequenzierung des, auf Chromosom 11q12 befindlichen, *PIWIL4*-5'UTR ergab eine Hypermethylierung des untersuchten Bereiches vom Transkriptionsstart bis +200 bp in beiden verwendeten Zelllinien, der auch nach Behandlung mit 5AzadC nicht demethyliert vorlag. In der TCam-2-Zelllinie konnte die mRNA-Expression von *PIWIL4* nicht durch das Demethylierungsmittel induziert werden, in der Zelllinie NT2/D1 kam es zu einem 10fachen Anstieg der *PIWIL4*-mRNA-Expression, trotz Hypermethylierung der untersuchten Region. Die *in silico* Analyse von *PIWIL4* zeigte das Vorhandensein eines putativen Promotors etwa 500 bp stromaufwärts vom TSS, in dem vereinzelt CpG-Dinukleotide vorliegen. Denkbar ist, dass die Demethylierung dieses Bereiches für die Expression entscheidend ist. Bezogen auf die basale Expression zeigten die TCam-2-Zellen einen 4fach höheren *PIWIL4*-mRNA-Gehalt als die NT2/D1-Zellen und auch die 5'UTR-Methylierung war etwas weniger stark (100 % zu 80 %). Das könnte auf eine epigenetische Regulation von *PIWIL4* hindeuten. Ferreira *et al.*, (2014) untersuchten die Promotormethylierung von *PIWIL1*, *2* und *4* in Hodenproben von gesunden Männern und solchen mit testikulären Tumoren. Sie zeigten dass die Promotoren der drei Homologe in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe hypermethyliert vorlagen. Weiterhin war die Hypermethylierung mit reduzierter *PIWIL*-Genexpression sowie reduzierter Methylierung von repetitiven Elementen verknüpft. Eine genomweite *array*-Analyse in Kindern zeigte differentiell methylierte CpG-Dinukleotide im *PIWIL4*-Gen ausschließlich in fettleibigen Kindern im Vergleich zu normalgewichtigen und schlossen auf eine Funktion von *PIWIL4* als Regulator für Adipozytenproliferation und -differenzierung (Huang *et al.*, 2015). Sugimoto und Kollegen (2007) zeigten zwar keine epigenetische Regulation des *PIWIL4*-Gens, jedoch eine Beteiligung von *PIWIL4* an epigenetischen Prozessen. So führte eine Überexpression von *PIWIL4* zu einer Erhöhung der Dimethylierung des Lysylrestes 9 in Histon H3 des Tumorsuppressorgens p16.

5.3 Stabiler *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*

Es existieren viele Studien die den Einfluss des Verlustes von *PIWIL1* und *PIWIL2* während der Keimzellentwicklung von Säugetieren untersuchen. Dabei führte ein *knockout* der *PIWIL*-Proteine zu einem spermatogenen Arrest in diversen Organismen (Deng und Lin 2002, Moussian *et al.*, 1998, Cox *et al.*, 1998). Im Menschen ist ein funktioneller Verlust von *PIWIL1* und *PIWIL2* für den korrekten Ablauf der Spermatogenese bisher unzureichend charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Verlustes der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf das Expressionsverhalten der verwendeten Zellkulturmodelle NT2/D1 und

TCam-2 untersucht werden. Dazu wurde das Transkriptom der Zelle, insbesondere die Expression Spermatogenese-relevanter Gene nach stabilem *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*, der durch die CRISPR/Cas9-Technik induziert wurde, untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf die Expression der *PIWIL*-Homologe 1-4 in den verwendeten Zellmodellen analysiert. In der Zelllinie NT2D1 führte ein *knockdown* von *PIWIL1* zu einer Erhöhung des *PIWIL1*-mRNA-Gehaltes, sowie einer starken Zunahme der *PIWIL1*-Wildtyp-Isoform (90 kDa) im Vergleich zur Kontrolle. Auch die im Westernblot detektierten *PIWIL1*-Isoformen mit einer Größe von 30 kDa und 37 kDa erfuhren eine Zunahme. Die *PIWIL1*-Isoformen mit einer molekularen Masse von 55 kDa und 60 kDa hingegen erfuhren einen *knockout* nach genomischer Veränderung der *PIWIL1*-Exone 3 und 15. Laut NCBI existieren acht *PIWIL1*-Spleißvarianten, die sich am 5'- und 3'-Ende unterscheiden und für verschiedene Proteinisoformen kodieren. Dabei besitzen sieben *PIWIL1*-Isoformen eine molekulare Masse um 90 kDa und eine Isoform eine molekulare Masse von etwa 50 kDa (Abb. 4). Weiterhin existieren fünf C-terminal stark verkürzte *PIWIL1*-Isoformen, mit einer molekularen Masse von etwa 15 kDa, deren Funktion in der Zelle bisher ungeklärt ist. So könnte es sich bei den im Western Blot bei 55 kDa und 60 kDa detektierten *PIWIL1*-Isoformen, um die gleiche Isoform mit unterschiedlicher Modifikation handeln, was einen *knockout* beider Banden nach dem *genome editing* mit dem CRISPR/Cas9-System erklären könnte. Über 37 kDa und 30 kDa große *PIWIL1*-Proteine ist bisher nichts bekannt. Hierbei könnte es sich entweder um Abbauprodukte, unbekannte Isoformen oder die C-terminal verkürzten *PIWIL1*-Isoformen mit Modifikationen handeln. Von einer *PIWIL1*-Zugehörigkeit ist auszugehen, da diese Banden nach *knockdown* in ihrer Intensität verändert werden. Das Fehlen der beiden *PIWIL1*-Proteinisoformen mit einer molekularen Masse von 55 kDa und 60 kDa in der Zelllinie NT2/D1 nach CRISPR/Cas9-induziertem *knockdown* könnte den starken Anstieg der *PIWIL1*-mRNA-Expression erklären, über den die Zelle versucht den Verlust auszugleichen. Darüber hinaus könnte die erhöhte Proteinexpression der *PIWIL1*-Wildtyp-Isoform einen Kompensationsmechanismus zum funktionellen Verlust der *PIWIL1*-Isoformen bei 55 kDa und 60 kDa darstellen. Gleichzeitig zeigt sich in den Expressionsveränderungen der einzelnen *PIWIL1*-Isoformen eine starke Relevanz des *PIWIL1*-Homologs für die NT2/D1-Zellen. Die Expression des *PIWIL2*-Gens war weder in ihrer mRNA- noch Proteinexpression nach *PIWIL1*-*knockdown* beeinflusst. Auch die mRNA-Expression des *PIWIL3*-Gens war nicht verändert. Die weitere Betrachtung der mRNA-

Expressionsdaten zeigte jedoch eine Zunahme der *PIWIL4*-mRNA-Expression. Sasaki *et al.*, (2003) untersuchten Sequenzhomologien der vier humanen PIWIL-Proteine untereinander. Es zeigte sich eine 48,7%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen PIWIL1 und 4. Dies lässt die Spekulation zu, dass PIWIL4 nach dem *knockdown* von PIWIL1 dessen Funktion in der Zelle übernehmen könnte. In PIWIL2-defizienten Mäusen konnte eine Delokalisation von PIWIL4 aus dem Kern ins Cytoplasma detektiert werden. Das wurde als kompensatorischer Mechanismus gedeutet (Reuter *et al.*, 2009). Ein *knockdown* von *PIWIL2* führte in der Zelllinie NT2/D1 zu einer Zunahme der mRNA-Expression von *PIWIL1*, welche sich auch in einer veränderten PIWIL1-Proteinexpression zeigte. Die Wildtyp-Isoform und die Isoform mit einer molekularen Masse von 60 kDa wurden zwar reduziert, jedoch zeigte sich das Auftreten von PIWIL1-Isoformen mit einer molekularen Masse von über 170 kDa und eine Zunahme der PIWIL1-Isoform bei 50 kDa. Die *in silico* Sequenzanalysen der humanen PIWIL-Proteine 1 und 2 ergaben eine Übereinstimmung von 34,4% (Sasaki *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass in der Zelllinie NT2/D1 PIWIL1 kompensatorisch für den Verlust von PIWIL2 aufkommt und deshalb in der mRNA- und Proteinexpression erhöht wird. Auf mRNA-Ebene kam es zu einer starken Reduktion der *PIWIL*-Homologe 2 und 3. Einhergehend damit führte der CRISPR/Cas9-induzierte *knockdown* von *PIWIL2* auf Proteinebene zu einer Reduktion PIWIL2-Wildtyp-Isoform (110 kDa) und der PIWIL2-Isoform bei 60 kDa, jedoch zu einer leichten Zunahme der PIWIL2-Isoform mit einer molekularen Masse von 80 kDa. Genau wie das Homolog *PIWIL1* besitzt auch *PIWIL2* eine Vielzahl bekannter Spleißvarianten, welche sich hauptsächlich in den nichtkodierenden 3'- und 5'-Enden unterscheiden. Die vier größten bisher beschriebenen Spleißvarianten kodieren für drei Proteine mit einer molekularen Masse von 90 kDa bis 110 kDa (Abb. 4). Ye *et al.*, (2010) identifizierten vier zusätzliche Spleißvarianten in verschiedenen humanen Zelllinien. Dabei handelt es sich um PIWIL2-Isoformen mit einer molekularen Masse von 40, 42, 50 und 60 kDa, welche im Vergleich zur Wildtyp-Isoform N-terminal verkürzt vorliegen. Zwei weitere PIWIL2-Isoformen wurden in testikulären Tumorzelllinien beschrieben, darunter auch in der für unsere Untersuchungen verwendete Karzinomzelllinie NT2/D1 (Gainetdinov *et al.*, 2014). Diese Varianten besitzen eine molekulare Masse von 60 kDa und 80 kDa. Zum einem lässt sich durch die Existenz mehrerer Spleißvarianten das Auftreten mehrerer Banden im Western Blot erklären. Weiterhin deutet eine Zunahme der Expression einzelner PIWIL2-Isoformen trotz *knockdown* von *PIWIL2* auf einen kompensatorischen Mechanismus hin.

In der Zelllinie TCam-2 führte die CRISPR/Cas9-Editierung des *PIWIL1*-Gens in den Exonen 3 und 15 zu einer sehr deutlichen Abnahme der *PIWIL1*-mRNA- und Proteinexpression der in der Zelllinie vertretenen Isoformen mit einer molekularen Masse von 50, 60 und 90 kDa. Die mRNA-Expression von *PIWIL2* und *PIWIL3* war nach *knockdown* von *PIWIL1* nicht beeinflusst, jedoch kam es zu einer Reduktion des *PIWIL2*-Proteingehaltes der Isoformen bei 50, 60, 80 und 110 kDa. Wie bereits in der Zelllinie NT2/D1 beschrieben, scheinen sich *PIWIL1* und *PIWIL2* in ihrer Expression gegenseitig zu beeinflussen. Neben einem kompensatorischen Mechanismus, bei dem die Expression von *PIWIL1* nach dem Verlust von *PIWIL2* erhöht wird, wäre auch ein direkter Einfluss von *PIWIL1* auf die Expression von *PIWIL2* denkbar. Es gibt einige Studien die zeigen, dass *PIWIL1* an der Regulation von Genen beteiligt ist. So verursacht *PIWIL1* in Endometriumkarzinomzelllinien epigenetische Veränderungen des *phosphatase and tensin homolog*-Gens (PTEN) durch Antivierung der DNA-Methyltransferase 1 (Chen *et al.*, 2015b). In Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass *PIWIL1* die Regulation von *transforming growth factor- β receptor* (TGF β R) und verschiedener *cyclin-dependent kinases* (CDK) kontrolliert (Cao *et al.*, 2016). Weiterhin nahm in der TCam-2-Zelllinie die mRNA-Expression von *PIWIL4* nach *knockdown* des *PIWIL1*-Gens zu. Bisher ist keine direkte Interaktion zwischen den Homologen *PIWIL1* und *PIWIL4* beschrieben worden, da die Expression während der Säugerspermatogenese zeitlich unabhängig voneinander stattfindet. Hierbei wird *PIWIL4* in Keimbahnstammzellen und *PIWIL1* in postmeiotischen Stadien der Spermatogenese exprimiert (Deng und Lin 2002; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2004). Jedoch beschrieben Al-Janabi und Kollegen (2014) einen signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *PIWIL1* und *PIWIL4* in Tumor- und Normalgewebe von Menschen mit Nierenkarzinomen und vermuteten eine potentielle Wechselwirkung der beiden Homologe. Neben Nierenkarzinomen konnte ein paralleles Auftreten von *PIWIL1-4* in unterschiedlichen Tumorentitäten wie Weichteilsarkomen, Lungenkarzinomen oder Magenkrebs beschrieben werden, was auf eine Interaktion oder gemeinsamen Regulationsmechanismus hindeuten könnte (Greither *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012).

Der *knockdown* von *PIWIL2* führte in der Zelllinie TCam-2 zu einer Abnahme der *PIWIL1*-mRNA- und einer Zunahme der *PIWIL3*-mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu wurde die Proteinexpression verschiedener *PIWIL1*-Isoformen erhöht. Weiterhin waren zusätzliche *PIWIL1*-Banden bei 70 kDa und 110 kDa nach *knockdown* von *PIWIL2* nachweisbar. Auch in dieser Zelllinie scheint *PIWIL1* das Fehlen von *PIWIL2* zu kompensieren. Die CRISPR/Cas9-

Editierung von *PIWIL2* in den Exonen 6 und 12 führte zu einer Reduktion des Proteingehaltes der beschriebenen *PIWIL2*-Isoformen bei 50, 60, 80 und 110 kDa. Grundsätzlich gestaltete sich ein kompletter *knockout* von *PIWIL1* und *PIWIL2* mit Hilfe der verwendeten CRISPR/Cas9-Methode in unseren Zellmodellen als schwierig. Die Vielzahl an Spleißvarianten schränkte die Auswahl der Exonbereiche für das *genome editing* insbesondere für *PIWIL2* stark ein. Zusätzlich wurden alle Zellen, die nachweislich mit dem CRISPR/Cas9-Vektor transfiziert waren, zur Kultivierung vereinigt. Daher ist von einer Heterogenität des für die Analysen verwendeten Zellpools auszugehen. Weiterhin kann für den unzureichenden *knockdown* eine mitunter nur heterozygote Veränderung der genomischen Bereiche von *PIWIL1* und *PIWIL2* verantwortlich sein, bei dem die reduzierte *PIWIL*-Genexpression über Transkription vom intakt verbliebenen Chromosom kompensiert wird. Das Auftreten von *PIWIL1*-Isoformen im Western Blot mit bisher unbekanntem molekularem Massen könnte auf einen größeren Vorrat an alternativen Spleißvarianten von *PIWIL1* und *PIWIL2* schließen lassen als bisher vermutet und weist auf eine große Relevanz der Homologe und ihrer Funktion für die Zelle hin.

Weiterhin wurde die Auswirkung des *knockdowns* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf das Expressionsprofil der Zelllinien NT2/D1 und TCam-2 untersucht. In verschiedenen Organismen wurde bereits die Rolle der *PIWIL*-Proteine für Stammzellerhaltung und -erneuerung beschrieben (Cox *et al.*, 1998; Deng und Lin 2002; Unhavaithaya *et al.*, 2009). In unseren Zellmodellen zeigen sich ebenfalls Hinweise auf diese zellulären Prozesse. In der Zelllinie NT2/D1 führte ein *knockdown* von *PIWIL1* in der qRT-PCR zu einem Anstieg der *NANOG*- und *PRDM14*-mRNA-Expression. Eine gesteigerte Expression der *NANOG*-, *POU5F1*- und *SOX2*-mRNA-Expression war nach dem *knockdown* von *PIWIL2* zu detektieren. In der Zelllinie TCam-2 zeigten sich unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der Stammzellfaktoren nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*. Hierbei führte der *knockdown* von *PIWIL1* zu einer Zunahme der *NANOG*- und *POU5F1*-mRNA-Expression und die Hemmung der *PIWIL2*-Expression zu einer Abnahme des *POU5F1*-, *PRDM14*-, und *SOX2*-mRNA-Gehaltes. Die untersuchten Faktoren entsprechen dem Expressionsprofil humaner embryonaler Stammzellen und sind verantwortlich für die Regulierung von Selbsterneuerungs- und Pluripotenz-eigenschaften und die Fähigkeit in multiple Linien zu differenzieren (Chia *et al.*, 2010). In einigen Tumorentitäten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Stammzellerhalt und Selbsterneuerung, sowie *PIWIL2*-Expression

beschrieben werden. Eine erhöhte Expression von PIWIL2 wurde in Subpopulationen von Brustkrebszellen gefunden, welche die Stammzellfaktoren POU5F1 und NANOG exprimieren (Lee *et al.*, 2010). Weiterhin existiert eine Korrelation von HIWI und HILI mit Stammzellmarkern in Colonkarzinomen. So stand eine erniedrigte Expression von PIWIL1 in Korrelation zu einer erhöhten POU5F1-Expression, sowie eine positive Korrelation zwischen PIWIL2 und SOX2 (Litwin *et al.*, 2015). In einer weiteren Studie wurden Fibroblasten mit *PIWIL2* transfiziert. Diese exprimierten daraufhin Stammzellmarker wie POU5F1, NANOG und SOX2 und zeigten viele Merkmale typischer Tumorstammzellvorläuferzellen, einschließlich Selbsterneuerungskapazität, Klonogenität, Pluripotenz, genetische Instabilität und die Fähigkeit *in vivo* Tumoren zu initiieren (Zhang *et al.*, 2017). In einer Studie von Chen und Kollegen führte der *knockdown* von *PIWIL1* zu unterschiedlichen Ergebnissen in endometrialen Tumorzelllinien in Bezug auf die Expression von POU5F1 und NANOG. So führte ein *knockdown* von *PIWIL1* in der einen Zelllinie zu einer erhöhten und in der anderen Zelllinie gleichen histologischen Ursprungs zu einer geringen Expression der Stammzellmarker (Chen *et al.*, 2015a). Die Transkriptionsfaktoren POU5F1, NANOG, SOX2 und PRDM14 sind für die Regulation der Pluripotenz und Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen verantwortlich. POU5F1 beispielsweise wird in embryonalen (ESC) und adulten Stammzellen exprimiert und ist dort mit Pluripotenz, dem proliferativen Potential und der Selbsterneuerung assoziiert (Niwa *et al.*, 2000). NANOG, ein Transkriptionsfaktor welcher POU5F1 nachgeschaltet ist, trägt zur Determinierung der pluripotenten embryonalen Stammzellen bei. Die Expression dieser Faktoren wird während der Embryogenese herunterreguliert und ist in differenzierten Zellen nicht mehr nachweisbar (Wang *et al.*, 2006). In vielen Tumorentitäten wurde jedoch eine Veränderung der Expression von ESC- und Keimzell-assoziierten Proteine detektiert. Es ist bekannt, dass Prozesse der Keimzellentwicklung und der Tumorentwicklung einige Gemeinsamkeiten aufweisen. Dies betrifft unter anderem zelluläre Abläufe wie Proliferation, Veränderung des Methylierungsstatus oder die Migration von Zellen. Darüber hinaus werden Gene exprimiert, die nur in Keimzellen und Tumorzellen vorhanden sind, die sogenannten *cancer/testis* (CT)-Antigene (Simpson *et al.*, 2005). Die veränderte Expression keimzellspezifischer Gene in Krebszellen, welche die Aktivierung eines gametogenen Programms in somatischen Zellen widerspiegelt, legitimiert deshalb den Gebrauch unserer Zellmodelle zur Messung des Einflusses der *PIWIL*-Gene auf die Expression stammzellspezifischer und keimzellspezifischer

Gene und zeigt, dass die von uns verwendeten Zellmodelle molekulare Mechanismen mit Stammzellen teilen, die durch die Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* reguliert werden.

Weiterhin führte in beiden Zelllinien ein *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zu einer Veränderung von Genen, die für primordiale Keimzellspezifikation verantwortlich sind. In Säugetieren geschieht die Prägung von Keimzellen über ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, die mitunter auch aus extraembryonalen Geweben stammen. Die frühesten Marker von primordialen Keimzellen der Maus sind *PRDM1* und *PRDM14*, zwei Faktoren, die die somatische Genexpression unterdrücken und keimzellspezifische Genexpression fördern, sowie das Pluripotenz-assoziierte Gen *DPPA3* (Marlow 2015). Im Menschen sind die Signale, die für die Bildung und Wanderung primordialer Keimzellen verantwortlich sind, bisher unzureichend charakterisiert und wurden bisher nur an *in vitro* Modellen untersucht. Dabei handelt es sich um die sogenannten primordiale Keimzellen ähnliche Zellen (PGCLC), welche aus induzierten pluripotenten Zellen (iPSC) über eine dem frühen Mesoderm entsprechende Zwischenstufe generiert wurden. In dieser Studie waren für die Spezifikation humaner primordialer Keimzellen die Expression von Transkriptionsfaktoren wie *SOX17*, *T* (*BRACHYURY*), *TFAP2C*, *PRDM1* und *PRDM14* von essentieller Bedeutung (Sasaki *et al.*, 2015). In einer weiteren Studie in PGCLC wurde das Expressionsprofil der Zellen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die PGC-Spezifikation beim Menschen dem murinen Prozess ähnelt. Dabei beginnt diese mit der Expression von *POU5F1*, *PRDM1* und *T* (*BRACHYURY*) gefolgt von der Expression von *c-KIT*, *DPPA3* und *TFAP2C*, sowie *DND1* und *TNAP* (Sugawa *et al.*, 2015; Irie *et al.*, 2015). In postmigratorischen Stadien der embryonalen primordialen Keimzellen werden Gene wie *NANOS3*, *DAZL* und *VASA* exprimiert (Anderson *et al.*, 2007; Julaton und Reijo Pera 2011; Gaskell *et al.*, 2004). Die qRT-PCR-Analyse in der Zelllinie NT2/D1 detektierte einen Anstieg der *DPPA3*-, sowie *DND1*-Expression und eine Verringerung von *c-KIT* und *NANOS3* und eine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors *T* (*BRACHYURY*) nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2*. Eine reduzierte Expression der *TNAP*- und *SOX17*-Expression war nur nach *knockdown* von *PIWIL2* zu verzeichnen. In der Zelllinie TCam-2 wurde die mRNA-Expression von *DPPA3* und *NANOS3* nach *knockdown* von *PIWIL1* erhöht, sowie die Expression von *PRDM1*, *c-KIT* und *TFAP2C* nach *knockdown* von *PIWIL2* erniedrigt. Es war ein leichter Anstieg der Expression von *T* (*BRACHYURY*) nach *knockdown* des *PIWIL2*-Gens zu detektieren. Betrachtet man das murine Expressionsschema der *PIWIL*-Proteine während der Keimzellbildung werden in den

primordialien Keimzellen die beiden Homologe MIWI2/PIWIL4 und MILI/PIWIL2 exprimiert und unterdrücken dort die Expression von Retrotransposonen während der Entwicklung der primordialien Keimzellen. Die MILI-Expression beginnt in primordialien Keimzellen im Embryo und dauert bis zum Stadium der runden Spermatozyten im erwachsenen Hoden, während MIWI2 nur in primordialien Keimzellen in fetalen Hoden exprimiert wird und MIWI/PIWIL1 nur in den pachytänen Spermatozyten und runden Spermatozyten im postnatalen Hoden vorhanden ist (Aravin *et al.*, 2008; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2001; Grivna *et al.*, 2006). Ein Verlust von MILI oder MIWI2 führt zu Sterilität in Folge von Defekten in frühen Stadien der Meiose und ist mit der Reexpression von LINE-1-Retrotransposonen verbunden (Reuter *et al.*, 2009; Carmell *et al.*, 2007). Im murinen Modell beginnt die Spezifikation der primordialien Keimzellen ab Tag 6.25 nach der Befruchtung im Embryo. Die Einlagerung in die Gonaden (PGC-Migration) ist ab Tag 10.5 nach der Befruchtung abgeschlossen. Die Expression von MILI beginnt erst ab Tag 12.5 nach Befruchtung, an dem die Spezifikation bereits abgeschlossen ist (Unhavaithaya *et al.*, 2009). Obwohl der zeitliche Ablauf von Keimbahnprägung und *PIWIL*-Genexpression nicht überschneidend ist, zeigen sich in unserer und weiteren Studien Einflüsse von *PIWIL1* und *PIWIL2* auf Gene, die in der frühen Keimzelle exprimiert werden. Ein Vergleich der Genexpression in humanen primordialien Keimzellen, humanen primordialien Keimzellen ähnlichen Zellen und der Zelllinie TCam-2 zeigte eine übereinstimmende Expression von 161 Genen, darunter insbesondere Gene für Pluripotenz und Keimzellspezifizierung wie *PRDM1*, *TFAP2C*, *SOX17*, *POU5F1* und *NANOG* (Irie *et al.*, 2015). Insbesondere die verstärkte Expression früher Mesodermmarker wie *HAND1*, *T* (*BRACHYURY*) und *PAX6* nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* demonstriert die Bedeutung von der *PIWIL*-Gene für Stammzellerhaltung und Differenzierung.

Die Mikroarray-Analyse lieferte Hinweise insbesondere auf die veränderte Expression Meiose-relevanter Gene wie *TESK1*, *MEI1* oder Mitglieder der *MSH*-Familie. Um einen einwandfreien Ablauf der Meiose zu garantieren ist die korrekte Assemblierung des *PIWIL*-Protein/piRNA-Komplexes, welcher insbesondere in prämeiotischen Stadien der Spermatozytogenese die Stilllegung von Retrotransposonen über DNA-Methylierung oder RNA-Interferenz bewirkt, unablässig. Die Akkumulation der Komponenten des *PIWIL*-piRNA-Komplexes geschieht in der sogenannten *nuage* (franz. Wolke). Dabei handelt es sich um cytoplasmatisch gelegene Zellorganellen, die im Elektronenmikroskop Bilder mit erhöhter Elektronendichte ergeben, welche aus mRNA-Protein-Aggregaten bestehen (Castañeda *et*

al., 2011). Am Aufbau dieses Komplexes ist vorherrschend die Klasse der *tudor-domain*-haltigen Proteine (TDRD) beteiligt. Deshalb wurde der Einfluss des *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf die mRNA-Expression der *TDRD*-Gene untersucht. In Mäusen ist die Interaktion unterschiedlicher TDRD- und PIWIL-Proteine gut charakterisiert. Bisher wurden die Expression von TDRD1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 und 12 in murinen Testis, sowie ihre Rolle bei der Spermatogenese und piRNA-Biogenese beschrieben (Chen *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2013; Yabuta *et al.*, 2011; Vagin *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2009). Ein *knockdown* des Gens *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* führte in der Zelllinie NT2/D1 zu einer Zunahme der *TDRD5*-mRNA-Expression. Die Expression von *TDRD1* wurde nach *PIWIL2*-*knockdown* reduziert. In der Zelllinie TCam-2 erfolgte nach *knockdown* von *PIWIL1* eine Zunahme der *TDRD1*-mRNA- und eine Abnahme der *TDRD5*-mRNA-Expression. In der Maus wurde eine Bindung der Tudor-Domänen von TDRD1 an dimethylierte Argininreste in der N-terminalen Domäne von MILI gezeigt. Ein *knockout* beider Proteine führte unabhängig voneinander zu einer Derepression von LINE-1-Transposonen, begleitet von einem Verlust der DNA-Methylierung an ihren regulatorischen Elementen (Reuter *et al.*, 2009). Weiterhin wurde TDRD1 im Mäusehoden in Komplexen detektiert, die neben MILI und den assoziierenden piRNAs auch TDRD12 enthielten (Pandey *et al.*, 2013). In einer weiteren Studie konnten *in vitro* Interaktionen zwischen TDRD1 und den drei Maushomologen MIWI, MILI und MIWI2 gezeigt werden, für welche ebenfalls die nachgewiesenen Argininmethylierungen Voraussetzung sind (Vagin *et al.*, 2009). Eine Studie in Patienten mit Spermatogenesedefekten ergab veränderte DNA-Methylierungsmuster in Genen, die an der piRNA-Biogenese beteiligt sind. So war die männliche Infertilität mit einem erhöhten Promotormethylierungsstatus von *PIWIL2* und *TDRD1*, sowie fehlerhafter piRNA-Produktion und einer Hypomethylierung von *LINE-1*-repetitiven Sequenzen verknüpft (Heyn *et al.*, 2012). Weiterhin waren in einer Studie mit chinesischen Patienten Einzelnukleotid-Polymorphismen im *TDRD1*-Gen mit dem Auftreten von Spermatogenesedefekten verknüpft (Zhu *et al.*, 2016). Ferreira *et al.*, (2014) detektierten eine reduzierte Expression von *PIWIL1*, 2, 4 und *TDRD1* in Seminomen in Folge von DNA-Hypermethylierung. Einhergehend damit waren ein Verlust der PIWIL/piRNA-Maschinerie und ein Verlust der DNA-Methylierung repetitiver Sequenzen. TDRD5 ist als Interaktionspartner der PIWIL-Proteine bisher nicht direkt beschrieben, wird aber im Mäusehoden pränatal zur gleichen Zeit wie MILI/PIWIL2 exprimiert (Smith *et al.*, 2004;

Aravin et al., 2009) Weiterhin zeigen TDRD5-defiziente Mäuse eine Fehlassemblierung der PIWIL/piRNA-Kernkomponenten wie TDRD1, 6, 7, 9 und MILI, MIWI und MIWI2. Das ist wiederum mit einem Arrest der Spermatogenese im Stadium der Spermatiden sowie demethylierten *LINE-1*-Promotoren verbunden (Yabuta et al., 2011). In unseren Modellen könnte die veränderte Expression von *TDRD5* auf eine Interaktion mit *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* hinweisen.

In beiden Zelllinien führte der *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zu einer Erhöhung der *LINE-1*-Transposon-mRNA-Expression. Viele Studien zeigen die Rolle der PIWIL-Proteine bei der Transposonkontrolle. Ein Verlust der drei murinen PIWIL-Proteine MIWI, MILI und MIWI2 führt zu einer Reduktion der piRNA-Produktion, was wiederum in einer signifikant niedrigeren *de novo* DNA-Methylierung, erhöhter *LINE-1*-Expression, sowie einer defekten Spermatogenese resultiert (Reuter et al., 2009; Fazio et al., 2011, Carmell et al., 2007). Übereinstimmend mit unseren Daten zeigten Siddiqi et al., (2012) in *PIWIL*-überexprimierenden mesenchymalen Stammzellen eine Reduktion der *LINE-1*-mRNA-Expression in Folge erhöhter globaler Methylierungsniveaus. Einer Untersuchung in testikulären Biopsieproben unterschiedlicher histologischer Klassifikationen ergab, dass die Expression von *PIWIL2* und *PIWIL4* negativ mit der Expression von *LINE-1*-mRNA korrelierte (Hempfling et al., 2017). In den Testis von Jungen, welche an Kryptorchismus leiden, war die Expression von *PIWIL2* und *PIWIL4* sowie weiterer Gene, die an der Stilllegung von Retrotransposonen beteiligt sind, darunter auch *TDRD9* vermindert und stand in engem Zusammenhang mit dem Risiko eine Azoospermie zu entwickeln (Hadziselimovic et al., 2011).

Der Einfluss des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf das Transkriptom der Zelle zeigte in der Mikroarray-Analyse, dass in der Zelllinie NT2/D1 weniger Gene differentiell reguliert vorlagen als in der Zelllinie TCam-2. Die GO-Analyse dieser Transkripte in beiden Zelllinien zeigte, dass die Mehrheit der Gene in verschiedenen Stoffwechselwegen sowie zellulären Prozessen beteiligt war. In der NT2/D1-Zelllinie wurde eine große Anzahl ribosomaler Proteintranskripte nach *knockdown* von *PIWIL1* und *PIWIL2* als differentiell exprimiert detektiert. In einer Transkriptomstudie im Ejakulat von Männern mit Normozoospermie und eingeschränkten Ejakulatparametern wurde wie in unserer Analyse eine veränderte Expression ribosomaler RNAs bei Probanden mit Asthenozoospermie nachgewiesen und auf eine gestörte mitochondriale Assemblierung mit

zusammenhängender Beeinträchtigung im Fertilisierungsprozess geschlossen (Bansal *et al.*, 2015). Weiterhin sind mehrere Transkripte verändert exprimiert, die für verschiedene Histone kodieren. Es ist bekannt, dass es während der Spermatogenese zu einer Verdichtung des Genoms mit erhöhter Chromatinkondensation kommt. Die Daten könnten somit auf eine Veränderung der Chromatinzusammensetzung nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* hindeuten. Weiterhin denkbar wäre auch die Induktion von DNA-Schädigungen an Genorten zusätzlich zu denen, die im Rahmen dieser Arbeit gezielt verändert wurden. In der Zelllinie TCam-2 waren eine Vielzahl von Hitzeschockproteintranskripten in ihrer Expression verändert. Bansal *et al.*, (2015) detektierten im Ejakulat von Männern mit eingeschränkter Fertilität ebenfalls eine veränderte Expression von Hitzeschockprotein-mRNA. Zusätzlich dazu waren ebenfalls Transkripte aus der Familie der nukleären Ribonukleoproteine verändert. Diese Proteine sind in der Lage, mit RNA, DNA und verschiedenen Proteinen zu interagieren und sind an diversen zellulären Prozessen einschließlich Chromatin-*remodelling* und DNA-Reparatur, Regulation von Transkription, RNA-Spleißen und Translation beteiligt (Geuens *et al.*, 2016). Die veränderte Expression dieser Gene nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* deutet ebenfalls auf den Einfluss der *PIWIL*-Gene auf DNA-Integrität und Chromatinmodellierung hin. Zusätzlich war in der Zelllinie TCam-2 nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* die Transkription von Genen stark erhöht, welche am Aufbau des Spleißosoms, sowie beim Spleißen verschiedener zellulärer RNAs beteiligt sind. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung von Genen, die in einer Studie von Berkovits *et al.*, (2012) identifiziert wurden (siehe Anhang Tabelle 3). Diese untersuchten das Transkriptom muriner runder Spermatozoen nach Mutation von *bromodomain, testis-specific* (BRDT), einem Protein dessen Verlust Sterilität und Fehler in der Spermatogenese verursacht. Sie detektierten eine Erhöhung der Expression von Genen wie *SRSF2*, *DDX5* und *HNRNPK*. Bei diesen Transkripten waren die 3'UTR nicht verkürzt, wie es normalerweise in runden Spermatozoen der Fall ist. Die 3'UTR ist eine bekannte regulatorische Region, da sie durch RNA-bindende Proteine und miRNAs gebunden werden kann, welche die Translation modulieren können. Die Modifikation der 3'UTR vieler mRNAs, insbesondere die Auswahl einer verkürzten Version, ist eine Form der Transkriptionskontrolle, die häufig in spermatogenen Zellen beobachtet wird (Liu *et al.*, 2007). Die Relevanz der kürzeren 3'-UTRs, in runden Spermatozoen ist noch nicht völlig geklärt, jedoch ist sie für das Gelingen der Spermatogenese unablässig. Die Daten zeigen, dass der Verlust von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* die Expression von Komponenten des

Speißosoms beeinflusst. Als RNA-bindende Proteine könnten die PIWIL-Proteine auch selbst an der Modulation der 3'UTR Spermatogenese-relevanter Gene beteiligt sein. Insgesamt zeigte die Validierung der Gene in der qRT-PCR mitunter andere Ergebnisse als die Mikroarray-Expressionsanalyse. Gründe dafür könnten die singuläre Durchführung der Mikroarray-Analyse (n= 1), aber auch der Nachweis anderer Genabschnitte als in der qRT-PCR sein. Generell betrachtet zeigen aber sowohl die Mikroarray-Analyse, als auch die Daten der qRT-PCR die Interaktion von *PIWIL1* und *PIWIL2* mit Genen, die für zelluläre Entwicklung, Reproduktion und Differenzierung entscheidend sind.

In einem letzten Teilversuch wurde der Einfluss des *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* auf zelluläre Funktionen wie Proliferation, Vitalität und Apoptose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Zelllinien das Wachstum und die Vitalität der Zellen nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* reduziert wurde. Für das *PIWIL2*-Gen konnte in beiden Zelllinien die verringerte Zellvitalität auf eine erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden. Erste Untersuchungen in humanen Testis zeigten, dass eine Überexpression von *PIWIL1* zu erhöhter Malignität von Keimzellen führt und somit die Entstehung von Seminomen begünstigt. Diese Studien deuten darauf hin, dass *PIWIL1* an der Proliferation humaner Keimzellen beteiligt sein könnte (Qiao *et al.*, 2002). *In vitro* Studien in Gliomzelllinien zeigten, dass die Suppression von *PIWIL1* zu einer verringerten Proliferation und erhöhtem Zellzyklusarrest über die Regulation von p21 und Cyclin D1 führt (Wang *et al.*, 2014b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Magentumoren wo der *knockdown* von *PIWIL1* das Wachstum der Zellen über induzierten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase hemmte (Liu *et al.*, 2006). In Brustkrebszelllinien und Sarkomzelllinien führte die Hemmung von *PIWIL1* ebenfalls zu einer reduzierten Proliferation (Wang *et al.*, 2014a; Siddiqi *et al.*, 2012). In unseren Untersuchungen zeigt sich, dass ein *knockdown* von *PIWIL2* zu einer verminderten Zellproliferation und gesteigerten Apoptose führt. In Brustkrebsproben konnte die Expression von *PIWIL2* in verschiedenen Stadien detektiert werden. Insbesondere in Brustkrebsvorstufen war die Expression von *PIWIL2* mit einer erhöhten Expression des Proliferationsmarkers Ki67 assoziiert (Liu *et al.*, 2010). In diversen Zelllinien sorgte eine Überexpression von *PIWIL2* zu einer inhibierten Apoptose über die direkte Aktivierung des STAT3/BCL-XL-Signalweges, sowie einer gesteigerten Proliferation über die STAT3/Cyclin D1-Signalkaskade (Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010). Die Behandlung der von uns verwendeten Zellmodelle mit CRISPR/Cas9 führte insbesondere zu einem starken *knockdown* der *PIWIL2*-

Isoform bei 60 kDa. Mehrere Transkriptvarianten des *PIWIL2*-Gens wurden bisher in präkanzerösen Stammzellen identifiziert. Die dominanteste Expression erfährt hierbei die Spleißvariante PL2L60, welche die Zellproliferation über den STAT3/BCL2-Signalweg auch in Abwesenheit von *PIWIL2*-Wildtyp fördert und über die verstärkte Expression zu einer erhöhten Tumorgenität *in vivo* beiträgt (Chen *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2010). In Brust- und Zervixkarzinomen wurde die *PIWIL2*-Wildtyp-Isoform hauptsächlich in apoptotischen Tumorzellen detektiert, aber nur in geringen Mengen in lebenden Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden *PIWIL2*-Spleißvarianten wie PL260L in verschiedenen Tumorgeweben, sowie Tumorzelllinien in Zusammenhang mit Proliferation und Apoptose nachgewiesen (Gainetdinov *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2010). In Übereinstimmung mit unseren Daten deutet das darauf hin, dass die zellfunktionellen Auswirkungen von *PIWIL2* größtenteils über die Spleißvarianten reguliert werden könnten und der Ausfall der *PIWIL2*-Isoform mit einer molekularen Masse von 60 kDa für die verringerte Proliferation, sowie gesteigerte Apoptose verantwortlich sein könnte.

5.4 Modell zur Funktion der *PIWIL*-Gene in humanen Keimzellen

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde die Funktion der *PIWIL*-Gene in humanen Keim- und Stammzellen erweitert (Abb. 33). Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die veränderte mRNA-Expression der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* in ejakulierten Spermatozoen in Zusammenhang mit reduzierter Motilität und reduzierter Spermienanzahl im Ejakulat steht. In *knockdown*-Versuchen konnte ein Einfluss von *PIWIL1* auf die Vitalität und das zelluläre Wachstum sowie ein Einfluss von *PIWIL2* auf die Apoptose bestätigt werden. Im Weiteren führte ein *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zur Erhöhung der Expression von Pluripotenzgenen und Genen der frühen mesodermen Differenzierung. Diese Gene werden in primordialen Keimzellen und deren Vorläufern exprimiert und dienen zur Spezifikation dieser Zelltypen und somit der Initiation der humanen Keimzellgenese. Die *PIWIL*-Gene scheinen in diesem Zusammenhang die Expression früher Keimzellgene zu unterdrücken und eine Differenzierung einzuleiten. Weiterhin unterdrücken die *PIWIL*-Gene die Expression transponibler Elemente in der Zelle und tragen damit zum Erhalt eines intakten Genoms bei. Die *in silico* und *in vitro* Untersuchungen der Region 5' vom Transkriptionsstart von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* zeigte das Vorhandensein epigenetisch regulierbarer Elemente in Form von CpG-Inseln, sowie eine Aktivierung der mRNA-Expression nach Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5AzadC. Weiterhin konnte die Promotoraktivierung von *PIWIL2*

durch Methylierung *in vitro* unterdrückt werden. Die Transkriptomstudien zeigten nach *knockdown* von *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* eine veränderte mRNA-Expression von Genen, welche am Aufbau des Spleißosoms der Zelle sowie an der Ribosomenassemblierung beteiligt sind. Diese Daten könnten auf eine bisher nicht untersuchte Beteiligung der *PIWIL*-Gene an der Prozessierung von mRNAs sowie deren Translationskontrolle hindeuten.

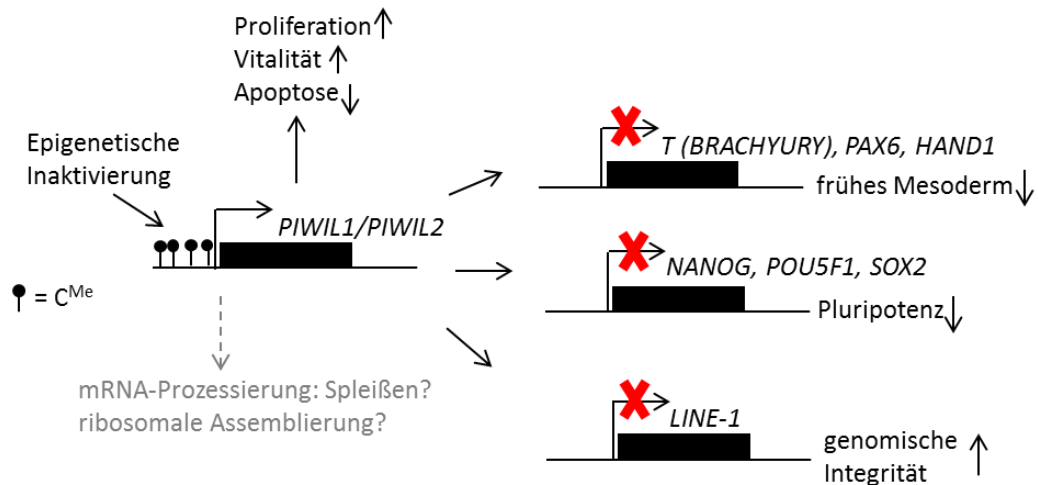


Abbildung 33: Modell zum Einfluss der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* auf zelluläre Ereignisse in der frühen Keimbahn

Die Expression der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* führt zu einer verminderten Expression von Pluripotenzgenen sowie Genen des frühen Mesoderms (Vorläufer für Keimbahnstammzellen) und können somit die Keimbahndifferenzierung einleiten. Damit sind die *PIWIL1* und *PIWIL2* wichtige Mediatoren zwischen Pluripotenz-erhalt und Differenzierung. Weiterhin sorgt die Expression von *PIWIL1* und *PIWIL2* für eine Reduktion der mRNA-Expression transponibler Elemente (*LINE-1*). Auf zellulärer Ebene sorgt *PIWIL1* für die Aufrechterhaltung von Proliferation und Vitalität und *PIWIL2* für die Unterdrückung von Apoptose. Die Transkriptomanalysen weisen auf eine bisher nicht charakterisierte Beteiligung der *PIWIL*-Gene an der Prozessierung von mRNAs sowie Aufbau der Translationsmaschinerie hin. C^{Me} = methyliertes Cytosin innerhalb einer CpG-Insel

6 Zusammenfassung

Die Spermatogenese ist ein komplexes Entwicklungsprogramm, bei dem männliche primordiale Keimzellen durch Mitose und Meiose zu befruchtungsfähigen Keimzellen heranreifen. Um zu funktionellen Spermatozoen zu werden, verlieren männliche Keimstammzellen allmählich ihr Stammzellpotential und durchlaufen eine Differenzierung. Somit ist während der Spermatogenese eine geordnete und präzise räumlich-zeitliche Regulierung der Expression einer Vielzahl von Genen notwendig, um das Keimzellschicksal zu bestimmen. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei die *P-Element induced wimpy testis like*-Proteine (PIWIL) zu spielen. Das Expressionsverhalten der PIWIL-Proteine sowie die Notwendigkeit für die Erneuerung und Erhaltung des Stammzellcharakters ist bereits in einigen Organismen beschrieben worden (Moussian et al., 1998; Cox et al., 2000; Kuramochi-Miyagawa et al., 2001). Für den Menschen existieren bereits erste Studien die zeigen, dass die vier humanen Vertreter der *PIWIL*-Gene in Zusammenhang mit männlicher Keimzellentwicklung und Infertilität zu stehen scheinen (Hempfling et al., 2017; Heyn et al., 2012; Friemel et al., 2014). In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass in ejakulierten Spermatozoen eine erhöhte mRNA-Expression von *PIWIL1* mit verringerter Motilität und Vitalität von Spermien assoziiert ist. Zusätzlich war eine reduzierte mRNA-Expression von *PIWIL2* mit reduzierter Gesamtspermienzahl und Spermienkonzentration verknüpft.

Im Weiteren konnten wir zeigen, dass die humanen *PIWIL*-Gene 1-4 in ihren Promotorregionen epigenetisch regulierbare Abschnitte in Form von CpG-Inseln besitzen und somit über DNA-Methylierung regulierbar sind. Für *PIWIL2* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen geringem Promotormethylierungsstatus und verstärkter Expression *in vitro* gezeigt werden. Weiterhin wurden Promotorabschnitte identifiziert, welche für die Transkriptionsaktivierbarkeit von *PIWIL2* ebenfalls in Abhängigkeit von der DNA-Methylierung entscheidend sind.

Mittels *knockdown*-Studien konnte gezeigt werden, dass die *PIWIL*-Gene 1 und 2 Einfluss auf die Expression von Genen haben, die für Stammzellspezifität sowie Keimzellspezifität unablässig sind. Darüber hinaus hat der Verlust der Gene *PIWIL1* und *PIWIL2* Konsequenzen auf zelluläre Funktionen wie Proliferation, Vitalität und Apoptose.

Zusammenfassend zeigt sich, dass in unseren Studien den *PIWIL*-Genen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stammzellerhalts und der Spermatogenese beim Menschen

zukommt. Die Analyse der *PIWIL*-Expression im Ejakulat von Männern könnte somit zu einem vielversprechenden Indikator zur Beurteilung des Fertilitätsstatus werden. Im Weiteren wäre zu klären, ob sich die *PIWIL*-Genexpression zur Diagnostik der männlichen Infertilität sowie zur prädiktiven Bewertung des Fertilisationsvermögens im Rahmen der assistierten Reproduktion nutzen lässt.

7 Literaturverzeichnis

Adams, B.; Dörfler, P.; Aguzzi, A.; Kozmik, Z.; Urbánek, P.; Maurer-Fogy, I.; Busslinger, M. (1992): Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev.* 6, 1589–1607.

Al-Janabi, O.; Wach, S.; Nolte, E.; Weigelt, K.; Rau, TT.; Stöhr, C. *et al.*, (2014): Piwi-like 1 and 4 gene transcript levels are associated with clinicopathological parameters in renal cell carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 686–690.

Anderson, RA.; Fulton, N.; Cowan, G.; Coutts, S.; Saunders, PT(2007): Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Dev Biol* 7, 136.

Aravin, AA.; Gaidatzis, D.; Pfeffer, S.; Lagos-Quintana, M.; Landgraf, P.; Iovino, N. *et al.*, (2006): A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203–207.

Aravin, AA.; Klenov, MS.; Vagin, VV.; Bantignies, F.; Cavalli, G.; Gvozdev, VA. (2004): Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol. Cell. Biol* 24, 6742–6750.

Aravin, AA.; Sachidanandam, R.; Bourc'his, D.; Schaefer, C.; Pezic, D.; Fejes-Toth, K. *et al.*, (2008): A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31, 785–799.

Aravin, AA.; Sachidanandam, R.; Girard, A.; Fejes-Toth, K.; Hannon, GJ. (2007): Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316 (5825), 744–747.

Bak, CW.; Yoon, T.; Choi, Y. (2011): Functions of PIWI proteins in spermatogenesis. *Clin Exp Reprod Med* 38, 61–67.

Bansal, SK.; Gupta, N.; Sankhwar, SN.; Rajender, S. (2015): Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *PloS one* 10, e0127007.

Bao, J.; Zhang, Y.; Schuster, A. S.; Ortogero, N.; Nilsson, E. E.; Skinner, M. K.; Yan, W. (2014): Conditional inactivation of Miwi2 reveals that MIWI2 is only essential for prospermatogonial development in mice. *Cell Death Differ.* 21, 783–796.

Berkovits, BD.; Wang, L.; Guarnieri, P.; Wolgemuth, DJ. (2012): The testis-specific double bromodomain-containing protein BRDT forms a complex with multiple spliceosome components and is required for mRNA splicing and 3'-UTR truncation in round spermatids. *Nucleic Acids Res.* 40, 7162–7175.

Berkovitz, A.; Eltes, F.; Lederman, H.; Peer, S.; Ellenbogen, A.; Feldberg, B.; Bartoov, B. (2006): How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 12, 634–638.

Blumenauer V, Czeromin U, Fiedler K, Gnoth C, Happel L, Krüssel JS, Kupka MS, Tandler-Schneider A :D.I.R.-Annual 2015. *J Reprod Med Endo*; 13: 188-223

Bourc'his, D.; Voinnet, O. (2010): A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science* 330, 617–622.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brennecke, J.; Aravin, AA.; Stark, A.; Dus, M.; Kellis, M.; Sachidanandam, R.; Hannon, GJ. (2007): Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128, 1089–1103.

Brower-Toland, B.; Findley, SD.; Jiang, L.; Liu, L.; Yin, H.; Dus, M. *et al.*, (2007): *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.* 21, 2300–2311.

Cao, J.; Xu, G.; Lan, J.; Huang, Q.; Tang, Z.; Tian, L. (2016): High expression of piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 is associated with poor prognosis via regulating transforming growth factor- β receptors and cyclin-dependent kinases in breast cancer. *Mol Med Rep* 13, 2829–2835.

Carmell, MA.; Girard, A; van de Kant, HJG.; Bourc'his, D.; Bestor, TH.; Rooij de, DG.; Hannon, GJ. (2007): MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell* 12, 503–514.

Carmell, MA.; Xuan, Z.; Zhang, MQ.; Hannon, GJ. (2002): The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742.

Castañeda, J.; Genzor, P.; Bortvin, A. (2011): piRNAs, transposon silencing, and germline genome integrity. *Mutation Res.* 714, 95–104.

Cerutti, L.; Mian, N.; Bateman, A. (2000): Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25, 481–482.

Chen, C.; Liu, J.; Xu, G. (2013): Overexpression of PIWI proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis. *Cancer Biomark* 13, 315–321.

Chen, C.; Jin, J.; James, DA.; Adams-Cioaba, MA.; Park, J.; Guo, Y. *et al.*, (2009): Mouse Piwi interactome identifies binding mechanism of Tdrkh Tudor domain to arginine methylated Miwi. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 20336–20341.

Chen, L.; Shen, R.; Ye, Y.; Pu, X.; Liu, X.; Duan, W. *et al.*, (2007): Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS one* 2, e293.

Chen, Z.; Che, Q.; He, X.; Wang, F.; Wang, H.; Zhu, M. *et al.*, (2015a): Stem cell protein Piwil1 endowed endometrial cancer cells with stem-like properties via inducing epithelial-mesenchymal transition. *BMC cancer* 15, 811.

Chen, Z.; Che, Q.; Jiang, F.; Wang, H.; Wang, F.; Liao, Y.; Wan, X. (2015b): Piwil1 causes epigenetic alteration of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferase in type I endometrial cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 463, 876–880.

Chia, N.; Chan, Y.; Feng, B.; Lu, X.; Orlov, YL.; Moreau, D. *et al.*, (2010): A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468, 316–320.

Christman, JK. (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495.

Clermont, Y. (1963): The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat.* 112, 35–51.

Cox, D. N.; Chao, A.; Baker, J.; Chang, L.; Qiao, D.; Lin, H. (1998): A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12, 3715–3727.

Cox, D. N.; Chao, A.; Lin, H. (2000): piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Dev.* 127, 503–514.

Craig, Nancy L. (Hg.) (2002): Mobile DNA II. Washington DC: ASM Press.

Darst, RP.; Pardo, CE.; Ai, L.; Brown, KD.; Kladde, MP. (2010): Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 7, Unit 7.9.1-17.

Deltcheva, E; Chylinski, K; Sharma, CM.; Gonzales, K; Chao, Y; Pirzada, ZA. *et al.*, (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607.

Deng, W.; Lin, H. (2002): miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell* 2, 819–830.

Fazio de, S.; Bartonicek, N.; Di Giacomo, M.; Abreu-Goodger, C.; Sankar, A.; Funaya, . *et al.*, (2011): The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 480, 259–263.

Feng, S.; Jacobsen, SE.; Reik, W. (2010): Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330 (6004), 622–627.

Ferreira, HJ.; Heyn, H.; Garcia del Muro, X.; Vidal, A.; Larriba, S.; Muñoz, C. *et al.*, (2014): Epigenetic loss of the PIWI/piRNA machinery in human testicular tumorigenesis. *Epigenetics* 9, 113–118.

Fischer, BE.; Wasbrough, E.; Meadows, LA.; Randlet, O.; Dorus, S.; Karr, TL.; Russell, S. (2012): Conserved properties of Drosophila and human spermatozoal mRNA repertoires. *Proc. Biol. Sci.* 279, 2636–2644.

Frank, F.; Sonenberg, N.; Nagar, B. (2010): Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465, 818–822.

Friemel, C.; Ammerpohl, O.; Gutwein, J.; Schmutzler, AG.; Caliebe, A.; Kautza, M. *et al.*, (2014): Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil Steril* 101, 1097-1103.

Funayama, N.; Nakatsukasa, M.; Mohri, K.; Masuda, Y.; Agata, K. (2010): Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evolution Dev.* 12, 275–287.

Gainetdinov, IV.; Skvortsova, YV.; Stukacheva, EA.; Bychenko, OS.; Kondratieva, SA.; Zinovieva, MV.; Azhikina, TL. (2014): Expression profiles of PIWIL2 short isoforms differ in testicular germ cell tumors of various differentiation subtypes. *PloS one* 9, e112528.

Gambichler, T.; Kohsik, C.; Höh, A.; Lang, K.; Käfferlein, HU.; Brüning, T. *et al.*, (2017): Expression of PIWIL3 in primary and metastatic melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 143, 433–437.

Gardiner-Garden, M.; Frommer, M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol* 196, 261–282.

Gaskell, TL.; Esnal, A.; Robinson, L.; Anderson, RA.; Saunders, PK. (2004): Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol. Reprod* 71, 2012–2021.

Geuens, T.; Bouhy, D.; Timmerman, V. (2016): The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet* 135, 851–867.

Gou, L.; Kang, J.; Dai, P.; Wang, X.; Li, F.; Zhao, S. *et al.*, (2017): Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis. *Cell* 169, 1090-1100.

Greither, T.; Koser, F.; Kappler, M.; Bache, M.; Lautenschläger, C.; Göbel, S. *et al.*, (2012): Expression of human Piwi-like genes is associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. *BMC cancer* 12, 272.

Grivna, ST.; Beyret, E.; Wang, Z.; Lin, H. (2006): A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 20, 1709–1714.

Grochola, L. F.; Greither, T.; Taubert, H.; Möller, P.; Knippschild, U.; Udelnow, A. *et al.*, (2008): The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer* 99, 1083–1088.

Gu, A.; Ji, Guixiang; Shi, X.; Long, Y.; Xia, Y.; Song, L. *et al.*, (2010): Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum Reprod* 25, 2955–2961.

Gu, Y.; Li, Q.; Pan, Z.; Li, M.; Luo, H.; Xie, Z. (2013): Molecular cloning, gene expression and methylation status analysis of PIWIL1 in cattle-yaks and the parental generation. *Anim Reprod Sci* 140, 131–137.

Güneş, S.; Kulaç, T. (2013): The role of epigenetics in spermatogenesis. *Turk. J. Urol* 39, 181–187.

Hadziselimovic, F.; Hadziselimovic, N. O.; Demougin, P.; Krey, G.; Oakeley, E. J. (2011): Deficient expression of genes involved in the endogenous defense system against transposons in cryptorchid boys with impaired mini-puberty. *Sex Dev.* 5, 287–293.

Hajkova, P.; Ancelin, K.; Waldmann, T.; Lacoste, N.; Lange, UC.; Cesari, F. *et al.*, (2008): Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 452, 877–881.

Hajkova, P.; Erhardt, S.; Lane, N.; Haaf, T.; El-Maarri, O.; Reik, W. *et al.*, (2002): Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev* 117, 15–23.

Hammoud, SS.; Nix, DA.; Zhang, H.; Purwar, J.; Carrell, DT.; Cairns, BR. (2009): Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.

Hanlon Newell, A. E.; Hemphill, A.; Akkari, Y. M. N.; Hejna, J.; Moses, R. E.; Olson, S. B. (2008): Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage. *Cytogenet Genome Res.* 121, 174–180.

He, W.; Wang, Z.; Wang, Q.; Fan, Q.; Shou, C.; Wang, J. *et al.*, (2009): Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *BMC cancer* 9, 426.

Hempfling, AL.; Lim, SL.; Adelson, D; Evans, J.; O'Connor, AE.; Qu, Z. *et al.*, (2017): Expression patterns of HENMT1 and PIWIL1 in human testis - Implications for transposon expression. *Reproductio*, 875-889

Heyn, H.; Ferreira, HJ.; Bassas, L.; Bonache, S.; Sayols, S.; Sandoval, J. *et al.*, (2012): Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PLoS one* 7, e47892.

Hou, Y.; Yuan, J.; Zhou, X.; Fu, X.; Cheng, H.; Zhou, R. (2012): DNA demethylation and USF regulate the meiosis-specific expression of the mouse Miwi. *PLoS genetics* 8, e1002716.

Huang, R. C.; Garratt, E. S.; Pan, H.; Wu, Y.; Davis, E. A.; Barton, S. J. *et al.*, (2015): Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics.* 10, 995–1005.

Irie, N.; Weinberger, L.; Tang, WWC.; Kobayashi, T.; Viukov, S.; Manor, YS. *et al.*, (2015): SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160, 253–268.

Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol* 169, 5429–5433.

Jenkins, TG.; Carrell, DT. (2012): Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front Genet.* 3, 143.

Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, JA.; Charpentier, E.(2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.

Jinek, M.; Doudna, JA. (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405–412.

Jong, J; Stoop, H.; Gillis, AJM.; Hersmus, R.; van Gurp, RJHLM; van de Geijn, GJM. *et al.*, (2008): Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 185–196.

Julaton, VT. Angeles; RP., Renee A. (2011): NANOS3 function in human germ cell development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2238–2250.

- Jungwirth, A.; Giwercman, A.; Tournaye, H.; Diemer, T.; Kopa, Z.; Dohle, G.; Krausz, C. (2012): European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 62, 324–332.
- Kalmykova, Al.; Klenov, MS.; Gvozdev, VA. (2005): Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* 33, 2052–2059.
- Kamaliyan, Z.; Pouriamanesh, S.; Amin-Beidokhti, M.; Rezagholizadeh, A.; Mirfakhraie, R. (2017): HIWI2 rs508485 Polymorphism Is Associated with Non-obstructive Azoospermia in Iranian Patients. *Report Biochem Mol Biol.* 5, 108–111.
- Krause, W.; Weidner, W.; Sperling, H.; Diemer, T. (Hg.) (2011): *Andrologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Krawetz, SA. (2005): Paternal contribution: new insights and future challenges. In: *Nat. Rev. Genet* 6, 633–642.
- Kuramochi-Miyagawa, S.; Kimura, T.; Ijiri, TW.; Isobe, T.; Asada, N.; Fujita, Y. *et al.*, (2004): Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Dev.* 131, 839–849.
- Kuramochi-Miyagawa, S.; Kimura, T.; Yomogida, K.; Kuroiwa, A.; Tadokoro, Y.; Fujita, Y. *et al.*, (2001): Two mouse piwi-related genes. Miwi and mili. *Mech. Dev* 108, 121–133.
- Kuramochi-Miyagawa, S.; Watanabe, T.; Gotoh, K.; Totoki, Y.; Toyoda, A.; Ikawa, M. *et al.*, (2008): DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917.
- Kwak, PB.; Tomari, Y. (2012): The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol* 19, 145–151.
- Lau, NC.; Seto, AG.; Kim, J.; Kuramochi-Miyagawa, S.; Nakano, T.; Bartel, DP.; Kingston, RE. (2006): Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313 (5785), 363–367.
- Lee, JH.; Jung, C.; Javadian-Elyaderani, P.; Schweyer, S.; Schütte, D.; Shoukier, M. *et al.*, (2010): Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein piwil2. *Cancer Res.* 70, 4569–4579.
- Lee, JH.; Schutte, D.; Wulf, G.; Fuzesi, L.; Radzun, HJ.; Schweyer, S. *et al.*, (2006): Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum. Mol. Genet.* 15, 201–211.
- Li, L.; Yu, C.; Gao, H.; Li, Y.(2010): Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC cancer* 10, 38.
- Lim, AK.; Tao, L.; Kai, T. (2009): piRNAs mediate posttranscriptional retroelement silencing and localization to pi-bodies in the *Drosophila* germline. *J. Cell Biol.* 186, 333–342.
- Lim, SL; Ricciardelli, C.; Oehler, MK.; Tan, A.; Russell, D.; Grützner, F. (2014): Overexpression of piRNA pathway genes in epithelial ovarian cancer. *PLoS one* 9, e99687.

- Lim, S.L.; Tsend-Ayush, E.; Kortschak, R.D.; Jacob, R.; Ricciardelli, C.; Oehler, M.K.; Grützner, F. (2013): Conservation and expression of PIWI-interacting RNA pathway genes in male and female adult gonad of amniotes. *Biol. Reprod* 89, 136.
- Lin, H.; Spradling, A. C. (1997): A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *J Dev.* 124, 2463–2476.
- Lipshultz, L.I.; Lamb, D.J. (2007): Risk of transmission of genetic diseases by assisted reproduction. *Nat Rev Urol.* 4, 460–461.
- Litwin, M.; Dubis, J.; Arczyńska, K.; Piotrowska, A.; Frydlewicz, A.; Karczewski, M. *et al.*, (2015): Correlation of HIWI and HILI Expression with Cancer Stem Cell Markers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 35, 3317–3324.
- Liu, D.; Brockman, J.M.; Dass, B.; Hutchins, L.N.; Singh, P.; McCarrey, J.R. *et al.*, (2007): Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 35, 234–246.
- Liu, J.J.; Shen, R.; Chen, L.; Ye, Y.; He, G.; Hua, K. *et al.*, (2010): Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol* 3, 328–337.
- Liu, S.; Liu, N.; Liu, M.; Sun, L.; Xia, W.; Lu, H. *et al.*, (2017): An unusual intragenic Promotor of PIWIL2 contributes to aberrant activation of oncogenic PL2L60. *Oncotarget* 8, 46104–46120.
- Liu, X.; Sun, Y.; Guo, J.; Ma, H.; Li, J.; Dong, B. *et al.*, (2006): Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 118, 1922–1929.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lotti, F.; Maggi, M. (2015): Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update.* 21, 56–83.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollst. überarb. Aufl. *Stuttgart: Thieme.*
- Mani, S.R.; Juliano, C.E. (2013): Untangling the web: the diverse functions of the PIWI/piRNA pathway. *Mol. Reprod. Dev* 80, 632–664.
- Marlow, Florence (2015): Primordial Germ Cell Specification and Migration. In: *F1000Research* 4.
- Mayer, W.; Niveleau, A.; Walter, J.; Fundele, R.; Haaf, T. (2000): Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502.
- McCallie, B.R.; Parks, J.C.; Patton, A.L.; Griffin, D.K.; Schoolcraft, W.B.; Katz-Jaffe, M.G. (2016): Hypomethylation and Genetic Instability in Monosomy Blastocysts May Contribute to Decreased Implantation Potential. *PLoS one* 11, e0159507.
- Meikar, O.; Da Ros, M.; Korhonen, H.; Kotaja, N. (2011): Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reprod.* 142, 195–209.

- Meister, G. (2013): Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet* 14, 447–459.
- Miller, D.; Ostermeier, GC.; Krawetz, SA. (2005): The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med.* 11, 156–163.
- Moussian, B.; Schoof, H.; Haecker, A.; Jürgens, G.; Laux, T. (1998): Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J* 17, 1799–1809.
- Muñoz, X.; Navarro, M.; Mata, A.; Bassas, L.; Larriba, S. (2014): Association of PIWIL4 genetic variants with germ cell maturation arrest in infertile Spanish men. *Asian J Androl* 16, 931–933.
- Murray, KS.; James, A.; McGeady, JB.; Reed, ML.; Kuang, WW.; Nangia, AK. (2012): The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. *J Fertil Steril* 98, 1428–1431.
- Navarro, A.; Tejero, R.; Viñolas, N.; Cordeiro, A.; Marrades, RM.; Fuster, D. *et al.*, (2015): The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 6, 31544–31556.
- Nieschlag, E.; Behre, HM.; Nieschlag, S. (2009): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. *Springer-Verlag.*
- Nieschlag, E.; Behre, HM.; Nieschlag, S. (Hg.) (2010): Andrology. *Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.*
- Niwa, H.; Miyazaki, J.; Smith, A. G. (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet* 24, 372–376.
- Oakes, C. C.; La Salle, S.; Smiraglia, D. J.; Robaire, B.; Trasler, J. M. (2007): Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev. Biol* 307, 368–379.
- Okano, M.; Bell, D. W.; Haber, D. A.; Li, E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Palakodeti, D.; Smielewska, M.; Lu, Y.; Yeo, GW.; Graveley, BR. (2008): The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. *RNA* 14, 1174–1186.
- Pandey, RR.; Tokuzawa, Y.; Yang, Z.; Hayashi, E.; Ichisaka, T.; Kajita, S. *et al.*, (2013): Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 16492–16497.
- Parker, JS.; Roe, SM.; Barford, D. (2004): Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* 23, 4727–4737.
- Peters, L.; Meister, G.(2007): Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26, 611–623.

Popp, C.; Dean, W.; Feng, S.; Cokus, S.J.; Andrews, S.; Pellegrini, M. *et al.*, (2010): Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105.

Pruitt, K.D.; Tatusova, T.; Maglott, D.R. (2005): NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 33, D501-4.

Qiao, D.; Zeeman, A.M.; Deng, W.; Looijenga, L.H.J.; Lin, H. (2002): Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*. 21, 3988–3999.

Qiu, L.; Xu, L.; Chang, G.; Guo, Q.; Liu, X.; Bi, Y. *et al.*, (2016): DNA methylation-mediated transcription factors regulate Piwil1 expression during chicken spermatogenesis. *J Reprod Dev* 62, 367–372.

Reddien, P.W.; Oviedo, N.J.; Jennings, J.R.; Jenkin, J.C.; Sanchez-Alvarado, A. (2005): SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310, 1327–1330.

Reuter, M.; Chuma, S.; Tanaka, T.; Franz, T.; Stark, A.; Pillai, R.S. (2009): Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 639–646.

Rogstad, D. K., Herring, J. L., Theruvathu, J. A., Burdzy, A., Perry, C. C., Neidigh, J. W., and Sowers, L. C. (2009) Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1194–1204

Rowe, P.J. (2003): WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Repr. Cambridge: Cambridge U.P.

Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Hikim, A.P.S.; Clegg, E.D. (1993): Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *Int J Androl* 16, 83.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T. *et al.*, (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

Saitou, M.; Yamaji, M. (2012): Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4, 155-176

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463–5467.

Sasaki, K.; Yokobayashi, S.; Nakamura, T.; Okamoto, I.; Yabuta, Y.; Kurimoto, K. *et al.*, (2015): Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 178–194.

Sasaki, T.; Shiohama, A.; Minoshima, S.; Shimizu, N. (2003): Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82, 323–330.

Schirle, NT.; MacRae, IJ. (2012): The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336, 1037–1040.

Schultz, N.; Hamra, F.; Garbers, DL. (2003): A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12201–12206.

Schütte, B.; El Hajj, N.; Kutz, J.; Nanda, I.; Gromoll, J.; Hahn, T. et al., (2013): Broad DNA methylation changes of spermatogenesis, inflammation and immune response-related genes in a subgroup of sperm samples for assisted reproduction. *Androl.* 1, 822–829.

Schwartz, CM.; Spivak, CE.; Baker, SC.; McDaniel, TK.; Loring, JF.; Nguyen, C. et al., (2005): NTera2: a model system to study dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 14, 517–534.

Sharma, AK.; Nelson, MC.; Brandt, JE.; Wessman, M.; Mahmud, N.; Weller, KP.; Hoffman, R. (2001): Human CD34(+) stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the Drosophila gene piwi. *Blood* 97, 426–434.

Shoji, M.; Tanaka, T.; Hosokawa, M.; Reuter, M.; Stark, A.; Kato, Y. et al., (2009): The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev. Cell* 17, 775–787.

Siddiqi, S.; Terry, M.; Matushansky, I. (2012): Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PLoS one* 7, e33711.

Simon, B.; Kirkpatrick, JP.; Eckhardt, S.; Reuter, M.; Rocha, EA.; Andrade-Navarro, MA. et al., (2011): Recognition of 2'-O-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. In: *Structure.* 19, 172–180.

Simpson, AJG.; Caballero, OL.; Jungbluth, A.; Chen, Y.; Old, LJ. (2005): Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 615–625.

Siomi, MC.; Sato, K.; Pezic, D.; Aravin, AA. (2011): PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 12, 246–258.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. et al., (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107–1112.

Smallwood, SA.; Tomizawa, S.; Krueger, F.; Ruf, N.; Carli, N.; Segonds-Pichon, A. et al., (2011): Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat. Genet* 43, 811–814.

Smith, JM.; Bowles, J.; Wilson, M.; Teasdale, RD.; Koopman, P. (2004): Expression of the tudor-related gene Tdrd5 during development of the male germline in mice. *GEP* 4, 701–705.

Sohn, YA.; Lee, SI.; Choi, HJ.; Kim, HJ.; Kim, KH.; Park, TS.; Han, JY. (2014): The CCAAT element in the CIWI Promotor regulates transcriptional initiation in chicken primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev* 81, 871–882.

Sugawa, F.; Araúzo-Bravo, MJ.; Yoon, J.; Kim, K.; Aramaki, S.; Wu, G. *et al.*, (2015): Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. *EMBO J* 34, 1009–1024.

Sugimoto, K.; Kage, H.; Aki, N.; Sano, A.; Kitagawa, H.; Nagase, T. *et al.*, (2007): The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 359, 497–502.

Sun, G.; Wang, Y.; Sun, L.; Luo, H.; Liu, N.; Fu, Z.; You, Y. (2011): Clinical significance of Hiwi gene expression in gliomas. *Brain Res* 1373, 183–188.

Takai, D.; Jones, PA. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3740–3745.

Talbert, PB.; Henikoff, S. (2006): Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat. Rev. Genet* 7, 793–803.

Tanaka, T.; Hosokawa, M.; Vagin, VV.; Reuter, M.; Hayashi, E.; Mochizuki, AL. *et al.*, (2011): Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 10579–10584.

Taubert, H.; Greither, T.; Kaushal, D.; Wurl, P.; Bache, M.; Bartel, F. *et al.*, (2007): Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene* 26, 1098–1100.

Thomas, PD.; Kejariwal, A.; Campbell, MJ.; Mi, H.; Diemer, K.; Guo, N. *et al.*, (2003): PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res.* 31, 334–341.

Unhavaithaya, Y.; Hao, Y.; Beyret, E.; Yin, H.; Kuramochi-Miyagawa, S.; Nakano, T.; Lin, H. (2009): MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J. Biol. Chem* 284, 6507–6519.

Vagin, Vasily V.; Klenov, MS.; Kalmykova, AI.; Stolyarenko, AD.; Kotelnikov, RN.; Gvozdev, VA. (2004): The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*. *RNA Biol.* 1, 54–58.

Vagin, VV.; Sigova, A.; Li, C.; Seitz, H.; Gvozdev, V.; Zamore, PD. (2006): A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. In: *Science* 313, 320–324.

Vagin, VV.; Wohlschlegel, J.; Qu, J.; Jonsson, Z.; Huang, X.; Chuma, S. *et al.*, (2009): Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* 23, 1749–1762.

Vourekas, A.; Zheng, Q.; Alexiou, P.; Maragkakis, M.; Kirino, Y.; Gregory, B.D.; Mourelatos, Z. (2012): Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol* 19, 773–781.

Wang, C.; Swerdloff, RS. (2014): Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. In: *Fertil Steril* 102, 1502–1507.

- Wang, D.; Wang, Z.; Wang, L.; Song, Y.; Zhang, G. (2014a): Overexpression of hiwi promotes growth of human breast cancer cells. *APJCP* 15, 7553–7558.
- Wang, J.; Rao, S.; Chu, J.; Shen, X.; Levasseur, D.; Theunissen, TW.; Orkin, SH. (2006): A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364–368.
- Wang, J.; Saxe, JP.; Tanaka, T.; Chuma, S.; Lin, H. (2009): Mili interacts with tudor domain-containing protein 1 in regulating spermatogenesis. *CB* 19, 640–644.
- Wang, X.; Tong, X.; Gao, H.; Yan, X.; Xu, X.; Sun, S. (2014b): Silencing HIWI suppresses the growth, invasion and migration of glioma cells. *Int. J. Oncol.* 45, 2385–2392.
- Wang, Y.; Liu, Y.; Shen, Xiaoying; Z., Xiaoyan; Chen, X.; Yang, C.; Gao, H. (2012): The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *IJCEP* 5, 315–325.
- Weinbauer, GF.; Luetjens, CM; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2010): Physiology of Testicular Function. *Andrology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*, 11–59.
- World Health Organization (2010): WHO Laborhandbuch. Zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates. 5. Aufl. 2010. Korr. Sonderausgabe 2014. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Yabuta, Y.; Ohta, H.; Abe, T.; Kurimoto, K.; Chuma, Shinichiro; S., Mitinori, F. (2011): TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J. Cell Biol.* 192, 781–795.
- Ye, Y.; Yin, D.; Chen, L.; Zhou, Q.; Shen, R.; He, G. (2010): Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. *PLoS one* 5, e13406.
- Yigit, E.; Batista, PJ.; Bei, Y.; Pang, K.; Chen, CG.; Tolia, NH. (2006): Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. In: *Cell* 127, 747–757.
- Yin, D.; Wang, Q.; Chen, L.; Liu, M.; Han, C.; Yan, Q. (2011): Germline stem cell gene PIWIL2 mediates DNA repair through relaxation of chromatin. *PLoS one* 6, e27154.
- Zhang, D.; Wu, X.; Liu, X.; Cai, C.; Zeng, G.; Rohozinski, J. (2017): Piwil2-transfected human fibroblasts are cancer stem cell-like and genetically unstable. In: *Oncotarget* 8, 12259–12271.
- Zhang, L.; Liu, W.; Shao, C.; Zhang, N.; Li, H.; Liu, K. et al., (2014): Cloning, expression and methylation analysis of piwil2 in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine genomics* 18, 45–54.
- Zhao, Yi.; Zhou, J.; Wang, L.; He, H.i; Wang, X.; Tao, Z. et al., (2012): HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Cancer* 118, 2708–2717.
- Zheng, K.; Wang, PJ. (2012): Blockade of pachytene piRNA biogenesis reveals a novel requirement for maintaining post-meiotic germline genome integrity. *PLoS genetics* 8, e1003038.
- Zhu, X.; Lu, J.; Zhi, E.; Zhu, Y.; Zou, S.; Zhu, Z. et al., (2016): Association of a TDRD1 variant with spermatogenic failure susceptibility in the Han Chinese. *J Assist Reprod Genet.* 33, 1099–1104.

8 Anhang

Gensymbol	mRNA-Beschreibung	biologischer Prozess	Expressionsänderung (x-fach)	
			PL1-KD	PL2-KD
CDR1	cerebellar degeneration-related protein 1	---	1,58	0,27
MSMO1	methylsterol monooxygenase 1	fatty acid metabolic process	3,37	1,10
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	blood vessel development process	3,05	1,34
CD55	decay accelerating factor for complement	complement activation, classical pathway	3,53	1,44
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj	chromatin organization	1,46	3,51
EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	mRNA export from nucleus cellular protein metabolic process	1,30	3,42
MT1A	metallothionein 1A	negative regulation of growth	1,31	3,24
DDX39B	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B	spliceosomal complex assembly	1,11	3,29
HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk	chromatin organization	1,23	6,43
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	1,24	5,66
HIST1H1E	Homo sapiens histone cluster 1, H1e	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	1,58	7,50
SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide	spliceosomal complex assembly	0,80	3,97
PKM	pyruvate kinase, muscle	carbohydrate metabolic process	4,23	8,14
EEF1D	eukaryotic translation elongation factor 1 delta	transcription, DNA-templated	3,99	6,34
MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3	lipid metabolic process	3,17	5,50
RPL28	ribosomal protein L28	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,98	4,52
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	glutamine metabolic process	3,28	4,78
CTSC	cathepsin C	T cell mediated cytotoxicity	3,17	5,50
RPS21	ribosomal protein S21	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,67	5,23
MT1B	metallothionein 1B	negative regulation of growth	2,87	5,86
THY1	Thy-1 cell surface antigen	angiogenesis	3,46	7,82
RPS11	ribosomal protein S11	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,19	3,94
RPL36A	ribosomal protein L36a	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,14	3,75
RPS28	ribosomal protein S28	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,35	3,98
RPL38	ribosomal protein L38	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,51	4,21
SNORD102	small nucleolar RNA, C/D box 102	---	3,45	4,26
RPL34	ribosomal protein L34	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,02	3,16
SF3A2	surfactant associated 3	cellular protein metabolic process	2,84	3,11
RPL21	ribosomal protein L21	nuclear-transcribed mRNA catabolic	2,72	3,08

		process, nonsense-mediated decay		
RPL41P5	ribosomal protein L41 pseudogene 5	---	3,95	4,34
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	platelet degranulation	3,79	4,14
RPL35	ribosomal protein L35	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,21	3,01
OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	regulation of cellular amino acid metabolic process	2,28	3,10
SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2	glycine metabolic process	2,54	3,67
HNRNPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	mRNA splicing, via spliceosome	2,53	3,63
RPL13A	ribosomal protein L13a	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,79	3,58
RPL37A	ribosomal protein L37a	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,56	3,08
RPL31	ribosomal protein L31	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,54	3,08
RPL41	ribosomal protein L4	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,47	3,02
MT1X	metallothionein 1X	response to metal ion	2,03	4,69
NOP10	NOP10 ribonucleoprotein	pseudouridine synthesis	2,07	4,98
CNDP2	CNDP dipeptidase 2	sulfur amino acid metabolic process	1,86	3,63
RPL22	ribosomal protein L22	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,06	3,20
RPS15	ribosomal protein S15	ribosomal small subunit assembly	2,38	4,20
RPL8	ribosomal protein L8	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,18	4,00
ZNF738	zinc finger protein 738	protein polyubiquitination	2,07	3,69
TECR	trans-2,3-enoyl-CoA reductase	triglyceride biosynthetic process	2,12	3,58
FTL	ferritin, light polypeptide	iron ion transport	6,13	4,08
ECH1	enoyl CoA hydratase 1	fatty acid beta-oxidation	5,46	3,86
APOE	apolipoprotein E	response to reactive oxygen species	7,59	6,07
RNASEK	ribonuclease, RNase K	rRNA transcription	3,12	2,86
COX8A	cytochrome c oxidase subunit VIIIA	positive regulation of defense response to virus by host	3,55	3,08
F11R	F11 receptor	regulation of cytokine production	3,61	3,02
RPS27	ribosomal protein S27	ribosomal small subunit assembly	3,66	2,66
SSR2	signal sequence receptor, beta	translation	3,25	2,59
SNORD49A	small nucleolar RNA, C/D box 49A	---	3,35	2,66
RPS24	ribosomal protein S24	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,35	3,18
PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	protein peptidyl-prolyl isomerization	3,77	3,59
RPS27A	ribosomal protein S27a	G1/S transition of mitotic cell cycle	3,75	3,59
GPX4	glutathione peroxidase 4	chromatin organization	3,76	3,49
SH3BGRL3	SH3 domain binding glutamate-rich protein like 3	regulation of actin filament depolymerization	3,83	3,49

EGR1	early growth response 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	4,14	3,26
RPS26	ribosomal protein S26	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	4,40	3,65
DEAD	dephospho-CoA kinase domain containing	coenzyme A biosynthetic process	5,77	2,97
PRSS8	protease serine, 8	proteolysis	6,50	3,07
C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1	sterol biosynthetic process	3,38	2,29
ARL2	ADP-ribosylation factor-like 2	energy reserve metabolic process	4,03	2,27
LDLR	low density lipoprotein receptor	lipid metabolic process	3,85	2,22
HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm	chromatin organization	0,24	1,90
DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	methylation on cytosine within a CG sequence	0,17	0,76
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C	formation of translation preinitiation complex	0,24	0,79
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	receptor-mediated endocytosis	0,25	0,86
HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	alternative mRNA splicing, via spliceosome	0,31	0,89
HAT1	histone acetyltransferase 1	DNA packaging	0,31	0,92
NAA50	N(alpha)-acetyltransferase 50, NatE catalytic subunit	N-terminal protein amino acid acetylation	0,30	1,11
L1TD1	LINE-1 type transposase domain containing 1	---	0,26	1,12
GTF2I	general transcription factor Iii	regulation of transcription, DNA-templated	0,27	0,71
STARD7	StAR-related lipid transfer	positive regulation of protein targeting to mitochondrion	0,29	0,65
DEK	DEK proto-oncogene	regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	0,31	0,59
NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	cyclic nucleotide metabolic process	0,32	0,63
NUDT4P1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 1	---	0,32	0,63
FOXM1	forkhead box M1	G2/M transition of mitotic cell cycle	0,27	0,57
MARCH7	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7, E3 ubiquitin protein ligase	regulation of tolerance induction	0,25	0,53
BCAT1	branched chain amino-acid transaminase 1	G1/S transition of mitotic cell cycle	0,27	0,51
H3F3AP4	H3 histone, family 3A, pseudogene 4	---	0,28	0,48
SUB1	SUB1 homolog, transcriptional regulator	regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	0,31	0,50
CSNK2A2	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	mitotic cell cycle	0,33	0,56
LAP3	leucine aminopeptidase 3	proteolysis	0,16	0,49
PVRL1	poliovirus receptor-related 1	lens morphogenesis in camera-type eye	0,11	0,37

PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	telomere maintenance	0,33	0,47
IMPDH2	IMP (inosine 5-monophosphate) dehydrogenase 2	purine nucleobase metabolic process	0,33	0,48
TARDBP	TAR DNA binding protein	negative regulation of protein phosphorylation	0,23	0,35
TSPAN18	tetraspanin 18	cell surface receptor signaling pathway	0,41	0,28

Tabelle 2: Übersicht über die differentiell exprimierte Gene nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in der NT2/D1-Zelllinie

Dargestellt sind die Daten der Mikroarray-Analyse mit Gensymbol, Genbeschreibung und biologischer Funktion. Ein Gen gilt als differentiell exprimiert wenn eine mindestens 3fache Veränderung der Genexpression zwischen *knockdown* und Kontrolle vorliegt. PL1-KD=*knockdown PIWIL1*, PL2-KD=*knockdown PIWIL2*. n=1.

Gensymbol	mRNA-Beschreibung	biologischer Prozess	Expressionsänderung (x-fach)	
			PL1-KD	PL2-KD
SRSF1	serine/arginine-rich splicing factor 1	alternative mRNA splicing, via spliceosome	5,47	5,36
STT3B	STT3B, subunit of the oligosaccharyltransferase complex	glycoprotein catabolic process	5,87	5,46
HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	mRNA splicing, via spliceosome	5,45	4,90
EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5	translational initiation	5,43	4,84
ATP6V0E1	ATPase, H+ transporting, V0 subunit e1	cellular iron ion homeostasis	5,74	5,08
ATN1	atrophin 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	5,96	7,42
FAM60A	family with sequence similarity 60, member A	negative regulation of cell migration	6,52	5,52
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain and cytoplasmic domain (semaphorin) 6A	neural crest cell migration	7,45	5,93
ZCCHC8	zinc finger, CCHC domain containing 8	mRNA splicing, via spliceosome	7,09	5,55
SUMO1	small ubiquitin-like modifier 1	double-strand break repair via homologous recombination	7,48	5,57
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha class A member 1	G2/M transition of mitotic cell cycle	7,92	4,92
NCL	nucleolin	angiogenesis	7,77	4,99
ADIPOR1	adiponectin receptor 1	G-protein coupled receptor signaling pathway	7,28	4,87
BICD1	bicaudal D homolog 1	RNA processing	6,66	4,84
AMBRA1	autophagy/beclin-1 regulator 1	autophagy	7,35	5,34
ND5	NADH dehydrogenase 5	response to hypoxia	3,55	3,07
CYTB	cytochrome b	response to hypoxia	3,64	3,24
MSH2	mutS homolog 2	meiotic mismatch repair	3,51	3,23
SMG1	Salzman2013	---	4,10	3,42

	ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR			
C11orf58	chromosome 11 open reading frame 58	biological_process	4,54	3,71
XPR1	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	G-protein coupled receptor signaling pathway	4,52	3,40
HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	alternative mRNA splicing, via spliceosome	3,29	3,29
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	DNA replication	3,40	3,33
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	activation of MAPKK activity	3,29	3,62
PA2G4	proliferation-associated 2G4	transcription, DNA-templated	4,49	4,19
RPS24	ribosomal protein S24	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,81	3,58
SLC25A6	solute carrier family 25 member 6	energy reserve metabolic process	3,99	4,61
ESRP1	epithelial splicing regulatory protein 1	mRNA processing	4,20	4,34
PTMA	prothymosin, alpha	transcription, DNA-templated	4,54	4,75
LDHA	lactate dehydrogenase A	pyruvate metabolic process	4,77	4,72
YWHAZ	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	apoptotic process	6,02	4,67
CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	xenobiotic metabolic process	6,03	4,53
KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	protein import into nucleus, docking	5,93	4,39
CD9	CD9 molecule	platelet degranulation	5,33	4,56
S100A11	S100 calcium binding protein A11	signal transduction	5,33	4,41
NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	4,84	4,07
VAPB	VAMP (vesicle-associated membrane protein)- associated protein B and C	sphingolipid metabolic process	5,15	3,94
SLC25A6	solute carrier family 25 member 6	energy reserve metabolic process	4,21	4,63
HDLBP	high density lipoprotein binding protein	lipid transport	3,71	4,24
MAPK1IP1L	mitogen-activated protein kinase 1 interacting protein 1-like	---	3,76	4,14
CAP1	adenylate cyclase- associated protein 1	ameboidal-type cell migration	4,02	5,36
EIF3E	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,79	5,10
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	mRNA 5'-splice site recognition	3,55	4,51
ACTN1	actinin, alpha 1	platelet degranulation	4,59	5,30
SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	mast cell mediated immunity	4,77	5,73
NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	regulation of kainate selective glutamate receptor activity	5,04	5,95

ITGB1	integrin, beta 1	G1/S transition of mitotic cell cycle	4,29	5,60
HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	mRNA splicing, via spliceosome	4,41	5,44
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	translational initiation	4,43	5,66
HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha class B member 1	placenta development	5,22	6,54
HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	mRNA splicing, via spliceosome	4,95	6,31
NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	cyclic nucleotide metabolic process	5,68	6,45
ATP5F1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1	ATP synthesis coupled proton transport	5,19	6,94
P4HB	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	response to reactive oxygen species	5,00	7,78
STMN1	stathmin 1	microtubule depolymerization	4,83	7,46
MYBL2	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2	G2/M transition of mitotic cell cycle	5,02	7,38
BMS1P20	BMS1 ribosome biogenesis factor pseudogene 20	---	4,90	6,82
SMAGP	small cell adhesion glycoprotein	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	4,12	6,01
CALM2	calmodulin 2	MAPK cascade	4,06	5,92
EIF3H	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H	formation of translation preinitiation complex	4,44	6,71
TRAM1	translocation associated membrane protein 1	translation	4,60	6,70
LAPTM4A	lysosomal protein transmembrane 4 alpha	transport	4,33	7,14
SLC25A3	solute carrier family 25, member 3	generation of precursor metabolites and energy	4,27	6,76
TUBB	tubulin, beta class I	microtubule cytoskeleton organization	2,63	3,68
HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	mRNA splicing, via spliceosome	2,49	3,50
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme	mitotic cell cycle // glycogen metabolic process	2,41	3,36
SUMO2	small ubiquitin-like modifier 2	double-strand break repair via homologous recombination	2,36	3,26
ANOS1	anosmin 1	movement of cell or subcellular component	2,51	3,36
KXD1	KxDL motif containing 1	vesicle-mediated transport	2,44	3,19
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich	ossification	2,30	3,38
ALG3	ALG3, alpha-1,3-mannosyltransferase	protein glycosylation	2,34	3,43
FUS	FUS RNA binding protein	mRNA splicing, via spliceosome	2,68	3,07
TUBG1	tubulin, gamma 1	microtubule cytoskeleton organization	2,84	3,24
STAU1	staufen double-stranded RNA binding protein 1	intracellular mRNA localization	2,98	3,69
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	apoptotic process	2,91	3,62

C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1	sterol biosynthetic process	3,03	3,69
EZR	ezrin	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	2,81	3,60
CSDE1	cold shock domain containing E1, RNA-binding	male gonad development	2,89	3,78
FXR1	fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	apoptotic process	2,88	3,64
ILF2	interleukin enhancer binding factor 2	transcription, DNA-templated	2,57	3,17
CDC42	cell division cycle 42	sprouting angiogenesis	2,57	3,30
RAN	RAN, member RAS oncogene family	ribosomal large subunit export from nucleus	3,59	6,21
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like	protein import into nucleus	3,58	5,99
PCNP	PEST proteolytic signal containing nuclear protein	cell cycle	3,64	5,99
F11R	F11 receptor	regulation of cytokine production	3,57	5,62
SUB1	SUB1 homolog, transcriptional regulator	regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	3,36	5,26
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	mRNA splicing, via spliceosome	2,82	5,16
VCP	valosin containing protein	DNA repair	2,83	5,32
RPL18	ribosomal protein L18	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,84	4,91
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	activation of MAPK activity	2,91	5,08
CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	MAPK cascade	2,89	4,81
CHST11	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	chondrocyte development	3,23	6,49
RPL23	ribosomal protein L23	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,28	6,58
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	glyoxylate cycle	3,30	6,55
EIF1	eukaryotic translation initiation factor 1	translational initiation	3,24	6,05
RPL7	ribosomal protein L7	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,19	5,96
CKAP5	cytoskeleton associated protein 5	G2/M transition of mitotic cell cycle	3,35	6,12
RRM1	ribonucleotide reductase M1	mitotic cell cycle	3,14	5,62
PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma	transcription, DNA-templated	6,49	6,98
LRRN1	leucine rich repeat neuronal 1	axonogenesis	6,96	7,62
PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	G2/M transition of mitotic cell cycle	6,05	6,30
RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	in utero embryonic development	5,83	6,30
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	positive regulation of protein phosphorylation	5,65	7,19
ACTN4	actinin, alpha 4	response to hypoxia	5,96	7,42
NUDT4	nudix (nucleoside	cyclic nucleotide metabolic process	5,06	6,79

	diphosphate linked moiety X)-type motif 4			
NUDT4P1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 1	---	5,68	6,45
RNASEK	ribonuclease, RNase K	rRNA transcription	5,61	6,42
OST4	oligosaccharyltransferase complex subunit 4	---	6,03	9,33
RPL6	ribosomal protein L6	ribosomal large subunit assembly	6,38	9,05
RPL12	ribosomal protein L12	ribosomal large subunit assembly	5,94	8,42
TRA2B	transformer 2 beta homolog	response to reactive oxygen species	7,28	10,46
PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	7,35	10,97
EIF4EBP2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	translation	7,32	9,68
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	response to hypoxia	7,99	10,69
CAPRIN1	cell cycle associated protein 1	negative regulation of translation	7,36	11,95
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	MAPK cascade	6,88	11,04
STT3A	STT3A, subunit of the oligosaccharyltransferase complex	protein N-linked glycosylation via asparagine	6,66	11,13
SDC2	syndecan 2	retinoid metabolic process	7,02	11,79
STRAP	serine/threonine kinase receptor associated protein	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	6,91	12,68
CLTC	clathrin, heavy chain (Hc)	osteoblast differentiation	7,24	13,27
ATP6V0C	ATPase, H+ transporting, V0 subunit c	cellular iron ion homeostasis	7,14	13,27
SET	SET nuclear proto-oncogene	mitotic cell cycle	5,48	14,63
RPL11	ribosomal protein L11	ribosomal large subunit assembly	4,88	13,38
HYOU1	hypoxia up-regulated 1	response to ischemia	4,63	11,74
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	telomere maintenance	4,39	14,51
KRT18	keratin 18, type I	cell cycle	4,23	11,86
XRN2	5-3 exoribonuclease 2	DNA catabolic process, exonucleolytic	4,05	12,45
FBL	fibrillarin	snoRNA 3'-end processing	4,02	10,03
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	axon guidance	4,25	10,12
ACTB	actin, beta	retina homeostasis	3,97	8,96
TMED2	transmembrane p24 trafficking protein 2	maternal placenta development	3,49	8,72
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	skeletal system development	3,17	7,51
KDELR2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	protein retention in ER lumen	4,60	8,79

SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein 200kDa	cis assembly of pre-catalytic spliceosome	4,31	8,38
RPS6	ribosomal protein S6	translation	3,60	7,11
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5	platelet degranulation	3,53	6,98
FBL	fibrillarlin	snoRNA 3'-end processing	3,70	7,75
SSR2	signal sequence receptor, beta	translation	3,87	7,19
PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	3,95	7,79
PTTG1IP	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	protein import into nucleus	3,96	7,64
RPS2	ribosomal protein S2	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	6,99	29,00
OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	regulation of cellular amino acid metabolic process	8,56	36,51
SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H member 1	chondrocyte development involved in endochondral bone morphogenesis	6,43	22,46
H2AFY	H2A histone family, member Y	regulation of cell growth	6,27	20,20
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog	movement of cell or subcellular component	5,35	9,95
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay	5,61	10,64
CCDC47	coiled-coil domain containing 47	osteoblast differentiation	6,18	11,00
MCL1	myeloid cell leukemia 1	cell fate determination	5,99	10,22
RCC2	regulator of chromosome condensation 2	mitotic cell cycle	6,26	14,96
HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	mRNA splicing, via spliceosome	5,74	12,81
EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta	translation	5,89	12,60
RPL7A	ribosomal protein L7a	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	5,39	11,66
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2	anion transport	9,67	16,69
SLC16A10	solute carrier family 16 (aromatic amino acid transporter), member 10	ion transport	9,69	15,36
RNF130	ring finger protein 130	apoptotic process	10,45	17,69
CAPZB	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	movement of cell or subcellular component	10,21	19,00
NSMAF	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	ceramide metabolic process	9,30	17,30
DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	protein folding	7,98	14,01
CDV3	CDV3 homolog	cell proliferation	9,06	14,73
BMPRI1A	bone morphogenetic protein receptor, type IA	mesoderm formation	8,71	14,81
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3	protein polyubiquitination	8,58	14,32

	ubiquitin protein ligase			
HSPA9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	protein folding	8,45	13,54
COX7A2L	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	transcription initiation from RNA polymerase II Promotor	8,17	13,23
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	endodermal cell fate specification	7,97	20,75
YBX1	Y box binding protein 1	mRNA splicing, via spliceosome	7,59	17,92
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	response to amphetamine	7,65	15,90
SPINT1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	neural tube closure	7,77	15,09
CCT8	chaperonin containing TCP1, subunit 8	protein folding	8,78	24,68
DDX12P	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12, pseudogene	nucleobase-containing compound metabolic process	9,80	10,09
AZIN1	antizyme inhibitor 1	regulation of cellular amino acid metabolic process	9,50	9,49
TMEM41A	transmembrane protein 41A	---	9,32	9,67
RPUSD3	RNA pseudouridylate synthase domain containing 3	tRNA pseudouridine synthesis	11,18	11,18
PTBP3	polypyrimidine tract binding protein 3	mRNA processing	10,43	10,35
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK cascade	10,71	14,07
ASPH	aspartate beta-hydroxylase	detection of calcium ion	10,52	12,53
ZMYND8	zinc finger, MYND-type containing 8	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	9,43	10,60
RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	intracellular protein transport	8,80	10,33
GTF2I	general transcription factor Iii	regulation of transcription, DNA-templated	9,05	10,73
DCTN5	dynactin 5	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	13,01	16,69
SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2	glycine metabolic process	12,32	16,31
TSPAN18	tetraspanin 18	cell surface receptor signaling pathway	13,52	16,39
RCN2	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	---	12,52	15,18
GLDC	glycine dehydrogenase	glycine catabolic process	11,97	16,66
STIP1	stress-induced phosphoprotein 1	response to stress	11,57	16,63
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	11,67	18,24
RBMX	RNA binding motif protein, X-linked	regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	13,13	20,03
CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	protein folding	13,04	22,03
ANP32A	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	transcription, DNA-templated	12,52	20,40
COL1A2	collagen, type I, alpha 2	skeletal system development	12,11	20,01

PDPN	podoplanin	cell morphogenesis	18,32	20,01
GARS	glycyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation for protein translation	18,92	19,17
HNRNPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	mRNA splicing, via spliceosome	16,99	17,31
ACTR3	ARPC3 actin-related protein 3 homolog .	movement of cell or subcellular component	17,62	16,66
CBX3	chromobox homolog 3	chromatin remodeling	18,50	17,12
NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	cardiac ventricle development	15,61	18,14
HMGB2	high mobility group box 2	positive regulation of endothelial cell proliferation	14,29	15,44
RPS3A	ribosomal protein S3A	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	26,66	43,66
TMEM123	transmembrane protein 123	oncosis	24,08	38,71
RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family	autophagosome assembly	24,03	33,85
TXNDC12	thioredoxin domain containing 12	cell redox homeostasis	18,87	24,70
APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	suckling behavior	18,27	26,68
CDC20	cell division cycle 20	mitotic cell cycle	20,44	29,65
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	protein folding	16,71	26,86
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	receptor-mediated endocytosis	17,61	29,50
TUBB4B	tubulin, beta 4B class IVb	G2/M transition of mitotic cell cycle	19,26	43,67
SP1	Sp1 transcription factor	ossification	13,64	26,59
GLUL	glutamate-ammonia ligase	neurotransmitter uptake	11,29	26,82
LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2	metabolic process	11,07	26,43
ATXN2	ataxin 2	negative regulation of receptor internalization	125,97	63,32
NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	transcription from RNA polymerase II Promotor	49,61	59,09
PPIL2	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2	protein polyubiquitination	55,57	84,21
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	response to stress	36,40	38,78
EGR1	early growth response 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	49,48	38,71
HNRNPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	mRNA splicing, via spliceosome	57,80	38,02
CCT6A	chaperonin containing TCP1, subunit 6A	protein folding	14,98	13,28
CACYBP	calcyclin binding protein	aging	16,50	13,85
TDGF1	teratocarcinoma-derived growth factor 1	activation of MAPK activity	18,47	13,38
NOP56	NOP56 ribonucleoprotein	rRNA modification	20,51	14,77
ZNF254	zinc finger protein 254	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	20,08	14,91
ANLN	anillin actin binding protein	mitotic cytokinesis	18,73	12,23
TULP3	tubby like protein 3	neural tube closure	21,17	12,94

WBP11	WW domain binding protein 11	rRNA processing	20,85	12,66
WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	transcription, DNA-templated	22,02	13,76
UBE2V1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	protein polyubiquitination	24,20	14,55
L1TD1	LINE-1 type transposase domain containing 1	---	23,86	14,58
CSTF3	cleavage stimulation factor, 3 pre-RNA, subunit 3	mRNA splicing, via spliceosome	22,89	14,46
CDR1	cerebellar degeneration-related protein 1	---	29,33	20,18
SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	29,03	18,61
NFIB	nuclear factor I/B	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	23,97	16,69
RPL5	ribosomal protein L5	ribosomal large subunit assembly	23,26	19,23
EIF3A	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A	formation of translation preinitiation complex	23,42	18,40
SF3B4	Homo sapiens splicing factor 3b, subunit 4	RNA splicing, via transesterification reactions	25,49	21,72
SLC25A16	solute carrier family 25, member 16	vitamin metabolic process	31,37	22,57
RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain containing 5 A.	protein targeting to Golgi	37,02	18,91
PIAS1	protein inhibitor of activated STAT 1	JAK-STAT cascade	28,45	15,16
RPL37	ribosomal protein L37	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	9,42	7,89
MATR3	matrin 3	posttranscriptional regulation of gene expression	8,21	6,98
MYH10	myosin, heavy chain 10	mitotic cytokinesis	8,84	8,22
CBWD2	COBW domain containing 2	---	13,14	7,17
BRE	brain and reproductive organ-expressed	double-strand break repair via homologous recombination	10,98	6,72
UHRF2	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2, E3 ubiquitin protein ligase	ubiquitin-dependent protein catabolic process	11,61	6,98
MTCH2	mitochondrial carrier 2	protein localization to mitochondrion	9,01	5,83
BRD4	bromodomain containing 4	inner cell mass cell proliferation	9,68	5,78
ATXN2L	ataxin 2-like	regulation of cytoplasmic mRNA processing body assembly	8,63	6,45
TOP3B	topoisomerase (DNA) III beta	DNA topological change	9,15	6,64
MED15	mediator complex subunit 15	stem cell population maintenance	9,74	6,61
ZNF43	zinc finger protein 43	transcription, DNA-templated	9,91	6,41
PHC1	polyhomeotic homolog 1	multicellular organismal development	15,36	8,96
LCE1E	late cornified envelope 1E	peptide cross-linking	15,64	9,16
CBWD5	COBW domain containing 5	---	16,47	9,86
RAB7A	RAB7A, member RAS oncogene family	protein targeting to lysosome	19,33	10,54
IDH3G	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma	carbohydrate metabolic process	17,61	9,51

CBWD3	COBW domain containing 3	---	19,26	9,70
TET1	tet methylcytosine dioxygenase 1	inner cell mass cell differentiation	15,40	10,86
HNRNPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	transcription, DNA-templated	16,54	11,31
DEK	DEK proto-oncogene	regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	16,58	11,09
HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	mRNA splicing, via spliceosome	11,42	8,38
IPO9	importin 9	protein import into nucleus	11,39	8,75
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	mitotic sister chromatid segregation	11,11	8,48
PKP2	plakophilin 2	desmosome assembly	13,57	9,09
KIF23	kinesin family member 23	mitotic spindle elongation	13,36	9,11
SCD	stearoyl-CoA desaturase	unsaturated fatty acid biosynthetic process	13,57	10,61
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	mitotic cell cycle	11,78	9,20
KLF7	Kruppel-like factor 7	transcription, DNA-templated	19,32	8,25
SMAD5	SMAD family member 5	ureteric bud development	22,00	10,20
GON4L	gon-4-like	regulation of transcription, DNA-templated	26,98	12,54
PHC3	polyhomeotic homolog 3	multicellular organismal development	26,37	11,43
NPIP8	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B8	---	66,34	13,14
NPIP6	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B6	---	57,68	13,05
NPIP4	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B4	---	44,00	9,57
NPIP4	NPIP-like protein LOC613037	---	41,76	9,64
NPIP3	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B3	---	37,71	8,70
NPIP9	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B9	---	57,13	9,26
LUC7L3	LUC7-like 3 pre-mRNA splicing factor	mRNA splice site selection	54,37	14,42
PNN	pinin, desmosome associated protein	mRNA splicing, via spliceosome	38,05	14,60
NPIP5	Homo sapiens nuclear pore complex interacting protein family, member B5	---	103,92	25,91
CCNK	cyclin K	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	77,01	20,57
TMEM109	transmembrane protein 109	ion transport	0,29	1,53
HIST2H2AC	histone cluster 2, H2ac	chromatin organization	0,30	0,87
RPL39	ribosomal protein L39	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	0,19	0,61

ZNF775	zinc finger protein 775	transcription, DNA-templated	0,25	0,08
KBTBD4	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4	---	0,53	0,15
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	angiogenesis	1,08	10,44
CD81	CD81 molecule	activation of MAPK activity	1,45	8,60
MRPL51	mitochondrial ribosomal protein L51	translation	1,23	5,41
COX6A1	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	generation of precursor metabolites and energy	1,33	6,45
RPLP2	ribosomal protein, large, P2	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	0,95	5,56
PSMD3	proteasome 26S subunit, non-ATPase 3	G1/S transition of mitotic cell cycle	1,02	4,57
CAPNS1	calpain, small subunit 1	proteolysis	0,96	3,22
SLC25A5	solute carrier family 25 member 5	energy reserve metabolic process	0,68	3,23
PSMC5	proteasome 26S subunit, ATPase 5	G1/S transition of mitotic cell cycle	0,53	4,52
NME1	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1	purine nucleotide metabolic process	0,73	4,70
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	protein folding	4,44	20,16
MLEC	malectin	protein folding	3,99	15,50
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	regulation of cell growth	2,92	14,44
RPL13	ribosomal protein L13	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,12	14,68
ATP6AP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	angiotensin maturation	2,39	8,34
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	platelet degranulation	2,08	7,23
RPN1	ribophorin I	translation	2,03	7,05
NOMO3	NODAL modulator 3	protein destabilization	2,07	7,49
ALYREF	Aly/REF export factor	mRNA 3'-end processing	2,21	8,44
H3F3B	H3 histone, family 3B	chromatin silencing at rDNA	2,10	8,22
PPP5C	protein phosphatase 5, catalytic subunit	MAPK cascade	1,99	7,81
TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma	stem cell population maintenance	1,48	3,85
RPL23A	ribosomal protein L23a	ribosomal large subunit assembly	1,31	3,56
GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	energy reserve metabolic process	1,35	3,98
UNC119	unc-119 lipid binding chaperone	endocytosis	1,55	5,19
PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme	glycogen metabolic process	1,53	4,72
PSAP	prosaposin	platelet degranulation	1,47	4,54
RCC2	regulator of chromosome condensation 2	mitotic cell cycle	1,75	5,17
LMAN2	lectin, mannose-binding 2	retrograde vesicle-mediated	1,80	5,08

		transport, Golgi to ER		
VIM	vimentin	apoptotic process	1,69	5,92
EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay	1,83	6,16
H2AFZ	H2A histone family, member Z	chromatin organization	1,84	6,19
EIF3K	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K	formation of translation preinitiation complex	2,36	6,90
NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,93	8,45
RTN3	reticulon 3	apoptotic process	3,26	9,01
CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	transcription, DNA-templated	1,60	3,58
PLK1	polo-like kinase 1	mitotic sister chromatid segregation	1,51	3,28
KRT8	keratin 8, type II	viral process	1,47	3,16
RPS27A	ribosomal protein S27a	G1/S transition of mitotic cell cycle	1,43	3,16
SLC2A14	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14	multicellular organismal development	1,76	3,75
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	carbohydrate metabolic process	1,72	3,31
ENO1	enolase 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	1,54	3,12
MARS	methionyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation for protein translation	1,56	3,07
RPL8	ribosomal protein L8	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	1,99	4,31
USP39	ubiquitin specific peptidase 39	spliceosomal complex assembly	1,93	4,43
RPL9	ribosomal protein L9 .	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,13	4,88
SOSTDC1	sclerostin domain containing 1	pattern specification process	2,24	5,10
NOMO1	NODAL modulator 1	biological_process	2,16	5,52
HIST1H2AG	histone cluster 1, H2ag	chromatin organization	2,24	5,69
LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing	endosomal transport	2,02	5,16
SLC3A2	solute carrier family 3, member 2	carbohydrate metabolic process	1,72	3,31
FADS2	fatty acid desaturase 2	unsaturated fatty acid biosynthetic process	2,32	3,99
RPL24	ribosomal protein L24	ribosomal large subunit assembly	2,34	4,61
RHOA	ras homolog family member A	response to hypoxia	2,26	4,87
RPS8	ribosomal protein S8	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2,41	5,04
LAMC1	laminin, gamma 1	protein complex assembly	2,52	4,97
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	peptidyl-tyrosine dephosphorylation	2,55	5,22
RPL15	ribosomal protein L15	nuclear-transcribed mRNA catabolic	2,01	3,33

		process, nonsense-mediated decay		
PIM2	Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase	G1/S transition of mitotic cell cycle	1,90	3,16
PDIA6	protein disulfide isomerase family A, member 6	protein folding	7,35	10,97
LAP3	Leucine Aminopeptidase 3	proteolysis	1,78	3,01
EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	hematopoietic progenitor cell differentiation	2,15	4,11
HNRNPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	2,06	4,02
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj	chromatin organization	2,13	3,84
TMEM97	transmembrane protein 97	regulation of cell growth	2,13	3,76
IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	gene expression	1,94	3,46
UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3	protein polyubiquitination	1,99	3,81
JAZF1	JAZF zinc finger 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	1,97	3,66
DMTF1	cyclin D binding myb-like transcription factor 1	transcription, DNA-templated	15,37	5,22
NPIP15	nuclear pore complex interacting protein family, member B15	---	17,94	4,00
FNDC3B	fibronectin type III domain containing 3B	---	5,00	2,38
UBAP2L	ubiquitin associated protein 2-like	binding of sperm to zona pellucida	5,03	2,55
ND2	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2	oxidation-reduction process	3,83	1,77
DNM2	dynamain 2	G2/M transition of mitotic cell cycle	3,22	1,77
GYLTL1B	glycosyltransferase-like 1B	protein O-linked mannosylation	3,76	2,60
RCC2	regulator of chromosome condensation 2	mitotic cell cycle	3,50	2,60
ERVH48-1	endogenous retrovirus group 48, member 1	syncytium formation	3,76	2,79
DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17	transcription, DNA-templated	3,75	2,84
ZNF217	zinc finger protein 217	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	3,26	2,72
SRSF10	serine/arginine-rich splicing factor 10	spliceosomal tri-snRNP complex assembly	3,33	2,68
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta, member 1	response to hypoxia	3,39	2,71
CHORDC1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1	regulation of centrosome duplication	3,41	2,74
WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	transcription, DNA-templated	4,81	3,06
HAT1	histone acetyltransferase 1	DNA packaging	4,46	3,00
THBS3	thrombospondin 3	growth plate cartilage development	4,37	2,60
PPHLN1	periphilin 1	transcription, DNA-templated	4,30	2,55
WNT9B	wingless-type MMTV integration site family, member 9B	branching involved in ureteric bud morphogenesis	3,63	2,36
PI4KA	phosphatidylinositol 4-	phospholipid metabolic process	3,25	2,15

	kinase			
TMEM179B	transmembrane protein 179B	---	6,06	3,37
MKI67	marker of proliferation Ki-67	cell proliferation	5,63	3,40
ELK4	ELK4, ETS-domain protein	negative regulation of transcription from RNA polymerase II Promotor	5,42	2,91
PHC1	polyhomeotic homolog 1	---	5,99	3,21
ZNF626	zinc finger protein 626	transcription, DNA-templated	6,40	3,27
ZNF160	zinc finger protein 160	transcription, DNA-templated	7,49	3,82
ENAH	enabled homolog	neural tube closure	7,17	3,64
MRPS21	mitochondrial ribosomal protein S21	translation	7,67	4,15
MEI1	meiotic double-stranded break formation protein 1	male meiosis I	7,95	4,08
CBWD1	COBW domain containing 1	---	8,23	4,28
SRSF5	serine/arginine-rich splicing factor 5	mRNA spliceosome	9,39	4,70
CAPRIN2	caprin family member 2	negative regulation of translation	8,88	4,30
NPIPA7	novel member of the nuclear pore complex interacting protein-like NPIPL gene family	---	9,45	3,54
MCM8	minichromosome maintenance 8 homologous recombination repair factor	G1/S transition of mitotic cell cycle	7,97	3,59
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	branching involved in ureteric bud morphogenesis	8,59	3,59
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1	RNA splicing, via transesterification reactions	6,73	2,71
PRRC2C	proline-rich coiled-coil 2C	hematopoietic progenitor cell differentiation	7,79	3,26
FNBP4	formin binding protein 4	---	6,84	2,96
ND3	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3	oxidation-reduction process	3,03	1,21
ND6	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6	oxidation-reduction process	3,85	1,30
NPIPA8	novel member of the nuclear pore complex interacting protein-like NPIPL gene family	---	7,12	1,28
NPIP11	nuclear pore complex interacting protein family, member B11	---	8,04	1,59
CENPE	centromere protein E	mitotic cell cycle	9,87	1,89

Tabelle 3: Übersicht über die differentiell exprimierte Gene nach *knockdown* der Gene *PIWIL1* bzw. *PIWIL2* in der TCam-2-Zelllinie

Dargestellt sind die Daten der Mikroarray-Analyse mit Gensymbol, Genbeschreibung und biologischer Funktion. Ein Gen gilt als differentiell exprimiert wenn eine mindestens 3fache Veränderung der Genexpression zwischen *knockdown* und Kontrolle vorliegt. PL1-KD=*knockdown PIWIL1*, PL2-KD=*knockdown PIWIL2*. n=1.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maria Giebler
geboren: 20.10.1985 in Gardelegen
Familienstand: ledig

Ausbildung und Tätigkeit

seit 11.2017 technische Assistentin
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

09.2011 – 12.2016 wissenschaftliche Mitarbeiterin
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10.2005 – 04.2011 Diplom-Biochemikerin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08.1992 – 07.2005 Allgemeine Hochschulreife - Geschwister-Scholl-Gymnasium, Gardelegen

Publikationen

1. Güttler, A.; **Giebler, M.**; Cuno, P.; Wichmann, H.; Keßler, J.; Ostheimer, C.; Söling, A.; Strauss, C.; Illert, J.; Kappler, M.; Vordermark, D.; Bache, M. (2013) Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: Radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiother Oncol.* 108, 535-540.
2. **Giebler, M.**; Staeger, MS.; Blauschmidt, S.; Ohm, LI.; Kraus, M.; Würfl, P.; Taubert H.; Greither T. (2018) Elevated HERV-K Expression in Soft Tissue Sarcoma Is Associated with Worsened Relapse-Free Survival. *Front Microbiol.* 9, 211.
3. **Giebler, M.**; Greither, T.; Müller, L.; Möisinger C.; Behre HM. (2018) Altered *PIWI-LIKE 1* and *PIWI-LIKE 2* mRNA expression in ejaculated spermatozoa of men with impaired sperm characteristics. *Asian J Androl.* 20, 260-264.

Eidesstattliche Erklärung

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

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Maria Giebler

Halle (Saale), 27.11.2017

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre. Ihm möchte ich recht herzlich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seiner Einrichtung durchführen zu können. Desweiteren möchte ich mich für seine Hilfe und Unterstützung während meiner gesamten Arbeit und die Möglichkeit der Kongressteilnahme bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Stephan König für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertationsschrift. Ich bedanke mich weiterhin außerordentlich für die vielen Anmerkungen, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Thomas Greither, als Leiter des Forschungslabors des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie. Es war mir eine riesige Freude mit ihm zu arbeiten und ich schätze seine gute Betreuung und sein stetig offenes Ohr für den wissenschaftlichen Austausch. Er hatte eine Zuversicht, die mir manchmal fehlte, aber mir auch Hoffnung gab, diese Arbeit gut zu beenden.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des FG05 E01 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Unterstützung im Laboralltag bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Maffes, Sindy und Carina. Danke für den Spaß und die anregenden Gespräche mit euch!

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) für die freundliche Zusammenarbeit. Für die große Unterstützung beim Sammeln der Ejakulatproben und der Auswertung der Spermioogramme danke ich insbesondere Frau Constanze Kloss.

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

Frau Dr.rer.nat. Darmer und Herrn Dr. rer. nat. Christov möchte ich für die Hilfsbereitschaft bei den DNA-Sequenzierungen danken. Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Christov zusätzlich herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Mikroarray-Analysen.

Bei Dr.rer.nat. Alex Navarette-Santos möchte ich mich überaus für die FACS-Analysen bedanken.

Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Staeger danke ich für die umfassende Hilfe bei den bioinformatischen Auswertungen und dass er sich die Zeit nahm, mir alles bis ins Detail zu erklären.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Helge Taubert möchte ich herzlich für die Übernahme des Drittgutachtens danken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ohne ihr Zuhören, die aufbauenden Gespräche und dem Ausräumen der Zweifel wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders Katrin danke ich für ihre fortwährende Motivation, wenn mir manchmal zum Heulen zu Mute war.